

ラットを用いた合成及び精製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
研究協力者 曹 永晩 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

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を用いた 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。24 年度に動物試験を開始した合成ナノクレイであるスメクトンおよび精製ナノクレイであるクニピアについて、動物試験を終了し、血液生化学的検査、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 0.2%、1.0%及び 5.0%のスメクトンあるいはクニピアを F344 雌雄ラットに 13 週間反復投与したところ、死亡例はみられず、一般状態、最終体重、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量および病理組織学的検討において、いずれも明らかな毒性を示さない事が明らかとなった。また、体内への取り込みや腸管粘膜への物理的影響を検討するため、糞便中のアルミニウム濃度の計測および便潜血を検討したところ、糞中のアルミニウム濃度は 5 % スメクトン投与群および 5 % クニピア群において、それぞれ、対照群の 23 および 100 倍程度であったが、投与終了時の肝臓でのアルミニウム濃度は投与による影響はなく、便潜血や腸管の組織学的変化などの物理的影響も認めなかった。以上より、本試験条件下における無毒性量（NOAEL）は雌雄ともに 5.0%（スメクトンの雄：2.91 g/kg 体重/日、雌：3.15 g/kg 体重/日、クニピアの雄：2.89 g/kg 体重/日、雌：3.09 g/kg 体重/日）と判断された。

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、各種の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) 合成および精製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合成および精製ナノクレイについて、雌雄の F344 ラットを用いた 13 週間反復投与試験を実施した。

「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、 α -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、腐植質などの土壌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、飛散を押さえるためペレット状にした固形飼料を、F344 雌雄ラット各群 10 匹に投与した。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。7 週時点において、各群 5 匹について、Single Slide Professional Kit (Cenogenics Corporation, NJ, USA) を用いて、便潜血を検討した。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 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (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、眼球およびハーパー腺、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、精囊、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) 合成および精製ナノクレイ投与ラット検体中のアルミニウム濃度測定

2 種のナノクレイの 5% 投与群と対照群の雄各 3 匹ずつについて、7 週時点での糞および最終屠殺時の肝臓を用いて、ナノクレイ中に金属成分として含有されているアルミニウムの濃度を ICP-MS を用いて測定した。

(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った。

C. 研究結果

1) 合成および精製ナノクレイの毒性試験

スメクトンおよびクニピアの 13 週間投与試験では、死亡例は見られず、経過中の一般状態にも著変は見られなかった。体重については、雄では変化は見られず (Figure 1)、雌ではスメクトン投与群は第 3 週から、クニピア投与群は第 5 週から対照群に比べて有意な高値を示した (Figure 2)、摂餌量は、5% 投与群で増加傾向を示したが、群間に有意な差異はなく、被験物質はほぼ濃度に相関して摂取されていた (Table 1)。また、7 週経過時の便潜血は陰性であった (Data not shown)。臓器重量では、雄では変化は見られず (Table 2)、雌では 5% クニピア群の肺、0.2 および 5% スメクトン群と 0.2 および 5% クニピア群の心臓、0.2% スメクトン群の脾臓および肝臓の絶対重量の高値が見られ、また、全スメクトンまたはクニピア投与群の脳の相対重量と 0.2% スメクトン群の腎臓の相対重量の低値が見られた (Table 3)。血液学的検査では、Table 4, 5 に示すように、雌の 1% 以上のスメクトン群で MCHC の有意な増加が、また、血液生化学的検査では、Table 6, 7 に示すように、雄の 5% スメクトン群で TG の有意な減少が見られた。病理学的検査の結果を Table 8 に

示すが、いずれの臓器にも投与に関連した変化は認めなかった。

2) 合成および精製ナノクレイ投与ラット検体中のアルミニウム濃度測定

投与7週目の糞中のアルミニウム濃度は5%スメクトン投与群および5%クニピア群において、それぞれ対照群の23および100倍程度であったが、投与終了時の肝臓でのアルミニウム濃度は投与による影響はなく、便潜血や腸管の組織学的変化などの物理的影響も認めなかった(Figure 3)。

