

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

腸管粘膜バリア破綻条件下での高分子化合物の
経口暴露による毒性影響の解明

平成 31 - 令和 3 年度 総合研究報告書

研究代表者 松下 幸平

令和 4 年 (2 0 2 2) 年 5 月

目次

I. 総合研究報告

腸管粘膜バリア破綻条件下での高分子化合物の
経口暴露による毒性影響の解明 ----- 1

松下幸平

Figure 1-1 ~ 1-3

Figure 2-1 ~ 2-5

Figure 3-1 ~ 3-10

Table 1

Table 2-1 ~ 2-2

Table 3-1 ~ 3-7

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 36

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

腸管粘膜バリア破綻条件下での高分子化合物の
経口暴露による毒性影響の解明

総括研究報告書

研究代表者： 松下 幸平（国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官）

研究要旨

近年、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物、砂糖、食塩やビール等の食品類から検出されることが報告されている。しかしながら、これまでの高分子化合物に関する毒性研究は主に水生生物を用いたものであり、動物を用いた研究は非常に少ない。一方、腸管は粘液や上皮細胞から構成される“粘膜バリア”で保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物や金属等の粒子状物質が体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に、ナノマテリアルの一つであるナノシリカ（一次粒径 0.1 μm 以下のシリカ）の実験動物を用いた研究では、静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているもの（*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492）、強制経口投与では 2000 mg/kg 体重の投与量で 90 日間の毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったと報告されている。（*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78）。しかしながら、ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症が存在することは稀ではなく、そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、明確な評価に足るデータは乏しいものの、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて、健常ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・検証し、腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が、経口暴露された高分子化合物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを明らかにすることを目的とした。

DSS がマウス及びラットに大腸炎を誘発することは良く知られている。ロットによって重合度合い等が異なっているとされており、我々の研究室で過去に行った検討では、ロットによって誘発される炎症の度合いが異なっていた。また、文献においても 0.5-5% まで様々な濃度での報告があるため（<https://www.chondrex.com/documents/dss-02.pdf>）、適切な炎症を誘発できるか確認する必要があると考えられた。初年度は、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた高分子化合物の反復経口投与実験を実施するための条件設定として、DSS 投与実験短期投与による影響及び、平均一次粒径 30 nm 及び 300 nm の PS の急性毒性について検討をおこなった。その結果、直腸においては 3% 群ではび慢性の潰瘍性病変がみられ、1% 群では散在性のびらん性病変が認められた。結腸においては 3% 濃度群で固有層及び粘膜下織におけるび慢性の炎症細胞浸潤がみられ、1% 濃度群では固有層における散在性の炎症細胞浸潤が認められた。小腸ではいずれの投与群においても著変は認められなかったことから、3% 投与による炎症は高度すぎると考えられた。

次年度は、F344 ラットに持続的に大腸炎を誘発する条件設定のため、DSS を 1 週おきに 6 週間 1% または 2% の濃度で飲料水投与し、実験開始 1 週後、2 週後、4 週後および 6 週後と経時的に大腸の炎症所見を評価した。その結果、入手した分子量 36-50 kDa の DSS を用いた場合、1% の濃度での F344 ラットへの飲料水投与によって、重篤な血便までは観察されず、結腸及び直腸にびらん/潰瘍並びに上皮の再生性変化を伴う適切な大腸炎を誘発すること、1 週間の休薬でも炎症所見が持続していることが確認された。また、PS をはじめとする高分子ナノマテリアルの毒性に関する情報収集を実施したところ、2021 年 1 月に、欧州委員会の Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) の専門家パネルによる化粧品中のナノマテリアルの安全性に関する提言において、潜在的に安全性への懸念があるナノマテリアルとしてスチレン/非晶ポリアリレート共重合体 (ナノ) + スチレン/非晶ポリアリレート共重合体 (ナノ) (SCCS/1595/18) を取り上げていることがわかった。その他の対象としては、銀ナノ粒子 (ナノ) (SCCS/1596/18)、シリカ、水和シリカ、およびアルキルシリレート (ナノフォーム) で修飾されたシリカ表面 (SCCS/1545/15)] があげられていた。スチレン/非晶ポリアリレート共重合体 (ナノ) に関しては、物理化学的、毒物学的、および暴露の側面を総合的に検討す

ると、他の物質をカプセル化したスチレン/アクリレート共重合体のナノビーズの使用が懸念される根拠があるとされていた。また、PubMed 検索においても、多くの関連論文が発表されているが、ナノサイズを含むポリスチレンの毒性影響については、特に *in vivo* データについては情報が限られていると考えられた。

最終年度は、それまでに得られたデータに基づき、飲料水として調整水を継続的に与えた健常ラット及び1% DSS 水を1週おきに与えた腸炎ラットにおいて、2サイクル目より PS 粒子を強制経口投与する28日間反復投与毒性試験を実施した。投与時の PS は、想定通りにナノサイズ及びマイクロサイズに分散していることが確認され、反復経口投与試験として適切と考えられた。経過中死亡動物は見られず、体重、飲水量、摂餌量に有意な変化は見られなかった。一般状態において、DSS 水群では調整水群よりも軟便及び下痢が頻回観察され、出血性下痢も一部の動物に認められたものの、PS 投与による増強は認めず、行動異常も見られなかった。尿検査、血液学的検査、血清生化学検査及び臓器重量においても、PS 投与による影響は認めなかった。病理組織学的検査では、DSS 水投与群では、盲腸、結腸及び直腸に腸炎所見が認められ、意図した大腸炎が誘導されていることが確認された。DSS 投与群の腸間膜リンパ節に、軽微～軽度のマクロファージの空胞化が認められたが、PS 投与による増強はみられなかった。その他の変化は F344 ラットの自然発生性病変として知られる所見であり、用量相関性もないため、偶発性の変化と考えられた。凍結標本の観察から、PS は腸管内に、透明で一部に約 2 µm までの凝集を示す微細顆粒状物質として認識されたものの、腸管及び肝臓組織内での局在は確認されなかった。また、全身諸臓器の何れにおいても PS 投与に関連した異物反応は認めなかった。

以上の結果から、ラットを用いた28日間反復経口投与の結果からは、健常動物のみならず、大腸炎存在下においても、粒径 30 nm 及び 300 nm の PS そのものは、1000 mg/kg 体重/日までの経口暴露による毒性影響はないと考えられた。

一方で、ナノサイズの二酸化チタンを同様に強制経口投与した検討においては、異物反応はないものの、回腸のパイエル板等への侵入が病理組織学的に確認されており、PS の微細顆粒も侵入している可能性は否定できないと考えられた。PS が生体内に取りこまれる場合は、混合される他の化合物のキャリアーとなる可能性は否定できないと考えられた。

研究分担者：

井手 鉄哉（国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官、独立行政法人医薬品医療機器総合機構・審査専門員）

赤根 弘敏（国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官）

A. 研究目的

近年、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物、砂糖、食塩やビール等の食品類から検出されることが報告されている。しかしながら、これまでの高分子化合物に関する毒性研究は主に水生生物を用いたものであり、動物を用いた研究は非常に少ない。

一方、腸管は粘液や上皮細胞から構成される“粘膜バリア”で保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物や金属等の粒子状物質が体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に、ナノマテリアルの一つであるナノシリカ（一次粒径 0.1 µm 以下のシリカ）の実験動物を用いた研究では、静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているものの (*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492)、強制経口投与では 2000 mg/kg 体重の投与量で 90 日間の毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったと

報告されている (*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78)。しかしながら、ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症が存在することは稀ではなく、そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、明確な評価に足るデータは乏しいものの、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。

本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて、健常ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・検証し、腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が、経口暴露された高分子化合物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを明らかにすることを目的とした。

DSS がマウス及びラットに大腸炎を誘発することは良く知られている。ロットによって重合度合い等が異なっているとされており、我々の研究室で過去に行った検討では、ロットによって誘発される炎症の度合いが異なっていた。また、文献においても 0.5-5%まで様々な濃度での報告があるため

(<https://www.chondrex.com/documents/dss-02.pdf>)、適切な炎症を誘発できるか確認する必要があると考え、PS の反復投与試験に先立って DSS 投与の条件設定を実施した。

B. 研究方法

B-1-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定①-短期投与

被験物質として MP Biomedicals より製造ロット番号 S2187 の DSS (分子量 36-50 kDa) を購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物試験では、6 週齢の雄性 F344 ラット各群 4 匹に、DSS を 1.0 または 3.0% の濃度で 1 週間自由飲水投与した。投与期間中は一般状態及び便性状を観察するとともに、体重及び飲水量測定を実施した。明らかな一般状態の悪化を示した動物については、イソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。計画屠殺例については投与期間終了後にイソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。剖検時に小腸及び大腸を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。

B-1-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

被験物質として Thermo Fisher Scientific より平均一次粒径 30 nm 及び 300 nm の PS 粒子懸濁液を購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物実験では、6 週齢の雌雄 F344 ラット各群 4 匹に、粒径 30 nm または 300 nm の PS 粒子を 200 または 1000 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与し、対照群には蒸留水を同様に投与した。投与後 14 日間は一般状態を観察するとともに、体重及び摂餌量測定を行い、投与後 15 日目にイソフルラン深麻酔下に

て腹部大動静脈より放血安楽殺した。剖検時に全身臓器の肉眼観察を行うとともに、肝臓、腎臓、脾臓及び心臓を摘出し、重量測定を実施した。

B-2-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定②-持続投与

ラットに持続的な腸炎を誘発できる DSS の投与濃度を決定するための予備試験として、DSS を 1 週おきに 6 週間 1% または 2% の濃度で飲料水投与し、経時的に大腸の炎症所見を評価した。DSS は、MP Biomedicals の製造ロット番号 S2187 (分子量 36-50 kDa) を使用した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物試験では、6 週齢の雄性 F344 ラットを平均体重が均一となるように対照群 8 匹、1% 及び 2% DSS 群各 16 匹割り付けた。DSS 投与群には DSS を 1 または 2% の濃度で 1 週間飲料水に混じて自由摂取させ、次の 1 週間は通常の水道を摂取させるサイクルを 3 回繰り返した。投与期間中は一般状態及び便性状を観察するとともに、体重及び飲水量測定を実施した。実験開始 1 週後、2 週後、4 週後および 6 週後に対照群は 2 匹ずつ、DSS 投与群は 4 匹ずつイソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。剖検時に大腸を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。

B-2-2. 情報収集

PS を含む高分子ナノマテリアルについて、Web 検索により、近年の欧州委員会における毒性評価情報及び文献情報を収集した。

B-3. 健常ラット及び大腸炎ラットにおけるナノマイクロポリスチレンの 28 日間反復投与毒性試験

これまでに得られたデータに基づき、飲料水として調整水を継続的に与えた健常ラット及び 1% DSS 水を 1 週おきに与えた腸炎ラットにおいて、2 サイクル目より PS 粒子を強制経口投与する 28 日間反復投与毒性試験を実施した。

PS は、Thermo 社の 5000 シリーズポリマー粒子懸濁液の 30 nm (#5003B) 及び 300 nm (#5030B) の 2

サイズを選定し、40, 200 及び 1000 mg/kg 体重/日の用量に蒸留水で調整して投与した。PS の分散については、動的光散乱光度計（大塚電子株式会社）を用いて測定した。DSS は、MP Biomedicals の製造ロット番号 S2187（分子量 36-50 kDa）を使用した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物試験では、6 週齢の雄性 F344 ラット計 70 匹を平均体重が均一となるように各群 5 匹ずつ 14 群に割り付けた。飲料水として調整水を投与する健常群及び 1% DSS の間欠投与で大腸炎を誘発させる大腸炎群を設定した。DSS 投与群には DSS を 1% の濃度で 1 週間飲料水に混じて自由摂取させ、次の 1 週間は調整水を摂取させるサイクルを 3 回繰り返した。2 週目からは 30 nm 及び 300 nm の PS をそれぞれ 40, 200 及び 1000 mg/kg 体重/日の用量で、プラスチック製ディスポーザブル経口ゾンデを用いて 10 ml/kg 体重の容量で 28 日間強制経口投与した。対照群には溶媒の蒸留水を等量経口投与した。投与量は直近の体重に基づいて算出した。

投与期間中は、一般状態及び便性状を毎日観察するとともに、体重及び飲水量を週 1 回測定した。実験開始 8 週目（PS 投与の 26 日目又は 27 日目）に、全動物についてオーションスティックアナライザーを用いて尿検査を実施し、グルコース、蛋白、ビリルビン、ウロビリノーゲン、pH、比重、潜血、ケトン体、亜硝酸塩、白血球、色調及び濁度について測定あるいは評価した。

実験開始 8 週後（PS 投与 28 日後）半日の絶食後イソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より採血後、放血安楽殺した。血液学的検査として、採取した血液の一部を抗凝固剤（EDTA-2K）入りの試験管に移し、自動血球計算装置 IDEXX プロサイト Dx を用いて、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（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）、網状赤血球数（RET）、血小板数（PLT）、白血球数（WBC）、及び白血球分画（好中球；Neutrophil、リンパ球；Lymphocyte、単球；Monocyte、好酸球；Eosinophil、好塩基球；Basophil）について測定した。

また血清生化学的検査として、残りの血液を血清分離剤及び凝固促進用シリカ微粒子入りの試験管に分注し、遠心分離して血清を得て、総蛋白（TP）、ア

ルブミン（ALB）、アルブミン/グロブリン比（A/G）、総ビリルビン（T-BIL）、ブドウ糖（GLU）、トリグリセリド（TG）、総コレステロール（T-CHO）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、塩素（Cl）、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）及びγ-グルタミルトランスペプチダーゼ（γ-GTP）について測定した。

剖検時に全臓器を肉眼観察後摘出し、大腸は内腔にホルマリンを注入して進展させた後に腸間膜附着部に沿って切開・展開し、濾紙に挟んで 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、全長の標本作製を行った。血液学的検査、血液生化学検査、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺、下垂体、脳、胸腺、肺、心臓、精巣、精囊、前立腺、唾液腺重量の測定を行い、心臓、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、縦隔リンパ節、胸腺、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、鼻腔、気管、肺、舌、顎下腺、舌下腺、耳下腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上部、前立腺、精囊、乳腺、大脳、小脳、脊髄、三叉神経、坐骨神経、大動脈、眼球、ハーダ-腺、皮膚、胸骨、大腿骨、骨格筋、ジンバル腺については、定法通りにヘマトキシリン-エオジン染色標本作製し病理組織学的検査を実施した。分析の必要性に備え、肝臓、腎臓及び脾臓の凍結検体も保存した。また、PS は有機溶剤に可溶性であるため、調整水群及び DSS 群の対照群と 30 nm 及び 300 nm PS の 1000 mg/kg 体重/日投与群各群 2 匹について、ホルマリン固定臓器から空腸、回腸、肝臓の凍結切片を作製し、被験物質の観察を行った。

（倫理面への配慮）

すべての動物実験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。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扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

C-1-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定①-短期投与

実験期間中、3.0 % 濃度群の全例で軽度から重度の血便及び体重増加抑制の傾向がみられ、うち 2 例が投与開始 5 日後に切迫屠殺となった。1.0 % 濃度群では実験期間中に 1 例で肛門周囲被毛の汚れがみられたものの、体重増加抑制の傾向等は認められなかった。

病理組織学的検索では、直腸においては3.0%濃度群で出血、陰窩膿瘍やリンパ組織過形成を伴うび慢性の潰瘍性病変がみられた一方で、1.0%濃度群では杯細胞減少を伴う散在性の糜爛性病変が認められた(Figure 1-1)。結腸においては3.0%濃度群で粘膜上皮の好塩基性化や固有層及び粘膜下織における慢性の炎症細胞浸潤がみられた一方で、1.0%濃度群では固有層における散在性の炎症細胞浸潤のみが認められた(Figure 1-2)。小腸ではいずれの投与群においても著変は認められなかった。

C-1-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認められなかった。実験期間中の体重推移については、PS粒子投与群と対照群間に有意な差はみられなかったが、粒径0.03 μmの1000 mg/kg体重群では雌雄ともに体重増加抑制の傾向が認められた(Figure 1-3)。摂餌量についてはPS粒子投与群と対照群間に差はみられなかった。

臓器重量の検索では、雌の粒径0.03 μmの1000 mg/kg体重群において肝臓の絶対重量の有意な低下が認められた(Table 1)。

C-2-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定②-持続投与

プロトコル(Figure 2-1)に沿って実施した実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。経過中の体重変化は、2%DSS投与群でやや増加抑制傾向が見られたが、統計学的な有意差は認めなかった(Figure 2-2)。また、飲水量(Figure 2-3)及び摂餌量(Figure 2-4)についてもDSS投与群と対照群の間に有意な差異は見られなかった。一般状態については、DSS投与群では肛門周囲被毛の汚れ及び下痢が観察され、1%よりも2%でより高度の傾向が見られた。また、DSS投与期間直後の時点ではより高度の所見を示す動物が多い傾向があった。2%群では、出血性下痢も観察され、DSS投与の休止1週後も半数以上の動物で何らかの所見が認められた(Table 2-1)。大腸の病理組織学的観察(Figure 2-5)では、DSS投与群では、1週後から直腸及び結腸にびらんまたは潰瘍及び粘膜上皮の再生像が観察され、1%よりも2%でより高度の傾向が見られた。特に、直腸の変化がより強く、DSS投与の休止1週後にも全例で何らかの所見が観察された。

C-2-2. 情報収集

2021年1月に、欧州委員会のScientific Committee on Consumer Safety (SCCS)の専門家パネルは化粧品

中のナノマテリアルの安全性に関する提言を發出した

(https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_239.pdf)。その中で、潜在的に安全性への懸念があるナノマテリアルとしてスチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)+スチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)

(SCCS/1595/18)を取り上げている。その他の対象としては、銀ナノ粒子(ナノ)(SCCS/1596/18)、シリカ、水和シリカ、およびアルキルシリレート(ナノフォーム)で修飾されたシリカ表面(SCCS/1545/15)]をあげている。

スチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)に関する記述

・物理化学的側面

1. 他の物質を含むスチレン/アクリレート共重合体(ナノビーズ)は、ナノスケール(20-160 nm)の粒子で構成されている(SCCS/1595/18)。

2. スチレン/アクリレート共重合体は、ナノスケールの非溶解性粒子で構成されており、報告されている溶解度は0.01 mg/L未満であり、水性媒体へのそれ以上の溶解はない(SCCS/1595/18)。

3. 不溶性ポリマーの性質により、スチレン/アクリレート共重合体は、一般に不溶性、非分解性、および本質的に持続性である他のマイクロ/ナノプラスチックと類似している(Ganesh Kumar et al, 2020)。したがって、SCCSは、スチレン/アクリレート共重合体の安全性評価に使用できる可能性のある他のマイクロ/ナノプラスチックの物理化学的および毒物学的側面に関する入手可能なデータも調査した。

・毒物学的側面

4. マイクロ/ナノプラスチック(スチレン/アクリレート共重合体を含む)は、潜在的な毒物学的危険性について以下の様に報告されている。

遺伝毒性:

PSナノ粒子(100 nm)は、ヒト線維芽細胞の*in vitro*での細胞質分裂ブロック小核(CBMN)アッセイでDNA損傷を誘発することが示されている(Poma et al, 2019)。PSナノ粒子(~100 nm)の表面にタンパク質コロナが存在すると、コメットアッセイでリンパ球のDNA損傷が増加することが報告されている(Gopinath et al, 2019)。しかし、CHO-K1細胞におけるPSナノ(47-64 nm)およびマイクロ(565-597 nm)粒子の小核アッセイからは、否定的な結果が報告されている(Hesler et al, 2019)。

一般毒性:

ナノプラスチックに関するほとんどの懸念は、その持続性と環境への影響に関連している(Ng et

al.2018, Alimba and Faggio 2019, Stapleton 2019, Yong et al.2020, Ganesh Kumar et al, 2020). 最近では、哺乳類とヒトの毒性に関する懸念がより注目を集めているが、データは一般的に不足している (Lehner et al. 2019, Chang et al. 2020, Stapleton 2019, Yong et al. 2020, Allan et al. 2020 でレビューされている). プラスチック粒子の考えられる毒性作用は、プラスチック自体の潜在的な毒性、および浸出性添加剤や吸着汚染物質との複合毒性に起因している (Chang et al, 2020).

インビトロ研究では、PS 粒子は、Caco-2 と HT29-MTX-E12 または BeWo b30 細胞の共培養に対して急性毒性はなく、腸および胎盤の障壁を通過しなかったが、ナノ (47-64 nm) およびマイクロ (565-597 nm) PS 粒子は、細胞への取り込みと細胞内蓄積を示した (Hesler et al, 2019). 同じ研究で、NIH/3T3 およびマウス胚性幹細胞について 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超える用量で PS 微粒子の細胞毒性が観察され、胚性幹細胞における心筋細胞の分化は、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量への曝露後に妨げられた。微粒子は、細胞毒性と胚毒性の両方の点でナノ粒子よりも毒性が高いことがわかった (ナノ粒子 $\text{IC}_{50}>100\mu\text{g}/\text{mL}$, 微粒子 $\text{IC}_{50}>12.6\mu\text{g}/\text{mL}$) が、どちらも弱毒性とされた。

PS ナノプラスチック (粒子サイズ $\sim 100\text{ nm}$) では、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の暴露量でかなりの細胞毒性と溶血が観察されたが、粒子表面でのタンパク質コロナ形成後に劇的に増加した (Gopinath et al, 2019).

5. SCCS / 1595/18 で評価された 2 つの物質 (マンヌロン酸メチルシラノールとヒアルロン酸ジメチルシラノール) の毒性データは入手できない。ただし、シラノールは、シラノール基 ($=\text{Si}-\text{OH}$; $=\text{Si}(\text{OH})_2$) が化学構造に組み込まれているさまざまな複雑さの化合物で構成されている。シラノールは、シリカ粒子の表面に化学官能基として存在し、シリコンナノ粒子の親水性 (Napierska et al, 2010) を規定している。角膜毒性に関して、長鎖シラノール末端化合物は短鎖シラノール末端化合物よりも毒性が高いことが明らかとなった (Green et al.1992)。

・暴露の側面

6. 他の化合物が充填されたスチレン/アクリレート共重合体ナノビーズの使用の目的は、制御された拡散により皮膚レベルで化合物の徐放を提供するとされている。SCCS は、これを化粧品にナノスケールで物質を使用する新しい方法のテストケースと見なしている。このタイプのアプリケーションは、多くの他の (生物活性) 物質を多数のアプリケーションで使用する機会を開く可能性があり、その結果、安全性がまだ評価されていないナノカプセル化材料への消費者の曝露が広がることになる。

・その他の側面

7. スチレン/アクリレート共重合体ナノビーズにカプセル化された物質に関する情報は事実上存在しないが、疎水性プラスチック製のナノサイズの担体に物質をカプセル化すると、カプセル化されていない形態の同じ物質と比較して、その毒物学的影響をさらに変化させる可能性のある生物動力学的挙動を示す可能性があると考えられる。このようなナノキャリアは、皮膚または他の全身器官のより深いところに物質を送達する可能性があるため、このタイプのアプリケーションは、さまざまな化粧品アプリケーションのために他の多数の物質をカプセル化するために使用できる。ただし、ポリマーとカプセル化物質の安全性を個別に示すことができたとしても、ナノスケールの実体の形でまとめた場合、これを 2 つの安全性の証拠と見なすことはできないことに注意が重要である。これに関連して、SCCS は、ポリマーマトリックスにナノカプセル化された化合物の安全性を実証するのに十分なデータがない場合、そのようなアプリケーションは消費者の安全性に対する懸念を構成すると考えている。

・まとめ

物理化学的、毒物学的、および暴露の側面を総合的に検討すると、他の物質をカプセル化したスチレン/アクリレート共重合体のナノビーズの使用が懸念される根拠があると考えている。化粧品は、消費者に健康上のリスクをもたらす可能性がある。SCCS は、化粧品での材料の安全な使用をサポートするために提供された証拠を評価する準備がある。

PubMed における文献検索では、polystyrene nanoparticle toxicity のキーワードでも、2020 年に 71 件、2021 年も現時点(5月)で 32 件の文献が見られる。PS ナノ粒子が様々な細胞に取りこまれ得ることも、報告されている。

C-3. 健康ラット及び大腸炎ラットにおけるナノ/マイクロポリスチレンの 28 日間反復投与毒性試験

C-3-1 被験物質の粒度分布

30 nm の PS 原液及び 300 nm の PS を蒸留水で 25 倍希釈して粒度を測定した (Figure 3-1)。3 回測定した粒径の平均値は、それぞれ 27.0 nm 及び 297.6 nm であり、軽度の幅はあるものの、粒子の凝集は認められず適切に分散できていることが確認された。

C-3-2 体重変化、飲水量、摂餌量及び一般状態

実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。経過中、体重変化は、DSS 水投与、PS 投与によらず群間に差異は認めなかった (Figure 3-2)。飲水量については、DSS 水投与の 1, 2 サイクル目はわずかにバラツキがみられたものの群間に差異は認めなかった (Figure 3-3)。また、摂餌量に

についても、群間に有意な差異は見られなかった(Figure 3-4). 一般状態については、調整水投与群においても、散発的に軟便が観察され、下痢は週の積算で2回程度までであり、PSの投与用量との相関は見られなかった. DSS水群では調整水群よりも軟便及び下痢が頻回観察され、出血性下痢も一部の動物に認められたが、行動異常等は見られなかった(Table 3-1).

C-3-3 尿検査

各検査項目に群間で大きな差は認められなかった(Table 3-2).

C-3-4 血液学的検査

血液学的検査では、DSS水群の300 nm PSの40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較してHGBの有意な高値が認められた(Table 3-3).

C-3-5 血清生化学検査

血清生化学検査では、調整水群の300 nm PSの1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較してNaの低値が、DSS水群の30 nm PSの1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較してT-CHOの低値が認められた(Table 3-4).

C-3-6 臓器重量

臓器重量では、調整水群の30 nm PSの40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して脳の絶対重量の高値及び、300 nm PSの40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して甲状腺の絶対重量の高値及び副腎の相対重量の低値が認められた(Table 3-5).

C-3-7 病理組織学的検査

剖検時、高用量のPS投与群では、腸管内容物が白色調を示したが、組織には肉眼的所見は見られなかった. 病理組織学的検査では、DSS水群において、PSの投与に関わらず全ての群で結腸に軽微な粘膜上皮再生像(Figure 3-5), 及び、直腸に軽微なびらん/潰瘍、中等度～高度な粘膜上皮再生像(Figure 3-6)並びに軽微～軽度の粘膜上皮過形成(Figure 3-7)が認められた(Table 3-6). 軽微な粘膜上皮再生像は、DSS水群の対照群、30 nm PSの1000 mg/kg 体重/日投与群及び300 nm PSの1000 mg/kg 体重/日投与群の盲腸においても、5匹中それぞれ4匹、3匹及び3匹に認められた(Figure 3-8). また、腸間膜リンパ節の軽微～軽度のマクロファージの空胞化(Figure 3-9)がDSS水群の対照群、30 nm PSの1000 mg/kg 体重/日投与群及び300 nm PSの1000 mg/kg 体重/日投与群の全例に認められた. その他、心筋内の局所的な単核細胞浸潤、肺胞内の局所的な出血、腎臓の集合管鉅質沈着、前立腺の間質内単核細胞浸潤が1～2例に認めら

れた(Table 3-10).

また、ポリスチレンは、通常の病理組織標本の作製時に用いるキシレンなどの有機溶剤に溶解されるため、ヘマトキシリン-エオジン標本上では腸管内を含め、被験物質は確認されなかった. 被験物質の観察を目的に、調整水群及びDSS群の対照群と30 nm及び300 nm PSの1000 mg/kg 体重/日投与群各群2匹について、ホルマリン固定臓器から空腸、回腸、肝臓の凍結ブロックを作製し、薄切してヘマトキシリンにより染色して水溶性封入剤による封入を施した. 全てのPS投与群において空腸、回腸の内腔に投与したPSのサイズにかかわらず、約2 µmまでの透明な粒状物が確認された(Figure 3-10). 一方、肝臓を含む組織内には顆粒状物は認識されず、異物を貪食した巨細胞浸潤も認めなかった.

D. 考察

D-1-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定①—短期投与

健常ラットと腸炎モデルラットを用いた PS 粒子の反復経口投与実験を実施するにあたり、F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できる DSS の製造ロットを探索するとともに、DSS の自由飲水投与の至適濃度を設定する目的で、まずは F344 ラットに起炎作用を発揮する濃度の DSS を 1 週間自由飲水投与した.

その結果、製造ロット番号 S2187 の DSS において、3.0 % 濃度群では全例にび慢性の潰瘍性病変が誘発されたのに対し、1.0 % 濃度群では全例に散在性の糜爛性病変が誘発されたことから、製造ロット番号 S2187 の DSS では F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できることが明らかになった. 一方で、DSS 誘発腸炎モデルラットを用いた PS 粒子の反復経口投与実験を行う上では、若干軽度の腸炎が持続的に誘発されたラットを用いるのが適切と考えられたことから、3.0 % の投与濃度は不適と判断した.

D-1-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

本研究では、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた PS 粒子の反復経口投与実験を実施するにあたり、PS 粒子の至適投与用量を設定する目的で、雌雄 F344 ラットに粒径 30 nm または 300 nm の PS 粒子を 0 (対照群)、200 または 1000 mg/kg 体重の投与量で単回強制経口投与した.

