

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

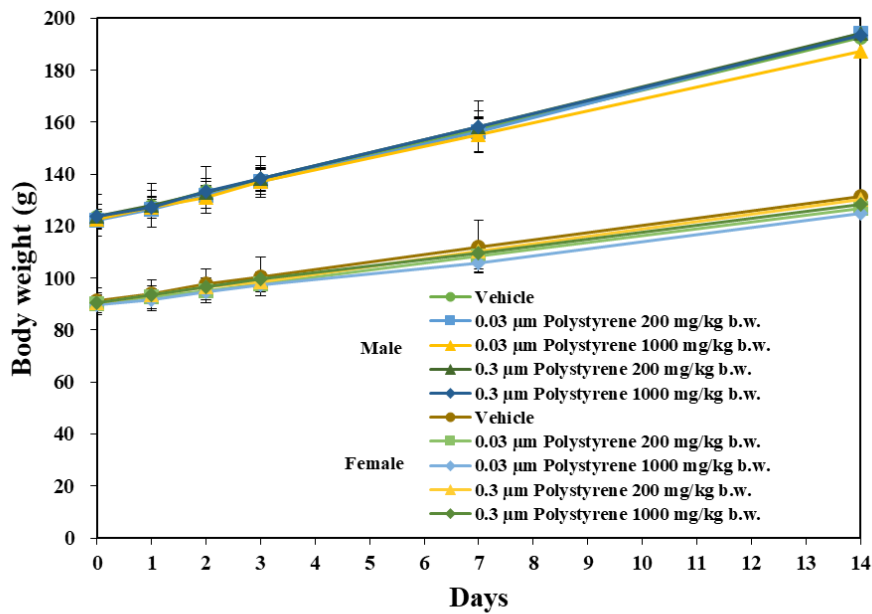


Figure 1. Body weights of F344 rats treated with polystyrene particles.