D. 考察

雌ラットにおいては、経過中よりスメクトンおよびクニピア投与群では、対照群よりも体重増加が亢進していたが、用量相関がない軽度の変化であり、背景データの範疇と考えられた。雌のみに見られた肺、心臓、脾臓及び肝臓の絶対重量の増加および脳と腎臓の相対重量の低下についても、いずれも用量相関性がない絶対重量と相対重量のみの変化であり、体重増加に伴う二次的な変化と考えられた。また、雌の1%以上のスメクトン群で認められたMCHCの有意な増加と雄の5%スメクトン群で認められたTGの有意な減少は、いずれも関連するパラメータの変動は伴っておらず、偶発的な変化と考えられた。

また、特にクニピア投与群については、糞中には高濃度のアルミニウムが確認されているが、13週間反復投与による肝臓への沈着は認めなかった。さらに、便潜血や腸管の組織学的変化はなく、物理的な影響も否定的であった。

E. 結論

スメクトンおよびクニピアについては、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。本試験条件下における無毒性量(NOEL)は雌雄ともに5.0%(スメ

クトンの雄:2.91 g/kg 体重/日、雌:3.15 g/kg 体重/日、クニピアの雄:2.89 g/kg 体重/日、雌:3.09 g/kg 体重/日)と判断した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

Ogawa, K., Onami, S., Cho, Y.-M., Toyoda, T., Akagi, J.-I., Suzuki, I., Mizuta, Y., Nishikawa, A. No significant adverse effect of nanoclay primarily consisting of Montmorillonite in a rat 13-week dietary administration study (モンモリロナイトを主成分とするナノクレイはラット13週間混餌投与試験において毒性影響を示さない)。The 13th International Congress of Toxicology; Seoul, 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