その結果、粒径 300 nm の PS 粒子ではいずれの投与用量でも毒性影響は認められなかった一方で、粒径 30 nm の PS 粒子では 1000 mg/kg 体重の投与量において雌雄ともに体重増加抑制の傾向が認められたことから、粒径の小さな PS 粒子ほど毒性影響が強

く発揮される可能性が示唆された。なお、臓器重量の検索において認められた、雌の粒径 30 nm の 1000 mg/kg 体重群における肝臓の絶対重量の有意な低下は、絶対重量のみの変動であり、相対重量に変動は認められなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

以上の結果に基づき、今後実施する反復経口投与実験では、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日とする方針を定めた。

D-2-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定②-持続投与

本検討から、入手した分子量 36-50 kDa の DSS を用いた場合、1%の濃度での F344 ラットへの飲料水投与によって、重篤な血便までは観察されず、結腸及び直腸にびらん/潰瘍並びに上皮の再生性変化を伴う適切な大腸炎を誘発すること、1 週間の休薬でも炎症所見が持続していることが確認された。本プロトコールに基づいて投与開始 1 週間後から、F344 ラットに粒径 30 nm 及び 300 nm の PS 粒子を用い、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日として、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた 28 日間反復経口投与実験を実施し、健常ラットと腸炎モデルラットそれぞれについて無毒性量 (NOAEL) を決定し、毒性影響の比較を行うことが適切と考えられた。

D-2-2. 情報収集

欧州委員会の提言では、ナノスチレンは環境と共に乳類やヒトの毒性影響が懸念されるもののデータが不足しており、結論には達することができないとの見解と考えられた。

D-3. 健常ラット及び大腸炎ラットにおけるナノ/マイクロポリスチレンの 28 日間反復投与毒性試験

健常ラット及び DSS 水の間欠投与による大腸炎ラットにおいて、30 nm 及び 300 nm の PS を 40, 200 及び 1000 mg/kg 体重/日の用量に蒸留水で調整して 28 日間強制経口投与し、全身諸臓器への毒性影響を検討した。

投与時の PS は、想定通りにナノサイズ及びマイクロサイズに分散していることが確認され、反復経口投与試験として適切と考えられた。

経過中死亡動物は見られず、体重、飲水量、摂餌量に有意な変化は見られなかった。一般状態において、DSS 水群では調整水群よりも軟便及び下痢が頻回観察され、出血性下痢も一部の動物に認められたものの、PS 投与による増強は認めず、行動異常も見られなかった。血液学的検査では、DSS 水群の 300

nm PS の 40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して HGB の有意な高値が認められたが、その他の赤血球パラメータには変動はなく、用量相関性も示さないことから、偶発的な変化と考えられた。血清生化学検査では、調整水群の 300 nm PS の 1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して Na の低値が、DSS 水群の 30 nm PS の 1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して T-CHO の低値が認められたが、病理組織学的検査においても肝臓、腎臓などへの影響も見られないことから PS による毒性影響の可能性は低いと考えられた。臓器重量では、調整水群の 30 nm PS の 40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して脳¹の絶対重量の高値及び、300 nm PS の 40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して甲状腺の絶対重量の高値及び副腎の相対重量の低値が認められたが、用量相関性も示さないことから、PS 投与による影響ではないと考えられた。病理組織学的検査では、DSS 水投与群では、盲腸、結腸、直腸に腸炎所見が認められ、意図した大腸炎が誘導されていることが確認された。対照群及び DSS 投与群の腸間膜リンパ節に、軽微～軽度のマクロファージの空胞化が認められたが、PS 投与による増強はみられなかった。その他の変化は F344 ラットの自然発生性病変として知られる所見であり、用量相関性もないため偶発性の変化と考えられた。凍結標本の観察から、PS は腸管内に、透明で一部に凝集を示す微細顆粒状物質として認識されたものの、組織内での局在は確認されなかった。また、全身諸臓器の何れにおいても PS 投与に関連した異物反応は認められなかった。今回の検討では、1000 mg/kg 体重/日までの 30 nm 及び 300 nm の PS そのもののラットへの経口投与による毒性影響はないと考えられた。一方で、ナノサイズの二酸化チタンを同様に強制経口投与した検討においては、異物反応はないものの、回腸のパイエル板等への侵入が病理組織学的に確認されており、PS の微細顆粒も侵入している可能性は否定できないと考えられた。PS が生体内に取りこまれる場合は、混合される他の化合物のキャリアーとなる可能性があるため、引き続き、生体内への侵入の有無については、追加検討が必要と考えられた。

E. 結論

E-1-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定①-短期投与

F344 ラットを用いた DSS の 1 週間自由飲水投与の結果より、製造ロット番号 S2187 の DSS では F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できたものの、3.0%の濃度では腸炎の程度が重度であったことから、3.0%よりも低濃度の DSS を用い、軽度な腸炎を持続的に誘発できる自由飲水投与の条件検討が必要と

考えられた。

E-1-2. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

DSS の自由飲水投与の実験条件を設定後、F344 ラットを用いた PS 粒子の単回経口投与実験の結果に基づき、粒径 30 nm の PS 粒子を使用し、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日として、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた反復経口投与実験を実施し、健常ラットと腸炎モデルラットそれぞれについて無毒性量 (NOAEL) を決定し、毒性影響の比較を行うことが適切と考えられた。

E-2-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定(2)-持続投与

1% の 36-50 kDa DSS を 1 週間毎に間欠的に飲水投与するプロトコールで持続的に大腸炎を誘発可能であることが明らかとなった。

E-2-2. 情報収集

ナノサイズを含む、PS の毒性影響については、情報が不十分とされていた。特に、海外において *in vivo* のデータは、ほとんど得られないことが、評価をより困難にしていると考えられた。

E-3. 健常ラット及び大腸炎ラットにおけるナノ/マイクロポリスチレンの 28 日間反復投与毒性試験

雄性 F344 ラットに、8 週齢時点から 28 日間、30 nm 及び 300 nm の PS を 40、200 及び 1000 mg/kg 体

重/日の用量で強制経口投与し、全身諸臓器への毒性影響を検討したところ、何れの臓器にも PS 投与に関連した毒性影響は認めなかった。また、1% DSS の間欠的飲水投与による大腸炎の存在下においても、PS の経口投与による毒性影響は認めなかった。

以上の結果から、健常動物のみならず、大腸炎存在下においても、粒径 30 nm 及び 300 nm の PS そのものは、1000 mg/kg 体重/日までの経口暴露による毒性影響はないと考えられた。一方、生体内への侵入の有無については、追加検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

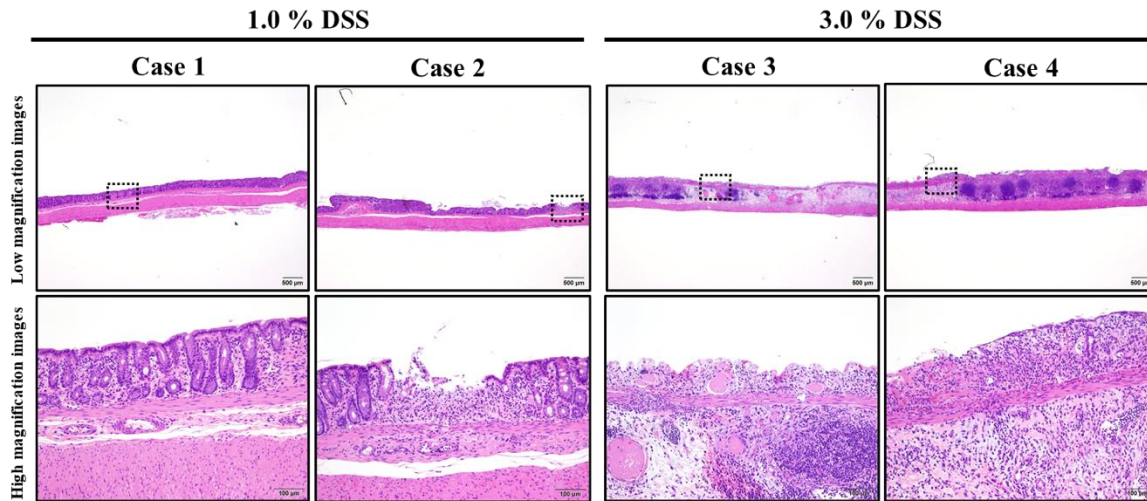


Figure 1-1. Histopathological changes in the rectum of F344 rats treated with DSS for 1 week.

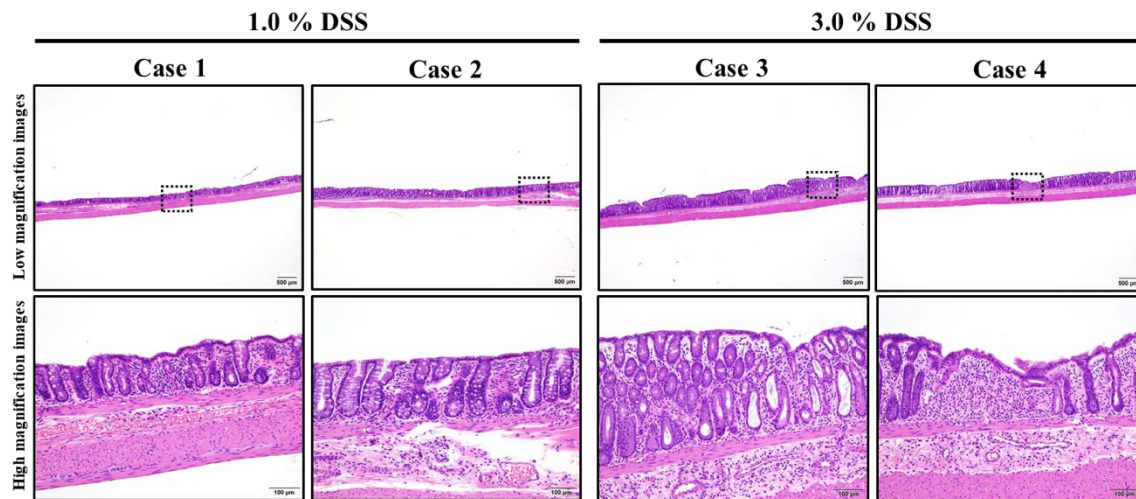


Figure 1-2. Histopathological changes in the colon of F344 rats treated with DSS for 1 week.

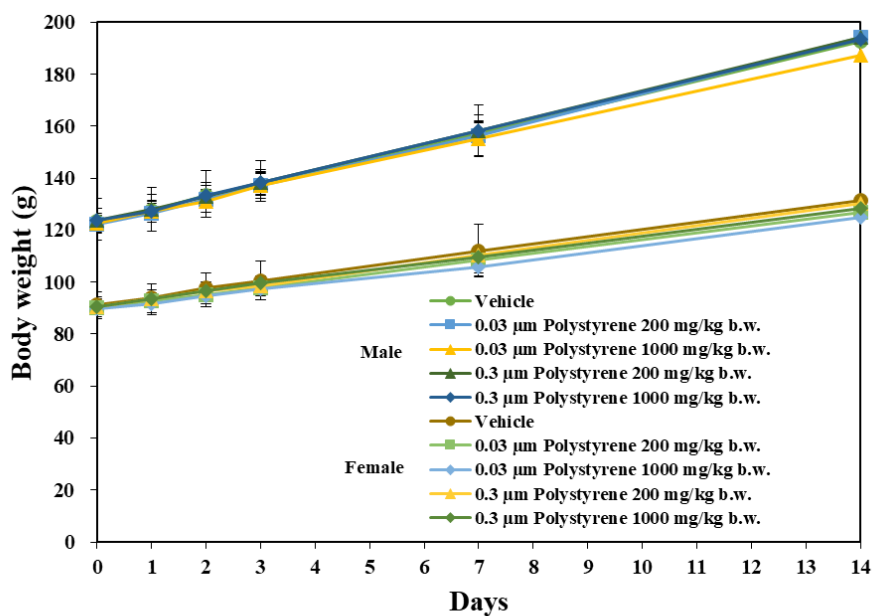
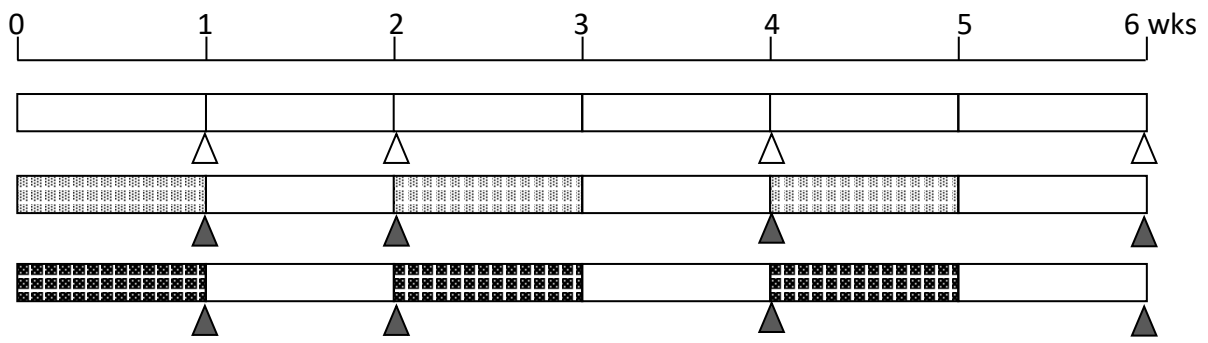


Figure 1-3. Body weights of F344 rats treated with polystyrene particles.







- Animals ; F344 male rats (total 40 rats)
-  ; 1% DSS (dextran sulfate sodium MW 36,000-50,000) in drinking water
-  ; 2% DSS (dextran sulfate sodium MW 36,000-50,000) in drinking water
-  ; sacrifice 2 rats/point
-  ; sacrifice 4 rats/point
- Examination ; body weight, food intake, water intake, macroscopic exam
histopathology (colon, rectum)

Figure 2-1. Experimental protocol

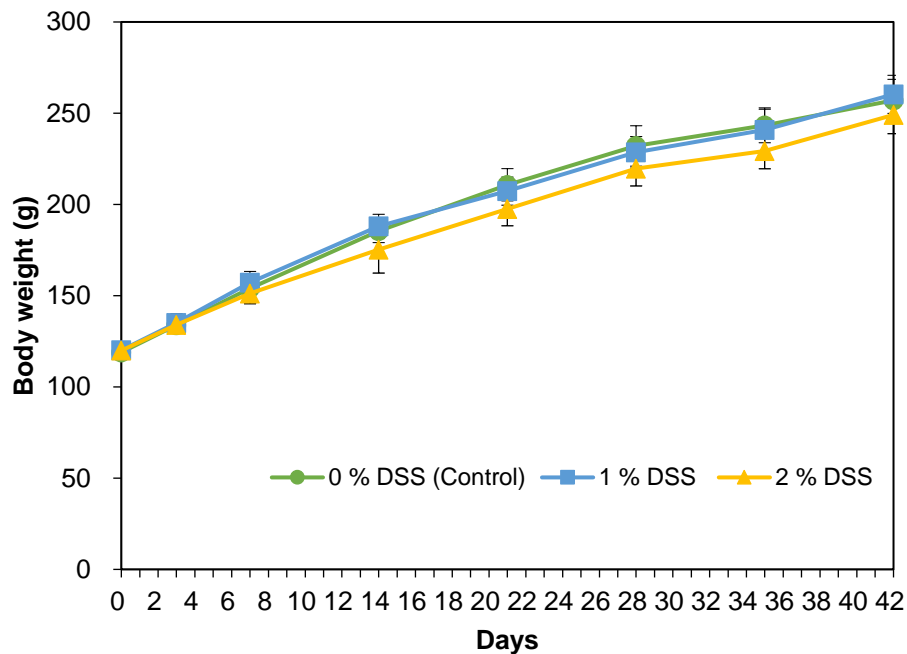


Figure 2-2. Body weight change curves

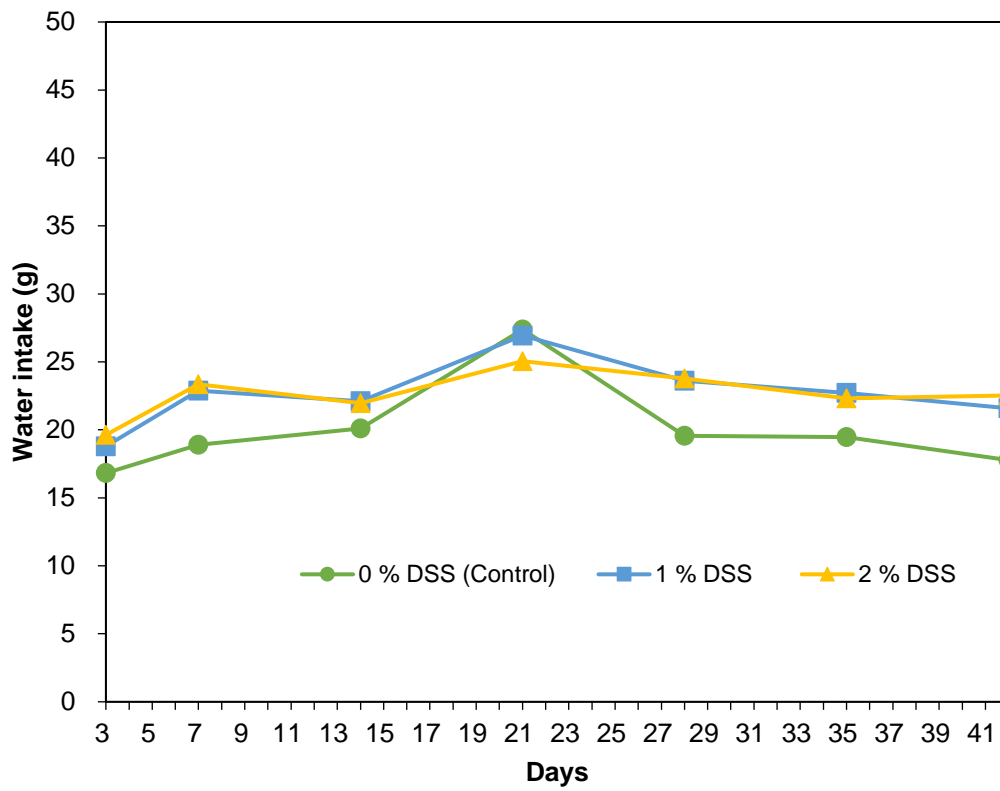


Figure 2-3. Water consumption curves

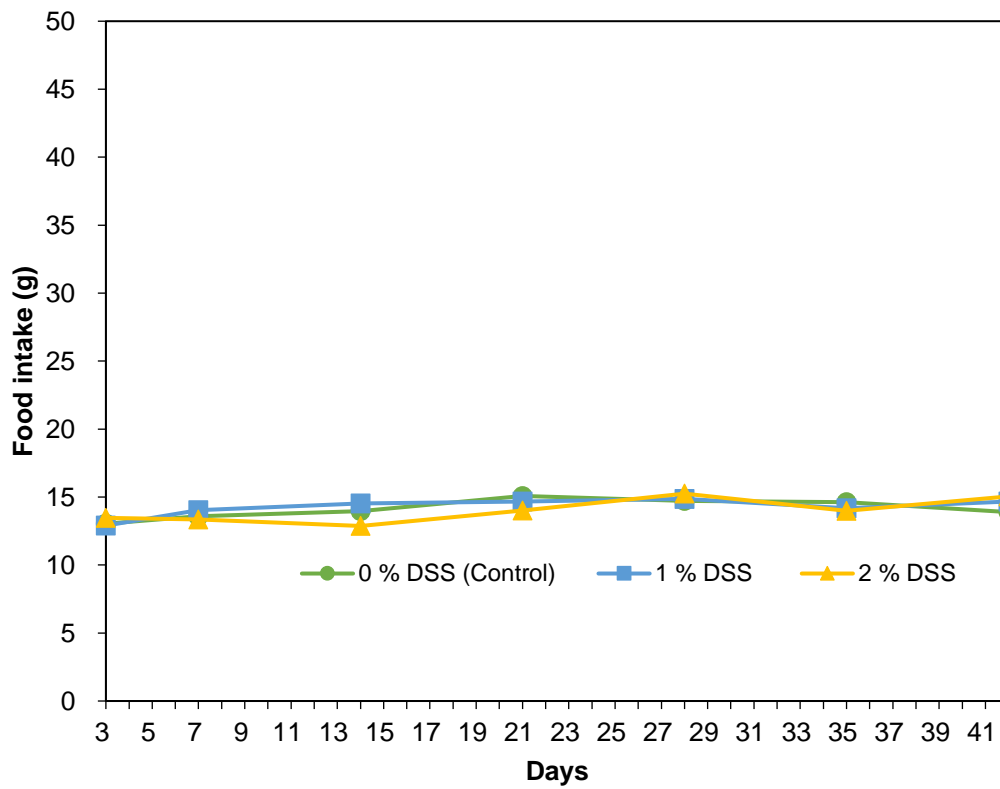


Figure 2-4. Food consumption curves

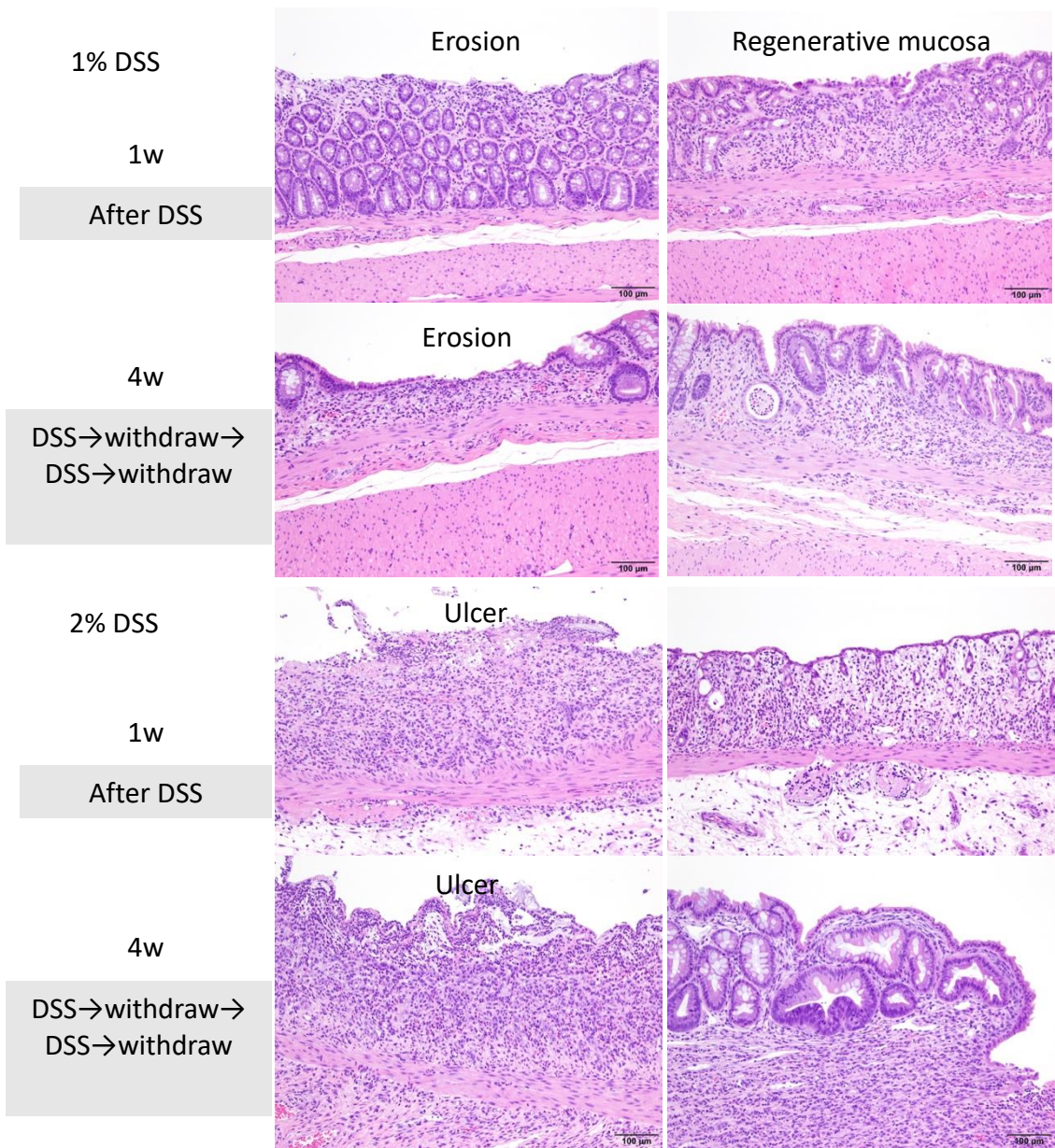


Figure 2-5. Histopathological lesion in the rectum of rats administered DSS

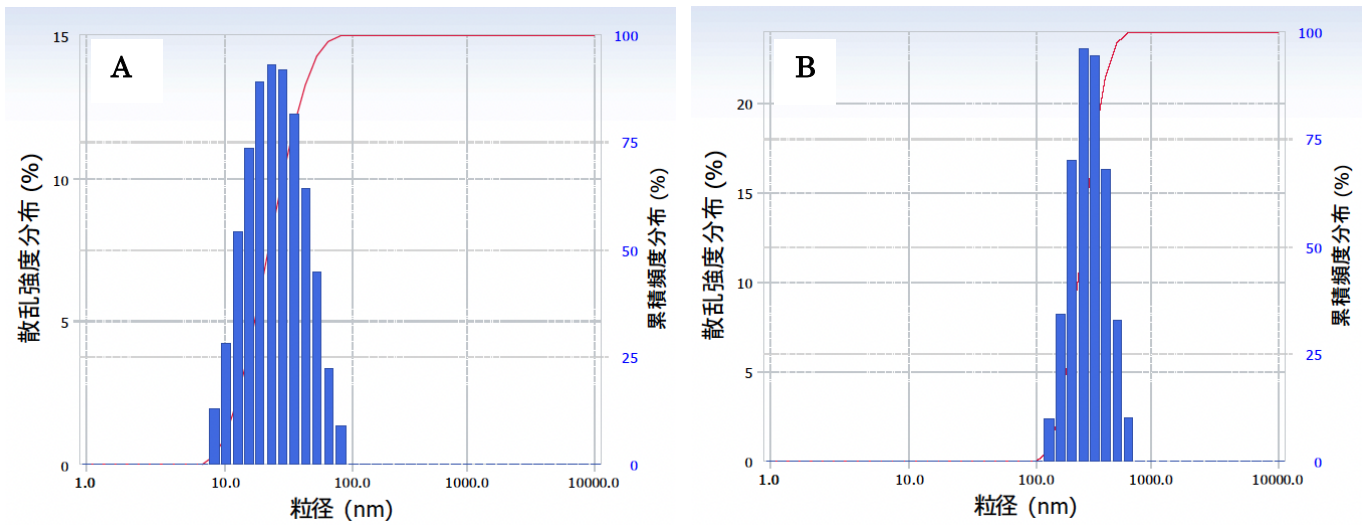


Figure 3-1. Particle size distribution analyzed by dynamic light scattering. A: 30 nm polystyrene, B: 300 nm polystyrene

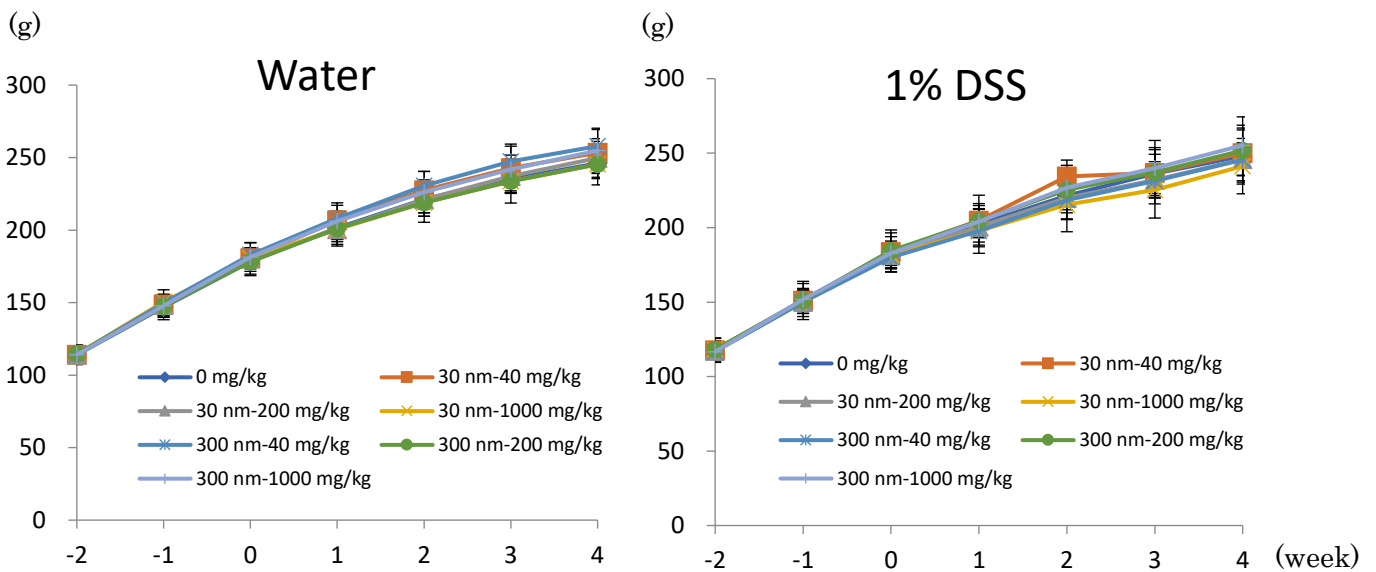


Figure 3-2. Body weight change of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

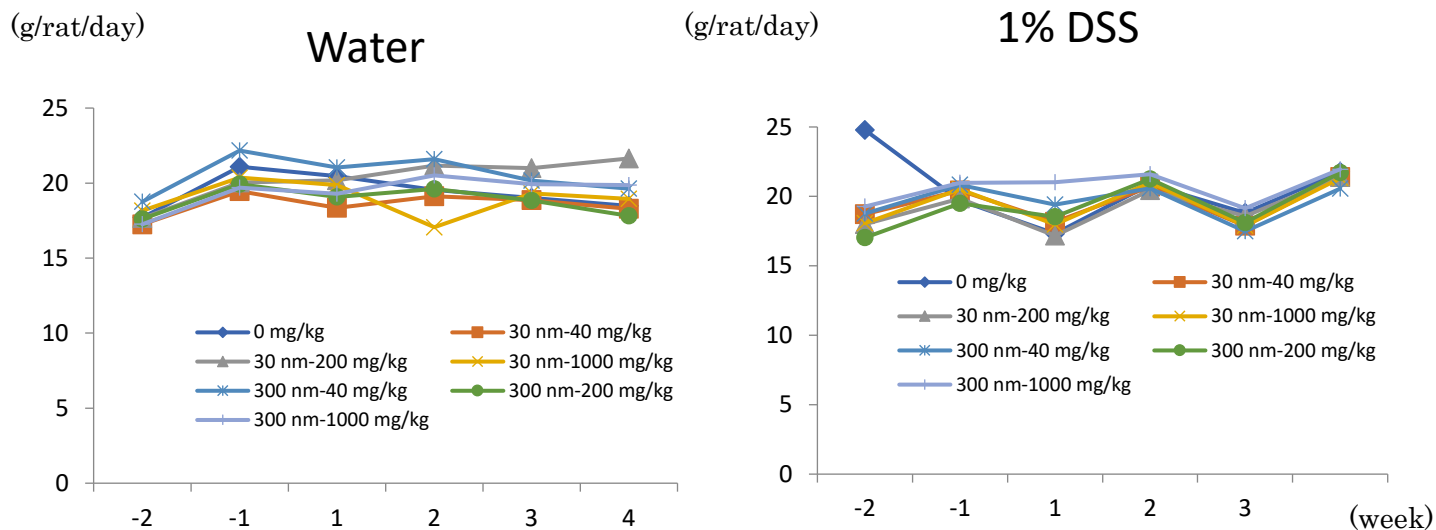


Figure 3-3. Water consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

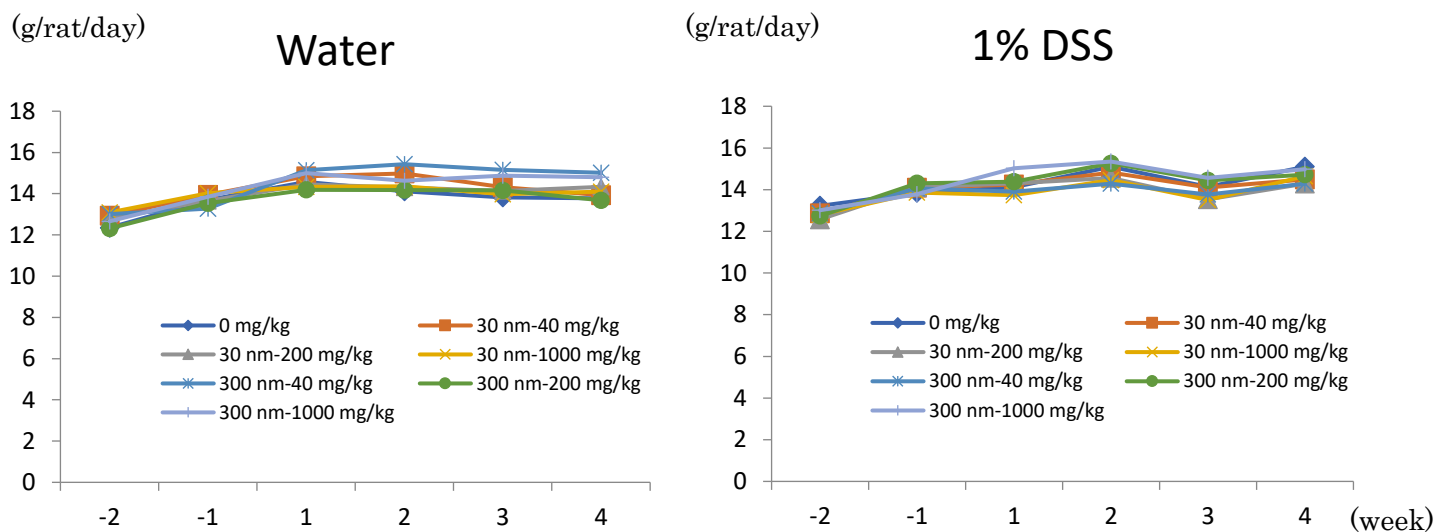
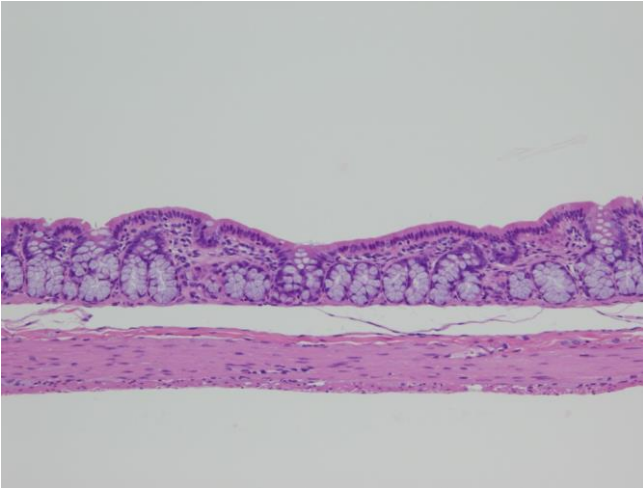
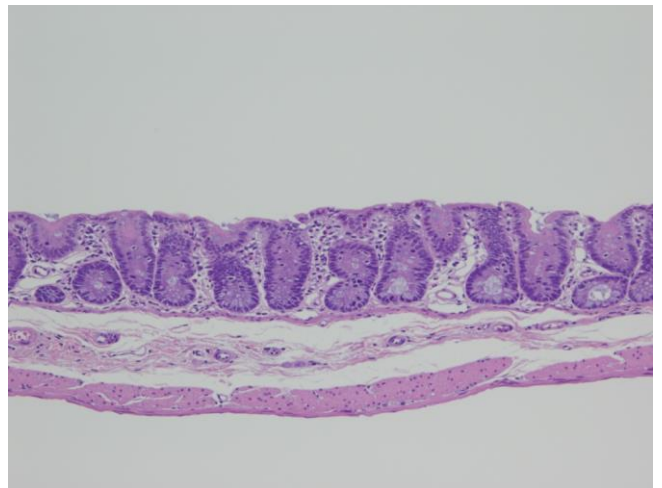