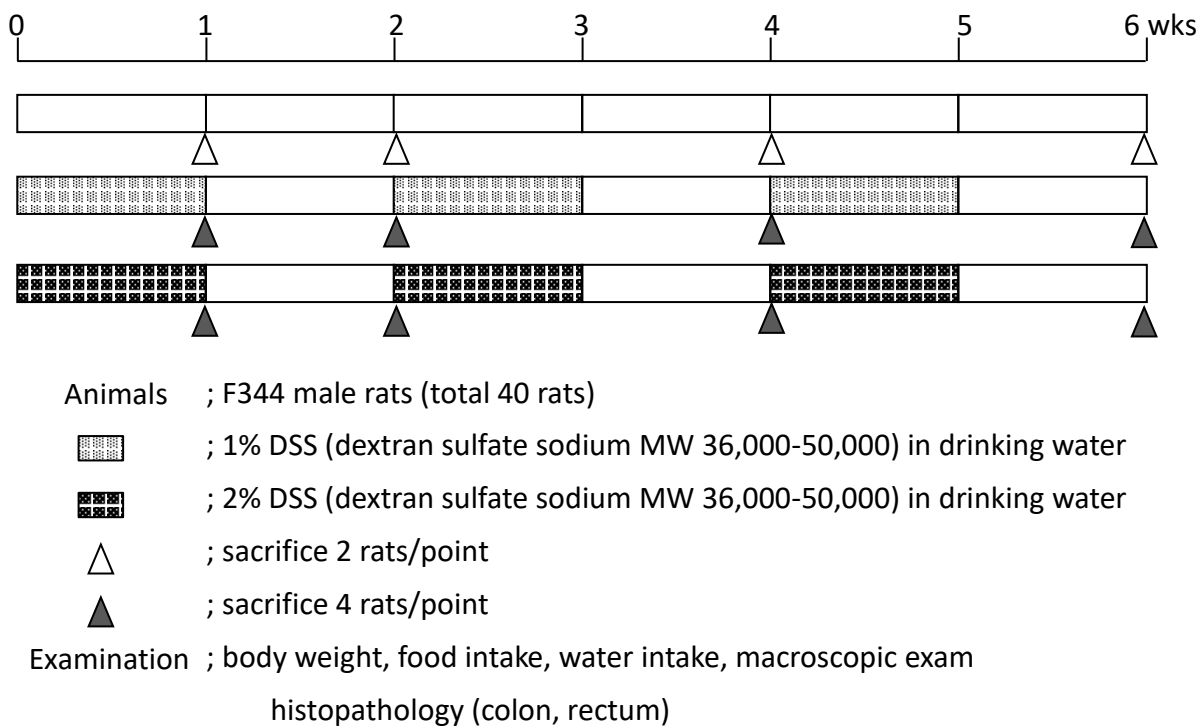


Figure 2-1. Experimental protocol

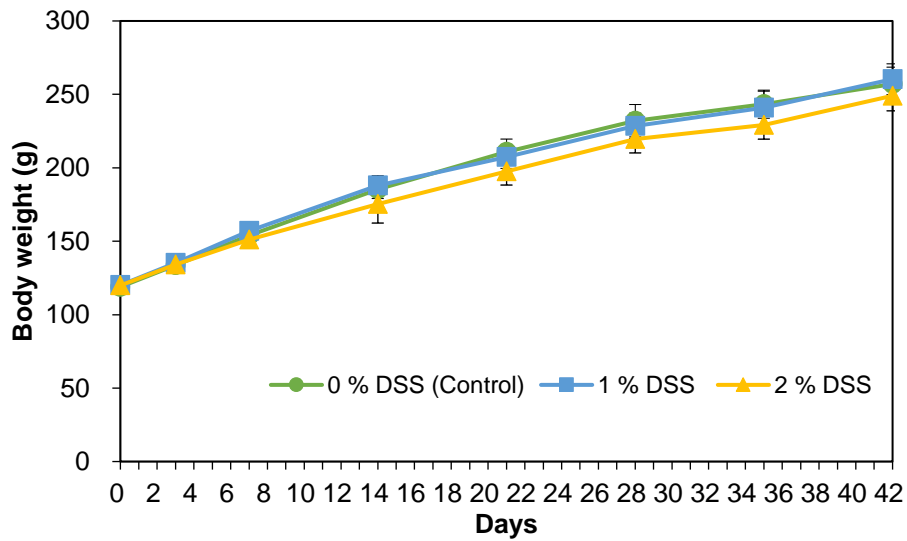


Figure 2-2. Body weight change curves

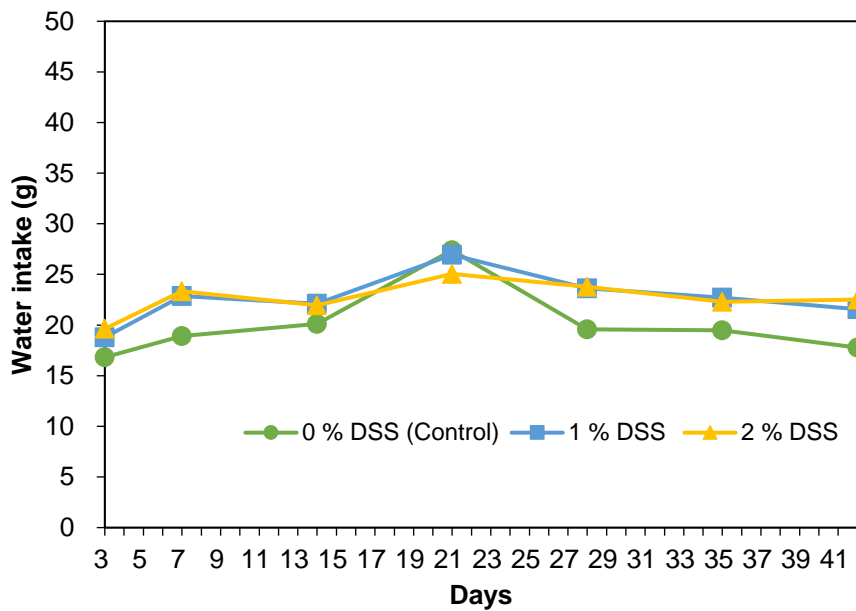