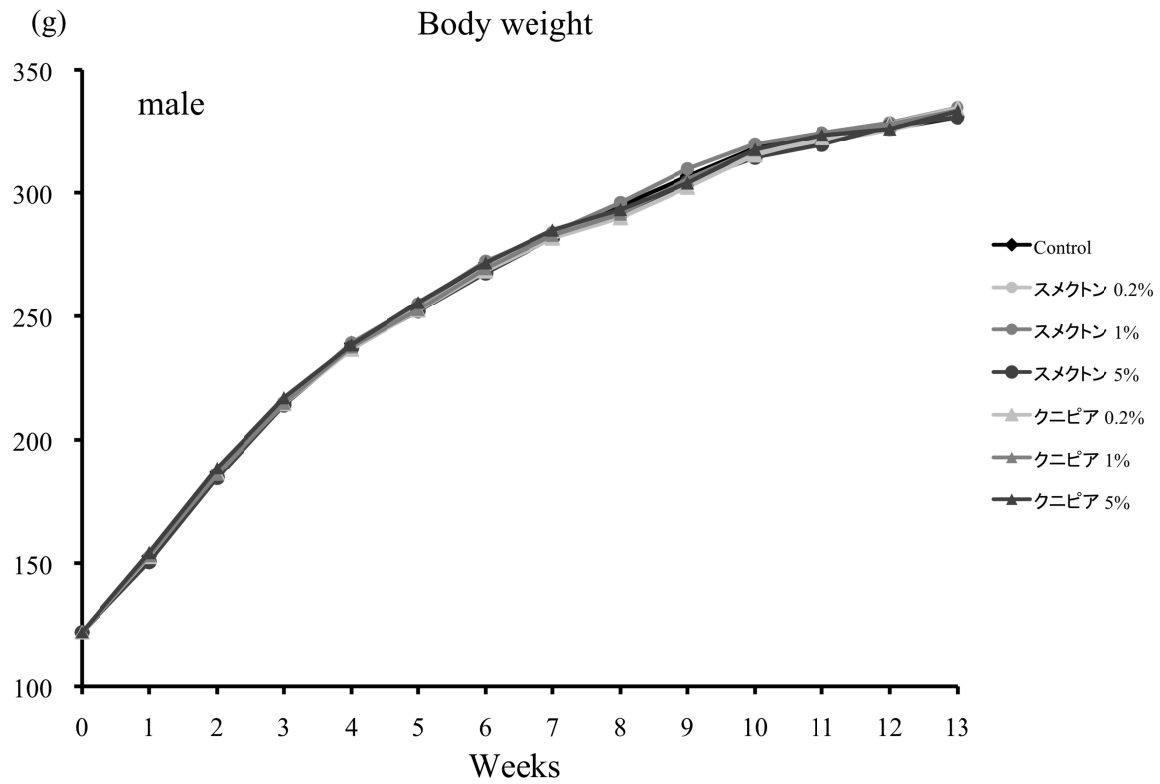


Figure 1: Mean body weights of the male F344 rats fed Sumecton or Kunipia for 13 weeks.

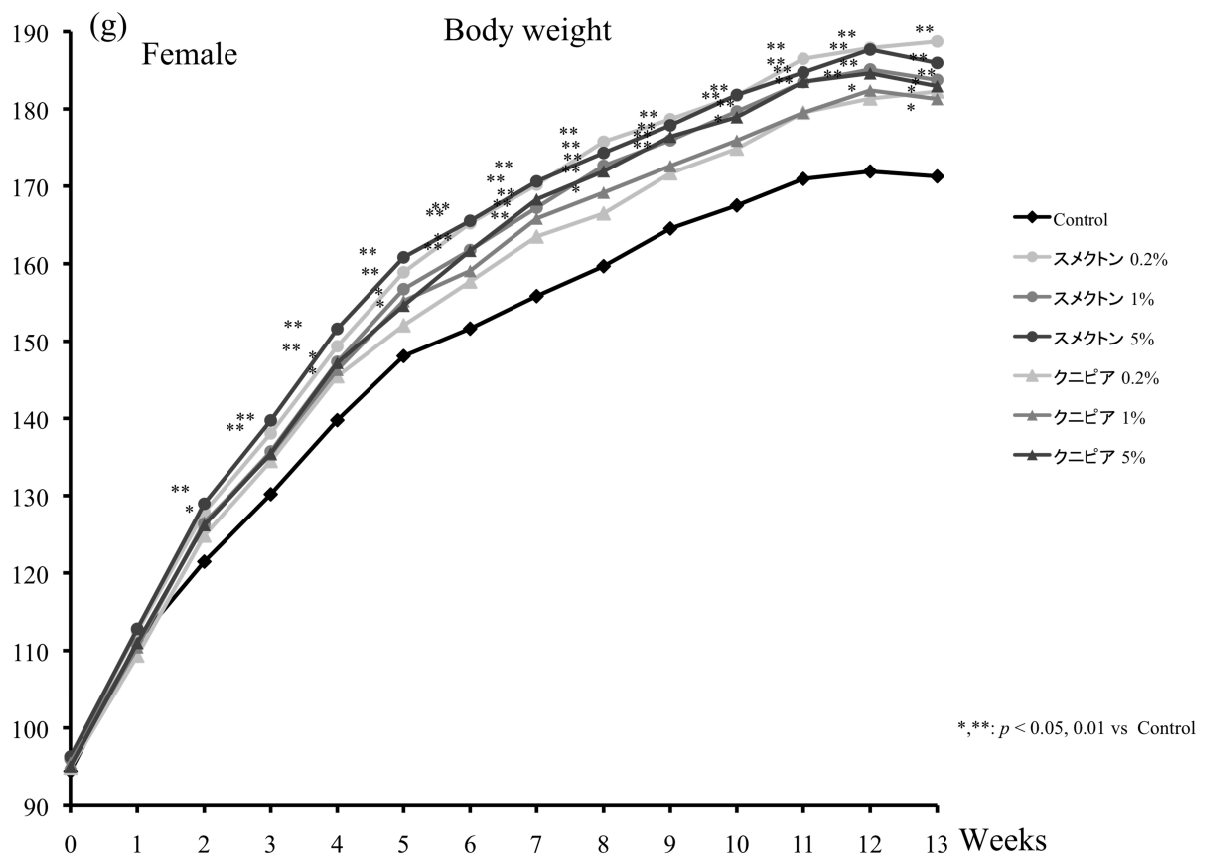


Figure 2: Mean body weights of the female F344 rats fed Sumecton or Kunipia for 13 weeks.