Figure 3-4. Food consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

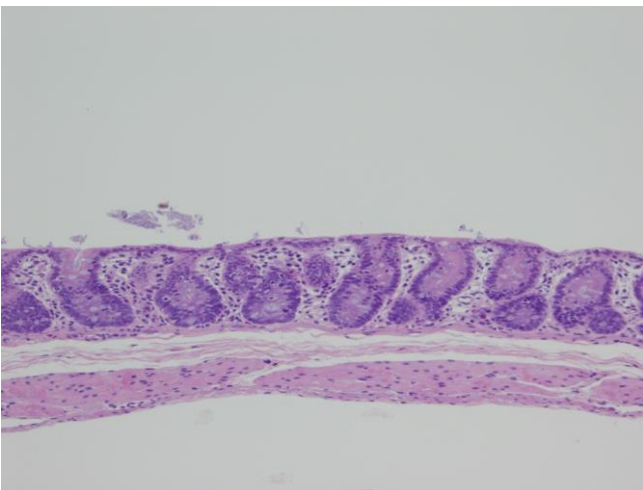
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

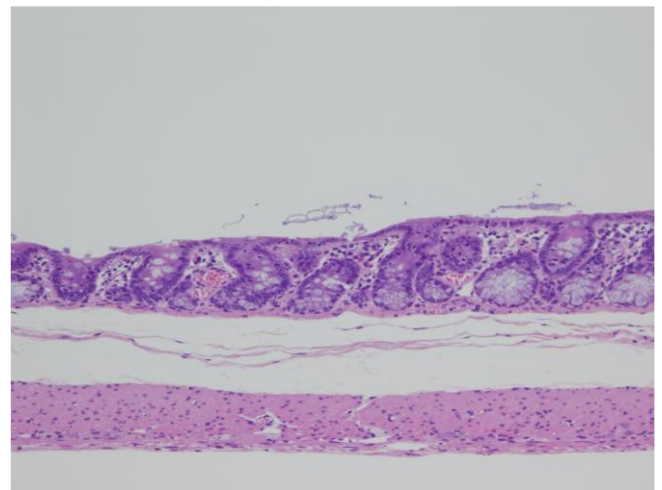
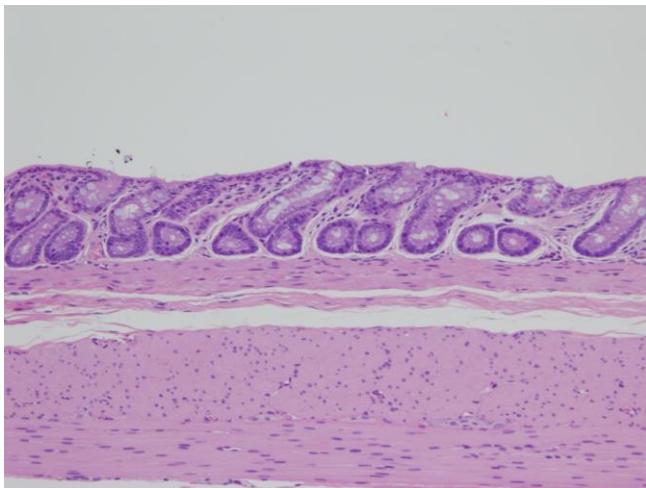
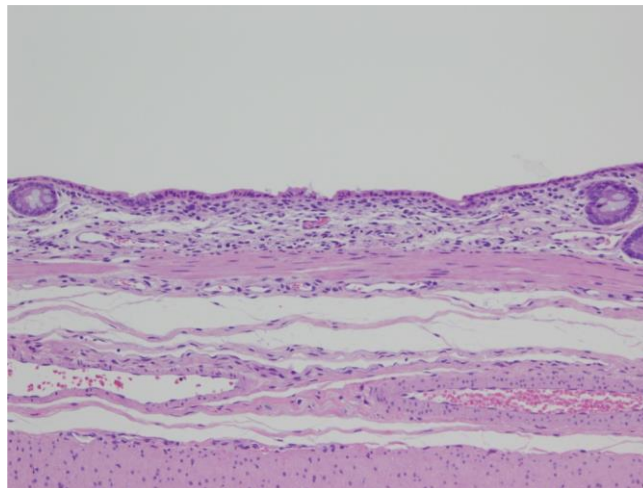


Figure 3-5. Representative histopathological finding in the colon of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration indicating crypts with increased number of cells showing decreased mucus production was observed in the mucosa of rats treated with DSS.

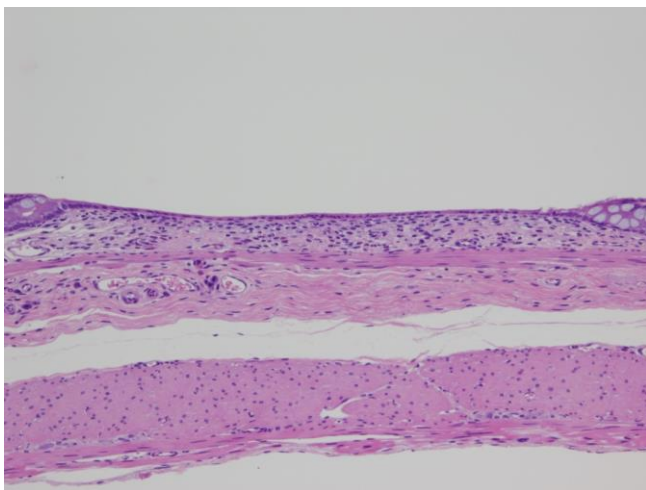
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

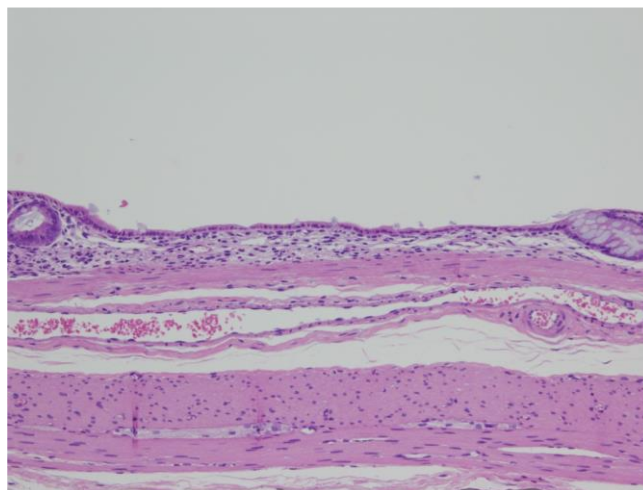
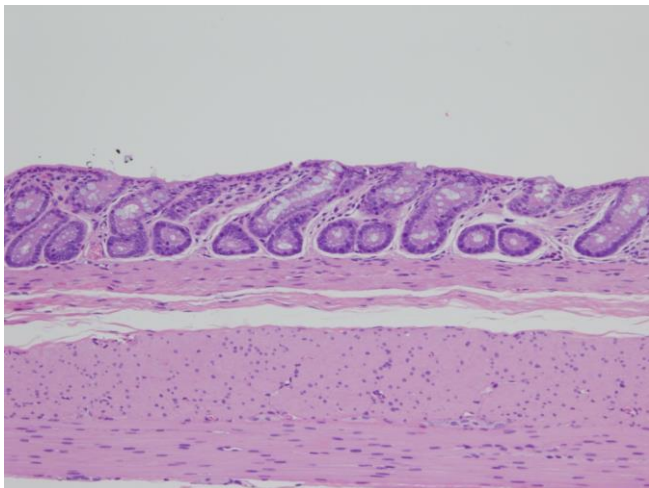
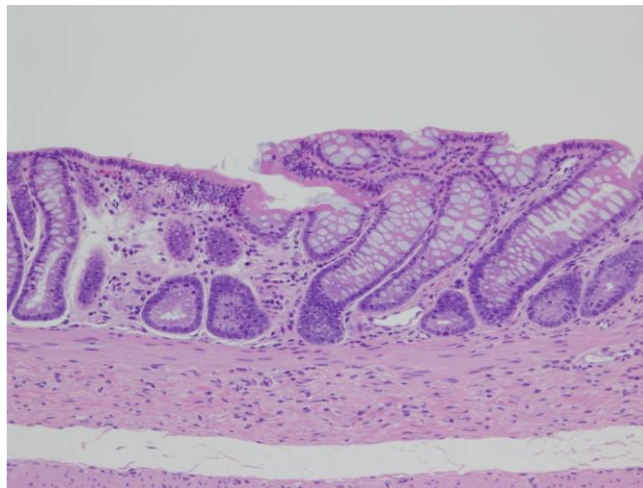


Figure 3-6. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration without crypts was observed in the mucosa of rats treated with DSS.

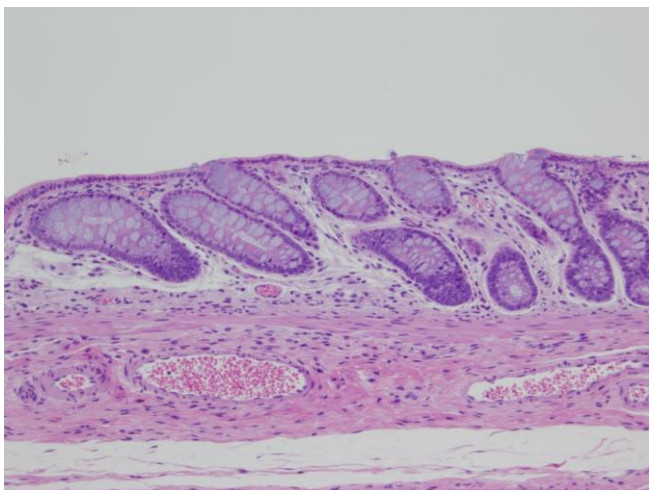
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

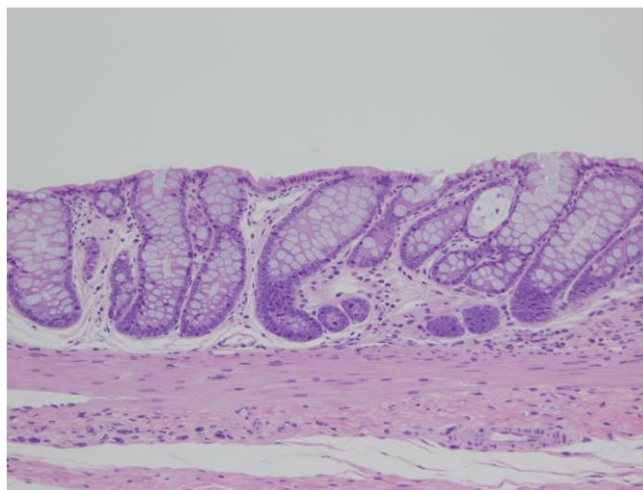
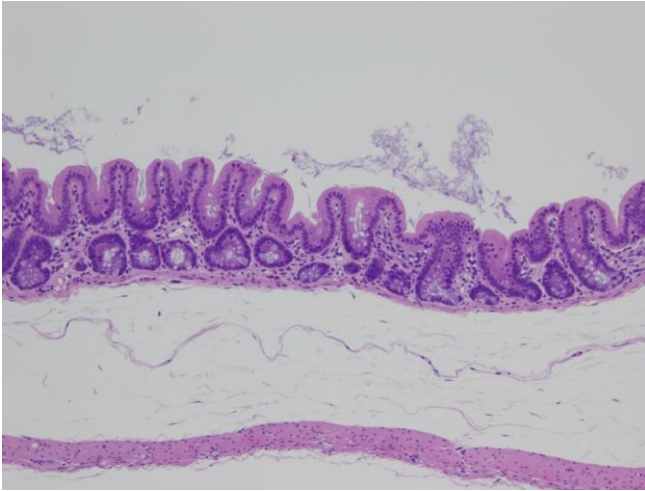
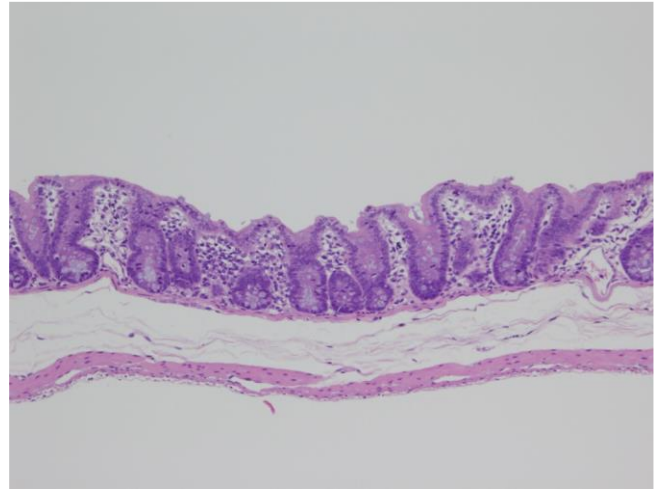


Figure 3-7. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild hyperplastic mucosal epithelium showing dilate crypts were observed in the mucosa of rats treated with DSS.

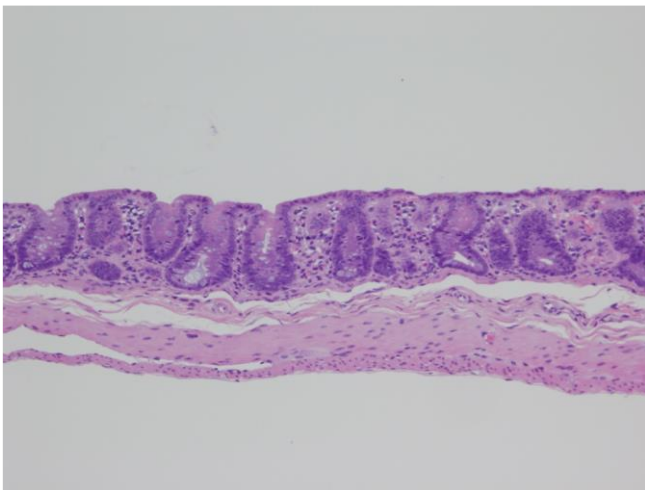
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

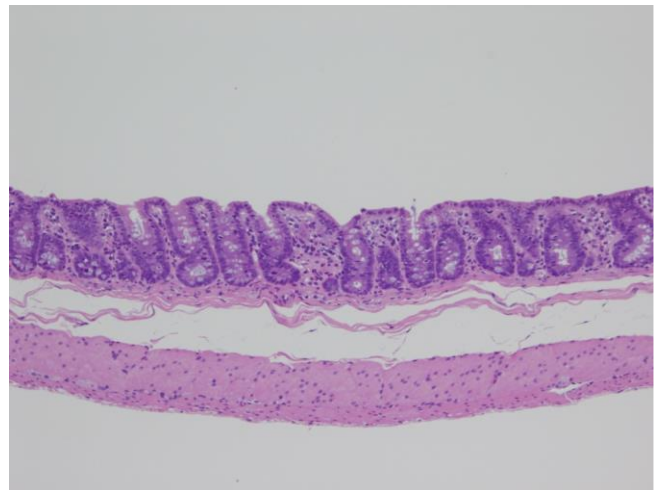


Figure 3-8. Representative histopathological finding in the cecum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal regeneration was observed in the mucosal epithelium of rats treated with DSS.

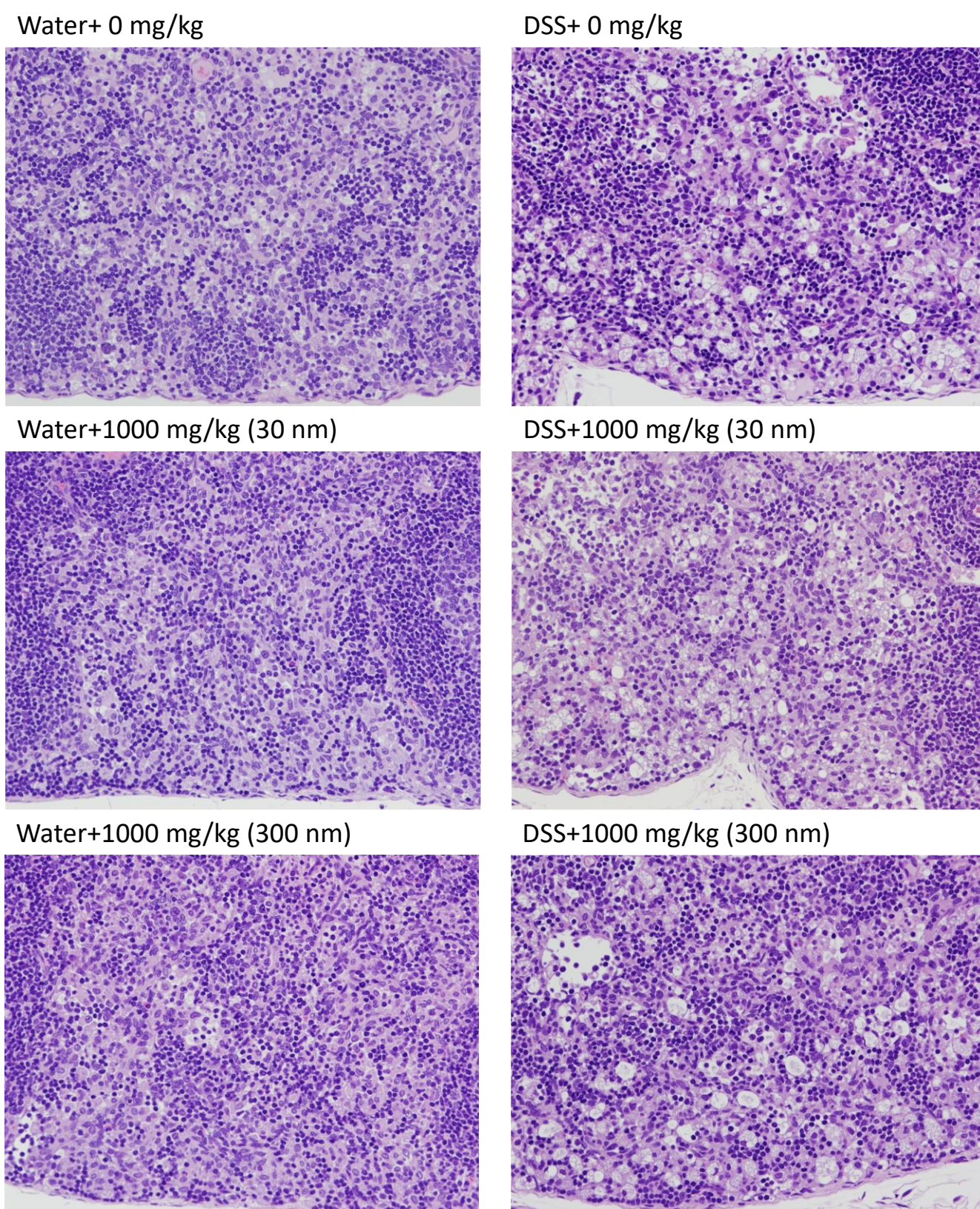
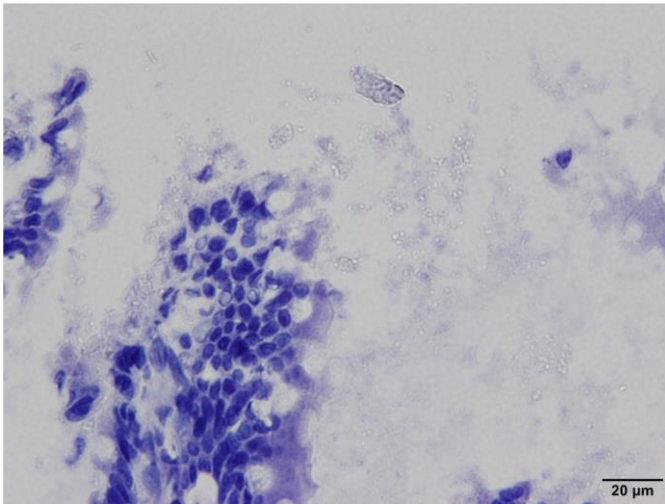


Figure 3-9. Representative histopathological finding in the mesentery lymph node of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild macrophage infiltration showing vacuolation was observed in rats treated with DSS.

Water+1000 mg/kg (30 nm)



Water+1000 mg/kg (300 nm)

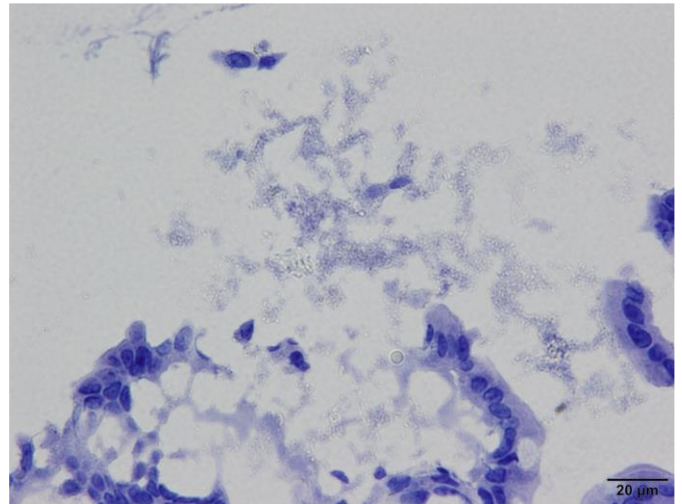


Figure 3-10. Representative histopathological observation of luminal materials in frozen section of the small intestine of rats administered 30 nm or 300 nm diameter polystyrene for 4 weeks. Translucent particles approximately less than 2 μm with smaller particle as their background were noticed in both group of rats, regardless of the size of the polystyrene administered.

Table 1. Final body weights and organ weights of F344 rats treated with polystyrene particles.

Sex	Male				
Dose (mg/kg b.w.)	Vehicle	0.03 μ m nano-polystyrene		0.3 μ m micro-polystyrene	
		200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.	200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.
Group	1	2	3	4	5
No. of animals	4	4	4	4	4
Body weight (g)	192.800 \pm 13.392	194.325 \pm 8.538	187.475 \pm 8.487	194.250 \pm 9.374	193.550 \pm 3.712
Absolute (g)					
Heart	0.673 \pm 0.061	0.664 \pm 0.046	0.644 \pm 0.042	0.686 \pm 0.036	0.659 \pm 0.034
Spleen	0.505 \pm 0.044	0.517 \pm 0.028	0.489 \pm 0.012	0.520 \pm 0.027	0.509 \pm 0.023
Liver	7.635 \pm 0.538	7.681 \pm 0.329	7.275 \pm 0.440	7.608 \pm 0.568	7.446 \pm 0.059
Kidneys	1.435 \pm 0.095	1.469 \pm 0.101	1.395 \pm 0.071	1.426 \pm 0.085	1.392 \pm 0.040
Relative (g%)					
Heart	0.349 \pm 0.014	0.341 \pm 0.009	0.344 \pm 0.018	0.353 \pm 0.016	0.341 \pm 0.015
Spleen	0.261 \pm 0.007	0.266 \pm 0.007	0.261 \pm 0.008	0.267 \pm 0.008	0.263 \pm 0.007
Liver	3.960 \pm 0.060	3.953 \pm 0.067	3.879 \pm 0.119	3.913 \pm 0.123	3.848 \pm 0.067
Kidneys	0.744 \pm 0.005	0.756 \pm 0.043	0.744 \pm 0.009	0.734 \pm 0.027	0.719 \pm 0.015

Sex	Female				
Dose (mg/kg b.w.)	Vehicle	0.03 μ m nano-polystyrene		0.3 μ m micro-polystyrene	
		200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.	200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.
Group	6	7	8	9	10
No. of animals	4	4	4	4	4
Body weight (g)	131.450 \pm 5.729	127.000 \pm 3.595	124.900 \pm 7.217	130.425 \pm 4.055	128.550 \pm 2.777
Absolute (g)					
Heart	0.475 \pm 0.031	0.467 \pm 0.024	0.471 \pm 0.039	0.477 \pm 0.018	0.474 \pm 0.029
Spleen	0.376 \pm 0.026	0.355 \pm 0.023	0.353 \pm 0.015	0.373 \pm 0.020	0.358 \pm 0.017
Liver	4.870 \pm 0.179	4.779 \pm 0.065	4.492 \pm 0.333 *	4.851 \pm 0.095	4.579 \pm 0.072
Kidneys	1.008 \pm 0.060	0.980 \pm 0.025	1.005 \pm 0.051	1.013 \pm 0.040	0.976 \pm 0.029
Relative (g%)					
Heart	0.362 \pm 0.060	0.368 \pm 0.025	0.377 \pm 0.019	0.366 \pm 0.003	0.369 \pm 0.029
Spleen	0.286 \pm 0.011	0.280 \pm 0.024	0.283 \pm 0.007	0.286 \pm 0.013	0.278 \pm 0.017
Liver	3.707 \pm 0.117	3.766 \pm 0.144	3.594 \pm 0.105	3.721 \pm 0.056	3.562 \pm 0.025
Kidneys	0.767 \pm 0.036	0.772 \pm 0.031	0.805 \pm 0.012	0.777 \pm 0.016	0.759 \pm 0.019

Values are means \pm standard deviation.

* Significantly different from the Vehicle group at $p < 0.05$

Table 2-1. Macroscopic observation of the rats treated with DSS

Findings	Duration Group	1 week*			2 weeks			3 weeks*			4 weeks			5 weeks*			6 weeks		
		0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS
	Number of animal	8	16	16	6	12	12	4	8	8	4	8	8	2	4	4	2	4	4
Dirt on the hair around the anus		0	8	9	0	3	8	0	5	0	0	4	5	0	1	0	0	4	4
Diarrhea		0	0	2	0	1	3	0	1	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0
Bloody diarrhea		0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	1	4	0	0	0

*: At the end of the period of DSS administration

Table 2-2. Microscopic observation in the rectum and colon of the rats treated with DSS

Organs	Findings	Duration Group	1 week*			2 weeks			4 weeks			6 weeks		
			0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS
		Number of animal	2	4	4	2	4	4	2	4	4	2	4	4
Rectum	Erosion/ulcer (1/2/3)		0	4 (3/1/0)	4 (1/1/2)	0	1 (1/0/0)	4 (2/1/1)	0	0 (0/0/0)	4 (1/3/0)	0	2 (2/0/0)	3 (1/2/0)
	Regeneration, mucosal epithelium (1/2/3/4)		0	4 (4/0/0/0)	4 (0/1/2/1)	0	4 (4/0/0/0)	4 (1/1/2/0)	0	4 (0/4/0/0)	4 (0/2/2/0)	0	4 (0/1/3/0)	4 (0/0/0/4)
Colon	Erosion/ulcer (1)		0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Regeneration, mucosal epithelium (1)		0	0	4	0	0	4	0	2	4	0	1	4

□ : No abnormalities detected, 1: Minimal (1-10 %), 2: Mild (11-25 %), 3: Moderate (26-50 %), 4: Severe (51< %)

*: At the end of the period of DSS administration

Table 3-1. General conditions of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

	Findings	Week	-2	-1	1	2	3	4
<i>Water</i>	Cumulated total No. of animals per week		35	35	35	35	35	35
	Types of drinking water		Water	Water	Water	Water	Water	Water
0 mg/kg	Loose stools		0	1	6	3	1	0
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
30 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	0	0	0	1	0
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
30 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	1	0	1	0	0
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
30 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	0	4	3	1	0
	Diarrhea		0	0	0	1	0	0
300 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	0	2	9	0	1
	Diarrhea		0	1	0	2	0	0
300 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	2	3	1	3	1
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
300 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	2	5	0	1	1
	Diarrhea		0	0	0	0	1	0
<i>DSS</i>	Cumulated total No. of animals per week		35	35	35	35	35	35
	Types of drinking water		DSS	Water	DSS	Water	DSS	Water
0 mg/kg	Loose stools		0	1	11	11	11	8
	Diarrhea		0	0	1	1	3	3
	Bloody stool		0	0	2	0	0	0
30 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	2	7	13	11	17
	Diarrhea		0	0	3	3	4	3
	Bloody stool		0	0	0	0	1	2
30 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	3	18	19	11	27
	Diarrhea		0	0	0	0	4	3
	Bloody stool		0	0	1	0	0	0
30 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	3	8	16	10	15
	Diarrhea		1	1	1	0	2	3
	Bloody stool		0	0	1	0	0	0
300 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	0	8	11	13	18
	Diarrhea		0	0	0	5	9	2
	Bloody stool		0	0	1	1	0	0
300 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	1	18	16	15	24
	Diarrhea		0	1	2	1	3	0
	Bloody stool		0	0	0	0	1	0
300 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	1	12	11	14	25
	Diarrhea		0	1	2	4	14	6
	Bloody stool		0	0	0	1	3	0

Table 3-2. Urinalysis data at week 4 in F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Parameter	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	<i>Water</i>							<i>DSS</i>						
		30 nm				300 nm			30 nm				300 nm		
		0	40	200	1000	40	200	1000	0	40	200	1000	40	200	1000
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Glucose	–	5	5	4	5	5	5	5	4	5	5	2	5	4	5
	±	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0
Protein	±	2	1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1
	1+	3	4	3	3	4	5	5	2	4	4	2	2	3	4
	2+	0	0	0	0	1	0	0	3	1	0	3	0	2	0
Bilirubin	–	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Urobilinogen	±	5	5	5	5	4	5	5	3	5	5	4	5	3	5
	1+	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	2	0
pH	6.5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	7	1	1	1	4	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1
	7.5	2	1	2	0	1	2	2	1	0	2	1	2	1	3
	8	2	3	2	0	4	3	3	4	4	1	0	2	4	1
	8.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Supacific grabvity	1.01	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	3	0	1
	1.015	2	2	1	2	1	2	2	0	0	2	1	2	1	3
	1.02	2	0	3	2	1	2	2	1	4	0	1	0	1	1
	1.025	1	2	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	1	0
	>1.03	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	3	0	2	0
Occult blood	–	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	±	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone body	–	5	5	4	3	5	5	3	0	1	3	0	5	1	4
	±	0	0	0	1	0	0	2	2	3	2	2	0	2	1
	1+	0	0	1	1	0	0	0	3	1	0	3	0	2	0
Nitrile	–	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Leukocytes	–	3	1	3	2	2	0	0	0	0	2	0	4	0	2
	25 /μl	1	3	1	3	2	2	3	0	2	2	1	1	1	2
	75 /μl	1	0	1	0	1	3	2	4	2	1	3	0	2	1

	250 / μ l	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2	0
Color	Colorless	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Light yellow	3	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	3	0	2
	Yellow	1	3	3	3	5	5	5	5	5	4	5	2	5	3
Turbidity	-	4	5	5	5	5	5	3	5	5	5	4	5	5	5
	\pm	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0

Table 3-3. Hematology data for F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Parameter	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	30 nm									300 nm											
		0			40			200			1000			40			200			1000		
<i>Water</i>																						
No. of animals		5			5			5			5			5			5			5		
RBC	($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.24	\pm	0.18	9.16	\pm	0.35	9.16	\pm	0.21	9.10	\pm	0.24	9.29	\pm	0.10	9.31	\pm	0.23	9.22	\pm	0.22
HGB	(g/dL)	15.6	\pm	0.4	15.5	\pm	0.6	15.6	\pm	0.3	15.3	\pm	0.4	15.6	\pm	0.3	15.7	\pm	0.4	15.6	\pm	0.4
HCT	(%)	45.8	\pm	1.2	45.6	\pm	1.9	45.5	\pm	1.0	45.1	\pm	1.3	45.8	\pm	0.8	46.2	\pm	1.4	45.8	\pm	1.6
MCV	(fL)	49.6	\pm	0.6	49.9	\pm	0.3	49.7	\pm	0.6	49.5	\pm	0.4	49.4	\pm	0.6	49.6	\pm	0.5	49.7	\pm	0.7
MCH	(pg)	16.9	\pm	0.2	16.9	\pm	0.1	17.0	\pm	0.2	16.9	\pm	0.1	16.8	\pm	0.3	16.9	\pm	0.1	16.9	\pm	0.2
MCHC	(g/dL)	34.1	\pm	0.4	34.0	\pm	0.2	34.3	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.0	\pm	0.4
RET	(%)	2.32	\pm	0.06	2.55	\pm	0.29	2.58	\pm	0.28	2.38	\pm	0.27	2.34	\pm	0.25	2.55	\pm	0.26	2.60	\pm	0.09
PLT	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	723.6	\pm	34.6	736.6	\pm	42.3	738.6	\pm	35.1	723.2	\pm	50.6	729.0	\pm	85.1	774.6	\pm	92.1	725.2	\pm	74.2
WBC	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.02	\pm	0.96	4.37	\pm	1.33	4.29	\pm	0.29	3.99	\pm	1.33	4.39	\pm	0.65	5.04	\pm	0.60	4.09	\pm	1.42
<i>Differential cell count</i>																						
Neutrophils	(%)	23.2	\pm	7.7	24.5	\pm	4.6	24.3	\pm	6.9	25.0	\pm	4.0	23.4	\pm	4.6	23.6	\pm	3.5	26.0	\pm	3.4
Lymphocytes	(%)	72.8	\pm	8.0	70.8	\pm	5.0	71.1	\pm	6.7	70.9	\pm	4.2	71.6	\pm	4.1	72.3	\pm	3.6	69.8	\pm	3.4
Momocytes	(%)	3.1	\pm	0.3	3.9	\pm	0.4	3.4	\pm	0.4	3.1	\pm	0.6	3.8	\pm	0.8	3.0	\pm	0.4	3.3	\pm	0.3
Eosinophils	(%)	0.7	\pm	0.3	0.6	\pm	0.2	0.8	\pm	0.1	0.9	\pm	0.3	0.9	\pm	0.2	0.8	\pm	0.2	0.7	\pm	0.2
Basophils	(%)	0.2	\pm	0.1	0.3	\pm	0.0	0.3	\pm	0.2	0.2	\pm	0.1	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.2
<i>DSS</i>																						
No. of animals		5			5			5			5			5			5			5		
RBC	($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.86	\pm	0.43	9.19	\pm	0.20	8.92	\pm	0.39	8.76	\pm	0.18	9.32	\pm	0.24	9.05	\pm	0.28	9.18	\pm	0.22
HGB	(g/dL)	14.9	\pm	0.6	15.4	\pm	0.3	15.1	\pm	0.7	14.8	\pm	0.4	15.7	\pm	0.4 [#]	15.3	\pm	0.4	15.4	\pm	0.3
HCT	(%)	44.0	\pm	2.1	45.5	\pm	1.0	44.5	\pm	2.2	43.5	\pm	1.3	46.2	\pm	1.4	44.7	\pm	1.3	45.6	\pm	1.0
MCV	(fL)	49.6	\pm	0.2	49.5	\pm	0.4	49.9	\pm	0.4	49.6	\pm	0.6	49.6	\pm	0.6	49.4	\pm	0.7	49.7	\pm	0.6
MCH	(pg)	16.9	\pm	0.2	16.8	\pm	0.1	16.9	\pm	0.1	16.9	\pm	0.2	16.9	\pm	0.2	16.9	\pm	0.3	16.8	\pm	0.2
MCHC	(g/dL)	34.0	\pm	0.3	34.0	\pm	0.3	33.9	\pm	0.2	34.1	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.1	\pm	0.2	33.9	\pm	0.1
RET	(%)	2.56	\pm	0.25	2.72	\pm	0.24	2.57	\pm	0.34	2.72	\pm	0.34	2.57	\pm	0.25	2.41	\pm	0.24	2.44	\pm	0.25

PLT	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	599.4	\pm	231.7	736.0	\pm	104.0	588.4	\pm	179.5	722.2	\pm	53.3	766.0	\pm	30.5	704.6	\pm	69.7	708.6	\pm	42.6
WBC	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3.93	\pm	1.15	4.09	\pm	0.54	3.30	\pm	1.11	4.61	\pm	1.40	4.83	\pm	0.67	3.60	\pm	0.95	5.24	\pm	0.89
Differential cell count																						
Neutrophils	(%)	29.0	\pm	5.7	26.5	\pm	2.3	26.4	\pm	4.6	27.6	\pm	9.3	24.9	\pm	4.9	25.6	\pm	6.0	23.2	\pm	3.8
Lymphocyte	(%)	66.1	\pm	6.3	68.9	\pm	2.2	68.4	\pm	5.4	67.6	\pm	9.6	71.1	\pm	5.0	69.6	\pm	7.1	72.3	\pm	5.2
Momocytes	(%)	3.4	\pm	0.8	3.4	\pm	0.3	3.6	\pm	1.0	3.2	\pm	0.5	3.0	\pm	0.6	3.3	\pm	0.5	3.1	\pm	0.8
Eosinophils	(%)	1.2	\pm	0.7	0.9	\pm	0.1	1.3	\pm	0.6	1.2	\pm	0.4	0.8	\pm	0.3	1.1	\pm	0.6	1.1	\pm	0.8
Basophils	(%)	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.2	0.3	\pm	0.1	0.2	\pm	0.1	0.4	\pm	0.3	0.2	\pm	0.0

Values are mean \pm S.D.

