

## ラットを用いたナノクレイの毒性評価に関する研究

研究代表者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究分担者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター長

### 研究要旨

本研究では、ナノクレイの毒性影響についてラット 13 週間反復投与試験を実施し NOAEL の設定をおこなうことを目的としている。まず、23 年度に動物試験を終了した、粒子サイズの異なるモンモリロナイトを主成分とする天然ナノクレイであるベンゲルフレークおよびベンゲルクリアについて、病理組織学的検査を実施し、最終評価を行った。飼料中濃度 0.04%、0.2%、1.0%及び 5.0%のベンゲルフレークおよびベンゲルクリアを F344 雌雄ラットに 13 週間反復投与した結果、いずれも投与に関連した毒性影響は認められず、本試験条件下における無毒性量（NOAEL）は雌雄ともに 5.0%（ベンゲルフレークの雄：4.01 g/kg/day、雌：3.97 g/kg/day、ベンゲルクリアの雄：3.91 g/kg/day、雌：3.96 g/kg/day）と判断した。また、より安定的・均一な物性を示す精製物と考えられる 2 種の合成および精製ナノクレイである、スメクトンおよびクニピアについてもラット 13 週間反復投与試験を実施している。現時点では、経過中一般状態には著変はみられていないが、体重増加について、雄ではいずれの群にも群間に差異は見られないが、雌では 7 週時点において、スメクトンは 0.2% 以上、クニピアは 1% 以上投与群において有意（ $p < 0.01$ ）な高値を示している。摂餌量の増加は雌雄とも 5%以下であり、体重あたりのカロリー摂取はほぼ同等であったにもかかわらず、体重増加の亢進を誘導していたことになり、飼料の吸収効率などに影響している可能性が示唆される。今後、投与を継続し、全身諸臓器の毒性影響について検討を行うことにより、安全で有効な使用を進める上で重要なデータが得られると考える。

### A. 研究目的

ナノマテリアルの食品や食品容器包装への応用としては、シリカ、銀+無機微粒子、ナノクレイ、白金ナノコロイドなどが現在使用されている。そのうち、ナノクレイは国内で年間 250 トン使用されていると報告されており、銀+無機微粒子の年間 50 トンよりも使用量も多いがその毒性影響についての情報は限られている。本研究では、ナノクレイの毒性影響についてラット 13 週間反復投与試験を実施し NOAEL の設定をおこなうこと

を目的としている。

### B. 研究方法

#### 1) 天然ナノクレイの毒性試験

23 年度に、粒子サイズの異なるモンモリロナイトを主成分とするベンゲルフレークおよびベンゲルクリアについて、飛散を最小限に抑えるため、0.04、0.2、1、5%の用量で基礎飼料と混合しペレット状にした固形飼料を、F344 雌雄ラット各群 10 匹に 13 週間投与した。24 年度は、採取した検

体を用いて、血液学的検査については、多項目自動血球計数装置 (K-4500 ; Sysmex、兵庫) を用いて、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) および血小板数 (PLT) を測定した。血清の血液生化学検査として、総蛋白質 (TP)、アルブミン (Alb)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Chol)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、および $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ GTP) を測定するとともに、臓器重量測定を実施した脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、精巣および卵巣に加え、鼻腔、眼球およびハーダー腺、三叉神経、下垂体、脊髄、甲状腺および上皮小体、気管、胸部大動脈、唾液腺、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、膵臓、精巣上体、前立腺、精嚢、尿道球腺、子宮、膣、膀胱、大腿筋、坐骨神経、皮膚、乳腺、骨および骨髄 (胸骨、大腿骨) を細切し、常法に従ってパラフィンに包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し対照群と高用量群について病理組織学的検査を行った。

## 2) 合成ナノクレイの毒性試験

今後使用の拡大が見込まれるナノクレイとして、より安定的・均一な物性を示す精製物と考えられる2種の合成および精製ナノクレイについてもラット13週間反復投与試験を実施している。

「クニピア」は、天然ベントナイト (モンモリロナイト含有率 60~70%) を粉砕した後、石英、長石、 $\alpha$ -クリストバライト等の不純物を除去して、モンモリロナイト含有率 100%に精製製造したナノクレイである。「スメクトン」は、合成無機質高分子であり、純粋化学原料の Mg, Al, Si 等の無機化合物より合成された純白色コロイド性

含水ケイ酸塩である。厚さ約 1 nm、幅 (又は長さ) が約 50 nm の板状結晶とされており、ナノクレイとして扱われている。この「スメクトン」は天然粘土原料由来ではないため、ガラス質、着色金属酸化物、腐植質などの土壤中夾雑物の混入がなく、「クニピア」の現用途 (例えば、包装容器材、燃料電池バックシート、断熱材・不燃材) 以外にも利用できるとされている。

スメクトンまたはクニピアを 0.2、1、5%の用量で基礎飼料と混合しペレット状にした固形飼料を、F344 雌雄ラット各群 10 匹に投与する。投与期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を週 1 回測定する。経過中、各群 5 匹について、Single Slide Professional Kit (Cenogenics Corporation, NJ, USA) を用いて、便潜血を検討する。動物は、投与期間終了後に、深麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血を行い、血液学的検査、血液生化学検査、主要臓器重量および全身諸臓器の病理組織学的検索を行う。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は、国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取り扱い規定に基づき動物の苦痛も最小限とするように配慮して行う。