** : p < 0.01 vs control group
Tukey's test

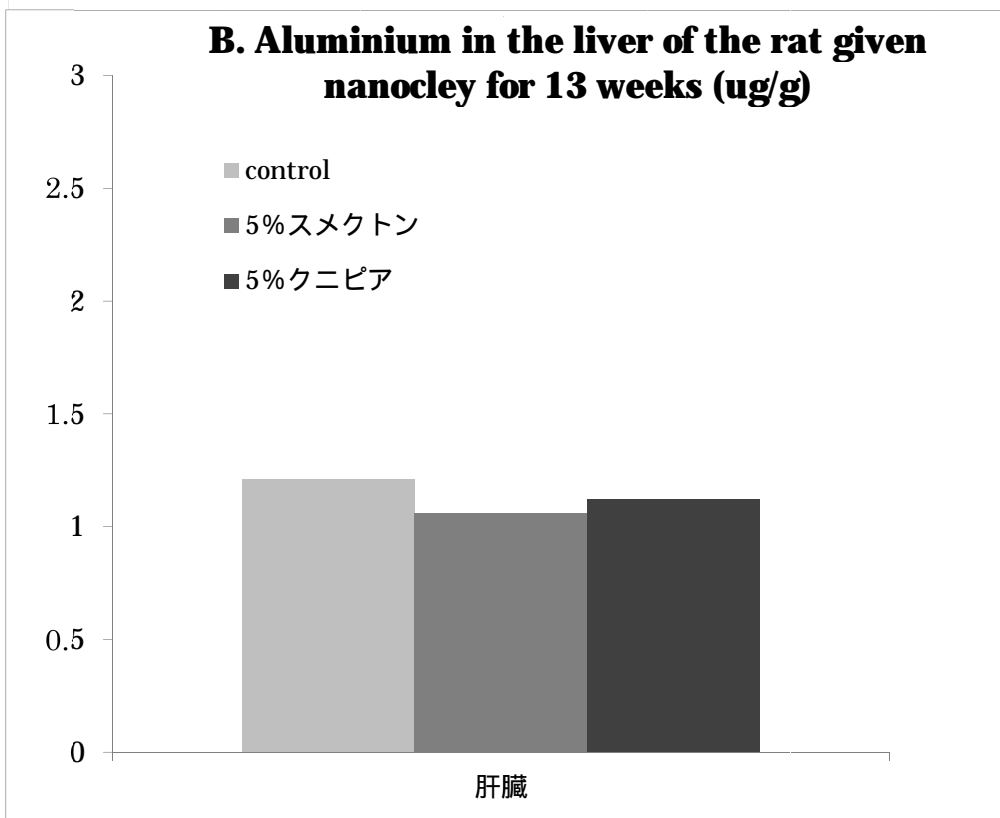


Figure 3; The aluminium concentration in the feces and liver of F344 rats fed Sumecton or Kunipia for 13 weeks.