#: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$.

Table 3-4. Serum biochemistry data for F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Parameter	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	30 nm						300 nm							
		0		40		200		1000		40		200		1000	
<i>Water</i>															
No. of animals		5		5		5		5		5		5		5	
TP	(g/dL)	6.2 ± 0.1	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.1 ± 0.1
ALB	(g/dL)	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1
A/G		2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1
T-BIL	(mg/dL)	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
GLU	(mg/dL)	167.4 ± 12.4	147.6 ± 13.8	158.0 ± 11.1	147.8 ± 15.8	158.0 ± 11.1	147.8 ± 15.8	164.8 ± 13.1	154.0 ± 12.7	177.2 ± 23.3	154.0 ± 12.7	154.0 ± 12.7	177.2 ± 23.3	177.2 ± 23.3	177.2 ± 23.3
TG	(mg/dL)	54.2 ± 20.0	63.0 ± 15.2	56.6 ± 16.9	51.2 ± 14.6	56.6 ± 16.9	51.2 ± 14.6	52.4 ± 11.0	72.2 ± 24.4	80.2 ± 21.6	72.2 ± 24.4	72.2 ± 24.4	80.2 ± 21.6	80.2 ± 21.6	80.2 ± 21.6
T-CHO	(mg/dL)	56.6 ± 4.9	55.2 ± 2.4	54.2 ± 2.6	52.2 ± 4.7	54.2 ± 2.6	52.2 ± 4.7	57.4 ± 2.3	59.0 ± 6.2	54.8 ± 2.9	57.4 ± 2.3	59.0 ± 6.2	54.8 ± 2.9	54.8 ± 2.9	54.8 ± 2.9
BUN	(mg/dL)	21.1 ± 1.5	20.8 ± 2.3	21.0 ± 2.6	19.2 ± 1.8	21.0 ± 2.6	19.2 ± 1.8	20.9 ± 2.2	22.4 ± 1.9	21.6 ± 1.4	20.9 ± 2.2	22.4 ± 1.9	21.6 ± 1.4	21.6 ± 1.4	21.6 ± 1.4
CRE	(mg/dL)	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02
Na	(mEQ/L)	140.8 ± 0.8	141.0 ± 0.7	141.4 ± 0.5	141.0 ± 1.4	141.4 ± 0.5	141.0 ± 1.4	139.8 ± 0.8	141.8 ± 0.4	139.6 ± 0.7 [#]	139.8 ± 0.8	141.8 ± 0.4	139.6 ± 0.7 [#]	139.6 ± 0.7 [#]	139.6 ± 0.7 [#]
K	(mEQ/L)	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Cl	(mEQ/L)	101.2 ± 1.1	100.8 ± 1.8	101.4 ± 0.5	101.2 ± 1.1	101.4 ± 0.5	101.2 ± 1.1	100.8 ± 1.3	101.2 ± 1.3	99.8 ± 1.3	100.8 ± 1.3	101.2 ± 1.3	99.8 ± 1.3	99.8 ± 1.3	99.8 ± 1.3
Ca	(mg/dL)	10.2 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.5 ± 0.1	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.5 ± 0.1	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2
IP	(mg/dL)	6.7 ± 0.3	6.9 ± 0.4	7.1 ± 0.3	6.8 ± 0.4	7.1 ± 0.3	6.8 ± 0.4	6.8 ± 0.0	7.1 ± 0.5	6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.0	7.1 ± 0.5	6.7 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.7 ± 0.1
AST	(IU/L)	81.0 ± 8.0	85.6 ± 8.4	89.8 ± 10.5	88.8 ± 8.0	89.8 ± 10.5	88.8 ± 8.0	84.8 ± 10.8	78.8 ± 8.3	79.0 ± 7.3	84.8 ± 10.8	78.8 ± 8.3	79.0 ± 7.3	79.0 ± 7.3	79.0 ± 7.3
ALT	(IU/L)	39.2 ± 2.2	39.4 ± 5.0	43.6 ± 5.5	40.0 ± 4.1	43.6 ± 5.5	40.0 ± 4.1	48.2 ± 10.9	39.6 ± 2.1	38.0 ± 4.2	48.2 ± 10.9	39.6 ± 2.1	38.0 ± 4.2	38.0 ± 4.2	38.0 ± 4.2
ALP	(IU/L)	623.6 ± 57.4	633.8 ± 28.8	653.2 ± 40.3	606.6 ± 17.4	653.2 ± 40.3	606.6 ± 17.4	624.0 ± 37.4	645.8 ± 80.4	636.2 ± 38.4	624.0 ± 37.4	645.8 ± 80.4	636.2 ± 38.4	636.2 ± 38.4	636.2 ± 38.4
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
<i>DSS</i>															
No. of animals		5		5		5		5		5		5		5	
TP	(g/dL)	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.1	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.2 ^{**}	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.2 ^{**}	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2
ALB	(g/dL)	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1
A/G		2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2 ^{**}	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2 ^{**}	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2
T-BIL	(mg/dL)	0.03 ± 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 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01

GLU	(mg/dL)	173.0 ± 18.9	180.2 ± 11.9	193.0 ± 9.5	202.2 ± 21*	190.8 ± 45.0	175.4 ± 17.7	185.0 ± 21.8
TG	(mg/dL)	76.2 ± 14.1	74.2 ± 18.2	85.6 ± 12.4	68.0 ± 13.2	72.8 ± 24.3	78.4 ± 12.1	91.8 ± 18.3
T-CHO	(mg/dL)	58.6 ± 1.1	59.2 ± 5.8	56.6 ± 3.6	50.0 ± 4*	56.2 ± 8.6	57.4 ± 2.5	55.4 ± 2.2
BUN	(mg/dL)	22.8 ± 2.5	24.6 ± 2.2	23.7 ± 1.7	21.2 ± 2.3	23.3 ± 2.4	23.4 ± 3.4	23.3 ± 2.1
CRE	(mg/dL)	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.05
Na	(mEQ/L)	139.2 ± 0.8	140.0 ± 1.2	140.6 ± 0.9	139.6 ± 0.9	140.0 ± 1.6	140.8 ± 0.8	140.0 ± 0.7
K	(mEQ/L)	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.1
Cl	(mEQ/L)	101.0 ± 1.0	101.0 ± 1.0	101.8 ± 0.8	100.6 ± 1.1	100.8 ± 1.3	101.2 ± 0.4	101.4 ± 0.9
Ca	(mg/dL)	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.4	10.3 ± 0.2	10.3 ± 0.3
IP	(mg/dL)	6.5 ± 0.6	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.3	6.6 ± 0.5	6.5 ± 0.2	6.9 ± 0.2	6.9 ± 0.7
AST	(IU/L)	74.2 ± 14.5	82.4 ± 9.4	69.4 ± 4.5	67.8 ± 12.1	72.4 ± 7.6	77.0 ± 8.0	77.0 ± 8.6
ALT	(IU/L)	41.8 ± 4.8	43.0 ± 2.8	39.2 ± 3.3	36.4 ± 5.6	38.4 ± 3.8	40.8 ± 3.5	41.0 ± 6.3
ALP	(IU/L)	614.4 ± 66.5	604.8 ± 32.3	584.4 ± 61.2	572.0 ± 63.8	593.8 ± 56.2	620.0 ± 45.4	587.4 ± 38.3
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Values are mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively/

#: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$

Table 3-5. Organ weights of F344 male rats treated with polystyrene for 28 days.

Particle size	30 nm						300 nm							
	0		40		200		1000		40		200		1000	
<i>Water</i>														
No. of animals	5		5		5		5		5		5		5	
Body weight (g)	231.9	± 6.9	241.3	± 9.1	235.6	± 12.4	232.7	± 9.1	245.8	± 10.9	231.4	± 14.2	240.7	± 15.9
Absolute (g)														
Brain	1.811	± 0.013	1.885	± 0.043*	1.855	± 0.055	1.855	± 0.033	1.864	± 0.059	1.825	± 0.032	1.871	± 0.032
Thymus	0.228	± 0.018	0.238	± 0.007	0.239	± 0.039	0.252	± 0.037	0.255	± 0.028	0.246	± 0.028	0.228	± 0.016
Lungs	0.803	± 0.015	0.798	± 0.039	0.821	± 0.068	0.787	± 0.007	0.863	± 0.065	0.798	± 0.031	0.844	± 0.053
Heart	0.731	± 0.057	0.773	± 0.042	0.751	± 0.030	0.740	± 0.042	0.777	± 0.048	0.741	± 0.043	0.744	± 0.044
Spleen	0.515	± 0.038	0.538	± 0.034	0.524	± 0.039	0.502	± 0.014	0.555	± 0.056	0.491	± 0.025	0.529	± 0.042
Liver	5.903	± 0.288	6.152	± 0.301	6.050	± 0.400	5.877	± 0.442	6.360	± 0.358	6.019	± 0.681	6.309	± 0.531
Adrenals	0.0433	± 0.0033	0.0389	± 0.0042	0.0402	± 0.0041	0.0392	± 0.0031	0.0380	± 0.0042	0.0389	± 0.0056	0.0423	± 0.0030
Kidneys	1.474	± 0.083	1.535	± 0.045	1.486	± 0.103	1.534	± 0.079	1.581	± 0.066	1.428	± 0.098	1.525	± 0.099
Testes	2.798	± 0.110	2.834	± 0.173	2.899	± 0.167	2.828	± 0.050	2.827	± 0.170	2.721	± 0.116	2.931	± 0.177
Pituitary	0.0080	± 0.0006	0.0083	± 0.0007	0.0078	± 0.0003	0.0081	± 0.0003	0.0078	± 0.0006	0.0077	± 0.0004	0.0081	± 0.0011
Thyroid	0.0134	± 0.0010	0.0141	± 0.0141	0.0137	± 0.0015	0.0146	± 0.0010	0.0154	± 0.0008 ^{##}	0.0135	± 0.0012	0.0143	± 0.0009
Salivary gland	0.407	± 0.050	0.463	± 0.029	0.413	± 0.030	0.431	± 0.029	0.445	± 0.037	0.399	± 0.035	0.450	± 0.025
Seminal vesicle	0.685	± 0.137	0.744	± 0.029	0.744	± 0.043	0.740	± 0.110	0.782	± 0.132	0.622	± 0.103	0.731	± 0.078
Prostate	0.568	± 0.051	0.577	± 0.032	0.525	± 0.053	0.578	± 0.056	0.555	± 0.087	0.516	± 0.062	0.554	± 0.066
Relative (g%)														
Brain	0.781	± 0.022	0.782	± 0.038	0.788	± 0.022	0.798	± 0.019	0.759	± 0.032	0.791	± 0.039	0.780	± 0.047
Thymus	0.098	± 0.005	0.099	± 0.005	0.101	± 0.013	0.108	± 0.012	0.104	± 0.008	0.106	± 0.010	0.095	± 0.010
Lungs	0.347	± 0.015	0.331	± 0.023	0.349	± 0.024	0.338	± 0.014	0.351	± 0.014	0.346	± 0.017	0.351	± 0.011
Heart	0.315	± 0.016	0.320	± 0.009	0.319	± 0.013	0.318	± 0.018	0.316	± 0.009	0.320	± 0.007	0.309	± 0.011
Spleen	0.222	± 0.011	0.223	± 0.013	0.223	± 0.014	0.216	± 0.004	0.226	± 0.018	0.213	± 0.013	0.220	± 0.018
Liver	2.545	± 0.053	2.550	± 0.069	2.566	± 0.057	2.523	± 0.101	2.587	± 0.080	2.595	± 0.136	2.618	± 0.058
Adrenals	0.0186	± 0.0011	0.0162	± 0.0019	0.0171	± 0.0018	0.0169	± 0.0019	0.0155	± 0.0017 [#]	0.0167	± 0.0014	0.0176	± 0.0019
Kidneys	0.635	± 0.029	0.637	± 0.017	0.630	± 0.023	0.659	± 0.026	0.644	± 0.021	0.617	± 0.008	0.634	± 0.015

Testes	1.208 ± 0.072	1.174 ± 0.048	1.231 ± 0.045	1.217 ± 0.051	1.150 ± 0.049	1.178 ± 0.047	1.218 ± 0.042
Pituitary	0.0035 ± 0.0002	0.0034 ± 0.0003	0.0033 ± 0.0001	0.0035 ± 0.0001	0.0032 ± 0.0002	0.0033 ± 0.0002	0.0034 ± 0.0003
Thyroid	0.0058 ± 0.0005	0.0058 ± 0.0005	0.0058 ± 0.0004	0.0063 ± 0.0004	0.0063 ± 0.0001	0.0058 ± 0.0003	0.0060 ± 0.0003
Salivary gland	0.175 ± 0.022	0.192 ± 0.013	0.175 ± 0.006	0.185 ± 0.006	0.181 ± 0.009	0.173 ± 0.013	0.187 ± 0.006
Seminal vesicle	0.295 ± 0.058	0.309 ± 0.010	0.316 ± 0.025	0.320 ± 0.060	0.317 ± 0.046	0.268 ± 0.033	0.303 ± 0.016
Prostate	0.245 ± 0.023	0.239 ± 0.016	0.224 ± 0.028	0.249 ± 0.030	0.225 ± 0.030	0.223 ± 0.019	0.230 ± 0.018

DSS

No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	239.4 ± 16.9	237.9 ± 17.7	236.2 ± 9.6	230.3 ± 18.3	233.7 ± 8.4	241.0 ± 21.4	244.1 ± 9.9
Absolute (g)							
Brain	1.829 ± 0.045	1.826 ± 0.034	1.837 ± 0.028	1.808 ± 0.074	1.823 ± 0.035	1.857 ± 0.076	1.832 ± 0.041
Thymus	0.243 ± 0.037	0.247 ± 0.053	0.240 ± 0.009	0.231 ± 0.044	0.232 ± 0.018	0.248 ± 0.048	0.237 ± 0.016
Lungs	0.774 ± 0.053	0.779 ± 0.067	0.750 ± 0.060	0.791 ± 0.076	0.820 ± 0.092 ⁽⁴⁾	0.829 ± 0.091	0.796 ± 0.040
Heart	0.732 ± 0.058	0.731 ± 0.071	0.735 ± 0.045	0.737 ± 0.032	0.730 ± 0.027	0.758 ± 0.061	0.752 ± 0.048
Spleen	0.536 ± 0.038	0.506 ± 0.046	0.521 ± 0.031	0.527 ± 0.029	0.517 ± 0.030	0.525 ± 0.045	0.537 ± 0.055
Liver	6.395 ± 0.380	6.429 ± 0.749	6.352 ± 0.379	6.216 ± 0.498	6.120 ± 0.345	6.383 ± 0.628	6.451 ± 0.428
Adrenals	0.0405 ± 0.0039	0.0448 ± 0.0076	0.0397 ± 0.0026	0.0433 ± 0.0033	0.0411 ± 0.0038	0.0414 ± 0.0026	0.0424 ± 0.0031
Kidneys	1.531 ± 0.144	1.524 ± 0.147	1.514 ± 0.052	1.550 ± 0.108	1.494 ± 0.038	1.510 ± 0.131	1.527 ± 0.077
Testes	2.845 ± 0.218	2.786 ± 0.091	2.807 ± 0.113	2.745 ± 0.216	2.846 ± 0.196	2.887 ± 0.172	2.846 ± 0.103
Pituitary	0.0079 ± 0.0009	0.0083 ± 0.0008	0.0086 ± 0.0004	0.0088 ± 0.0011	0.0090 ± 0.0013	0.0085 ± 0.0008	0.0078 ± 0.0005
Thyroid	0.0139 ± 0.0021	0.0137 ± 0.0013	0.0134 ± 0.0009	0.0133 ± 0.0027	0.0138 ± 0.0003	0.0156 ± 0.0018	0.0148 ± 0.0012
Salivary gland	0.425 ± 0.032	0.430 ± 0.023	0.452 ± 0.037	0.422 ± 0.025	0.431 ± 0.037	0.436 ± 0.041	0.421 ± 0.026
Seminal vesicle	0.751 ± 0.114	0.717 ± 0.062	0.678 ± 0.093	0.756 ± 0.114 ⁽⁴⁾	0.798 ± 0.085	0.672 ± 0.097	0.742 ± 0.112
Prostate	0.539 ± 0.096	0.483 ± 0.033	0.496 ± 0.076	0.523 ± 0.059 ⁽⁴⁾	0.522 ± 0.046	0.467 ± 0.051	0.504 ± 0.066
Relative (g%)							
Brain	0.766 ± 0.048	0.771 ± 0.047	0.779 ± 0.034	0.787 ± 0.034	0.781 ± 0.034	0.773 ± 0.037	0.751 ± 0.024
Thymus	0.102 ± 0.016	0.103 ± 0.015	0.102 ± 0.004	0.100 ± 0.013	0.099 ± 0.005	0.102 ± 0.012	0.097 ± 0.004
Lungs	0.324 ± 0.012	0.328 ± 0.023	0.317 ± 0.016	0.344 ± 0.027	0.353 ± 0.032 ⁽⁴⁾	0.344 ± 0.018	0.326 ± 0.011
Heart	0.306 ± 0.015	0.307 ± 0.015	0.311 ± 0.013	0.321 ± 0.015	0.312 ± 0.006	0.315 ± 0.014	0.308 ± 0.009

Spleen	0.224 ± 0.011	0.213 ± 0.012	0.220 ± 0.007	0.230 ± 0.018	0.221 ± 0.009	0.218 ± 0.006	0.220 ± 0.017
Liver	2.673 ± 0.070	2.696 ± 0.121	2.689 ± 0.081	2.700 ± 0.026	2.618 ± 0.081	2.648 ± 0.101	2.641 ± 0.078
Adrenals	0.0169 ± 0.0006	0.0190 ± 0.0044	0.0168 ± 0.0013	0.0190 ± 0.0027	0.0176 ± 0.0020	0.0173 ± 0.0020	0.0174 ± 0.0012
Kidneys	0.639 ± 0.030	0.640 ± 0.031	0.641 ± 0.015	0.674 ± 0.021	0.640 ± 0.027	0.627 ± 0.021	0.626 ± 0.015
Testes	1.188 ± 0.016	1.174 ± 0.057	1.190 ± 0.067	1.193 ± 0.052	1.220 ± 0.110	1.202 ± 0.083	1.167 ± 0.053
Pituitary	0.0035 ± 0.0001	0.0035 ± 0.0003	0.0036 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0004	0.0039 ± 0.0006	0.0035 ± 0.0002	0.0032 ± 0.0003
Thyroid	0.0058 ± 0.0007	0.0057 ± 0.0003	0.0057 ± 0.0004	0.0058 ± 0.0009	0.0059 ± 0.0003	0.0065 ± 0.0004	0.0061 ± 0.0005
Salivary gland	0.178 ± 0.012	0.181 ± 0.010	0.191 ± 0.013	0.184 ± 0.012	0.185 ± 0.019	0.181 ± 0.013	0.172 ± 0.012
Seminal vesicle	0.313 ± 0.039	0.303 ± 0.035	0.287 ± 0.033	0.336 ± 0.038 ⁽⁴⁾	0.342 ± 0.040	0.279 ± 0.033	0.304 ± 0.045
Prostate	0.225 ± 0.035	0.204 ± 0.023	0.210 ± 0.029	0.233 ± 0.022 ⁽⁴⁾	0.223 ± 0.016	0.196 ± 0.034	0.206 ± 0.023

Values are mean±S.D.

*: Significantly different from the 0 mg/kg BW/day group at $p < 0.05$.

#, ##: Significantly different from the 0 mg/kg BW/day group at $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

Table 3-6. Histopathological findings in the colon and rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Organ	Finding	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	30 nm				300 nm		
			0	40	200	1000	40	200	1000
<i>Water</i>									
	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
	Colon		0	0	0	0	0	0	0
	Rectum		0	0	0	0	0	0	0
<i>DSS</i>									
	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
	Colon	Erosion/ulcer	0	0	0	0	0	0	0
		Regeneration, mucosal epithelium (±/+/+/+/+++)	3 (3/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	2 (2/0/0/0)
	Rectum	Erosion/ulcer (±/+/+/+/+++)	4 (4/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	4 (4/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	5 (5/0/0/0)
		Regeneration, mucosal epithelium (±/+/+/+/+++)	5 (0/0/3/2)	5 (0/0/5/0)	5 (0/0/3/2)	5 (0/0/3/2)	5 (0/0/3/2)	5 (0/0/4/1)	5 (0/0/3/2)
		Hyperplasia, mucosal epithelium (±/+/+/+/+++)	5 (2/3/0/0)	5 (1/4/0/0)	5 (3/2/0/0)	5 (3/2/0/0)	5 (1/4/0/0)	5 (2/3/0/0)	5 (2/3/0/0)

±:minimal, +:mild, ++:moderate, +++:severe

Table 3-7. Histopathological findings other than the colon and rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Organ	Finding	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	Water		DSS			
			0	30 nm 1000	300 nm 1000	0	30 nm 1000	300 nm 1000
No. of animals ^a			5	5	5	5	5	5
Heart	Infiltration, mononuclear cell, myocardium, focal (±)		1	0	2	0	0	1
Spleen			0	0	0	0	0	0
Submandibular lymph node			0	0	0	0	0	0
Mesenteric lymph node	Vacuolation, macrophage (±/+)		0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	5 (2/3)	5 (2/3)	5 (1/4)
Mediastinal lymph node			0/2	0/1	0/3	0/2	0/2	0/4
Thymus			0	0	0	0	0	0
Pituitary gland			0	0	0	0	0	0
Thyroid gland			0	0	0	0	0	0
Parathyroid gland			0	0	0	0	0	0
Adrenal gland			0	0	0	0	0	0
Nasal cavity	Inflammation, acute (±/+)		0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	2 (1/1)	1 (1/0)
	Metaplasia, squamous cell, transitional epithelium (±)		0	0	0	0	2	0
Trachea			0	0	0	0	0	0
Lung	Hemorrhage, alveoli, focal (±)		0	0	1	0	1	0
Tongue			0	0	0	0	0	0
Submandibular gland			0	0	0	0	0	0
Sublingual gland			0	0/4	0/3	0/3	0/5	0/3
Parotid gland			0	0	0	0	0	0/3
Esophagus			0	0	0	0/4	0/5	0/3
Stomach			0	0	0	0	0	0
Duodenum			0	0	0	0	0	0
Jejunum			0	0	0	0	0	0
Ileum			0	0	0	0	0	0
Cecum	Regeneration, mucosal epithelium (±)		0	0	0	4	3	3
Liver			0	0	0	0	0	0
Pancreas			0	0	0	0	0	0
Kidney	Mineralization, collecting ducts (±)		0	0	0	1	0	0
Urinary bladder			0	0	0	0	0/4	0
Testis			0	0	0	0	0	0
Epididymis			0	0	0	0	0	0
Prostate	Infiltration, monocuclear cell, interstitial (±)		1	1	0	1	2/4	0
Seminal vesicle			0	0	0	0	0/4	0
Mammary gland			0	0	0	0	0	0
Cerebrum			0	0	0	0	0	0
Cerebellum			0	0	0	0	0	0
Spinal cord			0	0	0	0	0	0
Trigeminal nerve			0	0	0	0	0	0
Sciatic nerve			0	0	0	0	0	0
Aorta			0	0	0	0	0	0
Eye			0	0	0	0	0	0
Harderian gland			0	0	0	0	0	0
Skin			0	0	0	0	0	0
Sternum			0	0	0	0	0	0
Femur			0	0	0	0	0	0
Skeletal muscle			0	0	0	0	0	0
Zymbal's gland			0	0	0	0	0	0

^a:The number of samples for exceptional cases were indicated as denominator.