## C. 研究結果

### 1) 天然ナノクレイの毒性試験

ベンゲルフレークおよびベンゲルクリアの 13 週間投与試験では、一般状態、体重 (Fig. 1) 増加に著変はなく、摂餌量 (Table 1) は雌雄の 5% 投与群において、2 剤とも対照群に比べて増加傾向が見られたが有意差は認めなかった。また、臓器重量 (Table 2-3) には投与に関連した変化は見られなかった。血液学的検査では、雄の 1%以上のベンゲルフレーク群で MCH、MCHC および PLT の増加と、5%ベンゲルクリア群と 5%ベンゲルフレーク群で WBC の有意な増加が認められたが、いずれも用量相関はなく、偶発的な変化と考えられた (Table 4-5)。血液生化学検査では、雄の 5%

ベンゲルクリア群で TG の有意な減少が認められたが、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた (Table 6-7)。病理組織学的検査では背景病変以外に明らかな変化は認められなかった (Table 8)。以上の結果より、飼料中濃度 0.04%、0.2%、1.0% 及び 5.0% のモンモリロナイトを F344 雌雄ラットに 13 週間反復投与した結果、本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに 5.0% (ベンゲルフレークの雄 : 4.01 g/kg/day、雌 : 3.97 g/kg/day、ベンゲルクリアの雄 : 3.91 g/kg/day、雌 : 3.96 g/kg/day) と判断した。

## 2) 合成ナノクレイの毒性試験

スメクトンおよびクニピアの 13 週間投与試験は、現在 8 週経過中であり、一般状態には著変はみられていない。体重増加については、雄ではいずれの群にも群間に差異は見られないが、雌ではスメクトン投与群は第 2 週から、クニピア投与群は第 4 週から対照群に比べて高値を示し、7 週時点ではスメクトンは 0.2% 以上、クニピアは 1% 以上投与群において有意 ( $p < 0.01$ ) に高値であった (Fig. 2)。8 週時点での摂餌量については、スメクトンおよびクニピアにおいて、雌雄とも 5% 群で増加傾向を示した (Table 9)。また、7 週時点において雌雄の便潜血を検討したところ、いずれの群においても陰性であった。

## D. 考察

食品添加物規格の天然ナノクレイであるベンゲルクリアおよびベンゲルフレークについては、いずれのパラメータにおいても投与に関連した変化は見られず、毒性はないと考えられた。一方、合成・精製ナノクレイであるスメクトンとクニピアについては、雄では著変は見られていないが、雌の 0.2% 以上のスメクトンまたは、1% 以上のクニピア投与群では有意な体重増加を示した。被験物質混合飼料では飼料の栄養価は低いと考えられるが、摂餌量の増加は雌雄とも 5% 以下であり、体重あたりのカロリー摂取はほぼ同等であったにもかかわらず、体重増加の亢進を誘導していた

ことになり、飼料の吸収効率などに影響している可能性が示唆される。

今後、投与を継続し、糞中のモンモリロナイト量の解析と共に、全身諸臓器の毒性影響について検討を行うことにより、安全で有効な使用を進める上で重要なデータが得られると考える。

## E. 結論

ベンゲルフレークおよびベンゲルクリアについては、食品添加物の毒性試験として最高用量である 5% を投与したラットを用いた 13 週間投与試験において毒性所見を示さず、また、組織へのアルミニウムの蓄積も確認されなかった事から、血液脳関門や胎盤の通過性を検討する必要はないと判断された。本試験条件下における無毒性量 (NOAEL) は雌雄ともに 5.0% (ベンゲルフレークの雄 : 4.01 g/kg/day、雌 : 3.97 g/kg/day、ベンゲルクリアの雄 : 3.91 g/kg/day、雌 : 3.96 g/kg/day) と判断した。

スメクトンとクニピアについては、上記の 2 剤とは異なる影響を示す可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

鈴木 勇, 大波冴子, 曹 永晩, 豊田武士, 赤木純一, 水田保子, 西川秋佳, 小川久美子. モンモリロナイトを主成分とするナノクレイのラットに対する 13 週間混餌投与の影響. 第 29 回日本毒性病理学会総会および学術集会; つくば, 2013