Table1. Food consumption and material intake of F344 rats fed diet containing montmorillonite for 13 weeks

Sex	treatment	Dose (%)	No. of animals examined	Food consumption		Intake of Sumecton or Kunipia		
				(g/rat/day)	(g/kg BW/day)	Daily (g/kg BW/day)	Total (g/kg BW)	
male	control	0	10	14.3 ± 0.8	55.9 ± 14.9	0	0	
	Sumecton	0.2	10	13.8 ± 0.7	53.8 ± 12.9	0.11	9.69	
		1	10	14.0 ± 0.7	54.7 ± 13.8	0.55	49.19	
		5	10	14.8 ± 0.7	58.2 ± 14.3	2.91	261.68	
		Kunipia	0.2	10	14.2 ± 0.5	55.7 ± 13.6	0.11	10.02
	Kunipia	1	10	14.1 ± 0.6	55.0 ± 13.1	0.55	49.53	
5		10	14.8 ± 0.6	57.8 ± 14.5	2.89	260.09		
female		control	0	10	8.7 ± 0.3	59.0 ± 12.3	0	0
		Sumecton	0.2	10	9.2 ± 0.6	58.3 ± 12.7	0.12	10.49
	1		10	9.2 ± 0.7	59.2 ± 12.9	0.59	53.31	
	5		10	10.0 ± 0.8	63.1 ± 13.5	3.15	283.91	
	Kunipia		0.2	10	9.1 ± 0.6	59.5 ± 12.6	0.12	10.71
	Kunipia	1	10	8.9 ± 0.6	57.8 ± 12.5	0.58	52.03	
5		10	9.6 ± 0.5	61.8 ± 12.8	3.09	278.27		

Table 2. Organ weights of male F344 rats fed diet containing montmorillonite for 13 weeks

Treatment	Control	Sumecton 0.2%	Sumecton 1%	Sumecton 5%	Kunipia 0.2%	Kunipia 1%	Kunipia 5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	319.0 ± 11.9	320.7 ± 14.3	323.6 ± 8.5	319.6 ± 17.1	323.7 ± 8.4	322.1 ± 16.8	320.4 ± 9.3
Absolute							
Brain (g)	2.01 ± 0.04	1.99 ± 0.04	1.99 ± 0.05	1.98 ± 0.08	1.96 ± 0.05	2.00 ± 0.04	2.02 ± 0.04
Thymus (g)	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02
Lungs (g)	1.00 ± 0.08	1.04 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.04 ± 0.11	1.05 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.02 ± 0.10
Heart (g)	0.93 ± 0.05	0.92 ± 0.04	0.93 ± 0.03	0.93 ± 0.06	0.95 ± 0.04	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.05
Spleen (g)	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.64 ± 0.02	0.62 ± 0.05	0.65 ± 0.03
Liver (g)	7.33 ± 0.55	7.41 ± 0.38	7.35 ± 0.24	6.80 ± 1.93	7.45 ± 0.41	7.34 ± 0.50	7.27 ± 0.39
Adrenals (g)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01
Kidneys (g)	1.88 ± 0.09	1.91 ± 0.11	1.90 ± 0.12	1.89 ± 0.14	1.93 ± 0.10	1.93 ± 0.14	1.90 ± 0.12
Gonads (g)	3.16 ± 0.15	3.02 ± 0.28	3.11 ± 0.08	3.13 ± 0.11	3.11 ± 0.06	3.18 ± 0.09	3.09 ± 0.12
Relative							
Brain (g%)	0.63 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.61 ± 0.01	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.02
Thymus (g%)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Lungs (g%)	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.03
Heart (g%)	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Spleen (g%)	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.01
Liver (g%)	2.30 ± 0.11	2.31 ± 0.06	2.27 ± 0.08	2.14 ± 0.06	2.30 ± 0.10	2.28 ± 0.07	2.27 ± 0.09
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
Kidneys (g%)	0.59 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.59 ± 0.02	0.60 ± 0.04	0.59 ± 0.03
Gonads (g%)	0.99 ± 0.05	0.94 ± 0.09	0.96 ± 0.02	0.98 ± 0.06	0.96 ± 0.02	0.99 ± 0.05	0.97 ± 0.05

Each value represents the mean ± SD.