±:minimal, +:mild

腸管粘膜バリア破綻条件下での高分子化合物の
経口暴露による毒性影響の解明

総合分担報告書

腸炎モデルラットにおける高分子化合物ポリスチレンの28日間反復投与実験

研究代表者： 松下 幸平（国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官）

研究要旨

近年、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物、砂糖、食塩やビール等の食品類から検出されることが報告されている。しかしながら、これまでの高分子化合物に関する毒性研究は主に水生生物を用いたものであり、動物を用いた研究は非常に少ない。一方、腸管は粘液や上皮細胞から構成される“粘膜バリア”で保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物や金属等の粒子状物質が体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に、ナノマテリアルの一つであるナノシリカ（一次粒径0.1 μm 以下のシリカ）の実験動物を用いた研究では、静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているもの（*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492）、強制経口投与では2000 mg/kg 体重の投与量で90日間の毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったと報告されている。（*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78）。しかしながら、ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症が存在することは稀ではなく、そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、明確な評価に足るデータは乏しいものの、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて、健常ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・検証し、腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が、経口暴露された高分子化合物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを明らかにすることを目的とした。

初年度は高分子化合物 PS 粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の用量設定を行うため、粒径 30nm または 300nm の PS 粒子を F344 ラットに単回強制経口投与した。各種解析の結果、今後実施する反復経口投与実験では、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日とする方針を定めた。

次年度は、F344 ラットに持続的に大腸炎を誘発する条件設定のため、DSS を 1 週おきに 6 週間 1% または 2% の濃度で飲料水投与し、実験開始 1 週後、2 週後、4 週後および 6 週後と経時的に大腸の炎症所見を評価した。その結果、入手した分子量 36-50 kDa の DSS を用いた場合、1% の濃度での F344 ラットへの飲料水投与によって、重篤な血便までは観察されず、結腸及び直腸にびらん/潰瘍並びに上皮の再生性変化を伴う適切な大腸炎を誘発すること、1 週間の休薬でも炎症所見が持続していることが確認された。

最終年度は、それまでに得られたデータに基づき、飲料水として調整水を継続的に与えた健常ラット及び 1% DSS 水を 1 週おきに与えた腸炎ラットにおいて、2 サイクル目より PS 粒子を強制経口投与する 28 日間反復投与毒性試験を実施した。投与時の PS は、想定通りにナノサイズ及びマイクロサイズに分散していることが確認され、反復経口投与試験として適切と考えられた。経過中死亡動物は見られず、体重、飲水量、摂餌量に有意な変化は見られなかった。一般状態において、DSS 水群では調整水群よりも軟便及び下痢が頻回観察され、出血性下痢も一部の動物に認められたものの、PS 投与による増強は認めず、行動異常も見られなかった。尿検査、血液学的検査、血清生化学検査及び臓器重量においても、PS 投与による影響は認めなかった。また、全身諸臓器の病理組織学的検査においても PS 投与による毒性影響は認められなかった（分担研究者：赤根担当）。

以上の結果から、ラットを用いた 28 日間反復経口投与の結果からは、健常動物のみならず、大腸炎存在下においても、粒径 30 nm 及び 300 nm の PS そのものは、1000 mg/kg 体重/日までの経口暴露による毒性影響はないと考えられた。

A. 研究目的

近年、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物、砂糖、食塩やビール等の食品類から検出されることが報告されている。しかしながら、これまでの高分子化合物に関する毒性研究は主に水生生物を用いたものであり、動物を用いた研究は非常に少ない。

一方、腸管は粘液や上皮細胞から構成される“粘膜バリア”で保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物や金属等の粒子状物質が体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に、ナノマテリアルの一つであるナノシリカ（一次粒径 0.1 μm 以下のシリカ）の実験動物を用いた研究では、静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているものの (*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492), 強制経口投与では 2000 mg/kg 体重の投与量で 90 日間の毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったと報告されている (*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78)。しかしながら、ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症が存在することは稀ではなく、そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、明確な評価に足るデータは乏しいものの、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。

本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて、健常ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・検証し、腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が、経口暴露された高分子化合物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

被験物質として Thermo Fisher Scientific より平均一次粒径 30 nm 及び 300 nm の PS 粒子懸濁液を購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55 \pm 5%、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物実験では、6 週齢の雌雄 F344 ラット各群 4 匹に、粒径 30 nm または 300 nm の PS 粒子を 200 または 1000 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与し、

対照群には蒸留水を同様に投与した。投与後 14 日間は一般状態を観察するとともに、体重及び摂餌量測定を行い、投与後 15 日目にイソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。剖検時に全身臓器の肉眼観察を行うとともに、肝臓、腎臓、脾臓及び心臓を摘出し、重量測定を実施した。

B-2. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定-持続投与

ラットに持続的な腸炎を誘発できる DSS の投与濃度を決定するための予備試験として、DSS を 1 週おきに 6 週間 1%または 2%の濃度で飲料水投与し、経時的に大腸の炎症所見を評価した。DSS は、MP Biomedicals の製造ロット番号 S2187（分子量 36-50 kDa）を使用した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55 \pm 5%、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物試験では、6 週齢の雄性 F344 ラットを平均体重が均一となるように対照群 8 匹、1%及び 2%DSS 群各 16 匹割り付けた。DSS 投与群には DSS を 1 または 2%の濃度で 1 週間飲料水に混じて自由摂取させ、次の 1 週間は通常の水道を摂取させるサイクルを 3 回繰り返した。投与期間中は一般状態及び便性状を観察するとともに、体重及び飲水量測定を実施した。実験開始 1 週後、2 週後、4 週後および 6 週後に対照群は 2 匹ずつ、DSS 投与群は 4 匹ずつイソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より放血安楽殺した。剖検時に大腸を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 染色標本作製して病理組織学的検査を行った。

B-3. 健常ラット及び大腸炎ラットにおけるナノ/マイクロポリスチレンの 28 日間反復投与毒性試験

これまでに得られたデータに基づき、飲料水として調整水を継続的に与えた健常ラット及び 1% DSS 水を 1 週おきに与えた腸炎ラットにおいて、2 サイクル目より PS 粒子を強制経口投与する 28 日間反復投与毒性試験を実施した。

PS は、Thermo 社の 5000 シリーズポリマー粒子懸濁液の 30 nm(#5003B)及び 300 nm(#5030B) の 2 サイズを選定し、40, 200 及び 1000 mg/kg 体重/日の用量に蒸留水で調整して投与した。PS の分散につ

いては、動的光散乱光度計（大塚電子株式会社）を用いて測定した。DSS は、MP Biomedicals の製造ロット番号 S2187（分子量 36-50 kDa）を使用した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1 週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24±1°C、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物試験では、6 週齢の雄性 F344 ラット計 70 匹を平均体重が均一となるように各群 5 匹ずつ 14 群に割り付けた。飲料水として調整水を投与する健常群及び 1%DSS の間欠投与で大腸炎を誘発させる大腸炎群を設定した。DSS 投与群には DSS を 1% の濃度で 1 週間飲料水に混じて自由摂取させ、次の 1 週間は調整水を摂取させるサイクルを 3 回繰り返した。2 週目からは 30 nm 及び 300 nm の PS をそれぞれ 40, 200 及び 1000 mg/kg 体重/日の用量で、プラスチック製ディスポーザブル経口ゾンデを用いて 10 ml/kg 体重の容量で 28 日間強制経口投与した。対照群には溶媒の蒸留水を等量経口投与した。投与量は直近の体重に基づいて算出した。

投与期間中は、一般状態及び便性状を毎日観察するとともに、体重及び飲水量を週 1 回測定した。実験開始 8 週目（PS 投与の 26 日目又は 27 日目）に、全動物についてオーションスティックアナライザーを用いて尿検査を実施し、グルコース、蛋白、ビリルビン、ウロビリノーゲン、pH、比重、潜血、ケトン体、亜硝酸塩、白血球、色調及び濁度について測定あるいは評価した。

実験開始 8 週後（PS 投与 28 日後）半日の絶食後イソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より採血後、放血安楽殺した。血液学的検査として、採取した血液の一部を抗凝固剤（EDTA-2K）入りの試験管に移し、自動血球計算装置 IDEXX プロサイト Dx を用いて、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（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）、網状赤血球数（RET）、血小板数（PLT）、白血球数（WBC）、及び白血球分画（好中球；Neutrophil、リンパ球；Lymphocyte、単球；Monocyte、好酸球；Eosinophil、好塩基球；Basophil）について測定した。

また血清生化学的検査として、残りの血液を血清分離剤及び凝固促進用シリカ微粒子入りの試験管に分注し、遠心分離して血清を得て、総蛋白（TP）、アルブミン（ALB）、アルブミン/グロブリン比（A/G）、総ビリルビン（T-BIL）、ブドウ糖（GLU）、トリグリ

セリド（TG）、総コレステロール（T-CHO）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（CRE）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、塩素（Cl）、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）及びγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ（γ-GTP）について測定した。

（倫理面への配慮）

すべての動物実験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。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扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

C-1. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認められなかった。実験期間中の体重推移については、PS 粒子投与群と対照群間に有意な差はみられなかったが、粒径 0.03 μm の 1000 mg/kg 体重群では雌雄ともに体重増加抑制の傾向が認められた(Figure 1)。摂餌量については PS 粒子投与群と対照群間に差はみられなかった。

臓器重量の検索では、雌の粒径 0.03 μm の 1000 mg/kg 体重群において肝臓の絶対重量の有意な低下が認められた(Table 1)。

C-2. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定-持続投与

プロトコル(Figure 2-1)に沿って実施した実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。経過中の体重変化は、2%DSS 投与群でやや増加抑制傾向が見られたが、統計学的な有意差は認めなかった(Figure 2-2)。また、飲水量(Figure 2-3)及び摂餌量(Figure 2-4)についても DSS 投与群と対照群の間に有意な差異は見られなかった。一般状態については、DSS 投与群では肛門周囲被毛の汚れ及び下痢が観察され、1%よりも 2%でより高度の傾向が見られた。また、DSS 投与期間直後の時点ではより高度の所見を示す動物が多い傾向があった。2%群では、出血性下痢も観察され、DSS 投与の休止 1 週後も半数以上の動物で何らかの所見が認められた(Table 2-1)。大腸の病理組織学的観察(Table 2-2 及び Figure 2-5)では、DSS 投与群では、1 週後から直腸及び結腸にびらんまたは潰瘍及び粘膜上皮の再生像が

観察され、1%よりも2%でより高度の傾向が見られた。特に、直腸の変化がより強く、DSS 投与の休止1週間後にも全例で何らかの所見が観察された。

C-3. 健常ラット及び大腸炎ラットにおけるナノ/マイクロポリスチレンの28日間反復投与毒性試験

C-3-1 被験物質の粒度分布

30 nm の PS 原液及び 300 nm の PS を蒸留水で 25 倍希釈して粒度を測定した (Figure 3-1)。3 回測定した粒度の平均値は、それぞれ 27.0 nm 及び 297.6 nm であり、軽度の幅はあるものの、粒子の凝集は認められず適切に分散できていることが確認された。

C-3-2 体重変化、飲水量、摂餌量及び一般状態

実験期間を通して、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。経過中、体重変化は、DSS 水投与、PS 投与によらず群間に差異は認めなかった (Figure 3-2)。飲水量については、DSS 水投与の 1、2 サイクル目はわずかにバラツキがみられたものの群間に差異は認めなかった (Figure 3-3)。また、摂餌量についても、群間に有意な差異は見られなかった (Figure 3-4)。一般状態については、調整水投与群においても、散発的に軟便が観察され、下痢は週の積算で 2 回程度までであり、PS の投与用量との相関は見られなかった。DSS 水群では調整水群よりも軟便及び下痢が頻回観察され、出血性下痢も一部の動物に認められたが、行動異常等は見られなかった (Table 3-1)。

C-3-3 尿検査

各検査項目に群間で大きな差は認められなかった (Table 3-2)。

C-3-4 血液学的検査

血液学的検査では、DSS 水群の 300 nm PS の 40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して HGB の有意な高値が認められた (Table 3-3)。

C-3-5 血清生化学検査

血清生化学検査では、調整水群の 300 nm PS の 1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して Na の低値が、DSS 水群の 30 nm PS の 1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して T-CHO の低値が認められた (Table 3-4)。

D. 考察

D-1. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

本研究では、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた PS 粒子の反復経口投与実験を実施するにあたり、PS 粒子の至適投与用量を設定する目的で、雌雄

F344 ラットに粒径 30 nm または 300 nm の PS 粒子を 0 (対照群)、200 または 1000 mg/kg 体重の投与量で単回強制経口投与した。

その結果、粒径 300 nm の PS 粒子ではいずれの投与用量でも毒性影響は認められなかった一方で、粒径 30 nm の PS 粒子では 1000 mg/kg 体重の投与量において雌雄ともに体重増加抑制の傾向が認められたことから、粒径の小さな PS 粒子ほど毒性影響が強く発揮される可能性が示唆された。なお、臓器重量の検索において認められた、雌の粒径 30 nm の 1000 mg/kg 体重群における肝臓の絶対重量の有意な低下は、絶対重量のみの変動であり、相対重量に変動は認められなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

以上の結果に基づき、今後実施する反復経口投与実験では、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日とする方針を定めた。

D-2. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定-持続投与

本検討から、入手した分子量 36-50 kDa の DSS を用いた場合、1%の濃度での F344 ラットへの飲料水投与によって、重篤な血便までは観察されず、結腸及び直腸にびらん/潰瘍並びに上皮の再生性変化を伴う適切な大腸炎を誘発すること、1 週間の休薬でも炎症所見が持続していることが確認された。本プロトコールに基づいて投与開始 1 週間後から、F344 ラットに粒径 30 nm 及び 300 nm の PS 粒子を用い、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日として、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた 28 日間反復経口投与実験を実施し、健常ラットと腸炎モデルラットそれぞれについて無毒性量 (NOAEL) を決定し、毒性影響の比較を行うことが適切と考えられた。

D-3. 健常ラット及び大腸炎ラットにおけるナノ/マイクロポリスチレンの28日間反復投与毒性試験

健常ラット及びDSS水の間欠投与による大腸炎ラットにおいて、30 nm 及び 300 nm の PS を 40、200 及び 1000 mg/kg 体重/日の用量に蒸留水で調整して 28 日間強制経口投与し、全身諸臓器への毒性影響を検討した。

投与時の PS は、想定通りにナノサイズ及びマイクロサイズに分散していることが確認され、反復経口投与試験として適切と考えられた。

経過中死亡動物は見られず、体重、飲水量、摂餌量に有意な変化は見られなかった。一般状態において、DSS 水群では調整水群よりも軟便及び下痢が頻

回観察され、出血性下痢も一部の動物に認められたものの、PS 投与による増強は認めず、行動異常も見られなかった。血液学的検査では、DSS 水群の 300 nm PS の 40 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して HGB の有意な高値が認められたが、その他の赤血球パラメータには変動はなく、用量相関性も示さないことから、偶発的な変化と考えられた。血清生化学検査では、調整水群の 300 nm PS の 1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して Na の低値が、DSS 水群の 30 nm PS の 1000 mg/kg 体重/日投与群において、対照群と比較して T-CHO の低値が認められたが、病理組織学的検査（分担研究者：赤根担当）においても肝臓、腎臓などへの影響も見られないことから PS による毒性影響の可能性は低いと考えられた。

E. 結論

E-1. 高分子化合物ポリスチレン粒子の F344 ラットを用いた反復経口投与実験の条件設定

DSS の自由飲水投与の実験条件を設定後、F344 ラットを用いた PS 粒子の単回経口投与実験の結果に基づき、粒径 30 nm の PS 粒子を使用し、高用量を 1000 mg/kg 体重/日に設定し、公比 5 で除して中間用量を 200、低用量を 40 mg/kg 体重/日として、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた反復経口投与実験を実施し、健常ラットと腸炎モデルラットそれぞれについて無毒性量 (NOAEL) を決定し、毒性影響の比較を行うことが適切と考えられた。

E-2. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定-持続投与

1% の 36-50 kDa DSS を 1 週間毎に間欠的に飲水投与するプロトコールで持続的に大腸炎を誘発可能であることが明らかとなった。

E-3. 健常ラット及び大腸炎ラットにおけるナノ/マイクロポリスチレンの 28 日間反復投与毒性試験

雄性 F344 ラットに、8 週齢時点から 28 日間、30 nm 及び 300 nm の PS を 40、200 及び 1000 mg/kg 体重/日の用量で強制経口投与し、全身諸臓器への毒性影響を検討したところ、何れの臓器にも PS 投与に関連した毒性影響は認めなかった。また、1% DSS の間欠的飲水投与による大腸炎の存在下においても、PS の経口投与による毒性影響は認めなかった。

以上の結果から、健常動物のみならず、大腸炎存在下においても、粒径 30 nm 及び 300 nm の PS そのものは、1000 mg/kg 体重/日までの経口暴露による毒性影響はないと考えられた。一方、生体内への侵入の有無については、追加検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

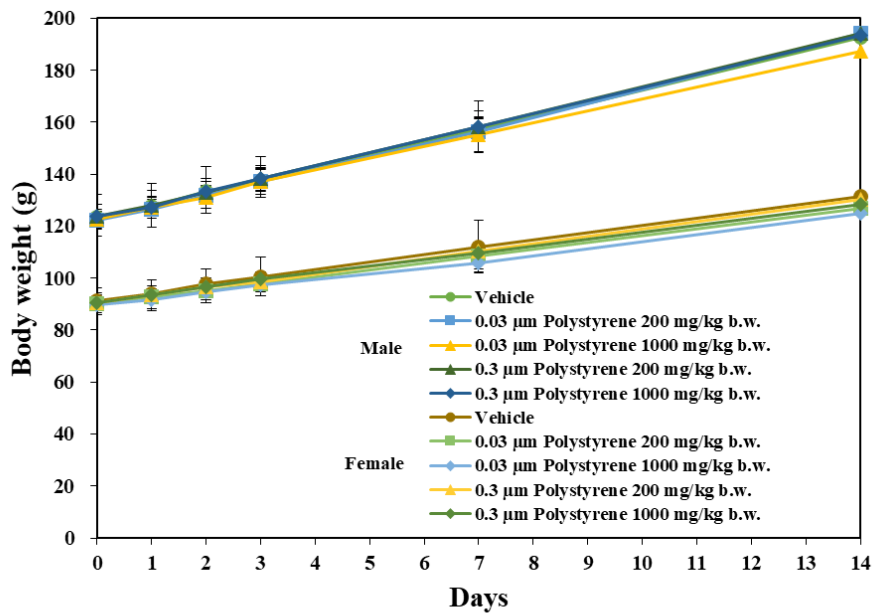


Figure 1. Body weights of F344 rats treated with polystyrene particles.

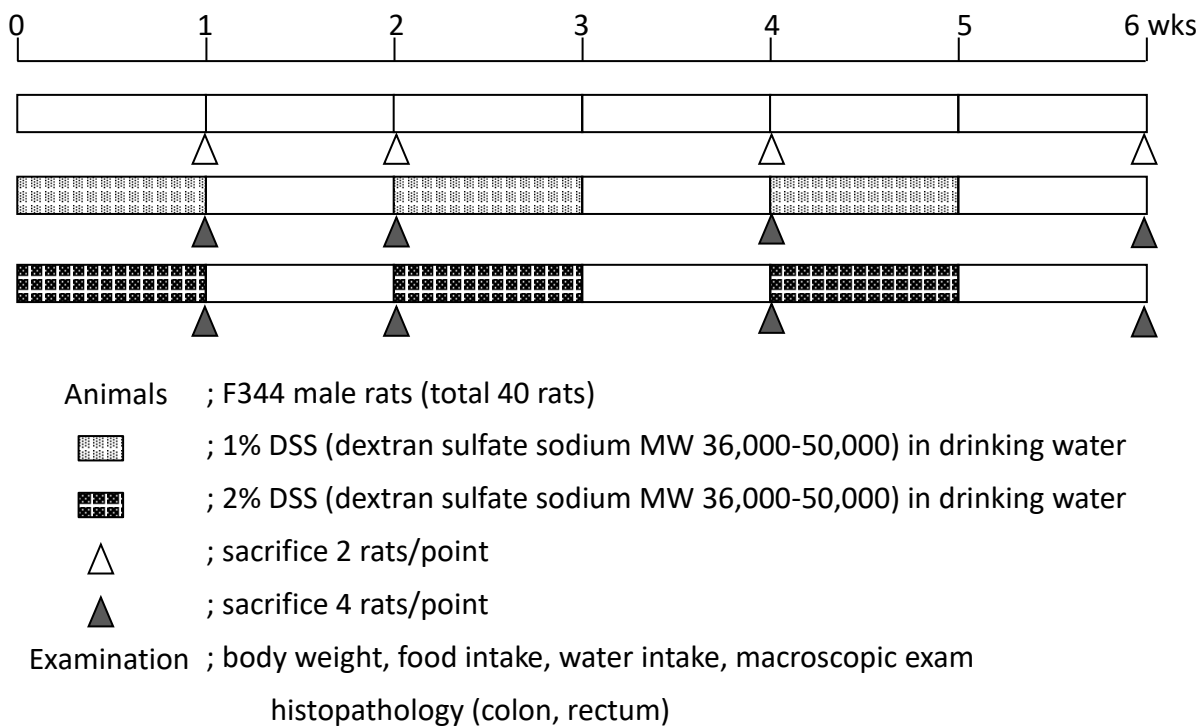


Figure 2-1. Experimental protocol

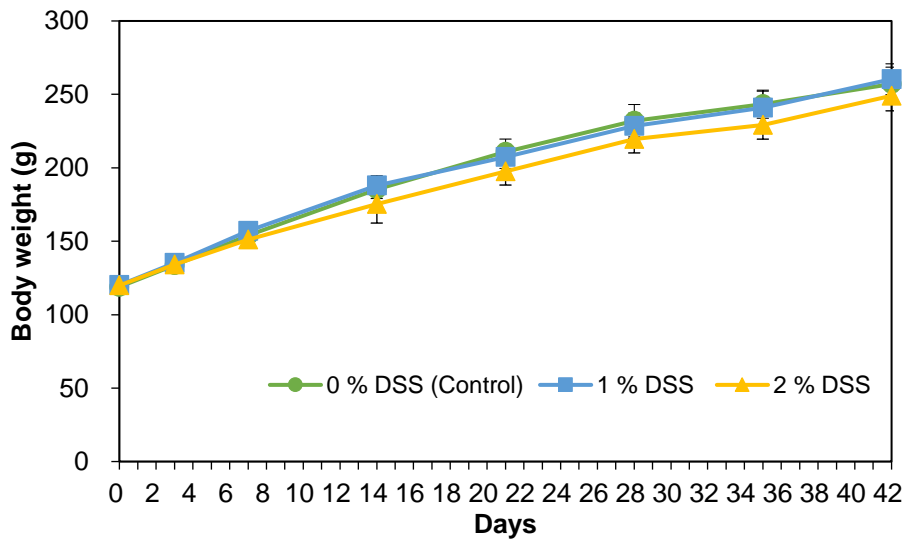


Figure 2-2. Body weight change curves

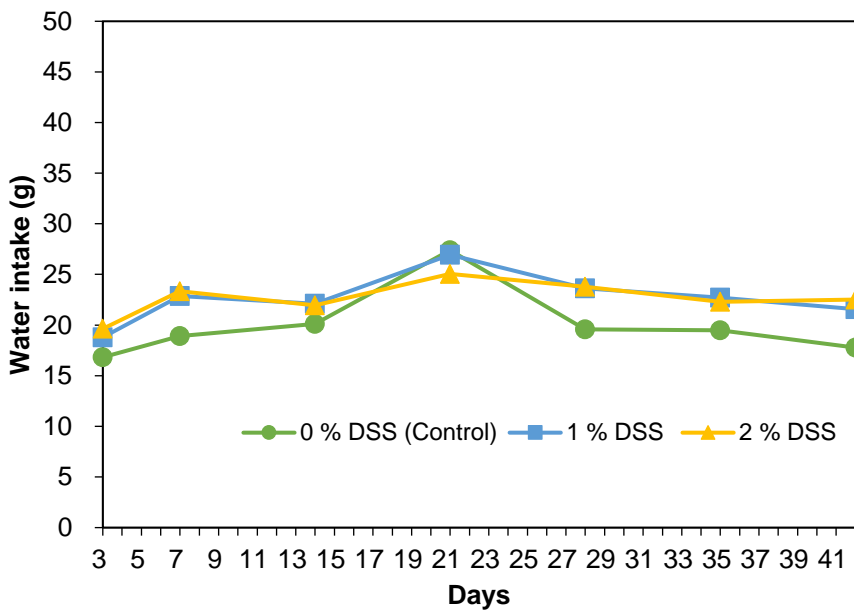


Figure 2-3. Water consumption curves

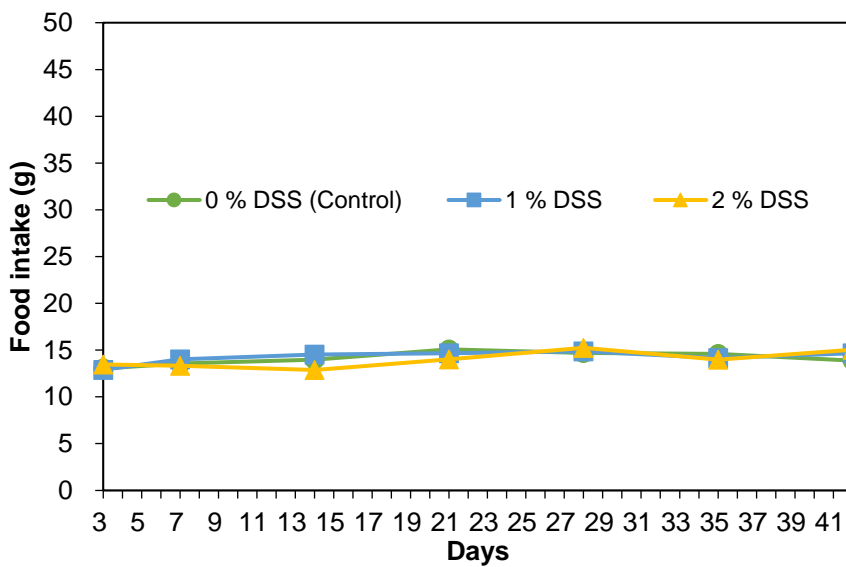


Figure 2-4. Food consumption curves

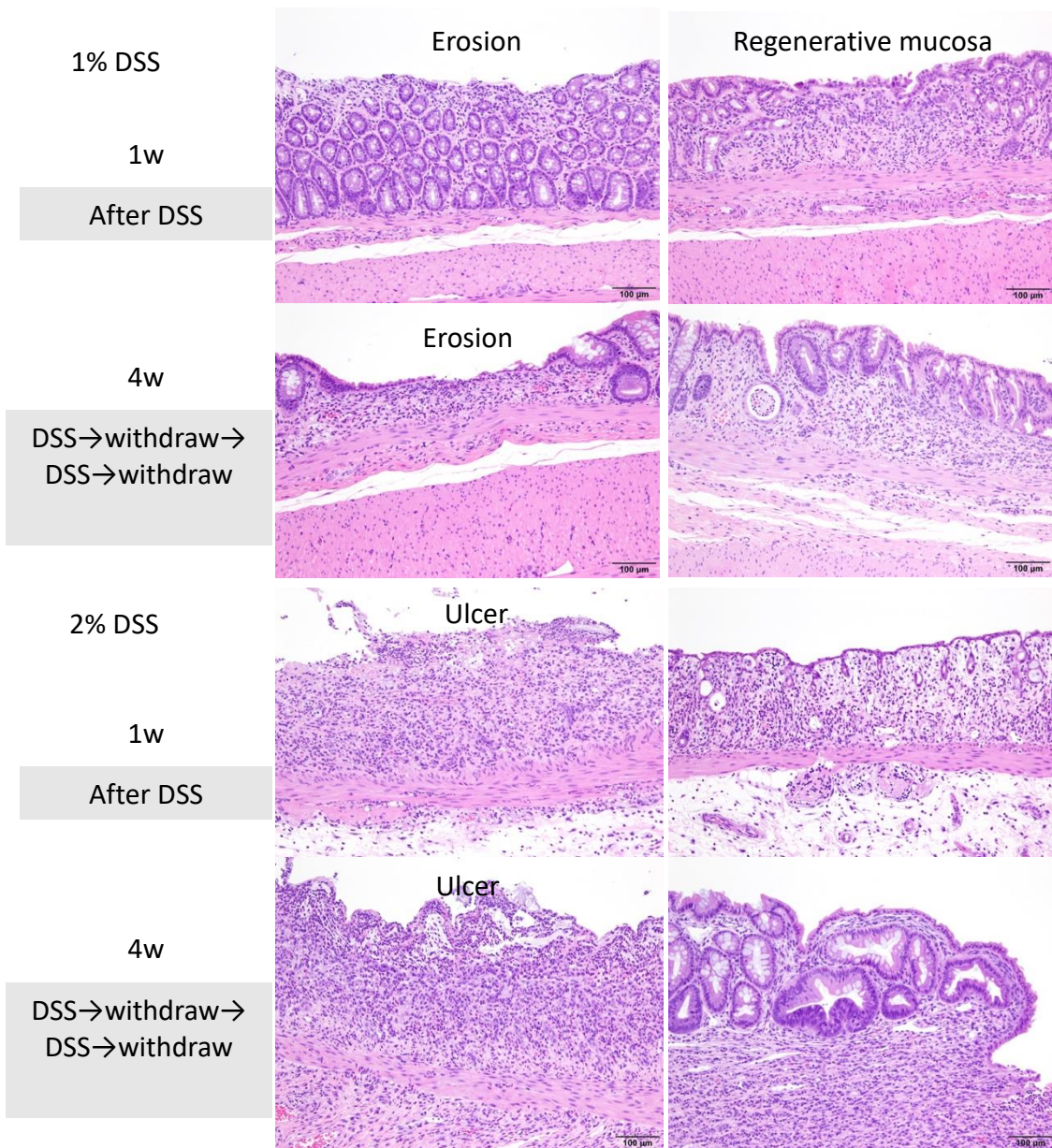


Figure 2-5. Histopathological lesion in the rectum of rats administered DSS

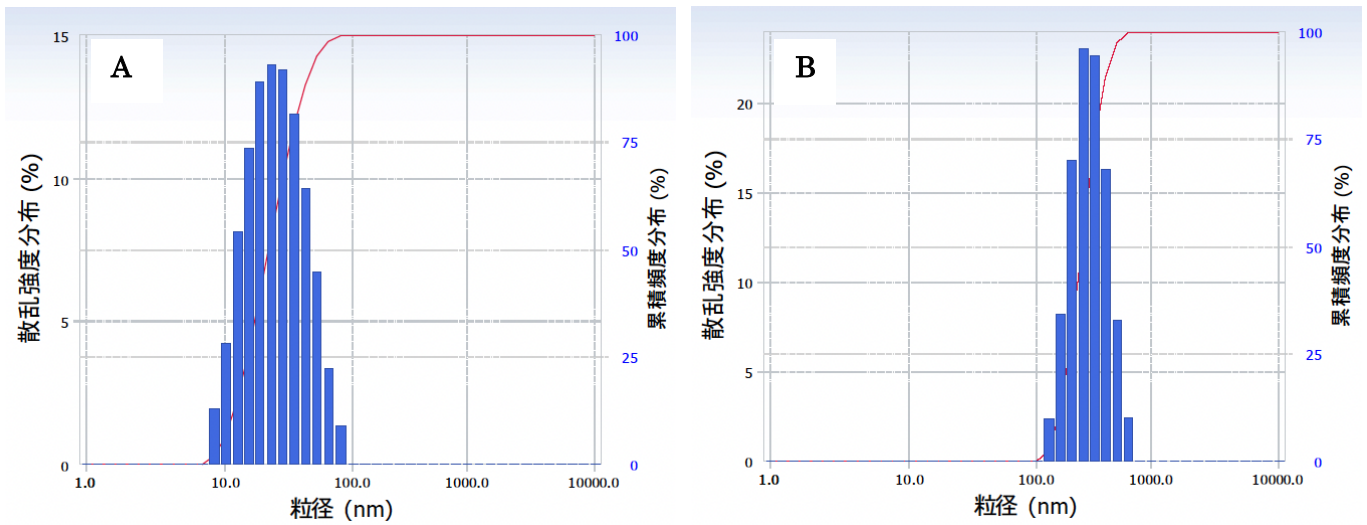


Figure 3-1. Particle size distribution analyzed by dynamic light scattering. A: 30 nm polystyrene, B: 300 nm polystyrene

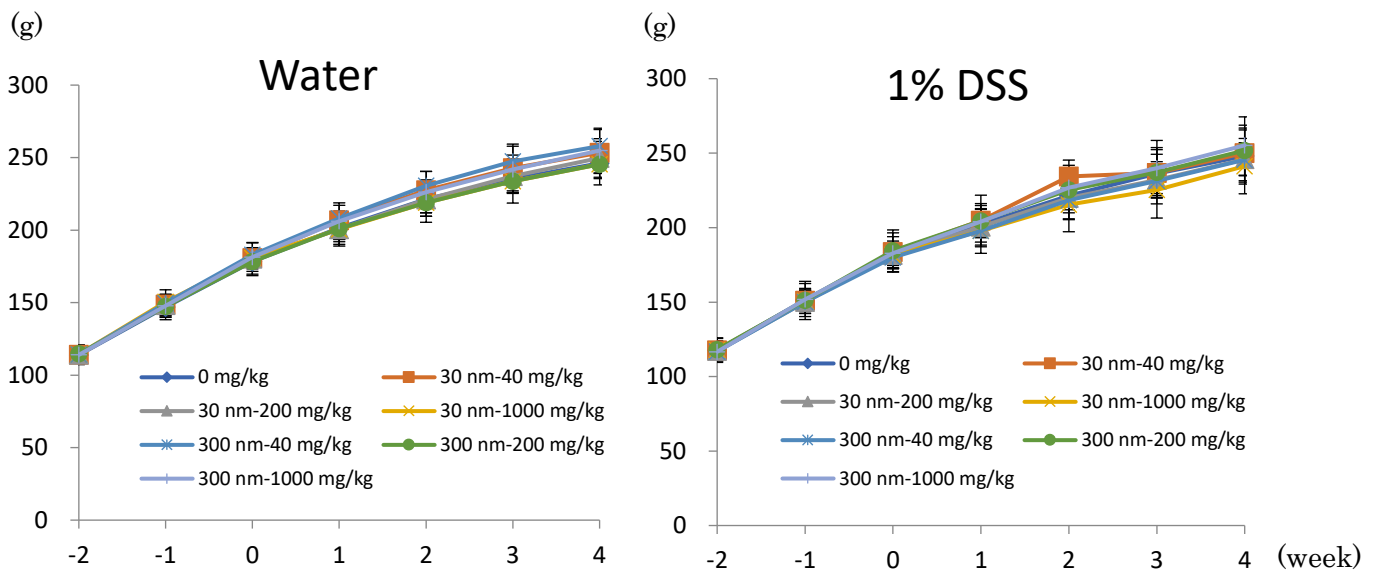


Figure 3-2. Body weight change of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

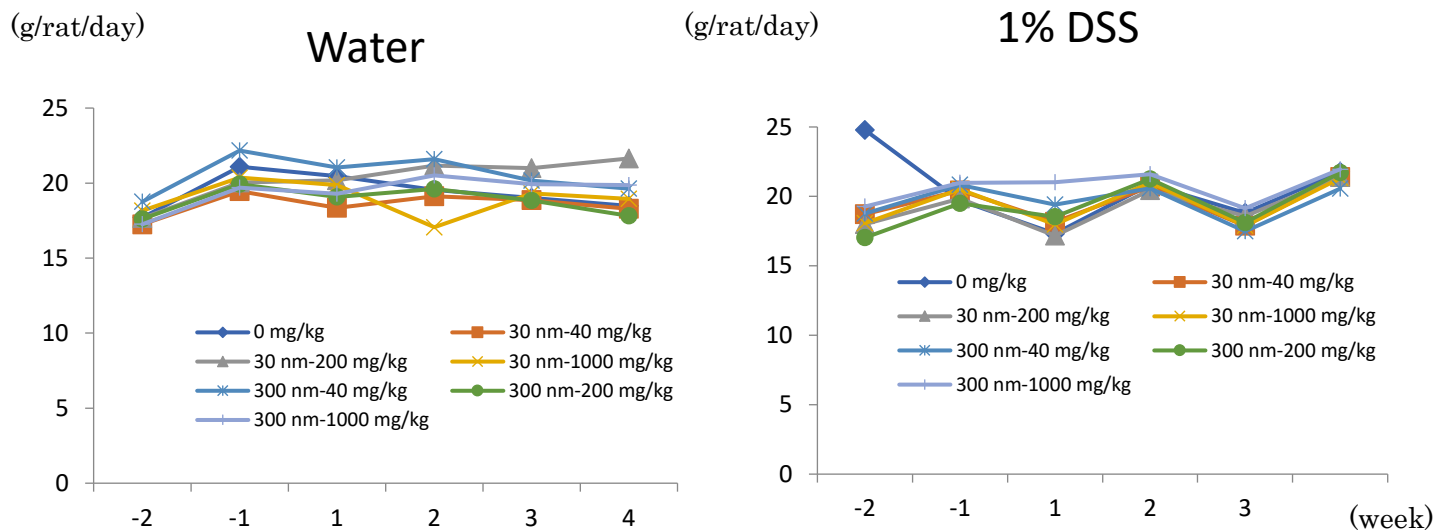


Figure 3-3. Water consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

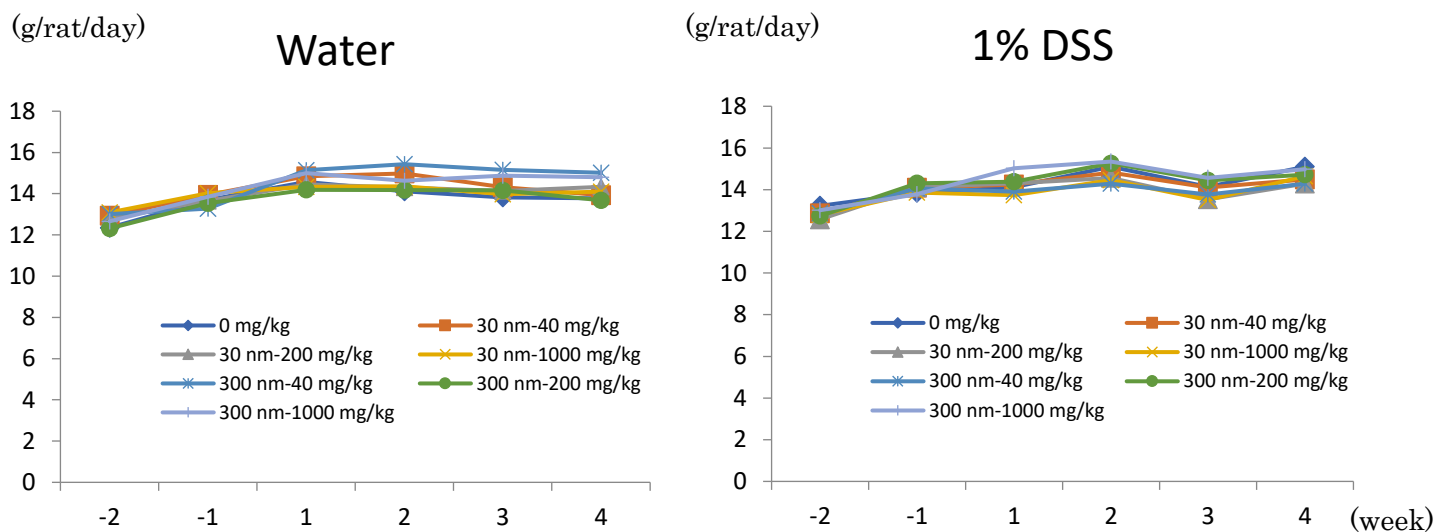


Figure 3-4. Food consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Table 1. Final body weights and organ weights of F344 rats treated with polystyrene particles.