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし

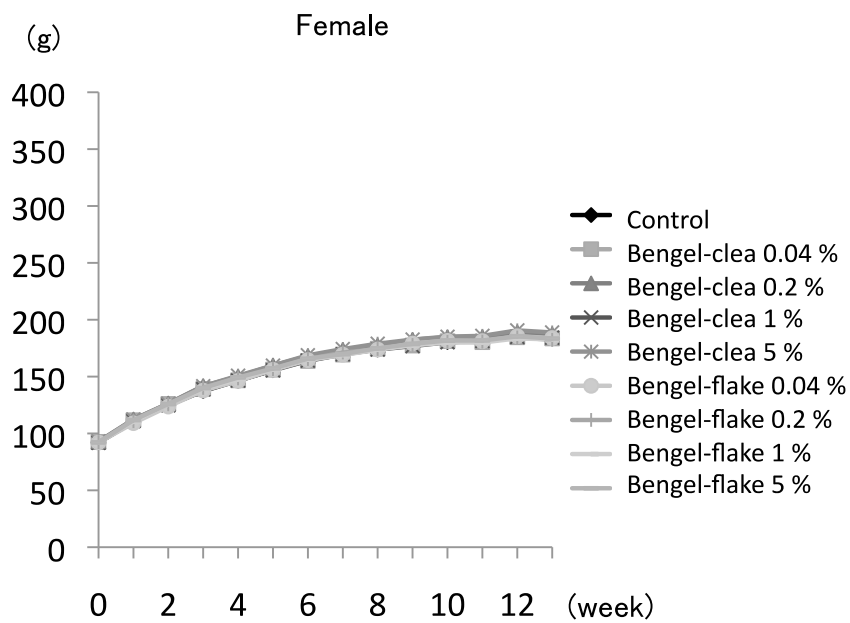
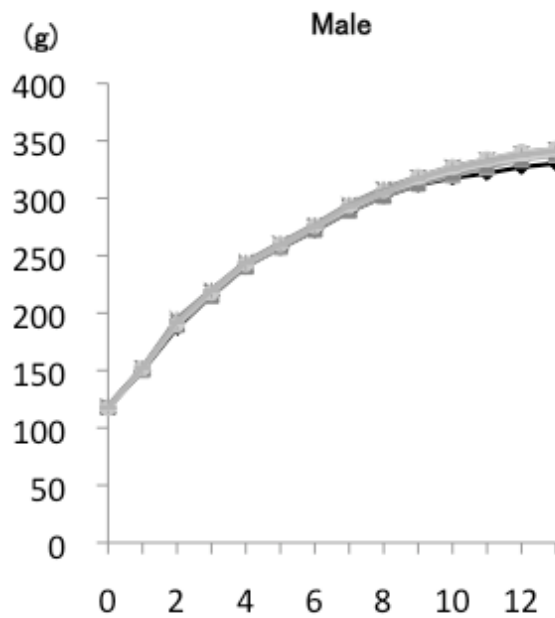


Fig. 1 Body weight curves of F344 rats fed diet containing Bengal-clea or Bengal-flake for 13 weeks

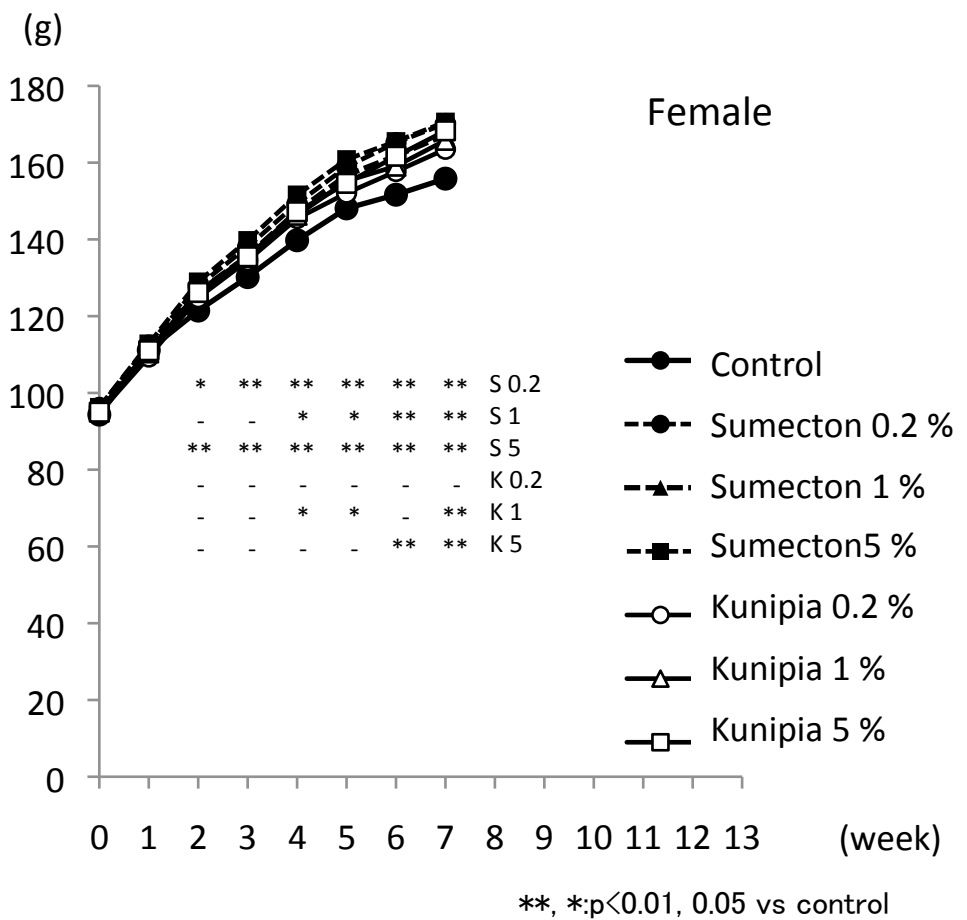
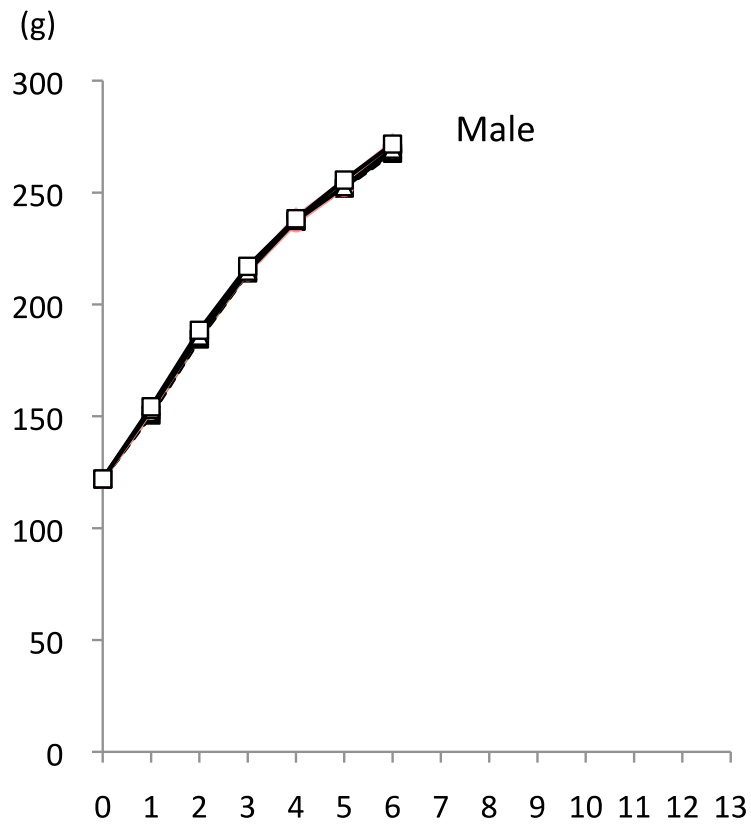