Figure 2-3. Water consumption curves

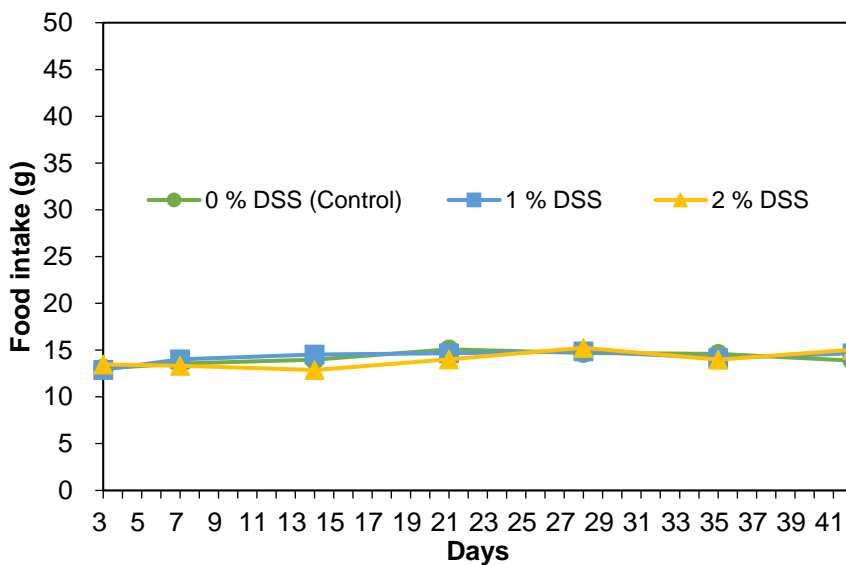


Figure 2-4. Food consumption curves

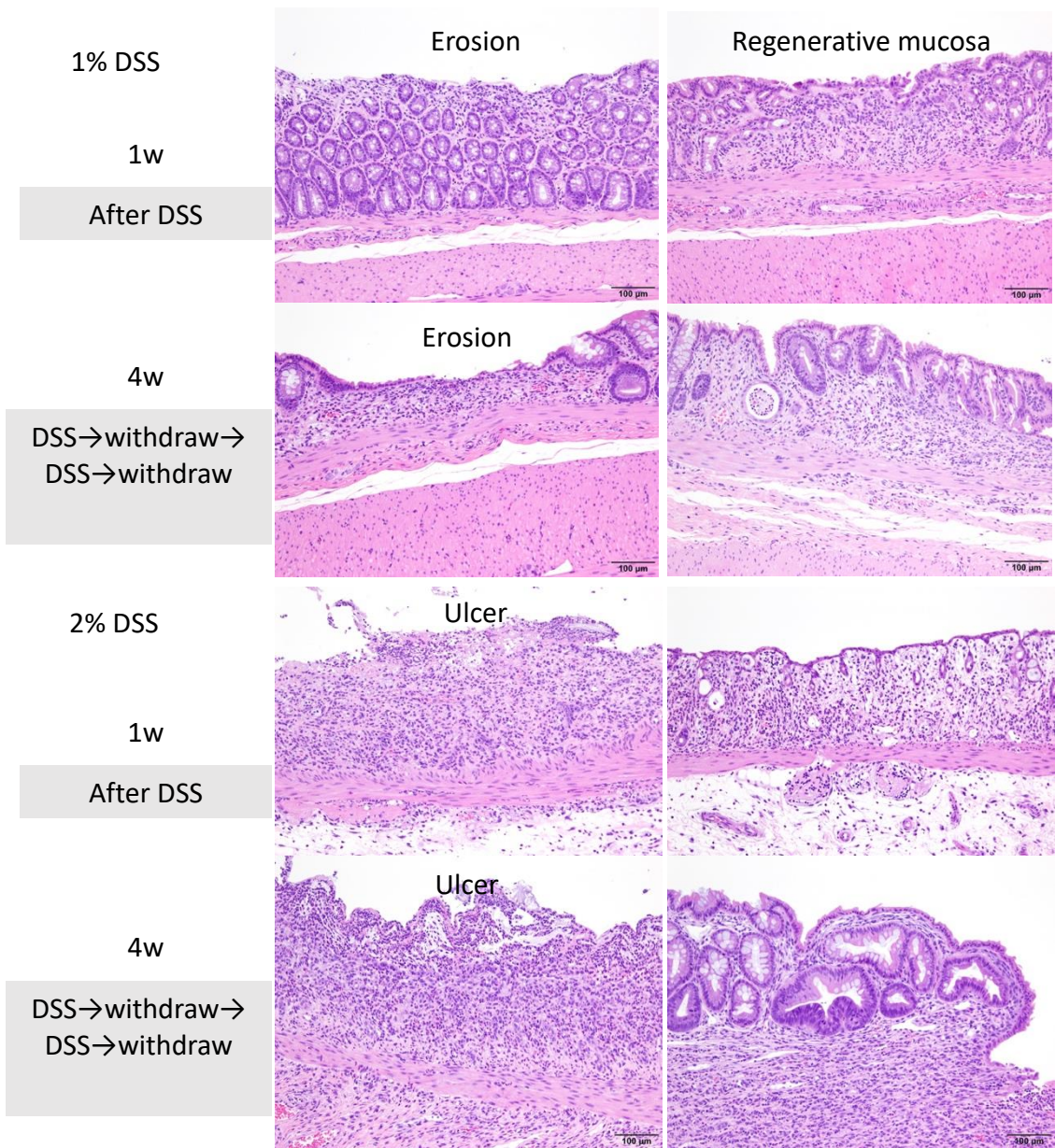


Figure 2-5. Histopathological lesion in