Sex	Male				
Dose (mg/kg b.w.)	Vehicle	0.03 µm nano-polystyrene		0.3 µm micro-polystyrene	
		200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.	200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.
Group	1	2	3	4	5
No. of animals	4	4	4	4	4
Body weight (g)	192.800 ± 13.392	194.325 ± 8.538	187.475 ± 8.487	194.250 ± 9.374	193.550 ± 3.712
Absolute (g)					
Heart	0.673 ± 0.061	0.664 ± 0.046	0.644 ± 0.042	0.686 ± 0.036	0.659 ± 0.034
Spleen	0.505 ± 0.044	0.517 ± 0.028	0.489 ± 0.012	0.520 ± 0.027	0.509 ± 0.023
Liver	7.635 ± 0.538	7.681 ± 0.329	7.275 ± 0.440	7.608 ± 0.568	7.446 ± 0.059
Kidneys	1.435 ± 0.095	1.469 ± 0.101	1.395 ± 0.071	1.426 ± 0.085	1.392 ± 0.040
Relative (g%)					
Heart	0.349 ± 0.014	0.341 ± 0.009	0.344 ± 0.018	0.353 ± 0.016	0.341 ± 0.015
Spleen	0.261 ± 0.007	0.266 ± 0.007	0.261 ± 0.008	0.267 ± 0.008	0.263 ± 0.007
Liver	3.960 ± 0.060	3.953 ± 0.067	3.879 ± 0.119	3.913 ± 0.123	3.848 ± 0.067
Kidneys	0.744 ± 0.005	0.756 ± 0.043	0.744 ± 0.009	0.734 ± 0.027	0.719 ± 0.015

Sex	Female				
Dose (mg/kg b.w.)	Vehicle	0.03 µm nano-polystyrene		0.3 µm micro-polystyrene	
		200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.	200 mg/kg b.w.	1000 mg/kg b.w.
Group	6	7	8	9	10
No. of animals	4	4	4	4	4
Body weight (g)	131.450 ± 5.729	127.000 ± 3.595	124.900 ± 7.217	130.425 ± 4.055	128.550 ± 2.777
Absolute (g)					
Heart	0.475 ± 0.031	0.467 ± 0.024	0.471 ± 0.039	0.477 ± 0.018	0.474 ± 0.029
Spleen	0.376 ± 0.026	0.355 ± 0.023	0.353 ± 0.015	0.373 ± 0.020	0.358 ± 0.017
Liver	4.870 ± 0.179	4.779 ± 0.065	4.492 ± 0.333 *	4.851 ± 0.095	4.579 ± 0.072
Kidneys	1.008 ± 0.060	0.980 ± 0.025	1.005 ± 0.051	1.013 ± 0.040	0.976 ± 0.029
Relative (g%)					
Heart	0.362 ± 0.060	0.368 ± 0.025	0.377 ± 0.019	0.366 ± 0.003	0.369 ± 0.029
Spleen	0.286 ± 0.011	0.280 ± 0.024	0.283 ± 0.007	0.286 ± 0.013	0.278 ± 0.017
Liver	3.707 ± 0.117	3.766 ± 0.144	3.594 ± 0.105	3.721 ± 0.056	3.562 ± 0.025
Kidneys	0.767 ± 0.036	0.772 ± 0.031	0.805 ± 0.012	0.777 ± 0.016	0.759 ± 0.019

Values are means ± standard deviation.

* Significantly different from the Vehicle group at p < 0.05

Table 2-1. Macroscopic observation of the rats treated with DSS

Findings	Duration Group	1 week*			2 weeks			3 weeks*			4 weeks			5 weeks*			6 weeks		
		0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS
Number of animal		8	16	16	6	12	12	4	8	8	4	8	8	2	4	4	2	4	4
Dirt on the hair around the anus		0	8	9	0	3	8	0	5	0	0	4	5	0	1	0	0	4	4
Diarrhea		0	0	2	0	1	3	0	1	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0
Bloody diarrhea		0	0	4	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	1	4	0	0	0

*: At the end of the period of DSS administration

Table 2-2. Microscopic observation in the rectum and colon of the rats treated with DSS

Organs	Findings	Duration Group	1 week*			2 weeks			4 weeks			6 weeks		
			0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS	0% DSS	1% DSS	2% DSS
			2	4	4	2	4	4	2	4	4	2	4	4
Rectum	Erosion/ulcer (1/2/3)		0	4 (3/1/0)	4 (1/1/2)	0	1 (1/0/0)	4 (2/1/1)	0	0 (0/0/0)	4 (1/3/0)	0	2 (2/0/0)	3 (1/2/0)
	Regeneration, mucosal epithelium (1/2/3/4)		0	4 (4/0/0/0)	4 (0/1/2/1)	0	4 (4/0/0/0)	4 (1/1/2/0)	0	4 (0/4/0/0)	4 (0/2/2/0)	0	4 (0/1/3/0)	4 (0/0/0/4)
Colon	Erosion/ulcer (1)		0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Regeneration, mucosal epithelium (1)		0	0	4	0	0	4	0	2	4	0	1	4

□ : No abnormalities detected, 1: Minimal (1-10 %), 2: Mild (11-25 %), 3: Moderate (26-50 %), 4: Severe (51< %)

*: At the end of the period of DSS administration

Table 3-1. General conditions of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

	Findings	Week	-2	-1	1	2	3	4
<i>Water</i>	Cumulated total No. of animals per week		35	35	35	35	35	35
	Types of drinking water		Water	Water	Water	Water	Water	Water
0 mg/kg	Loose stools		0	1	6	3	1	0
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
30 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	0	0	0	1	0
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
30 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	1	0	1	0	0
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
30 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	0	4	3	1	0
	Diarrhea		0	0	0	1	0	0
300 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	0	2	9	0	1
	Diarrhea		0	1	0	2	0	0
300 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	2	3	1	3	1
	Diarrhea		0	0	0	0	0	0
300 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	2	5	0	1	1
	Diarrhea		0	0	0	0	1	0
<i>DSS</i>	Cumulated total No. of animals per week		35	35	35	35	35	35
	Types of drinking water		DSS	Water	DSS	Water	DSS	Water
0 mg/kg	Loose stools		0	1	11	11	11	8
	Diarrhea		0	0	1	1	3	3
	Bloody stool		0	0	2	0	0	0
30 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	2	7	13	11	17
	Diarrhea		0	0	3	3	4	3
	Bloody stool		0	0	0	0	1	2
30 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	3	18	19	11	27
	Diarrhea		0	0	0	0	4	3
	Bloody stool		0	0	1	0	0	0
30 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	3	8	16	10	15
	Diarrhea		1	1	1	0	2	3
	Bloody stool		0	0	1	0	0	0
300 nm-40 mg/kg	Loose stools		0	0	8	11	13	18
	Diarrhea		0	0	0	5	9	2
	Bloody stool		0	0	1	1	0	0
300 nm-200 mg/kg	Loose stools		0	1	18	16	15	24
	Diarrhea		0	1	2	1	3	0
	Bloody stool		0	0	0	0	1	0
300 nm-1000 mg/kg	Loose stools		0	1	12	11	14	25
	Diarrhea		0	1	2	4	14	6
	Bloody stool		0	0	0	1	3	0

Table 3-2. Urinalysis data at week 4 in F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Parameter	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	<i>Water</i>							<i>DSS</i>						
		30 nm				300 nm			30 nm				300 nm		
		0	40	200	1000	40	200	1000	0	40	200	1000	40	200	1000
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Glucose	–	5	5	4	5	5	5	5	4	5	5	2	5	4	5
	±	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0
Protein	±	2	1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1
	1+	3	4	3	3	4	5	5	2	4	4	2	2	3	4
	2+	0	0	0	0	1	0	0	3	1	0	3	0	2	0
Bilirubin	–	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Urobilinogen	±	5	5	5	5	4	5	5	3	5	5	4	5	3	5
	1+	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	2	0
pH	6.5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	7	1	1	1	4	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1
	7.5	2	1	2	0	1	2	2	1	0	2	1	2	1	3
	8	2	3	2	0	4	3	3	4	4	1	0	2	4	1
	8.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Supacific grabvity	1.01	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	3	0	1
	1.015	2	2	1	2	1	2	2	0	0	2	1	2	1	3
	1.02	2	0	3	2	1	2	2	1	4	0	1	0	1	1
	1.025	1	2	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	1	0
	>1.03	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	3	0	2	0
Occult blood	–	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	±	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone body	–	5	5	4	3	5	5	3	0	1	3	0	5	1	4
	±	0	0	0	1	0	0	2	2	3	2	2	0	2	1
	1+	0	0	1	1	0	0	0	3	1	0	3	0	2	0
Nitrile	–	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Leukocytes	–	3	1	3	2	2	0	0	0	0	2	0	4	0	2
	25 /μl	1	3	1	3	2	2	3	0	2	2	1	1	1	2
	75 /μl	1	0	1	0	1	3	2	4	2	1	3	0	2	1

	250 / μ l	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	2	0
Color	Colorless	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Light yellow	3	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	3	0	2
	Yellow	1	3	3	3	5	5	5	5	5	4	5	2	5	3
Turbidity	-	4	5	5	5	5	5	3	5	5	5	4	5	5	5
	\pm	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0

Table 3-3. Hematology data for F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Parameter	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	30 nm									300 nm											
		0			40			200			1000			40			200			1000		
<i>Water</i>																						
No. of animals		5			5			5			5			5			5			5		
RBC	($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.24	\pm	0.18	9.16	\pm	0.35	9.16	\pm	0.21	9.10	\pm	0.24	9.29	\pm	0.10	9.31	\pm	0.23	9.22	\pm	0.22
HGB	(g/dL)	15.6	\pm	0.4	15.5	\pm	0.6	15.6	\pm	0.3	15.3	\pm	0.4	15.6	\pm	0.3	15.7	\pm	0.4	15.6	\pm	0.4
HCT	(%)	45.8	\pm	1.2	45.6	\pm	1.9	45.5	\pm	1.0	45.1	\pm	1.3	45.8	\pm	0.8	46.2	\pm	1.4	45.8	\pm	1.6
MCV	(fL)	49.6	\pm	0.6	49.9	\pm	0.3	49.7	\pm	0.6	49.5	\pm	0.4	49.4	\pm	0.6	49.6	\pm	0.5	49.7	\pm	0.7
MCH	(pg)	16.9	\pm	0.2	16.9	\pm	0.1	17.0	\pm	0.2	16.9	\pm	0.1	16.8	\pm	0.3	16.9	\pm	0.1	16.9	\pm	0.2
MCHC	(g/dL)	34.1	\pm	0.4	34.0	\pm	0.2	34.3	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.0	\pm	0.4
RET	(%)	2.32	\pm	0.06	2.55	\pm	0.29	2.58	\pm	0.28	2.38	\pm	0.27	2.34	\pm	0.25	2.55	\pm	0.26	2.60	\pm	0.09
PLT	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	723.6	\pm	34.6	736.6	\pm	42.3	738.6	\pm	35.1	723.2	\pm	50.6	729.0	\pm	85.1	774.6	\pm	92.1	725.2	\pm	74.2
WBC	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.02	\pm	0.96	4.37	\pm	1.33	4.29	\pm	0.29	3.99	\pm	1.33	4.39	\pm	0.65	5.04	\pm	0.60	4.09	\pm	1.42
<i>Differential cell count</i>																						
Neutrophils	(%)	23.2	\pm	7.7	24.5	\pm	4.6	24.3	\pm	6.9	25.0	\pm	4.0	23.4	\pm	4.6	23.6	\pm	3.5	26.0	\pm	3.4
Lymphocytes	(%)	72.8	\pm	8.0	70.8	\pm	5.0	71.1	\pm	6.7	70.9	\pm	4.2	71.6	\pm	4.1	72.3	\pm	3.6	69.8	\pm	3.4
Momocytes	(%)	3.1	\pm	0.3	3.9	\pm	0.4	3.4	\pm	0.4	3.1	\pm	0.6	3.8	\pm	0.8	3.0	\pm	0.4	3.3	\pm	0.3
Eosinophils	(%)	0.7	\pm	0.3	0.6	\pm	0.2	0.8	\pm	0.1	0.9	\pm	0.3	0.9	\pm	0.2	0.8	\pm	0.2	0.7	\pm	0.2
Basophils	(%)	0.2	\pm	0.1	0.3	\pm	0.0	0.3	\pm	0.2	0.2	\pm	0.1	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.2
<i>DSS</i>																						
No. of animals		5			5			5			5			5			5			5		
RBC	($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.86	\pm	0.43	9.19	\pm	0.20	8.92	\pm	0.39	8.76	\pm	0.18	9.32	\pm	0.24	9.05	\pm	0.28	9.18	\pm	0.22
HGB	(g/dL)	14.9	\pm	0.6	15.4	\pm	0.3	15.1	\pm	0.7	14.8	\pm	0.4	15.7	\pm	0.4 [#]	15.3	\pm	0.4	15.4	\pm	0.3
HCT	(%)	44.0	\pm	2.1	45.5	\pm	1.0	44.5	\pm	2.2	43.5	\pm	1.3	46.2	\pm	1.4	44.7	\pm	1.3	45.6	\pm	1.0
MCV	(fL)	49.6	\pm	0.2	49.5	\pm	0.4	49.9	\pm	0.4	49.6	\pm	0.6	49.6	\pm	0.6	49.4	\pm	0.7	49.7	\pm	0.6
MCH	(pg)	16.9	\pm	0.2	16.8	\pm	0.1	16.9	\pm	0.1	16.9	\pm	0.2	16.9	\pm	0.2	16.9	\pm	0.3	16.8	\pm	0.2
MCHC	(g/dL)	34.0	\pm	0.3	34.0	\pm	0.3	33.9	\pm	0.2	34.1	\pm	0.2	34.0	\pm	0.2	34.1	\pm	0.2	33.9	\pm	0.1
RET	(%)	2.56	\pm	0.25	2.72	\pm	0.24	2.57	\pm	0.34	2.72	\pm	0.34	2.57	\pm	0.25	2.41	\pm	0.24	2.44	\pm	0.25

PLT	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	599.4	\pm	231.7	736.0	\pm	104.0	588.4	\pm	179.5	722.2	\pm	53.3	766.0	\pm	30.5	704.6	\pm	69.7	708.6	\pm	42.6
WBC	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3.93	\pm	1.15	4.09	\pm	0.54	3.30	\pm	1.11	4.61	\pm	1.40	4.83	\pm	0.67	3.60	\pm	0.95	5.24	\pm	0.89
Differential cell count																						
Neutrophils	(%)	29.0	\pm	5.7	26.5	\pm	2.3	26.4	\pm	4.6	27.6	\pm	9.3	24.9	\pm	4.9	25.6	\pm	6.0	23.2	\pm	3.8
Lymphocyte	(%)	66.1	\pm	6.3	68.9	\pm	2.2	68.4	\pm	5.4	67.6	\pm	9.6	71.1	\pm	5.0	69.6	\pm	7.1	72.3	\pm	5.2
Momocytes	(%)	3.4	\pm	0.8	3.4	\pm	0.3	3.6	\pm	1.0	3.2	\pm	0.5	3.0	\pm	0.6	3.3	\pm	0.5	3.1	\pm	0.8
Eosinophils	(%)	1.2	\pm	0.7	0.9	\pm	0.1	1.3	\pm	0.6	1.2	\pm	0.4	0.8	\pm	0.3	1.1	\pm	0.6	1.1	\pm	0.8
Basophils	(%)	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.1	0.3	\pm	0.2	0.3	\pm	0.1	0.2	\pm	0.1	0.4	\pm	0.3	0.2	\pm	0.0

Values are mean \pm S.D.

#: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$.

Table 3-4. Serum biochemistry data for F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Parameter	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	30 nm						300 nm		
		0	40	200	1000	40	200	1000		
<i>Water</i>										
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5
TP	(g/dL)	6.2 ± 0.1	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.1 ± 0.1
ALB	(g/dL)	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1
A/G		2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1
T-BIL	(mg/dL)	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
GLU	(mg/dL)	167.4 ± 12.4	147.6 ± 13.8	158.0 ± 11.1	147.8 ± 15.8	164.8 ± 13.1	154.0 ± 12.7	177.2 ± 23.3		
TG	(mg/dL)	54.2 ± 20.0	63.0 ± 15.2	56.6 ± 16.9	51.2 ± 14.6	52.4 ± 11.0	72.2 ± 24.4	80.2 ± 21.6		
T-CHO	(mg/dL)	56.6 ± 4.9	55.2 ± 2.4	54.2 ± 2.6	52.2 ± 4.7	57.4 ± 2.3	59.0 ± 6.2	54.8 ± 2.9		
BUN	(mg/dL)	21.1 ± 1.5	20.8 ± 2.3	21.0 ± 2.6	19.2 ± 1.8	20.9 ± 2.2	22.4 ± 1.9	21.6 ± 1.4		
CRE	(mg/dL)	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02		
Na	(mEQ/L)	140.8 ± 0.8	141.0 ± 0.7	141.4 ± 0.5	141.0 ± 1.4	139.8 ± 0.8	141.8 ± 0.4	139.6 ± 0.7 [#]		
K	(mEQ/L)	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.4 ± 0.1		
Cl	(mEQ/L)	101.2 ± 1.1	100.8 ± 1.8	101.4 ± 0.5	101.2 ± 1.1	100.8 ± 1.3	101.2 ± 1.3	99.8 ± 1.3		
Ca	(mg/dL)	10.2 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.5 ± 0.1	10.2 ± 0.2		
IP	(mg/dL)	6.7 ± 0.3	6.9 ± 0.4	7.1 ± 0.3	6.8 ± 0.4	6.8 ± 0.0	7.1 ± 0.5	6.7 ± 0.1		
AST	(IU/L)	81.0 ± 8.0	85.6 ± 8.4	89.8 ± 10.5	88.8 ± 8.0	84.8 ± 10.8	78.8 ± 8.3	79.0 ± 7.3		
ALT	(IU/L)	39.2 ± 2.2	39.4 ± 5.0	43.6 ± 5.5	40.0 ± 4.1	48.2 ± 10.9	39.6 ± 2.1	38.0 ± 4.2		
ALP	(IU/L)	623.6 ± 57.4	633.8 ± 28.8	653.2 ± 40.3	606.6 ± 17.4	624.0 ± 37.4	645.8 ± 80.4	636.2 ± 38.4		
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3		
<i>DSS</i>										
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5	5
TP	(g/dL)	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.1	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.2 ^{**}	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.2		
ALB	(g/dL)	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.1		
A/G		2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2 ^{**}	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2		
T-BIL	(mg/dL)	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01		

GLU	(mg/dL)	173.0 ± 18.9	180.2 ± 11.9	193.0 ± 9.5	202.2 ± 21*	190.8 ± 45.0	175.4 ± 17.7	185.0 ± 21.8
TG	(mg/dL)	76.2 ± 14.1	74.2 ± 18.2	85.6 ± 12.4	68.0 ± 13.2	72.8 ± 24.3	78.4 ± 12.1	91.8 ± 18.3
T-CHO	(mg/dL)	58.6 ± 1.1	59.2 ± 5.8	56.6 ± 3.6	50.0 ± 4*	56.2 ± 8.6	57.4 ± 2.5	55.4 ± 2.2
BUN	(mg/dL)	22.8 ± 2.5	24.6 ± 2.2	23.7 ± 1.7	21.2 ± 2.3	23.3 ± 2.4	23.4 ± 3.4	23.3 ± 2.1
CRE	(mg/dL)	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.05
Na	(mEQ/L)	139.2 ± 0.8	140.0 ± 1.2	140.6 ± 0.9	139.6 ± 0.9	140.0 ± 1.6	140.8 ± 0.8	140.0 ± 0.7
K	(mEQ/L)	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.1
Cl	(mEQ/L)	101.0 ± 1.0	101.0 ± 1.0	101.8 ± 0.8	100.6 ± 1.1	100.8 ± 1.3	101.2 ± 0.4	101.4 ± 0.9
Ca	(mg/dL)	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.4	10.3 ± 0.2	10.3 ± 0.3
IP	(mg/dL)	6.5 ± 0.6	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.3	6.6 ± 0.5	6.5 ± 0.2	6.9 ± 0.2	6.9 ± 0.7
AST	(IU/L)	74.2 ± 14.5	82.4 ± 9.4	69.4 ± 4.5	67.8 ± 12.1	72.4 ± 7.6	77.0 ± 8.0	77.0 ± 8.6
ALT	(IU/L)	41.8 ± 4.8	43.0 ± 2.8	39.2 ± 3.3	36.4 ± 5.6	38.4 ± 3.8	40.8 ± 3.5	41.0 ± 6.3
ALP	(IU/L)	614.4 ± 66.5	604.8 ± 32.3	584.4 ± 61.2	572.0 ± 63.8	593.8 ± 56.2	620.0 ± 45.4	587.4 ± 38.3
γ-GTP	(IU/L)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Values are mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively/

#: Significantly different from the 0 mg/kg group at $p < 0.05$

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

腸管粘膜バリア破綻条件下での高分子化合物の
経口暴露による毒性影響の解明

総合分担研究報告書

腸炎モデルラット作製のための条件検討及び高分子ナノマテリアルについての情報収集

研究分担者：井手 鉄哉（国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官，独立行政法人医薬品医療機器
総合機構・審査専門員）

研究要旨

近年、ポリスチレン(PS)、ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物、砂糖、食塩やビール等の食品類から検出されることが報告されている。しかしながら、これまでの高分子化合物に関する毒性研究は主に水生生物を用いたものであり、動物を用いた研究は非常に少ない。一方、腸管は粘液や上皮細胞から構成される“粘膜バリア”で保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物や金属等の粒子状物質が体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に、ナノマテリアルの一つであるナノシリカ（一次粒径 0.1 μm 以下のシリカ）の実験動物を用いた研究では、静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているもの（*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492）、強制経口投与では 2000 mg/kg 体重の投与量で 90 日間の毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったと報告されている。（*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78）。しかしながら、ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症が存在することは稀ではなく、そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、明確な評価に足るデータは乏しいものの、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて、健常ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・検証し、腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が、経口暴露された高分子化合物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを明らかにすることを目的とした。

DSS がマウス及びラットに大腸炎を誘発することは良く知られている。ロットによって重合度合い等が異なっているとされており、我々の研究室で過去に行った検討では、ロットによって誘発される炎症の度合いが異なっていた。また、文献においても 0.5-5% まで様々な濃度での報告があるため（<https://www.chondrex.com/documents/dss-02.pdf>）、適切な炎症を誘発できるか確認する必要があると考えられた。初年度は、健常ラットと腸炎モデルラットを用いた高分子化合物の反復経口投与実験を実施するための条件設定として、DSS 投与実験短期投与による影響について検討を行った。その結果、直腸においては 3% 群ではび慢性の潰瘍性病変がみられ、1% 群では散在性のびらん性病変が認められた。結腸においては 3% 濃度群で固有層及び粘膜下織におけるび慢性の炎症細胞浸潤がみられ、1% 濃度群では固有層における散在性の炎症細胞浸潤が認められた。小腸ではいずれの投与群においても著変は認められなかったことから、3% 投与による炎症は高度すぎると考えられた。

次年度は、PS をはじめとする高分子ナノマテリアルの毒性に関する情報収集を実施した。結果、2021 年 1 月に、欧州委員会の Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) の専門家パネルによる化粧品中のナノマテリアルの安全性に関する提言において、潜在的に安全性への懸念があるナノマテリアルとしてスチレン/非晶ポリアリレート共重合体（ナノ）+スチレン/非晶ポリアリレート共重合体（ナノ）(SCCS/1595/18) を取り上げていることがわかった。その他の対象としては、銀ナノ粒子（ナノ）(SCCS/1596/18)、シリカ、水和シリカ、およびアルキルシリレート（ナノフォーム）で修飾されたシリカ表面 (SCCS/1545/15)]があげられていた。スチレン/非晶ポリアリレート共重合体（ナノ）に関しては、物理化学的、毒物学的、および暴露の側面を総合的に検討すると、他の物質をカプセル化したスチレン/アクリレート共重合体のナノビーズの使用が懸念される根拠があるとされていた。また、PubMed 検索においても、多くの関連論文が発表されているが、ナノサイズを含むポリスチレンの毒性影響については、特に *in vivo* データについては情報が限られていると考えられた。

A. 研究目的

近年、ポリスチレン(PS), ポリプロピレンやポリエチレン等の高分子化合物が海産物, 砂糖, 食塩やビール等の食品類から検出されることが報告されている。しかしながら, これまでの高分子化合物に関する毒性研究は主に水生生物を用いたものであり, 動物を用いた研究は非常に少ない。

一方, 腸管は粘液や上皮細胞から構成される“粘膜バリア”で保護されていることから, 経口暴露によって高分子化合物や金属等の粒子状物質が体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に, ナノマテリアルの一つであるナノシリカ(一次粒径 0.1 μm 以下のシリカ)の実験動物を用いた研究では, 静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているものの(*Jpn. J. Hyg.*, 2010, 65: 487-492), 強制経口投与では 2000 mg/kg 体重の投与量で 90 日間の毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったと報告されている(*Int. J. Nanomed.*, 2014, 9: 67-78)。しかしながら, ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症が存在することは稀ではなく, そのような粘膜バリアが破綻した条件下では, 明確な評価に足るデータは乏しいものの, 高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり, 容易に全身循環し, 通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。

本研究では, デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて, 健康ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・検証し, 腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が, 経口暴露された高分子化合物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを明らかにすることを目的とした。

DSS がマウス及びラットに大腸炎を誘発することは良く知られている。ロットによって重合度合い等が異なっているとされており, 我々の研究室で過去に行った検討では, ロットによって誘発される炎症の度合いが異なっていた。また, 文献においても 0.5-5%まで様々な濃度での報告があるため

(<https://www.chondrex.com/documents/dss-02.pdf>), 適切な炎症を誘発できるか確認する必要があると考え, PS の反復投与試験に先立って DSS 投与の条件設定を実施した。

B. 研究方法

B-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定①-短期投与

被験物質として MP Biomedicals より製造ロット番号 S2187 の DSS (分子量 36-50 kDa) を購入した。動物は 5 週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し, 1 週間の馴化後, 実験に供

した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24\pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55\pm 5\%$, 換気回数 18 回/時(オールフレッシュ), 12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で, 飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 匹ずつ収容し, 床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い, 週 2 回交換を行った。また, 実験期間中は基礎食として固形 CRF-1 を自由摂取させた。

動物試験では, 6 週齢の雄性 F344 ラット各群 4 匹に, DSS を 1.0 または 3.0%の濃度で 1 週間自由飲水投与した。投与期間中は一般状態及び便性状を観察するとともに, 体重及び飲水量測定を実施した。明らかな一般状態の悪化を示した動物については, イソフルラン深麻酔下にて腹部大動脈より放血安楽殺した。計画屠殺例については投与期間終了後にイソフルラン深麻酔下にて腹部大動脈より放血安楽殺した。剖検時に小腸及び大腸を摘出し, 10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。ホルマリン固定サンプルを用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し, HE 染色標本作製して病理組織学的検査を行った。

B-2. 情報収集

PS を含む高分子ナノマテリアルについて, Web 検索により, 近年の欧州委員会における毒性評価情報及び文献情報を収集した。

C. 研究結果

C-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定-短期投与

実験期間中, 3.0%濃度群の全例で軽度から重度の血便及び体重増加抑制の傾向がみられ, うち 2 例が投与開始 5 日後に切迫屠殺となった。1.0%濃度群では実験期間中に 1 例で肛門周囲被毛の汚れがみられたものの, 体重増加抑制の傾向等は認められなかった。

病理組織学的検索では, 直腸においては 3.0%濃度群で出血, 陰窩膿瘍やリンパ組織過形成を伴う慢性の潰瘍性病変がみられた一方で, 1.0%濃度群では杯細胞減少を伴う散在性の糜爛性病変が認められた(Figure 1-1)。結腸においては 3.0%濃度群で粘膜上皮の好塩基性化や固有層及び粘膜下織における慢性の炎症細胞浸潤がみられた一方で, 1.0%濃度群では固有層における散在性の炎症細胞浸潤のみが認められた(Figure 1-2)。小腸ではいずれの投与群においても著変は認められなかった。

C-2. 情報収集

2021 年 1 月に, 欧州委員会の Scientific Committee

on Consumer Safety (SCCS) の専門家パネルは化粧品中のナノマテリアルの安全性に関する提言を提出した

(https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_239.pdf). その中で、潜在的に安全性への懸念があるナノマテリアルとしてスチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)+スチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)(SCCS/1595/18)を取り上げている。その他の対象としては、銀ナノ粒子(ナノ)(SCCS/1596/18)、シリカ、水和シリカ、およびアルキルシリレート(ナノフォーム)で修飾されたシリカ表面(SCCS/1545/15)]をあげている。

スチレン/非晶ポリアリレート共重合体(ナノ)に関する記述

・物理化学的側面

1. 他の物質を含むスチレン/アクリレート共重合体(ナノビーズ)は、ナノスケール(20-160 nm)の粒子で構成されている(SCCS/1595/18)。

2. スチレン/アクリレート共重合体は、ナノスケールの非溶解性粒子で構成されており、報告されている溶解度は0.01 mg/L未満であり、水性媒体へのそれ以上の溶解はない(SCCS/1595/18)。

3. 不溶性ポリマーの性質により、スチレン/アクリレート共重合体は、一般に不溶性、非分解性、および本質的に持続性である他のマイクロ/ナノプラスチックと類似している(Ganesh Kumar et al, 2020)。したがって、SCCSは、スチレン/アクリレート共重合体の安全性評価に使用できる可能性のある他のマイクロ/ナノプラスチックの物理化学的および毒物学的側面に関する入手可能なデータも調査した。