Fig. 2 Body weight curves of F344 rats fed diet containing sumecton or knipia for 8 weeks

Table 1. Food consumption and material intake of F344 rats fed diet containing Bengel-clea or Bengel-flake for 13 weeks

Sex	Dose (%)	No. of animals examined	Food consumption			Intake of Clea or Flake	
			(g/rat/day)	(g/kg BW/day)	Daily (g/kg BW/day)	Total (g/kg BW)	
male							
control	0	10	14.8 ± 0.8	64.0 ± 23.8	0	0	
Clea	0.04	10	14.5 ± 0.7	61.9 ± 21.5	0.02	2	
	0.2	10	14.8 ± 0.8	64.6 ± 21.9	0.13	12	
	1	10	15.1 ± 0.8	65.2 ± 22.6	0.65	59	
	5	10	16.0 ± 0.7	67.0 ± 23.7	3.35	301	
	0.04	10	14.8 ± 0.8	62.5 ± 22.0	0.03	2	
Flake	0.2	10	14.8 ± 0.8	62.2 ± 21.3	0.12	11	
	1	10	15.1 ± 0.8	64.1 ± 22.5	0.64	58	
	5	10	15.8 ± 0.9	66.7 ± 23.3	3.34	300	
	0.04	10	14.8 ± 0.8	62.5 ± 22.0	0.03	2	
female							
control	0	10	9.9 ± 0.5	67.3 ± 17.9	0	0	
Clea	0.04	10	9.7 ± 0.6	66.9 ± 17.9	0.03	2	
	0.2	10	9.9 ± 0.6	67.6 ± 18.5	0.14	12	
	1	10	9.7 ± 0.6	67.3 ± 18.2	0.67	61	
	5	10	10.6 ± 0.5	70.7 ± 19.1	3.53	318	
	0.04	10	9.5 ± 0.7	64.8 ± 17.4	0.03	2	
Flake	0.2	10	9.4 ± 0.8	64.0 ± 17.8	0.13	12	
	1	10	9.7 ± 0.7	66.4 ± 18.2	0.66	60	
	5	10	10.2 ± 0.8	69.2 ± 19.4	3.46	311	
	0.04	10	9.5 ± 0.7	64.8 ± 17.4	0.03	2	

Table 2. Organ weight of F344 rats fed diet containing Bengel-clea or Bengel-flake for 13 weeks : male