Table 3. Organ weights of female F344 rats fed diet containing montmorillonite for 13 weeks

Treatment	Control	Sumecton 0.2%	Sumecton 1%	Sumecton 5%	Kunipia 0.2%	Kunipia 1%	Kunipia 5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	162.6 ± 4.3	180.0 ± 8.7 **	175.3 ± 7.3 **	176.7 ± 10.2 **	173.8 ± 8.0 *	172.9 ± 10.9 *	173.4 ± 6.6 *
Absolute							
Brain (g)	1.82 ± 0.04	1.82 ± 0.04	1.82 ± 0.05	1.82 ± 0.04	1.80 ± 0.03	1.81 ± 0.04	1.81 ± 0.03
Thymus (g)	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Lungs (g)	0.62 ± 0.05	0.65 ± 0.11	0.69 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.67 ± 0.07	0.65 ± 0.08	0.72 ± 0.11 *
Heart (g)	0.55 ± 0.03	0.60 ± 0.03 **	0.58 ± 0.03	0.59 ± 0.02 *	0.59 ± 0.02 *	0.58 ± 0.03	0.59 ± 0.05 *
Spleen (g)	0.39 ± 0.03	0.43 ± 0.04 **	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.02
Liver (g)	3.60 ± 0.18	3.91 ± 0.23 *	3.78 ± 0.17	3.84 ± 0.19	3.82 ± 0.22	3.82 ± 0.25	3.80 ± 0.28
Adrenals (g)	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01
Kidneys (g)	1.05 ± 0.06	1.08 ± 0.06	1.06 ± 0.06	1.11 ± 0.05	1.08 ± 0.07	1.10 ± 0.06	1.09 ± 0.07
Gonads (g)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Relative							
Brain (g%)	1.12 ± 0.04	1.01 ± 0.05 **	1.04 ± 0.05 **	1.03 ± 0.06 **	1.04 ± 0.05 **	1.05 ± 0.06 *	1.04 ± 0.04 *
Thymus (g%)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Lungs (g%)	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.42 ± 0.06
Heart (g%)	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02
Spleen (g%)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01
Liver (g%)	2.21 ± 0.11	2.17 ± 0.06	2.16 ± 0.08	2.18 ± 0.08	2.20 ± 0.11	2.21 ± 0.11	2.19 ± 0.11
Adrenals (g%)	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Kidneys (g%)	0.65 ± 0.04	0.60 ± 0.02 *	0.61 ± 0.04	0.63 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.63 ± 0.04
Gonads (g%)	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 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 montmorillonite for 13 weeks

Treatment	Control	Sumecton 0.2%	Sumecton 1%	Sumecton 5%	Kunipia 0.2%	Kunipia 1%	Kunipia 5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10
WBC (x10 ² /μl)	30 ± 7	26 ± 9	26 ± 9	25 ± 8	26 ± 8	26 ± 9	33 ± 5
RBC (x10 ⁴ /μl)	949 ± 80	950 ± 65	972 ± 80	930 ± 65	925 ± 49	973 ± 62	984 ± 27
HGB (g/dL)	16.0 ± 1.2	16.2 ± 1.0	16.5 ± 1.4	15.9 ± 1.1	15.9 ± 0.8	16.6 ± 1.0	16.8 ± 0.4
HCT (%)	50.7 ± 3.8	51.2 ± 2.6	51.7 ± 3.8	49.9 ± 3.2	49.8 ± 2.6	52.2 ± 3.4	52.9 ± 0.9
MCV (fL)	53.5 ± 1.2	53.9 ± 1.1	53.2 ± 0.6	53.6 ± 0.4	53.8 ± 0.4	53.6 ± 0.8	53.8 ± 0.9
MCH (pg)	16.9 ± 0.4	17.1 ± 0.3	17.0 ± 0.3	17.1 ± 0.2	17.1 ± 0.5	17.0 ± 0.3	17.1 ± 0.2
MCHC (g/dL)	31.6 ± 0.4	31.7 ± 0.5	31.9 ± 0.6	32.0 ± 0.5	31.9 ± 0.8	31.7 ± 0.4	31.8 ± 0.5
PLT (x10 ⁴ /μl)	70.8 ± 7.4	76.1 ± 8.9	77.1 ± 8.8	72.4 ± 6.2	73.5 ± 6.9	76.8 ± 4.4	75.4 ± 4.9