・毒物学的側面

4. マイクロ/ナノプラスチック(スチレン/アクリレート共重合体を含む)は、潜在的な毒物学的危険性について以下の様に報告されている。

遺伝毒性:

PS ナノ粒子(100 nm)は、ヒト線維芽細胞の *in vitro* での細胞質分裂ブロック小核(CBMN)アッセイでDNA損傷を誘発することが示されている(Poma et al, 2019)。PS ナノ粒子(~100 nm)の表面にタンパク質コロナが存在すると、コメットアッセイでリンパ球のDNA損傷が増加することが報告されている(Gopinath et al, 2019)。しかし、CHO-K1細胞におけるPS ナノ(47-64 nm)およびマイクロ(565-597 nm)粒子の小核アッセイからは、否定的な結果が報告されている(Hesler et al, 2019)。

一般毒性:

ナノプラスチックに関するほとんどの懸念は、そ

の持続性と環境への影響に関連している(Ng et al.2018, Alimba and Faggio 2019, Stapleton 2019, Yong et al.2020, Ganesh Kumar et al, 2020)。最近では、哺乳類とヒトの毒性に関する懸念がより注目を集めているが、データは一般的に不足している(Lehner et al. 2019, Chang et al. 2020, Stapleton 2019, Yong et al. 2020, Allan et al. 2020 でレビューされている)。プラスチック粒子の考えられる毒性作用は、プラスチック自体の潜在的な毒性、および浸出性添加剤や吸着汚染物質との複合毒性に起因している(Chang et al, 2020)。

インビトロ研究では、PS粒子は、Caco-2とHT29-MTX-E12またはBeWo b30細胞の共培養に対して急性毒性はなく、腸および胎盤の障壁を通過しなかったが、ナノ(47-64 nm)およびマイクロ(565-597 nm) PS粒子は、細胞への取り込みと細胞内蓄積を示した(Hesler et al, 2019)。同じ研究で、NIH/3T3およびマウス胚性幹細胞について25µg/mLを超える用量でPS微粒子の細胞毒性が観察され、胚性幹細胞における心筋細胞の分化は、1µg/mLの用量への曝露後に妨げられた。微粒子は、細胞毒性と胚毒性の両方の点でナノ粒子よりも毒性が高いことがわかった(ナノ粒子IC50>100µg/mL, 微粒子IC50>12.6µg/mL)が、どちらも弱毒性とされた。

PS ナノプラスチック(粒子サイズ~100 nm)では、10µg/mLの暴露量でかなりの細胞毒性と溶血が観察されたが、粒子表面でのタンパク質コロナ形成後に劇的に増加した(Gopinath et al, 2019)。

5. SCCS/1595/18で評価された2つの物質(マンヌロン酸メチルシラノールとヒアルロン酸ジメチルシラノール)の毒性データは入手できない。ただし、シラノールは、シラノール基(≡Si-OH; =Si(OH)2)が化学構造に組み込まれているさまざまな複雑さの化合物で構成されている。シラノールは、シリカ粒子の表面に化学官能基として存在し、シリコンナノ粒子の親水性(Napierska et al, 2010)を規定している。角膜毒性に関して、長鎖シラノール末端化合物は短鎖シラノール末端化合物よりも毒性が高いことが明らかとなった(Green et al.1992)。

・暴露の側面

6. 他の化合物が充填されたスチレン/アクリレート共重合体ナノビーズの使用の目的は、制御された拡散により皮膚レベルで化合物の徐放を提供するとされている。SCCSは、これを化粧品にナノスケールで物質を使用する新しい方法のテストケースと見なしている。このタイプのアプリケーションは、多くの他の(生物活性)物質を多数のアプリケーションで使用する機会を開く可能性があり、その結果、安全性がまだ評価されていないナノカプセル化材料への消費者の曝露が広がることになる。

・その他の側面

7. スチレン/アクリレート共重合体ナノビーズにカプセル化された物質に関する情報は事実上存在しないが、疎水性プラスチック製のナノサイズの担体に物質をカプセル化すると、カプセル化されていない形態の同じ物質と比較して、その毒物学的影響をさらに変化させる可能性のある生物動力学的挙動を示す可能性があると考えられる。このようなナノキャリアは、皮膚または他の全身器官のより深いところに物質を送達する可能性があるため、このタイプのアプリケーションは、さまざまな化粧品アプリケーションのために他の多数の物質をカプセル化するために使用できる。ただし、ポリマーとカプセル化物質の安全性を個別に示すことができたとしても、ナノスケールの実体の形でまとめた場合、これを2つの安全性の証拠と見なすことはできないことに注意が重要である。これに関連して、SCCSは、ポリマーマトリックスにナノカプセル化された化合物の安全性を実証するのに十分なデータがない場合、そのようなアプリケーションは消費者の安全性に対する懸念を構成すると考えている。

・まとめ

物理化学的、毒物学的、および暴露の側面を総合的に検討すると、他の物質をカプセル化したスチレン/アクリレート共重合体のナノビーズの使用が懸念される根拠があると考えている。化粧品は、消費者に健康上のリスクをもたらす可能性がある。SCCSは、化粧品での材料の安全な使用をサポートするために提供された証拠を評価する準備がある。

PubMedにおける文献検索では、polystyrene nanoparticle toxicityのキーワードでも、2020年に71件、2021年も現時点(5月)で32件の文献が見られる。PS ナノ粒子が様々な細胞に取りこまれ得ることが、報告されている。

D. 考察

D-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定-短期投与

健常ラットと腸炎モデルラットを用いた PS 粒子の反復経口投与実験を実施するにあたり、F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できる DSS の製造ロットを探索するとともに、DSS の自由飲水投与の至適濃度を設定する目的で、まずは F344 ラットに起炎作用を発揮する濃度の DSS を 1 週間自由飲水投与した。

その結果、製造ロット番号 S2187 の DSS において、3.0 % 濃度群では全例にび慢性の潰瘍性病変が誘発されたのに対し、1.0 %濃度群では全例に散在性の糜爛性病変が誘発されたことから、製造ロット番号

S2187 の DSS では F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できることが明らかになった。一方で、DSS 誘発腸炎モデルラットを用いた PS 粒子の反復経口投与実験を行う上では、若干軽度の腸炎が持続的に誘発されたラットを用いるのが適切と考えられたことから、3.0 %の投与濃度は不適と判断した。

D-2. 情報収集

欧州委員会の提言では、ナノスチレンは環境と共にほ乳類やヒトの毒性影響が懸念されるもののデータが不足しており、結論には達することができないとの見解と考えられた。

E. 結論

E-1. F344 ラットを用いた DSS 誘発腸炎モデル作製のための DSS 投与実験の条件設定-短期投与

F344 ラットを用いた DSS の 1 週間自由飲水投与の結果より、製造ロット番号 S2187 の DSS では F344 ラットに安定的に腸炎を誘発できたものの、3.0 %の濃度では腸炎の程度が重度であったことから、3.0 %よりも低濃度の DSS を用い、軽度な腸炎を持続的に誘発できる自由飲水投与の条件検討が必要と考えられた。

E-2. 情報収集

ナノサイズを含む、PS の毒性影響については、情報が不十分とされていた。特に、海外において *in vivo* のデータは、ほとんど得られないことが、評価をより困難にしていると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

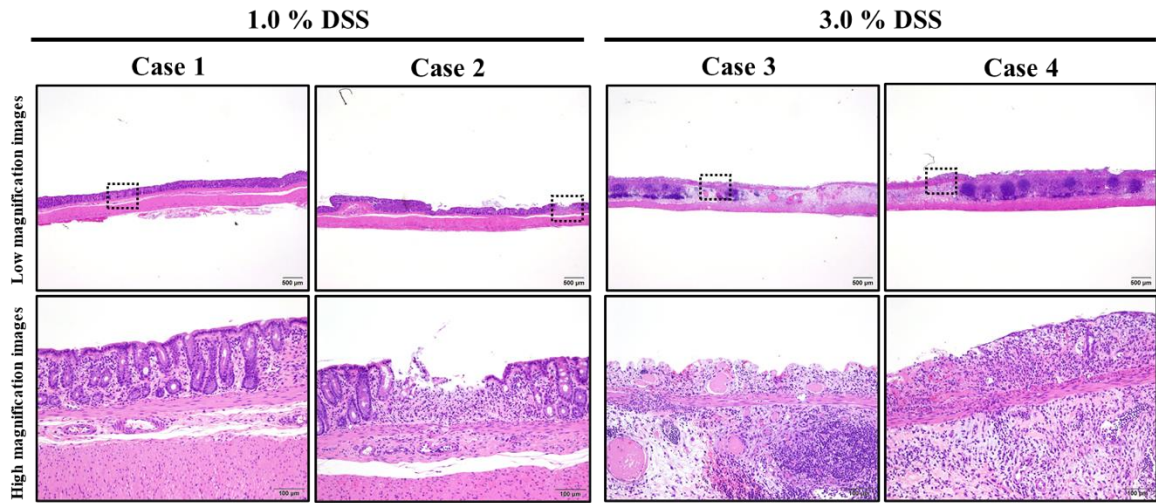


Figure 1-1. Histopathological changes in the rectum of F344 rats treated with DSS for 1 week.

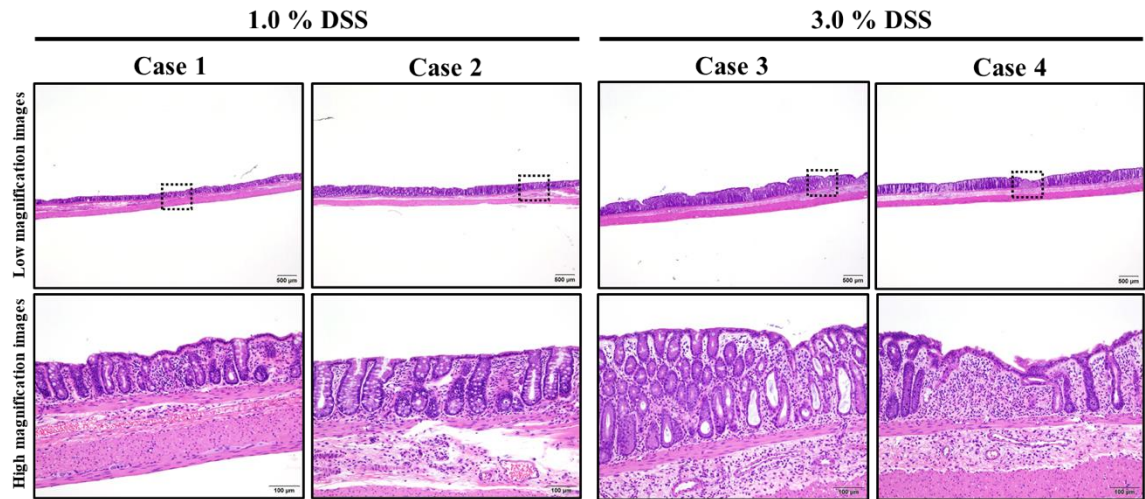


Figure 1-2. Histopathological changes in the colon of F344 rats treated with DSS for 1 week.

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
腸管粘膜バリア破綻条件下での高分子化合物の経口暴露による毒性影響の解明

総合分担研究報告書

腸炎モデルラットにおける高分子化合物ポリスチレンの 28 日間反復投与実験における病理評価

研究分担者 赤根 弘敏 国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究官

研究要旨

食品中から検出されている高分子化合物の一つであるポリスチレン (PS) 粒子については、生物に対する物理的影響を検証した報告が多く存在する。水生生物に対しては、マイクロスケール（一次粒径 0.1-5000 μm ）の PS 粒子であれば毒性影響を誘発しない一方で、ナノスケール（一次粒径 0.001-0.1 μm ）の PS 粒子では生存率、摂食率、代謝反応、免疫反応、抗酸化作用の低下や神経症状の誘発等の毒性影響に関する報告がされている。しかしながら、動物に対しては、マイクロスケールの PS 粒子を用いたマウスの経口投与による亜急性毒性試験において、腸管や他の主要臓器に毒性影響はみられなかったとの報告があるものの、ナノスケールの PS 粒子については詳細に検討した報告はなく、ヒトへの影響を評価するためのデータは国内外ともに乏しいのが現状である。本研究では、健常ラットと腸炎モデルラットに高分子化合物である PS 粒子を反復経口投与した際の生体影響について比較・検証し、ナノ化高分子化合物のリスク評価に資するデータを得ることを目的とした。本年度は、これまでに得られたデータに基づき、飲料水として調整水を継続的に与えた健常ラット及び 1% DSS 水を 1 週おきに与えた腸炎ラットにおいて、2 サイクル目より PS 粒子（30 nm 及び 300 nm）を強制経口投与（40, 200 及び 1000 mg/kg 体重/日）する 28 日間反復投与毒性試験を実施し、病理評価を行った。

その結果、臓器重量測定において PS 投与による影響はみられず、また病理組織学的検査においても PS 投与による毒性影響は認められなかった。

A. 研究目的

腸管は粘液や上皮細胞から構成される“粘膜バリア”で保護されていることから、経口暴露によって高分子化合物や金属等の粒子状物質が体内へ吸収される量は少ないと予想される。実際に、ナノマテリアルの一つであるナノシリカ（一次粒径0.1 μm 以下のシリカ）の実験動物を用いた研究では、静脈内投与では重篤な毒性発現が報告されているものの (Jpn. J. Hyg., 2010, 65: 487-492), 強制経口投与では2000 mg/kg体重の投与量で90日間の毒性試験を実施した場合でも毒性影響は認められなかったと報告されている (Int. J. Nanomed., 2014, 9: 67-78)。しかしながら、ヒトの腸管には感染性腸炎等の急性炎症や潰瘍性大腸炎等の慢性炎症が存在することは稀ではなく、そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、明確な評

価に足るデータは乏しいものの、高分子化合物は直接腸管の深部組織に接することとなり、容易に全身循環し、通常とは異なる生体影響や体内動態を示す可能性がある。

本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の飲料水投与によるラット腸炎モデルを用いて、健常ラットと腸炎ラットに高分子化合物を経口投与した際の生体影響や体内動態について比較・検証し、腸炎による腸管粘膜バリアの破綻が、経口暴露された高分子化合物の毒性発現に影響を及ぼし得るかを明らかにすることを目的とした。研究分担者：赤根は動物実験を実施し、病理検査を担当した。

B. 研究方法

B. 研究方法

B-1. 被験物質及び動物

初年度は、高分子化合物としてポリスチレン(PS)粒子を選定し、PS粒子の投与量設定試験及びDSSのロットチェック(起炎作用評価)試験を実施し、30 nm及び300 nmの2サイズのPSについて、1000 mg/kg体重/日の用量までラットに経口投与可能であることを確認し、腸炎を誘発できるDSSの製造ロットを決定した。2年度目は、ラットに持続的な腸炎を誘発できるDSSの投与濃度を決定するための予備試験として、DSSを1週間投与後1週間休薬する処置を1サイクルとし、1%または2%の濃度で3サイクル飲水投与し、経時的な大腸の炎症所見評価によって、投与濃度を1%と決定した。3年度目は、これまでに得られたデータに基づき、飲料水として調整水を継続的に与えた健常ラット及び1% DSS水を1週おきに与えた腸炎ラットにおいて、2サイクル目よりPS粒子を強制経口投与する28日間反復投与毒性試験を実施した。

PSは、Thermo社の5000シリーズポリマー粒子懸濁液の30 nm(#5003B)及び300 nm(#5030B)の2サイズを選定し、40、200及び1000 mg/kg体重/日の用量に蒸留水で調整して投与した。PSの分散については、動的光散乱光度計(大塚電子株式会社)を用いて測定した。DSSは、MP Biomedicalsの製造ロット番号S2187(分子量36-50 kDa)を使用した。動物は5週齢の雄性F344ラットを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、1週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、12時間蛍光灯照明/12時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに2匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週2回交換を行った。また、実験期間中は基礎食として固形CRF-1を自由摂取させた。

B-2. 動物試験

6週齢の雄性F344ラット計70匹を平均体重が均一となるように各群5匹ずつ14群に割り付けた。飲料水として調整水を投与する健常群及び1%DSSの間欠投与で大腸炎を誘発させる大腸炎群を設定した。DSS投与群にはDSSを1%の濃度で1週間飲料水に混じて自由摂取させ、次の1週間は調整水を摂取させるサイクルを3回繰り返した。2週目からは30 nm及び300 nmのPSをそれぞれ40、200及び1000 mg/kg体重/日の用量で、プラスチック製ディスポーザブル経口ゾンデを用いて10 ml/kg体重の容量で28日間強制経口投与した。対照群には溶媒の蒸留水を等量経口投与した。投与量は直近の体重に基づ

いて算出した。

実験開始8週間後(PS投与28日後)半日の絶食後イソフルラン深麻酔下にて腹部大動静脈より採血後、放血安楽殺した。剖検時に全臓器を肉眼観察後摘出し、大腸は内腔にホルマリンを注入して進展させた後に腸間膜付着部に沿って切開・展開し、濾紙に挟んで10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、全長の標本作製を行った肝臓、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺、下垂体、脳、胸腺、肺、心臓、精巣、精嚢、前立腺、唾液腺重量の測定を行い、心臓、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、縦隔リンパ節、胸腺、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、鼻腔、気管、肺、舌、顎下腺、舌下腺、耳下腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、乳腺、大脳、小脳、脊髄、三叉神経、坐骨神経、大動脈、眼球、ハーダ-腺、皮膚、胸骨、大腿骨、骨格筋、ジンバル腺については、定法通りにヘマトキシリン-エオジン染色標本を作製し病理組織学的検査を実施した。分析の必要性に備え、肝臓、腎臓及び脾臓の凍結検体も保存した。また、PSは有機溶剤に可溶性であるため、調整水群及びDSS群の対照群と30 nm及び300 nm PSの1000 mg/kg体重/日投与群各群2匹について、ホルマリン固定臓器から空腸、回腸、肝臓の凍結切片を作製し、被験物質の観察を行った。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た後に実施した。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扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。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扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

C-1 臓器重量

臓器重量では、調整水群の30 nm PSの40 mg/kg体重/日投与群において、対照群と比較して脳の絶対重量の高値及び、300 nm PSの40 mg/kg体重/日投与群において、対照群と比較して甲状腺の絶対重量の高値及び副腎の相対重量の低値が認められた(Table

1).

C-2 病理組織学的検査

剖検時、高用量のPS投与群では、腸管内容物が白色調を示したが、組織には肉眼的所見は見られなかった。病理組織学的検査では、DSS水群において、PSの投与に関わらず全ての群で結腸に軽微な粘膜上皮再生像(Figure 1)、及び、直腸に軽微なびらん/潰瘍、中等度～高度な粘膜上皮再生像(Figure 2)並びに軽微～軽度の粘膜上皮過形成(Figure 3)が認められた(Table 2)。軽微な粘膜上皮再生像は、DSS水群の対照群、30 nm PSの1000 mg/kg体重/日投与群及び300 nm PSの1000 mg/kg体重/日投与群の盲腸においても、5匹中それぞれ4匹、3匹及び3匹に認められた(Figure 4)。また、腸間膜リンパ節の軽微～軽度のマクロファージの空胞化(Figure 5)がDSS水群の対照群、30 nm PSの1000 mg/kg体重/日投与群及び300 nm PSの1000 mg/kg体重/日投与群の全例に認められた。その他、心筋内の局所的な単核細胞浸潤、肺胞内の局所的な出血、腎臓の集合管鉍質沈着、前立腺の間質内単核細胞浸潤が1～2例に認められた(Table 3)。

また、ポリスチレンは、通常病理組織標本の作製時に用いるキシレンなどの有機溶剤に溶解されるため、ヘマトキシリン-エオジン標本上では腸管内を含め、被験物質は確認されなかった。被験物質の観察を目的に、調整水群及びDSS群の対照群と30 nm及び300 nm PSの1000 mg/kg体重/日投与群各群2匹について、ホルマリン固定臓器から空腸、回腸、肝臓の凍結ブロックを作製し、薄切してヘマトキシリンにより染色して水溶性封入剤による封入を施した。全てのPS投与群において空腸、回腸の内腔に投与したPSのサイズにかかわらず、約2 µmまでの透明な粒状物が確認された(Figure 4)。一方、肝臓を含む組織内には顆粒状物は認識されず、異物を貪食した巨細胞浸潤も認めなかった。

D. 考察

これまでの検討から、分子量36-50 kDaのDSSを1%の用量でF344ラットに飲料水投与することにより、重篤な血便までは至らず、結腸及び直腸にびらん/潰瘍並びに上皮の再生性変化を伴う、潰瘍性大腸炎を模した大腸炎を誘発すること、1週間の休薬でも炎症所見が持続していることが確認された。健常ラット及びDSS水の間欠投与による大腸炎ラットにおいて、30 nm及び300 nmの

PSを40、200及び1000 mg/kg体重/日の用量に蒸留水で調整して28日間強制経口投与し、全身諸臓器への毒性影響を検討した。

臓器重量では、調整水群の30 nm PSの40 mg/kg体重/日投与群において、対照群と比較して脳の絶対重量の高値及び、300 nm PSの40 mg/kg体重/日投与群において、対照群と比較して甲状腺の絶対重量の高値及び副腎の相対重量の低値が認められたが、用量相関性も示さないことから、PS投与による影響ではないと考えられた。病理組織学的検査では、DSS水投与群では、盲腸、結腸、直腸に腸炎所見が認められ、意図した大腸炎が誘導されていることが確認された。対照群及びDSS投与群の腸間膜リンパ節に、軽微～軽度のマクロファージの空胞化が認められたが、PS投与による増強はみられなかった。その他の変化はF344ラットの自然発生病変として知られる所見であり、用量相関性もないため偶発性の変化と考えられた。凍結標本の観察から、PSは腸管内腔に、透明で一部に凝集を示す微細顆粒状物質として認識されたものの、組織内での局在は確認されなかった。また、全身諸臓器の何れにおいてもPS投与に関連した異物反応は認められなかった。

E. 結論

健常ラット及び腸炎モデルラットに、8週齢時点から28日間、30 nm及び300 nmのPSを40、200及び1000 mg/kg体重/日の用量で強制経口投与し、全身諸臓器への毒性影響を検討したところ、臓器重量測定及び病理組織学的検査においてPSの毒性影響は認められなかった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

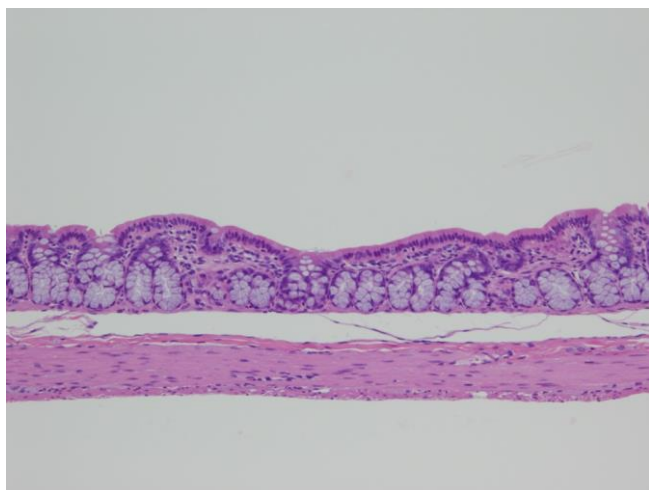
2. 実用新案登録

該当なし。

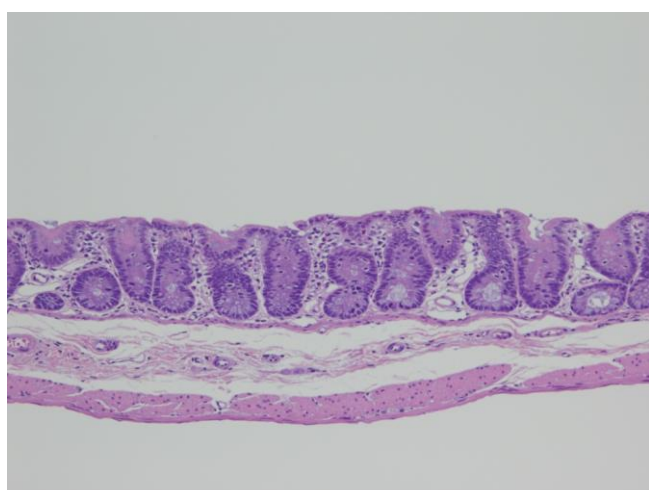
3. その他

該当なし。

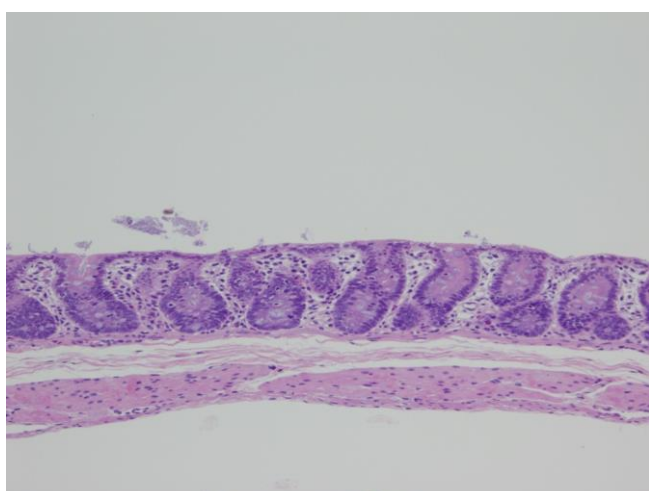
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

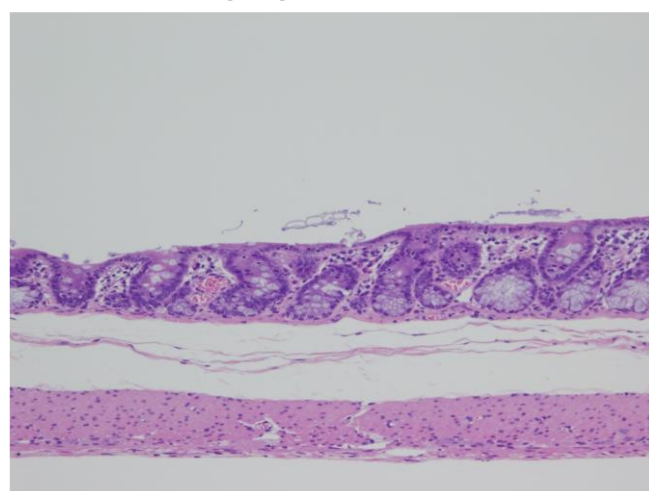
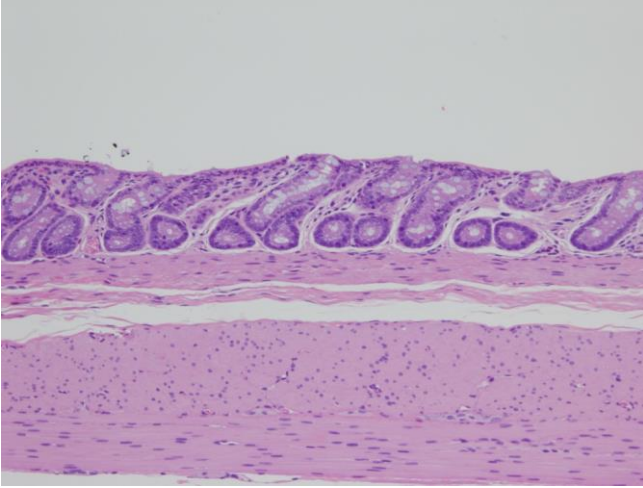
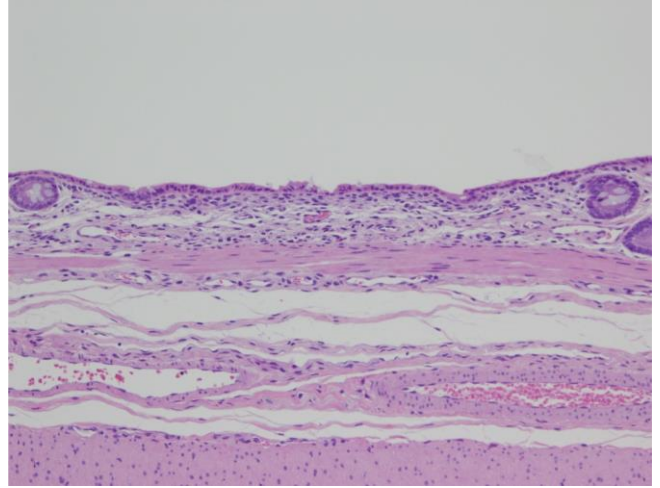


Figure 1. Representative histopathological finding in the colon of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration indicating crypts with increased number of cells showing decreased mucus production was observed in the mucosa of rats treated with DSS.

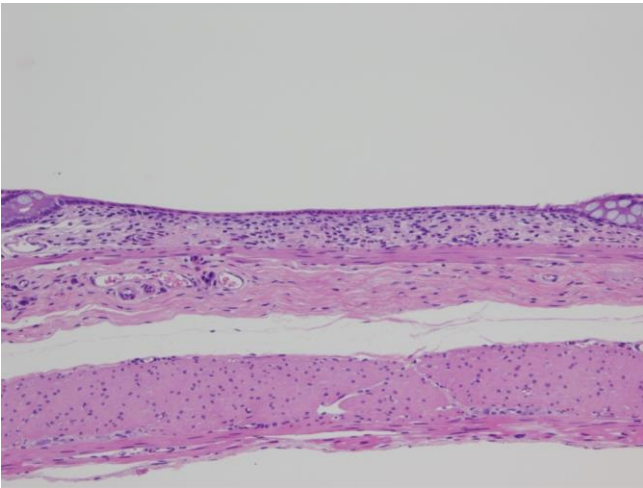
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

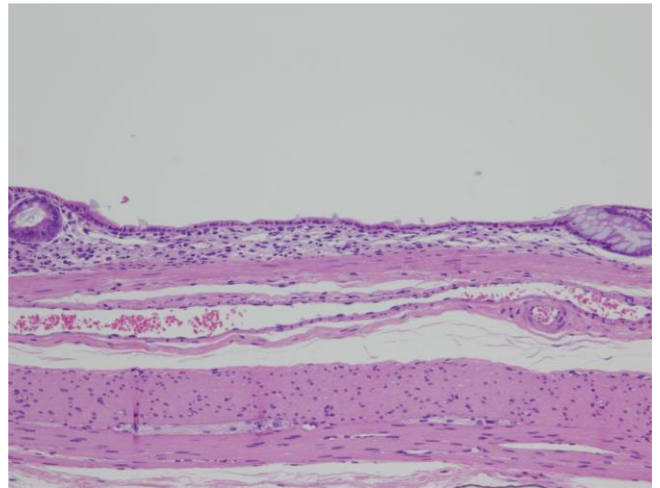
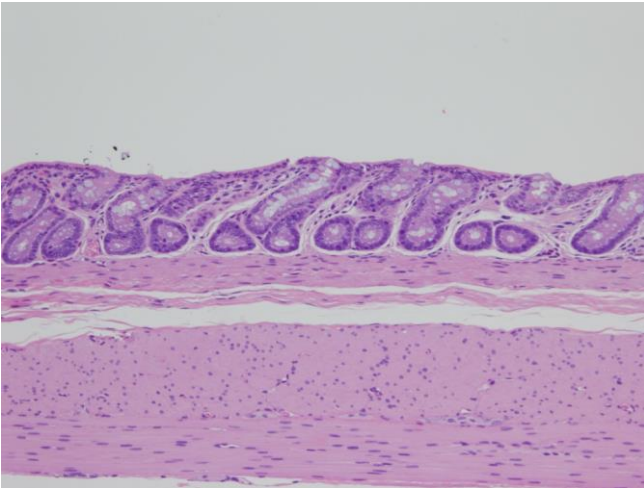
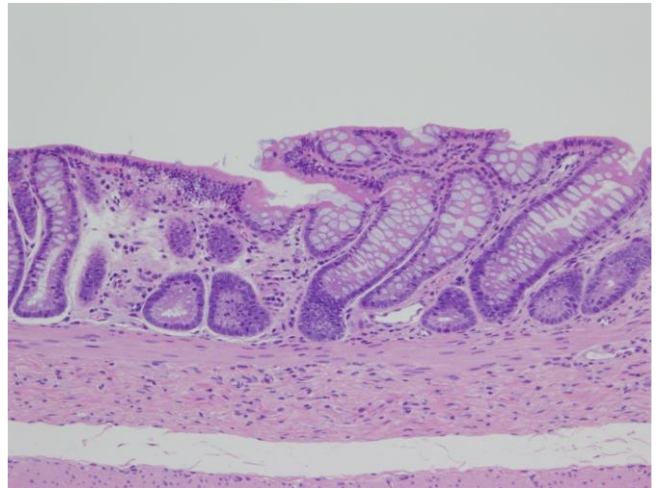


Figure 2. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration without crypts was observed in the mucosa of rats treated with DSS.