Treatment	Control	Bengel-clea				Bengel-flake			
		0.04 %	0.2 %	1 %	5 %	0.04 %	0.2 %	1 %	5 %
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	319 ± 18.8	326 ± 20.8	329 ± 12.2	333 ± 11.6	333 ± 10.1	333 ± 15.3	332 ± 11.7	329 ± 11.5	329 ± 10.4
Absolute									
Brain (g)	2.00 ± 0.04	1.99 ± 0.06	1.98 ± 0.05	1.98 ± 0.03	2.01 ± 0.05	1.99 ± 0.03	2.00 ± 0.04	2.00 ± 0.03	1.97 ± 0.07
Thymus (g)	0.21 ± 0.05	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.01
Lungs (g)	0.96 ± 0.11	0.94 ± 0.14	0.95 ± 0.09	0.99 ± 0.09	1.02 ± 0.07	0.93 ± 0.07	0.97 ± 0.10	0.97 ± 0.10	1.04 ± 0.10
Heart (g)	0.93 ± 0.07	0.94 ± 0.08	0.95 ± 0.03	0.95 ± 0.06	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.03	0.95 ± 0.05	0.96 ± 0.04	0.96 ± 0.06
Spleen (g)	0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.62 ± 0.04	0.65 ± 0.08 *	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.64 ± 0.02
Liver (g)	7.71 ± 0.47	7.80 ± 0.41	7.86 ± 0.39	7.96 ± 0.44	7.90 ± 0.32	8.07 ± 0.50	7.96 ± 0.36	7.88 ± 0.43	8.09 ± 0.31
Adrenals (g)	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Kidneys (g)	1.90 ± 0.13	1.90 ± 0.11	1.91 ± 0.05	1.93 ± 0.09	2.02 ± 0.15	1.95 ± 0.10	1.98 ± 0.08	2.02 ± 0.10 *	1.98 ± 0.06
Gnads (g)	3.12 ± 0.14	3.03 ± 0.16	3.09 ± 0.12	3.11 ± 0.14	3.15 ± 0.09	3.07 ± 0.12	3.08 ± 0.08	3.12 ± 0.12	3.07 ± 0.10
Relative									
Brain (g%)	0.63 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.60 ± 0.02
Thymus (g%)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00
Lungs (g%)	0.30 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.04
Heart (g%)	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02
Spleen (g%)	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Liver (g%)	2.42 ± 0.08	2.39 ± 0.05	2.39 ± 0.07	2.39 ± 0.08	2.37 ± 0.04	2.42 ± 0.07	2.40 ± 0.06	2.40 ± 0.11	2.46 ± 0.04
Adrenals (g%)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Kidneys (g%)	0.60 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.61 ± 0.04	0.59 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.60 ± 0.03
Gnads (g%)	0.98 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.94 ± 0.06	0.93 ± 0.03	0.95 ± 0.04	0.92 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.95 ± 0.05	0.93 ± 0.04

Each value represents the mean ± SD.

\*, \*\*: Significantly different from control v.s. administered group at p < 0.05 and p < 0.01, respectively

Table 3. Organ weight of F344 rats fed diet containing Bengel-clea or Bengel-flake for 13 weeks : female

Treatment	Control	Bengel-clea				Bengel-flake			
		0.04 %	0.2 %	1 %	5 %	0.04 %	0.2 %	1 %	5 %
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	178.1 ± 4.0	176.9 ± 5.1	180.6 ± 7.3	177.4 ± 10.5	181.5 ± 5.3	177.7 ± 4.7	177.1 ± 5.5	176.8 ± 8.1	177.2 ± 7.2
Absolute									
Brain (g)	1.81 ± 0.03	1.81 ± 0.04	1.81 ± 0.05	1.78 ± 0.05	1.80 ± 0.04	1.81 ± 0.05	1.81 ± 0.04	1.82 ± 0.04	1.78 ± 0.08
Thymus (g)	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Lungs (g)	0.69 ± 0.05	0.66 ± 0.06	0.69 ± 0.07	0.68 ± 0.10	0.71 ± 0.07	0.66 ± 0.04	0.71 ± 0.07	0.68 ± 0.05	0.67 ± 0.08
Heart (g)	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.59 ± 0.03	0.58 ± 0.04	0.60 ± 0.04	0.58 ± 0.04	0.58 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.58 ± 0.03
Spleen (g)	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.02
Liver (g)	3.96 ± 0.21	3.86 ± 0.18	4.00 ± 0.16	3.97 ± 0.23	4.04 ± 0.23	3.93 ± 0.20	3.91 ± 0.08	3.94 ± 0.26	3.94 ± 0.20
Adrenals (g)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Kidneys (g)	1.16 ± 0.06	1.15 ± 0.05	1.15 ± 0.04	1.15 ± 0.08	1.14 ± 0.05	1.11 ± 0.07	1.13 ± 0.06	1.13 ± 0.07	1.13 ± 0.07
Gnads (g)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00
Relative									
Brain (g%)	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.03	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.04	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.02	1.03 ± 0.03	1.01 ± 0.05
Thymus (g%)	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Lungs (g%)	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.04
Heart (g%)	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Spleen (g%)	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Liver (g%)	2.22 ± 0.10	2.18 ± 0.11	2.22 ± 0.08	2.24 ± 0.08	2.23 ± 0.14	2.21 ± 0.06	2.21 ± 0.08	2.22 ± 0.08	2.22 ± 0.08
Adrenals (g%)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Kidneys (g%)	0.65 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.65 ± 0.02	0.63 ± 0.04	0.62 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.02	0.64 ± 0.03
Gnads (g%)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00

Each value represents the mean ± SD.