the rectum of rats administered DSS

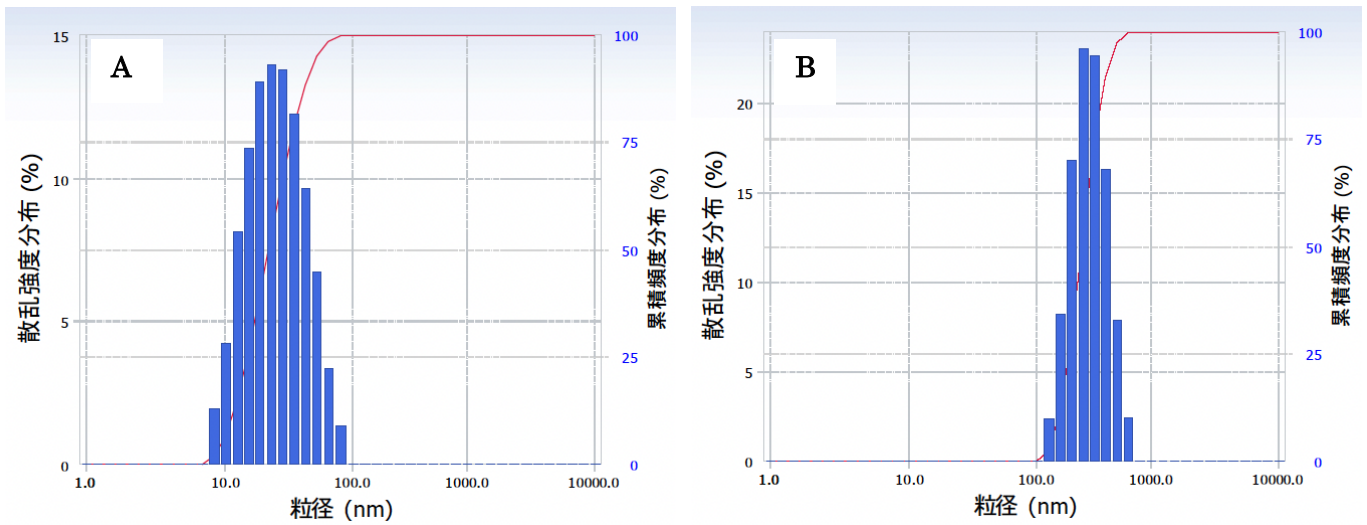


Figure 3-1. Particle size distribution analyzed by dynamic light scattering. A: 30 nm polystyrene, B: 300 nm polystyrene