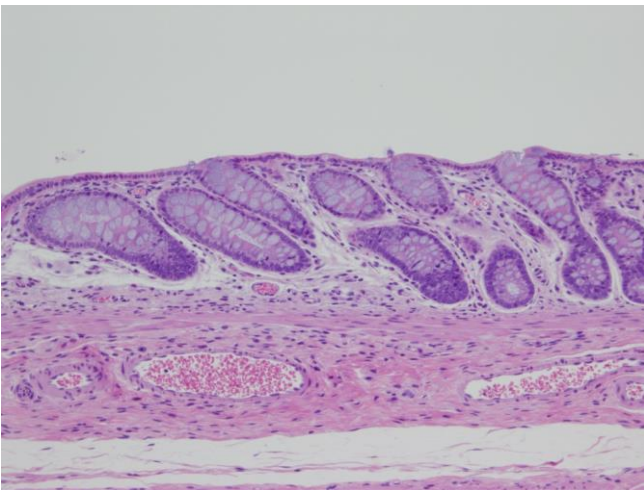
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

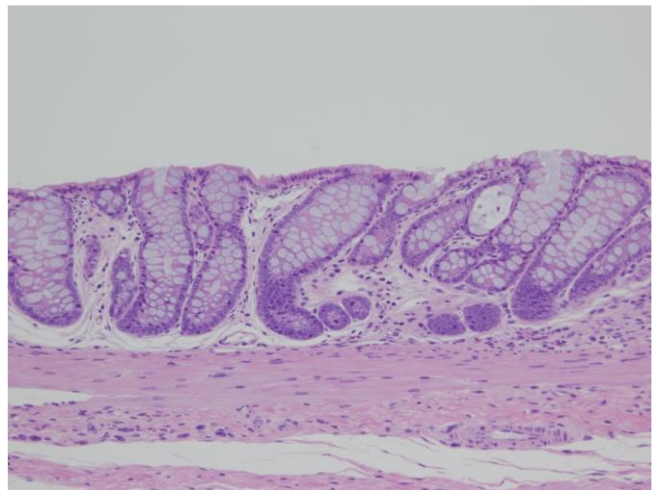
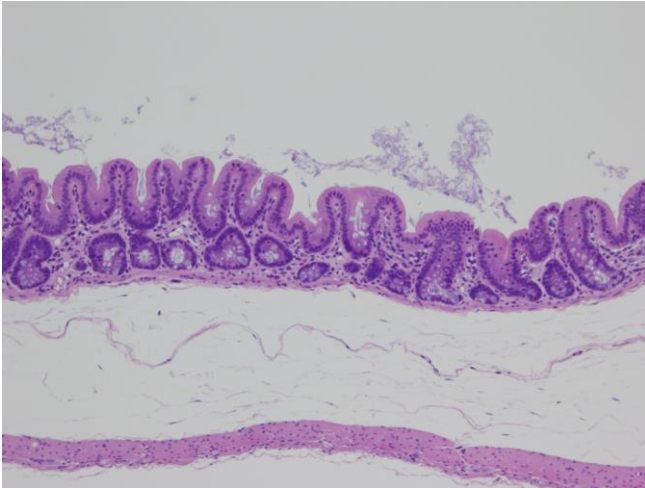
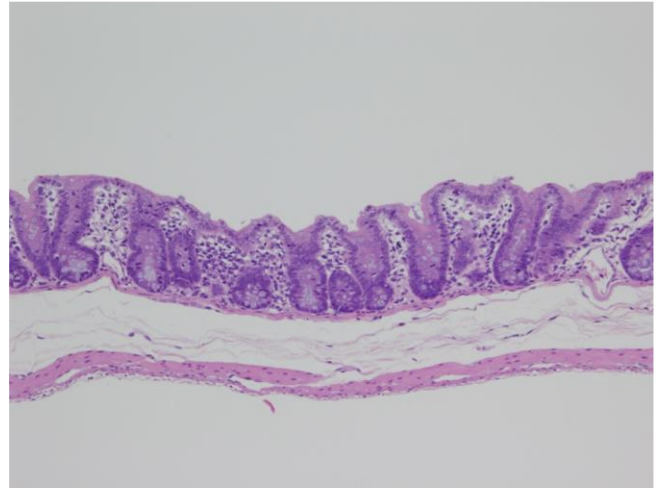


Figure 3. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild hyperplastic mucosal epithelium showing dilatate crypts were observed in the mucosa of rats treated with DSS.

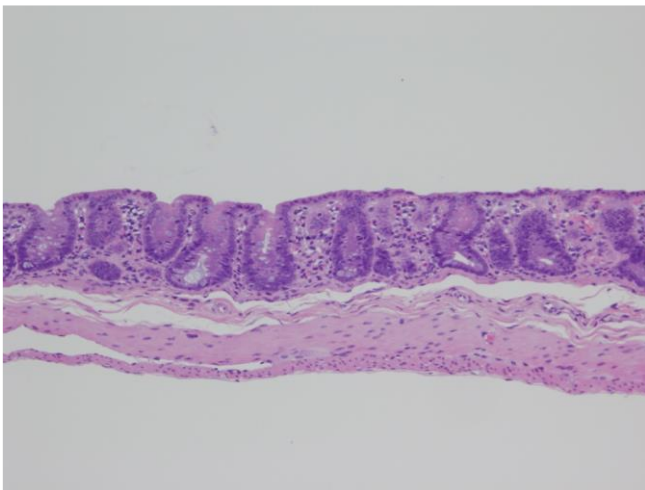
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

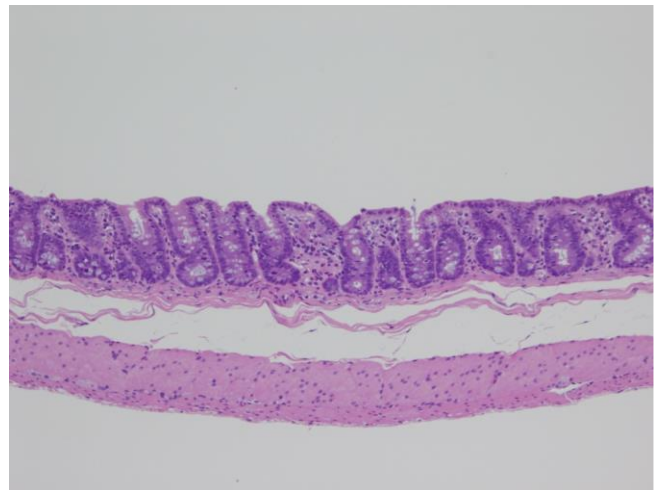
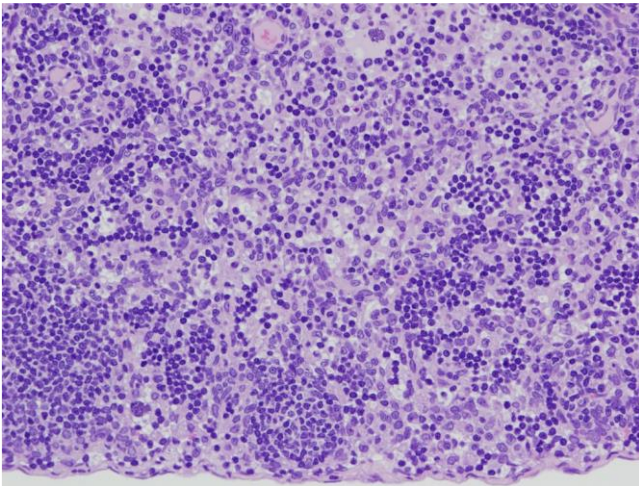
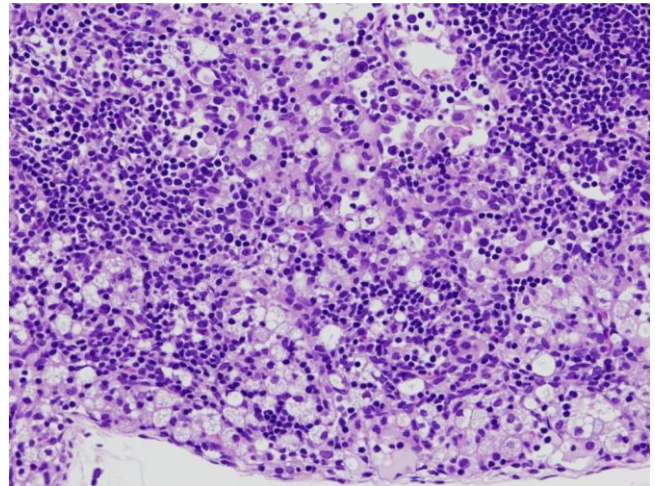


Figure 4 Representative histopathological finding in the cecum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal regeneration was observed in the mucosal epithelium of rats treated with DSS.

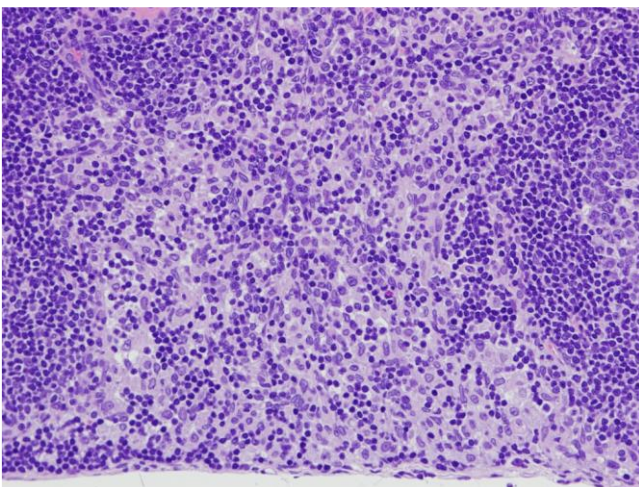
Water+ 0 mg/kg



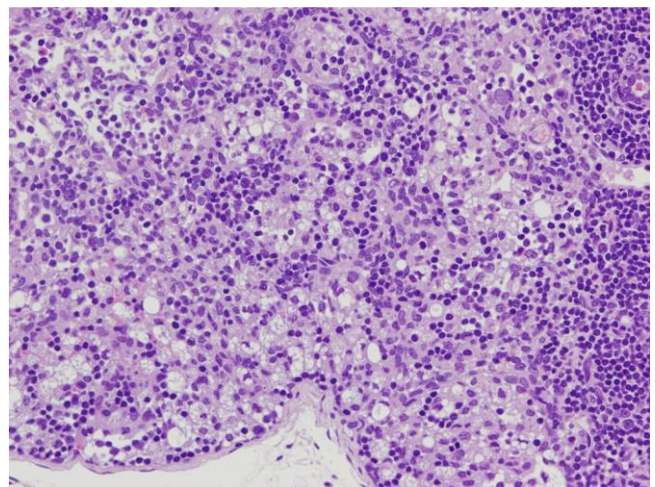
DSS+ 0 mg/kg



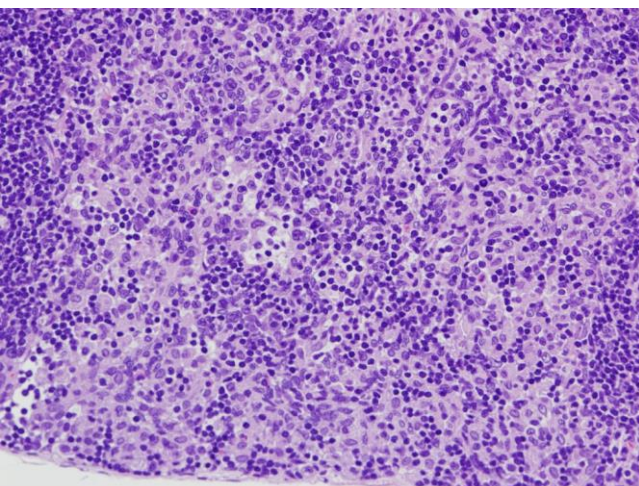
Water+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



Water+1000 mg/kg (300 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

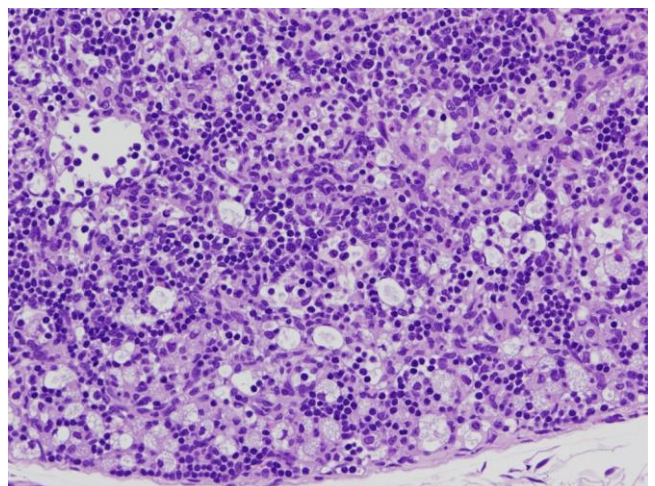
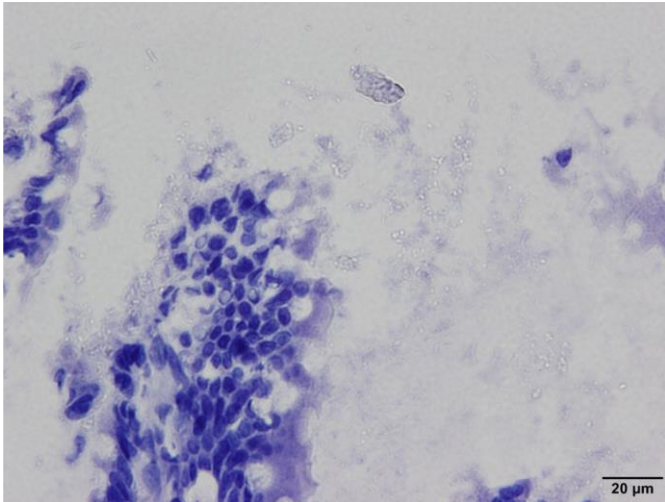


Figure 5. Representative histopathological finding in the mesentery lymph node of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild macrophage infiltration showing vacuolation was observed in rats treated with DSS.

Water+1000 mg/kg (30 nm)



Water+1000 mg/kg (300 nm)

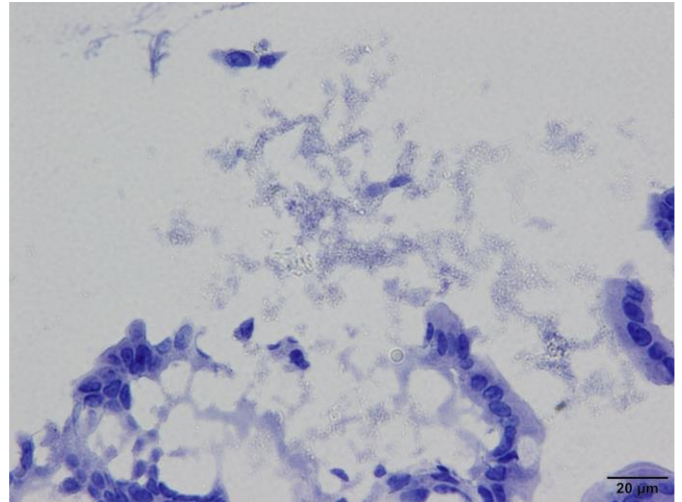


Figure 6. Representative histopathological observation of luminal materials in frozen section of the small intestine of rats administered 30 nm or 300 nm diameter polystyrene for 4 weeks. Translucent particles approximately less than 2 μm with smaller particle as their background were noticed in both group of rats, regardless of the size of the polystyrene administered.

Table 1. Organ weights of F344 male rats treated with polystyrene for 28 days.

Particle size	30 nm						300 nm							
	0		40		200		1000		40		200		1000	
<i>Water</i>														
No. of animals	5		5		5		5		5		5		5	
Body weight (g)	231.9 ± 6.9		241.3 ± 9.1		235.6 ± 12.4		232.7 ± 9.1		245.8 ± 10.9		231.4 ± 14.2		240.7 ± 15.9	
Absolute (g)														
Brain	1.811 ± 0.013		1.885 ± 0.043*		1.855 ± 0.055		1.855 ± 0.033		1.864 ± 0.059		1.825 ± 0.032		1.871 ± 0.032	
Thymus	0.228 ± 0.018		0.238 ± 0.007		0.239 ± 0.039		0.252 ± 0.037		0.255 ± 0.028		0.246 ± 0.028		0.228 ± 0.016	
Lungs	0.803 ± 0.015		0.798 ± 0.039		0.821 ± 0.068		0.787 ± 0.007		0.863 ± 0.065		0.798 ± 0.031		0.844 ± 0.053	
Heart	0.731 ± 0.057		0.773 ± 0.042		0.751 ± 0.030		0.740 ± 0.042		0.777 ± 0.048		0.741 ± 0.043		0.744 ± 0.044	
Spleen	0.515 ± 0.038		0.538 ± 0.034		0.524 ± 0.039		0.502 ± 0.014		0.555 ± 0.056		0.491 ± 0.025		0.529 ± 0.042	
Liver	5.903 ± 0.288		6.152 ± 0.301		6.050 ± 0.400		5.877 ± 0.442		6.360 ± 0.358		6.019 ± 0.681		6.309 ± 0.531	
Adrenals	0.0433 ± 0.0033		0.0389 ± 0.0042		0.0402 ± 0.0041		0.0392 ± 0.0031		0.0380 ± 0.0042		0.0389 ± 0.0056		0.0423 ± 0.0030	
Kidneys	1.474 ± 0.083		1.535 ± 0.045		1.486 ± 0.103		1.534 ± 0.079		1.581 ± 0.066		1.428 ± 0.098		1.525 ± 0.099	
Testes	2.798 ± 0.110		2.834 ± 0.173		2.899 ± 0.167		2.828 ± 0.050		2.827 ± 0.170		2.721 ± 0.116		2.931 ± 0.177	
Pituitary	0.0080 ± 0.0006		0.0083 ± 0.0007		0.0078 ± 0.0003		0.0081 ± 0.0003		0.0078 ± 0.0006		0.0077 ± 0.0004		0.0081 ± 0.0011	
Thyroid	0.0134 ± 0.0010		0.0141 ± 0.0141		0.0137 ± 0.0015		0.0146 ± 0.0010		0.0154 ± 0.0008 ^{##}		0.0135 ± 0.0012		0.0143 ± 0.0009	
Salivary gland	0.407 ± 0.050		0.463 ± 0.029		0.413 ± 0.030		0.431 ± 0.029		0.445 ± 0.037		0.399 ± 0.035		0.450 ± 0.025	
Seminal vesicle	0.685 ± 0.137		0.744 ± 0.029		0.744 ± 0.043		0.740 ± 0.110		0.782 ± 0.132		0.622 ± 0.103		0.731 ± 0.078	
Prostate	0.568 ± 0.051		0.577 ± 0.032		0.525 ± 0.053		0.578 ± 0.056		0.555 ± 0.087		0.516 ± 0.062		0.554 ± 0.066	
Relative (g%)														
Brain	0.781 ± 0.022		0.782 ± 0.038		0.788 ± 0.022		0.798 ± 0.019		0.759 ± 0.032		0.791 ± 0.039		0.780 ± 0.047	
Thymus	0.098 ± 0.005		0.099 ± 0.005		0.101 ± 0.013		0.108 ± 0.012		0.104 ± 0.008		0.106 ± 0.010		0.095 ± 0.010	
Lungs	0.347 ± 0.015		0.331 ± 0.023		0.349 ± 0.024		0.338 ± 0.014		0.351 ± 0.014		0.346 ± 0.017		0.351 ± 0.011	
Heart	0.315 ± 0.016		0.320 ± 0.009		0.319 ± 0.013		0.318 ± 0.018		0.316 ± 0.009		0.320 ± 0.007		0.309 ± 0.011	
Spleen	0.222 ± 0.011		0.223 ± 0.013		0.223 ± 0.014		0.216 ± 0.004		0.226 ± 0.018		0.213 ± 0.013		0.220 ± 0.018	

Liver	2.545 ± 0.053	2.550 ± 0.069	2.566 ± 0.057	2.523 ± 0.101	2.587 ± 0.080	2.595 ± 0.136	2.618 ± 0.058
Adrenals	0.0186 ± 0.0011	0.0162 ± 0.0019	0.0171 ± 0.0018	0.0169 ± 0.0019	0.0155 ± 0.0017 [#]	0.0167 ± 0.0014	0.0176 ± 0.0019
Kidneys	0.635 ± 0.029	0.637 ± 0.017	0.630 ± 0.023	0.659 ± 0.026	0.644 ± 0.021	0.617 ± 0.008	0.634 ± 0.015
Testes	1.208 ± 0.072	1.174 ± 0.048	1.231 ± 0.045	1.217 ± 0.051	1.150 ± 0.049	1.178 ± 0.047	1.218 ± 0.042
Pituitary	0.0035 ± 0.0002	0.0034 ± 0.0003	0.0033 ± 0.0001	0.0035 ± 0.0001	0.0032 ± 0.0002	0.0033 ± 0.0002	0.0034 ± 0.0003
Thyroid	0.0058 ± 0.0005	0.0058 ± 0.0005	0.0058 ± 0.0004	0.0063 ± 0.0004	0.0063 ± 0.0001	0.0058 ± 0.0003	0.0060 ± 0.0003
Salivary gland	0.175 ± 0.022	0.192 ± 0.013	0.175 ± 0.006	0.185 ± 0.006	0.181 ± 0.009	0.173 ± 0.013	0.187 ± 0.006
Seminal vesicle	0.295 ± 0.058	0.309 ± 0.010	0.316 ± 0.025	0.320 ± 0.060	0.317 ± 0.046	0.268 ± 0.033	0.303 ± 0.016
Prostate	0.245 ± 0.023	0.239 ± 0.016	0.224 ± 0.028	0.249 ± 0.030	0.225 ± 0.030	0.223 ± 0.019	0.230 ± 0.018
<i>DSS</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	239.4 ± 16.9	237.9 ± 17.7	236.2 ± 9.6	230.3 ± 18.3	233.7 ± 8.4	241.0 ± 21.4	244.1 ± 9.9
Absolute (g)							
Brain	1.829 ± 0.045	1.826 ± 0.034	1.837 ± 0.028	1.808 ± 0.074	1.823 ± 0.035	1.857 ± 0.076	1.832 ± 0.041
Thymus	0.243 ± 0.037	0.247 ± 0.053	0.240 ± 0.009	0.231 ± 0.044	0.232 ± 0.018	0.248 ± 0.048	0.237 ± 0.016
Lungs	0.774 ± 0.053	0.779 ± 0.067	0.750 ± 0.060	0.791 ± 0.076	0.820 ± 0.092 ⁽⁴⁾	0.829 ± 0.091	0.796 ± 0.040
Heart	0.732 ± 0.058	0.731 ± 0.071	0.735 ± 0.045	0.737 ± 0.032	0.730 ± 0.027	0.758 ± 0.061	0.752 ± 0.048
Spleen	0.536 ± 0.038	0.506 ± 0.046	0.521 ± 0.031	0.527 ± 0.029	0.517 ± 0.030	0.525 ± 0.045	0.537 ± 0.055
Liver	6.395 ± 0.380	6.429 ± 0.749	6.352 ± 0.379	6.216 ± 0.498	6.120 ± 0.345	6.383 ± 0.628	6.451 ± 0.428
Adrenals	0.0405 ± 0.0039	0.0448 ± 0.0076	0.0397 ± 0.0026	0.0433 ± 0.0033	0.0411 ± 0.0038	0.0414 ± 0.0026	0.0424 ± 0.0031
Kidneys	1.531 ± 0.144	1.524 ± 0.147	1.514 ± 0.052	1.550 ± 0.108	1.494 ± 0.038	1.510 ± 0.131	1.527 ± 0.077
Testes	2.845 ± 0.218	2.786 ± 0.091	2.807 ± 0.113	2.745 ± 0.216	2.846 ± 0.196	2.887 ± 0.172	2.846 ± 0.103
Pituitary	0.0079 ± 0.0009	0.0083 ± 0.0008	0.0086 ± 0.0004	0.0088 ± 0.0011	0.0090 ± 0.0013	0.0085 ± 0.0008	0.0078 ± 0.0005
Thyroid	0.0139 ± 0.0021	0.0137 ± 0.0013	0.0134 ± 0.0009	0.0133 ± 0.0027	0.0138 ± 0.0003	0.0156 ± 0.0018	0.0148 ± 0.0012
Salivary gland	0.425 ± 0.032	0.430 ± 0.023	0.452 ± 0.037	0.422 ± 0.025	0.431 ± 0.037	0.436 ± 0.041	0.421 ± 0.026
Seminal vesicle	0.751 ± 0.114	0.717 ± 0.062	0.678 ± 0.093	0.756 ± 0.114 ⁽⁴⁾	0.798 ± 0.085	0.672 ± 0.097	0.742 ± 0.112
Prostate	0.539 ± 0.096	0.483 ± 0.033	0.496 ± 0.076	0.523 ± 0.059 ⁽⁴⁾	0.522 ± 0.046	0.467 ± 0.051	0.504 ± 0.066

Relative (g%)

Brain	0.766 ± 0.048	0.771 ± 0.047	0.779 ± 0.034	0.787 ± 0.034	0.781 ± 0.034	0.773 ± 0.037	0.751 ± 0.024
Thymus	0.102 ± 0.016	0.103 ± 0.015	0.102 ± 0.004	0.100 ± 0.013	0.099 ± 0.005	0.102 ± 0.012	0.097 ± 0.004
Lungs	0.324 ± 0.012	0.328 ± 0.023	0.317 ± 0.016	0.344 ± 0.027	0.353 ± 0.032 ⁽⁴⁾	0.344 ± 0.018	0.326 ± 0.011
Heart	0.306 ± 0.015	0.307 ± 0.015	0.311 ± 0.013	0.321 ± 0.015	0.312 ± 0.006	0.315 ± 0.014	0.308 ± 0.009
Spleen	0.224 ± 0.011	0.213 ± 0.012	0.220 ± 0.007	0.230 ± 0.018	0.221 ± 0.009	0.218 ± 0.006	0.220 ± 0.017
Liver	2.673 ± 0.070	2.696 ± 0.121	2.689 ± 0.081	2.700 ± 0.026	2.618 ± 0.081	2.648 ± 0.101	2.641 ± 0.078
Adrenals	0.0169 ± 0.0006	0.0190 ± 0.0044	0.0168 ± 0.0013	0.0190 ± 0.0027	0.0176 ± 0.0020	0.0173 ± 0.0020	0.0174 ± 0.0012
Kidneys	0.639 ± 0.030	0.640 ± 0.031	0.641 ± 0.015	0.674 ± 0.021	0.640 ± 0.027	0.627 ± 0.021	0.626 ± 0.015
Testes	1.188 ± 0.016	1.174 ± 0.057	1.190 ± 0.067	1.193 ± 0.052	1.220 ± 0.110	1.202 ± 0.083	1.167 ± 0.053
Pituitary	0.0035 ± 0.0001	0.0035 ± 0.0003	0.0036 ± 0.0001	0.0038 ± 0.0004	0.0039 ± 0.0006	0.0035 ± 0.0002	0.0032 ± 0.0003
Thyroid	0.0058 ± 0.0007	0.0057 ± 0.0003	0.0057 ± 0.0004	0.0058 ± 0.0009	0.0059 ± 0.0003	0.0065 ± 0.0004	0.0061 ± 0.0005
Salivary gland	0.178 ± 0.012	0.181 ± 0.010	0.191 ± 0.013	0.184 ± 0.012	0.185 ± 0.019	0.181 ± 0.013	0.172 ± 0.012
Seminal vesicle	0.313 ± 0.039	0.303 ± 0.035	0.287 ± 0.033	0.336 ± 0.038 ⁽⁴⁾	0.342 ± 0.040	0.279 ± 0.033	0.304 ± 0.045
Prostate	0.225 ± 0.035	0.204 ± 0.023	0.210 ± 0.029	0.233 ± 0.022 ⁽⁴⁾	0.223 ± 0.016	0.196 ± 0.034	0.206 ± 0.023

Values are mean±S.D.

*: Significantly different from the 0 mg/kg BW/day group at $p < 0.05$.

#, ##: Significantly different from the 0 mg/kg BW/day group at $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

Table 2. Histopathological findings in the colon and rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Organ	Finding	Particle size		30 nm			300 nm		
		Dose (mg/kg BW/day)	0	40	200	1000	40	200	1000
<i>Water</i>									
	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
	Colon		0	0	0	0	0	0	0
	Rectum		0	0	0	0	0	0	0
<i>DSS</i>									
	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
Colon	Erosion/ulcer		0	0	0	0	0	0	0
	Regeneration, mucosal epithelium (±/+/+/+/+++)		3 (3/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	2 (2/0/0/0)
Rectum	Erosion/ulcer (±/+/+/+/+++)		4 (4/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	2 (2/0/0/0)	4 (4/0/0/0)	3 (3/0/0/0)	5 (5/0/0/0)
	Regeneration, mucosal epithelium (±/+/+/+/+++)		5 (0/0/3/2)	5 (0/0/5/0)	5 (0/0/3/2)	5 (0/0/3/2)	5 (0/0/3/2)	5 (0/0/4/1)	5 (0/0/3/2)
	Hyperplasia, mucosal epithelium (±/+/+/+/+++)		5 (2/3/0/0)	5 (1/4/0/0)	5 (3/2/0/0)	5 (3/2/0/0)	5 (1/4/0/0)	5 (2/3/0/0)	5 (2/3/0/0)

±:minimal, +:mild, ++:moderate, +++:severe

Table 3. Histopathological findings other than the colon and rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

Organ	Finding	Particle size Dose (mg/kg BW/day)	Water		DSS		
			0	30 nm	300 nm	0	30 nm
No. of animals ^a			5	5	5	5	5
Heart	Infiltration, mononuclear cell, myocardium, focal (±)		1	0	2	0	0
Spleen			0	0	0	0	0
Submandibular lymph node			0	0	0	0	0
Mesenteric lymph node	Vacuolation, macrophage (±/+)		0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	5 (2/3)	5 (2/3)
Mediastinal lymph node			0/2	0/1	0/3	0/2	0/2
Thymus			0	0	0	0	0
Pituitary gland			0	0	0	0	0
Thyroid gland			0	0	0	0	0
Parathyroid gland			0	0	0	0	0
Adrenal gland			0	0	0	0	0
Nasal cavity	Inflammation, acute (±/+)		0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	2 (1/1)
	Metaplasia, squamous cell, transitional epithelium (±)		0	0	0	0	2
Trachea			0	0	0	0	0
Lung	Hemorrhage, alveoli, focal (±)		0	0	1	0	1
Tongue			0	0	0	0	0
Submandibular gland			0	0	0	0	0
Sublingual gland			0	0/4	0/3	0/3	0/5
Parotid gland			0	0	0	0	0
Esophagus			0	0	0	0/4	0/5
Stomach			0	0	0	0	0
Duodenum			0	0	0	0	0
Jejunum			0	0	0	0	0
Ileum			0	0	0	0	0
Cecum	Regeneration, mucosal epithelium (±)		0	0	0	4	3
Liver			0	0	0	0	0
Pancreas			0	0	0	0	0
Kidney	Mineralization, collecting ducts (±)		0	0	0	1	0
Urinary bladder			0	0	0	0	0/4
Testis			0	0	0	0	0
Epididymis			0	0	0	0	0
Prostate	Infiltration, monocuclear cell, interstitial (±)		1	1	0	1	2/4
Seminal vesicle			0	0	0	0	0/4
Mammary gland			0	0	0	0	0
Cerebrum			0	0	0	0	0
Cerebellum			0	0	0	0	0
Spinal cord			0	0	0	0	0
Trigeminal nerve			0	0	0	0	0
Sciatic nerve			0	0	0	0	0
Aorta			0	0	0	0	0
Eye			0	0	0	0	0
Harderian gland			0	0	0	0	0
Skin			0	0	0	0	0
Sternum			0	0	0	0	0
Femur			0	0	0	0	0
Skeletal muscle			0	0	0	0	0
Zymbal's gland			0	0	0	0	0

^a:The number of samples for exceptional cases were indicated as denominator.

±:minimal, +:mild

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
 - ・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。
 - なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)、遺伝子治療等臨床研究に関する指針(平成27年厚生労働省告示第344号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。
3. 「C. 研究結果」について
 - ・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。

4. 「F. 健康危険情報」について

- ・研究分担者や研究協力者の把握した情報・意見等についても研究代表者がとりまとめて総括研究報告書に記入すること。

5. その他

- (1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。
- (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					