\*, \*\*: Significantly different from control v.s. administered group at p < 0.05 and p < 0.01, respectively

Table 4. Hematology date of male F344 rats fed diet containing Bengel-clea or Bengel-flake for 13 weeks

Treatment	Control	Bengel-clea				Bengel-flake			
		0.04%	0.20%	1%	5%	0.04%	0.20%	1%	5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10
WBC (x10 <sup>2</sup> /μl)	41 ± 11	49±9	45 ± 8	45 ± 8	59 ± 11**	49 ± 11	44 ± 7	49 ± 5	53 ± 11*
RBC (x10 <sup>4</sup> /μl)	956 ± 63	955±56	928 ± 35	908 ± 104	933 ± 72	972 ± 48	973 ± 36	970 ± 45	939 ± 69
HGB (g/dL)	16.2 ± 0.9	16.4±0.7	16.1 ± 0.3	15.6 ± 1.9	16.3 ± 1.6	16.5 ± 0.5	16.6 ± 0.6	17.0 ± 0.4	16.5 ± 1.1
HCT (%)	51.0 ± 2.9	50.7±2.7	49.3 ± 1.8	48.3 ± 5.5	49.8 ± 3.7	51.5 ± 2.1	51.3 ± 1.9	51.4 ± 2.4	49.9 ± 3.3
MCV (fL)	53.4 ± 0.7	53.1±0.4	53.1 ± 0.6	53.1 ± 0.7	53.5 ± 0.5	53.0 ± 0.6	52.8 ± 0.6	53.0 ± 0.4	53.1 ± 0.6
MCH (pg)	17.0 ± 0.6	17.2±0.4	17.3 ± 0.4	17.2 ± 0.3	17.5 ± 0.5	17.0 ± 0.5	17.0 ± 0.5	17.6 ± 0.6*	17.6 ± 0.3*
MCHC (g/dL)	31.8 ± 0.7	32.4±0.7	32.6 ± 0.8	32.3 ± 0.9	32.7 ± 1.0	32.2 ± 0.7	32.3 ± 0.7	33.2 ± 1.0**	33.1 ± 0.5**
PLT (x10 <sup>4</sup> /μl)	68.1 ± 17.1	75.3±10.6	78.0 ± 4.8	73.0 ± 9.4	73.2 ± 10.6	76.5 ± 6.0	77.6 ± 3.3	81.9 ± 5.8**	80.5 ± 8.1*
Differential counts (%)									
Band form neutrophils	0.2 ± 0.3	0.2±0.3	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2
Segmented neutrophils	24.9 ± 6.4	24.5±3.1	28.4 ± 7.4	25.2 ± 5.0	25.8 ± 6.5	27.2 ± 6.3	26.5 ± 7.1	27.3 ± 5.7	25.4 ± 2.7
Eosinophils	1.0 ± 0.8	1.6±1.2	1.4 ± 0.8	1.4 ± 0.7	0.9 ± 0.6	1.3 ± 0.8	1.3 ± 0.8	1.0 ± 1.0	1.1 ± 0.8
Basophils	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytes	73.5 ± 5.8	73.6±2.8	69.6 ± 7.4	73.0 ± 5.1	72.5 ± 6.4	70.9 ± 6.5	71.3 ± 7.2	71.4 ± 5.4	73.2 ± 3.3
Monocytes	0.5 ± 0.7	0.2±0.3	0.6 ± 0.6	0.4 ± 0.5	0.6 ± 0.6	0.6 ± 0.8	0.6 ± 0.8	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.5
Reticulocytes	0	0	0	0	0	0	0.1 ± 0.3	0	0.1 ± 0.3

Each value represents the mean ± SD.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively

Table 5. Hematology date of female F344 rats fed diet containing Bengel-clea or Bengel-flake for 13 weeks

Treatment	Control	Bengel-clea				Bengel-flake			
		0.04%	0.20%	1%	5%	0.04%	0.20%	1%	5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10	10	10
WBC (x10 <sup>2</sup> /μl)	41 ± 8	36 ± 5	35 ± 12	34 ± 8	34 ± 12	34 ± 7	37 ± 9	37 ± 10	42 ± 8
RBC (x10 <sup>4</sup> /μl)	884 ± 51	903 ± 35	866 ± 66	887 ± 20	887 ± 48	870 ± 42	871 ± 28	881 ± 48	901 ± 32
HGB (g/dL)	16.4 ± 0.8	16.9 ± 0.4	16.4 ± 1.1	16.8 ± 0.5	16.3 ± 0.5	16.1 ± 0.6	16.2 ± 0.5	16.4 ± 0.8	17.0 ± 0.5
HCT (%)	49.6 ± 2.7	50.5 ± 1.9	48.5 ± 3.6	49.9 ± 1.0	49.6 ± 2.3	48.6 ± 2.3	48.7 ± 1.3	49.4 ± 2.6	50.5 ± 1.7
MCV (fL)	56.1 ± 0.4	55.9 ± 0.3	56.1 ± 0.2	56.2 ± 0.5	55.9 ± 0.5	55.9 ± 0.4	55.9 ± 0.4	56.1 ± 0.2	56.1 ± 0.2
MCH (pg)	18.6 ± 0.5	18.7 ± 0.6	19.0 ± 0.4	19.0 ± 0.5	18.4 ± 0.5	18.5 ± 0.6	18.6 ± 0.5	18.7 ± 0.5	18.9 ± 0.8
MCHC (g/dL)	33.1 ± 0.7	33.4 ± 1.0	33.9 ± 0.6	33.7 ± 0.7	33.0 ± 0.7	33.1 ± 1.2	33.3 ± 0.9	33.2 ± 0.8	33.6 ± 1.2
PLT (x10 <sup>4</sup> /μl)	79.7 ± 6.2	80.7 ± 3.3	79.8 ± 9.2	81.2 ± 4.8	79.9 ± 5.7	77.1 ± 7.4	79.4 ± 4.1	79.5 ± 6.6	79.9 ± 5.5
Differential counts (%)									
Band form neutrophil	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3
Segmented neutrophil	26.1 ± 4.6	25.8 ± 6.2	27.3 ± 6.6	27.7 ± 5.6	31.3 ± 5.5	28.9 ± 5.9	33.3 ± 4.4*	26.5 ± 6.1	24.5 ± 5.2
Eosinophils	1.4 ± 0.7	1.5 ± 0.9	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.9	1.1 ± 0.7	1.4 ± 1.0	1.4 ± 0.8	2.0 ± 0.7	1.5 ± 1.1
Basophils	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphocytes	71.8 ± 4.3	72.2 ± 5.4	71.2 ± 6.6	70.5 ± 6.0	66.9 ± 6.1	68.9 ± 6.0	64.9 ± 4.4*	71.2 ± 5.9	73.3 ± 5.4
Monocytes	0.6 ± 0.7	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.5 ± 0.6	0.6 ± 0.6	0.7 ± 0.8	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.6
Reticulocytes	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0	0.2 ± 0.4	0	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.7	0.3 ± 0.7