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 montmorillonite for 13 weeks

Treatment	Control	Sumecton 0.2%	Sumecton 1%	Sumecton 5%	Kunipia 0.2%	Kunipia 1%	Kunipia 5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10
WBC (x10 ² /μl)	24 ± 8	26 ± 10	23 ± 4	24 ± 7	19 ± 5	20 ± 4	21 ± 6
RBC (x10 ⁴ /μl)	834 ± 46	823 ± 40	851 ± 24	808 ± 53	840 ± 30	824 ± 27	837 ± 31
HGB (g/dL)	15.3 ± 0.7	15.4 ± 0.6	15.9 ± 0.4	15.2 ± 1.0	15.6 ± 0.6	15.4 ± 0.6	15.5 ± 0.4
HCT (%)	48.2 ± 1.6	47.6 ± 1.7	48.7 ± 1.3	46.4 ± 3.1	48.7 ± 1.6	48.0 ± 1.5	48.4 ± 1.2
MCV (fL)	57.9 ± 2.0	57.9 ± 1.6	57.2 ± 0.4	57.4 ± 0.6	58.1 ± 0.8	58.3 ± 1.2	57.8 ± 1.6
MCH (pg)	18.4 ± 0.3	18.7 ± 0.5	18.7 ± 0.2	18.8 ± 0.4	18.5 ± 0.3	18.7 ± 0.4	18.5 ± 0.5
MCHC (g/dL)	31.8 ± 0.7	32.4 ± 0.7	32.7 ± 0.3 **	32.7 ± 0.8 **	32.0 ± 0.5	32.1 ± 0.5	32.0 ± 0.4
PLT (x10 ⁴ /μl)	75.1 ± 4.6	77.9 ± 5.5	74.4 ± 5.9	68.7 ± 7.2	72.5 ± 4.8	70.6 ± 8.8	70.9 ± 2.2

Each value represents the mean ± SD.

** : Significantly different from the control at $p < 0.01$

Table 6. Blood biochemical changes of male F344 rats fed diet containing montmorillonite for 13 weeks

Treatment	Control	Sumecton 0.2%	Sumecton 1%	Sumecton 5%	Kunipia 0.2%	Kunipia 1%	Kunipia 5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10
TP g/dL	6.5 ± 0.2	6.5 ± 0.2	6.4 ± 0.3	6.3 ± 0.3	6.4 ± 0.2	6.3 ± 0.3	6.3 ± 0.2
Alb g/dL	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.1
A/G	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Bil mg/dL	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Glu mg/dL	158 ± 24	151 ± 18	144 ± 27	130 ± 18	153 ± 37	151 ± 24	156 ± 40
TG mg/dL	89 ± 16	71 ± 16	65 ± 19	53 ± 14*	75 ± 25	82 ± 31	68 ± 33
T-Cho mg/dL	59 ± 5	57 ± 5	56 ± 4	56 ± 5	57 ± 5	56 ± 5	56 ± 6
BUN mg/dL	19 ± 2	18 ± 1	18 ± 2	17 ± 1	18 ± 3	18 ± 2	18 ± 3
Cre mg/dL	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.02
Na mEq/L	143 ± 1	143 ± 1	142 ± 2	144 ± 1	142 ± 3	141 ± 3	142 ± 1
Cl mEq/L	102 ± 2	103 ± 2	101 ± 2	102 ± 1	101 ± 3	100 ± 2	101 ± 1
K mEq/L	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2
Ca mg/dL	10.1 ± 0.1	10.0 ± 0.3	9.9 ± 0.3	9.9 ± 0.2	9.9 ± 0.4	9.8 ± 0.4	9.9 ± 0.2
IP mg/dL	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.6	5.8 ± 0.3	6.0 ± 0.5	5.1 ± 0.7	5.1 ± 0.5	5.4 ± 0.7
AST IU/L	89 ± 13	89 ± 14	85 ± 7	84 ± 8	93 ± 16	95 ± 20	88 ± 12
ALT IU/L	57 ± 5	54 ± 9	51 ± 6	48 ± 7	59 ± 14	54 ± 9	50 ± 7
ALP IU/L	338 ± 18	347 ± 17	348 ± 20	346 ± 24	355 ± 40	351 ± 33	350 ± 32
γGTP IU/L	<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. Blood biochemical changes of female F344 rats fed diet containing montmorillonite for 13 weeks