Each value represents the mean ± SD.

\*, \*\*: Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively



**Table 6. Biochemical changes of male F344 rats fed diet containing Bengel-clea or Bengel-flake for 13 weeks**

Treatment	Control	Bengel-clea				Bengel-flake			
		0.04%	0.20%	1%	5%	0.04%	0.20%	1%	5%
		10	10	10	10	10	10	10	10
No. of animals									
TP g/dL	6.7 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.5 ± 0.1	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.1	6.5 ± 0.3	6.6 ± 0.3
Alb g/dL	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1
A/G	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.2
Bil mg/dL	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Glucose mg/dL	170 ± 8	163 ± 18	162 ± 11	167 ± 17	169 ± 31	168 ± 17	158 ± 14	156 ± 27	164 ± 11
TG mg/dL	135 ± 30	123 ± 24	124 ± 28	120 ± 25	96 ± 15 *	121 ± 28	114 ± 23	111 ± 50	139 ± 25
T-Chol mg/dL	68 ± 6	67 ± 4	70 ± 4	67 ± 4	66 ± 4	66 ± 6	68 ± 4	65 ± 5	66 ± 4
BUN mg/dL	24 ± 3	22 ± 2	21 ± 2 *	22 ± 2	22 ± 2	23 ± 2	22 ± 2	22 ± 3	24 ± 3
Cre mg/dL	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.30 ± 0.03
Na mEq/L	145 ± 1	145 ± 0	145 ± 1	145 ± 1	144 ± 1	145 ± 1	145 ± 1	144 ± 1	144 ± 1 *
Cl mEq/L	105 ± 1	105 ± 1	104 ± 1	105 ± 1	104 ± 1	104 ± 1	104 ± 1	104 ± 1	104 ± 2 *
K mEq/L	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.3	4.6 ± 0.2
Ca mg/dL	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.3 ± 0.2	10.0 ± 0.2 *	10.2 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.2 ± 0.3	10.1 ± 0.2
IP mg/dL	5.4 ± 0.8	5.5 ± 0.6	5.4 ± 0.4	5.6 ± 0.1	5.8 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.5
AST IU/L	82 ± 16	85 ± 10	82 ± 11	79 ± 12	78 ± 12	82 ± 6	88 ± 20	82 ± 14	84 ± 19
ALT IU/L	58 ± 13	59 ± 8	57 ± 11	55 ± 6	52 ± 7	57 ± 4	62 ± 12	54 ± 8	53 ± 10
ALP IU/L	418 ± 36	414 ± 31	405 ± 42	420 ± 24	398 ± 19	421 ± 16	411 ± 21	403 ± 32	440 ± 33
γGTP IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Each value represents the mean ± SD.