Treatment	Control	Sumecton	Sumecton	Sumecton	Kunipia	Kunipia	Kunipia
		0.2%	1%	5%	0.2%	1%	5%
No. of animals	10	10	10	10	10	10	10
TP g/dL	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.5	6.4 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.4 ± 0.4	6.3 ± 0.3
Alb g/dL	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2
A/G	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1**	2.2 ± 0.1**	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Bil mg/dL	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Glu mg/dL	89 ± 11	87 ± 13	93 ± 17	96 ± 14	95 ± 17	102 ± 26	106 ± 23
TG mg/dL	26 ± 6	25 ± 6	31 ± 11	24 ± 7	32 ± 17	53 ± 36	40 ± 34
T-Cho mg/dL	80 ± 8	77 ± 13	83 ± 8	72 ± 8	77 ± 8	81 ± 10	75 ± 13
BUN mg/dL	17 ± 2	16 ± 1	16 ± 2	17 ± 1	16 ± 3	17 ± 3	17 ± 2
Cre mg/dL	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02
Na mEq/L	143 ± 2	142 ± 6	141 ± 2	143 ± 2	141 ± 3	142 ± 4	142 ± 2
Cl mEq/L	104 ± 2	102 ± 5	102 ± 2	103 ± 2	102 ± 2	102 ± 4	102 ± 3
K mEq/L	4.2 ± 0.4	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Ca mg/dL	9.7 ± 0.2	9.7 ± 0.6	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.3	9.5 ± 0.3	9.7 ± 0.6	9.7 ± 0.3
IP mg/dL	5.1 ± 0.5	5.4 ± 0.8	5.1 ± 0.6	5.6 ± 0.3	4.5 ± 1.2	4.3 ± 1.3	4.6 ± 1.5
AST IU/L	76 ± 8	71 ± 8	66 ± 7	68 ± 5	72 ± 11	72 ± 7	72 ± 3
ALT IU/L	30 ± 4	28 ± 3	29 ± 3	28 ± 4	29 ± 4	30 ± 5	29 ± 4
ALP IU/L	207 ± 22	201 ± 20	203 ± 23	216 ± 25	212 ± 15	218 ± 31	205 ± 35
γGTP IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Each value represents the mean ± SD.

** : Significantly different from control v.s. administered group at p < 0.01

Table 8. Histopathological findings for F344 rats fed diet containing montmorillonite for 13 weeks

Sex	Treatment	Male			Female		
		Control	Sumecton 5%	Kunipia 5%	Control	Sumecton 5%	Kunipia 5%
No. of animals		10	10	10	10	10	10
Kidney	Regeneration, tubular	2	0	0	0	0	0
Heart	Cardiomyopathy	2	1	0	0	0	0
Intestine, rectum	Metaplasia, squamous	0	0	0	1	0	0
Lung	Metaplasia, osseous	0	1	2	0	0	0
Pancreas	Single cell necrosis, tubular cell, focal	1	0	0	0	0	0
Pituitary	Cyst, pars distalis	0	0	1	2	1	1
	Cyst, pars nervosa	1	0	0	0	0	0
Spinal cord, lumbar	Epidermal cyst	0	0	0	2	0	0
Thyroid	Ultimobranchial body	1	2	1	2	1	2