\* : Significantly different from control v.s. administered group at p < 0.05

**Table 7. Biochemical changes of female F344 rats fed diet containing Bengel-clea or Bengel-flake for 13 weeks**

Treatment	Control	Bengel-clea				Bengel-flake			
		0.04%	0.20%	1%	5%	0.04%	0.20%	1%	5%
		10	10	10	10	10	10	10	10
No. of animals									
TP g/dL	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.4	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.2
Alb g/dL	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
A/G	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2
Bil mg/dL	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.01*	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01 *	0.05 ± 0.01 **	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01 *	0.05 ± 0.01 *	0.05 ± 0.00 *
Glucose mg/dL	138 ± 11	126 ± 14	124 ± 22	129 ± 19	126 ± 18	134 ± 11	126 ± 14	136 ± 10	137 ± 15
TG mg/dL	62 ± 29	64 ± 28	57 ± 22	50 ± 25	57 ± 34	62 ± 23	76 ± 39	66 ± 34	74 ± 23
T-Chol mg/dL	90 ± 9	92 ± 6	91 ± 5	87 ± 5	86 ± 8	88 ± 5	87 ± 11	94 ± 10	93 ± 7
BUN mg/dL	23 ± 4	22 ± 2	21 ± 3	21 ± 3	22 ± 2	22 ± 2	22 ± 2	22 ± 1	22 ± 3
Cre mg/dL	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.03
Na mEq/L	144 ± 1	145 ± 1	144 ± 1	145 ± 1	145 ± 1	144 ± 1	145 ± 1	144 ± 1	144 ± 0
Cl mEq/L	107 ± 1	106 ± 1	106 ± 1	107 ± 1	106 ± 1	106 ± 1	106 ± 1	106 ± 1	106 ± 1
K mEq/L	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.5	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2
Ca mg/dL	9.9 ± 0.2	10.0 ± 0.3	9.9 ± 0.1	9.9 ± 0.2	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.1	10.0 ± 0.1	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.3
IP mg/dL	4.6 ± 0.5	4.9 ± 1.0	4.8 ± 0.9	4.8 ± 1.0	5.2 ± 1.1	4.9 ± 0.5	4.3 ± 0.9	4.2 ± 0.7	4.6 ± 0.7
AST IU/L	70 ± 7	74 ± 12	69 ± 6	68 ± 5	74 ± 19	68 ± 6	69 ± 5	67 ± 4	68 ± 2
ALT IU/L	43 ± 7	40 ± 4	38 ± 6	35 ± 6 *	39 ± 6	41 ± 6	40 ± 5	37 ± 2	43 ± 10
ALP IU/L	276 ± 43	269 ± 41	253 ± 40	275 ± 35	248 ± 24	273 ± 39	260 ± 49	278 ± 41	267 ± 32
γGTP IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Each value represents the mean ± SD.

\*, \*\*, Significantly different from control v.s. administered group at p < 0.05 and p < 0.01, respectively

**Table 8. Histopathological findings for F344 rat in the 13-week repeated dose study of Bengel-clea or Bengel-flake**

Sex	Treatment	Male			Female		
		Control	Bengel-clea 5 %	Bengel-flake 5 %	Control	Bengel-clea 5 %	Bengel-flake 5 %
	No. of animals	10	10	10	10	10	10
Liver							
	Microgranuloma	4	2	1	2	3	0
Kidney							
	Cast, hyaline	3	5	5	0	1	0
	Mineralization, medulla	4	5	5	1	1	1
	Regeneration, tubular	7	8	9	0	2	0
Heart							
	Cardiomyopathy	4	4	6	0	0	0
Lung							
	Metaplasia, osseous	0	0	1	0	0	1
Spleen							
	Hematopoiesis, extramedullary	3	2	4	1	0	0
Sublingual gland							
	Cell infiltration, interstitial, lymphocytic	0	0	0	1	0	0
Pancreas							
	Atrophy, acinar, focal	0	0	1	2	0	0
Thyroid							
	Ultimobranchial body	1	2	1	0	0	3
Prostate							
	Cell infiltration, interstitial, lymphocytic	3	3	3	-	-	-
Eye							
	Atrophy, retinal	0	0	0	2	1	0
Harderian gland							
	Cell infiltration, interstitial, lymphocytic	2	0	1	3	1	2
Bone marrow, femoral							
	Microgranuloma	0	0	0	2	2	3
Bone marrow, sternal							
	Microgranuloma	0	0	0	1	0	0

Table 9. Diet consumptions and test substance intake in F344 rats given diet containing Sumecton or Kunipia for 13-weeks. (at week 8)

Sex	Groups	Dose	No. examined	Food consumption		Intake of test substance	Intake of test substance	
				(g/rat/day)	(g/kg BW/day)	(g/kg BW/day)	(g/kg BW/90day)	
Male	Control	0	10	14.6 ± 0.7	68.5 ± 12.4	0	-	
	Sumecton	0.2	10	13.8 ± 0.9	65.0 ± 10.3	0.13	-	
		1	10	14.1 ± 0.8	66.2 ± 12.1	0.66	-	
		5	10	14.9 ± 0.9	70.5 ± 11.8	3.52	-	
	Kunipia	0.2	10	14.3 ± 0.8	67.2 ± 11.6	0.13	-	
		1	10	14.1 ± 0.9	66.3 ± 10.6	0.66	-	
		5	10	14.9 ± 0.6	69.7 ± 13.0	3.48	-	
	Female	Control	0	10	9.2 ± 0.3	68.1 ± 9.3	0	-
		Sumecton	0.2	10	9.7 ± 0.2	67.7 ± 9.5	0.14	-
1			10	9.8 ± 0.3	69.0 ± 9.2	0.69	-	
5			10	10.6 ± 0.4	73.4 ± 9.6	3.67	-	
Kunipia		0.2	10	9.5 ± 0.2	68.6 ± 10.2	0.14	-	
		1	10	9.4 ± 0.3	67.1 ± 9.7	0.67	-	
		5	10	10.0 ± 0.1	71.2 ± 10.0	3.56	-	

Mean ± SD.