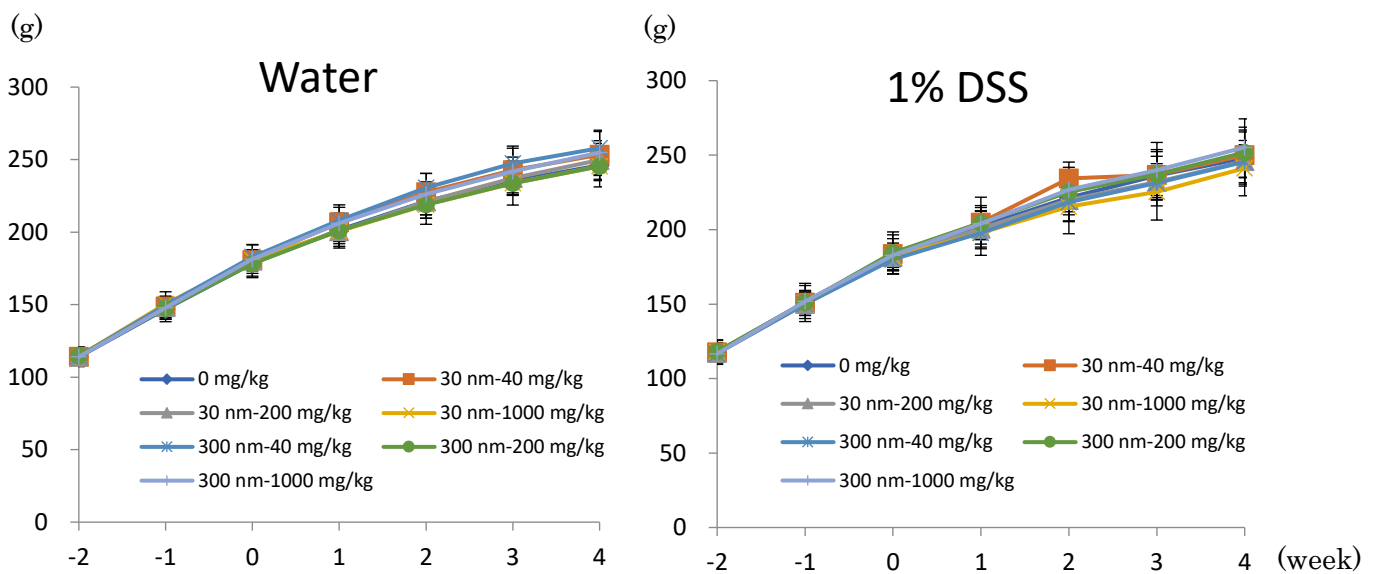


Figure 3-2. Body weight change of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

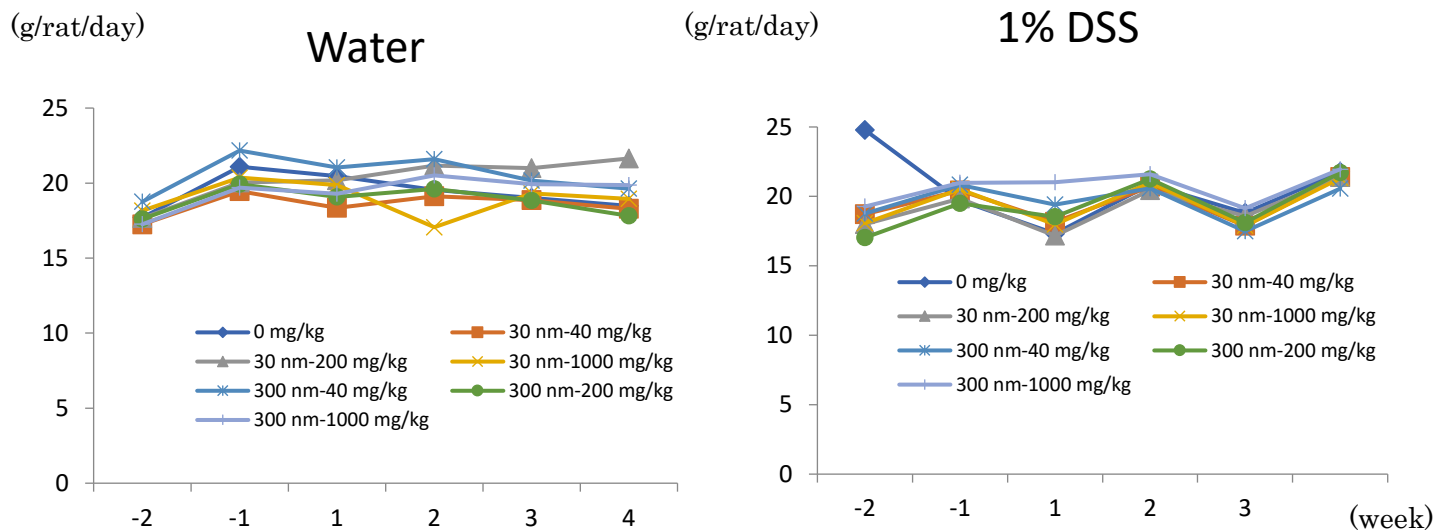


Figure 3-3. Water consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

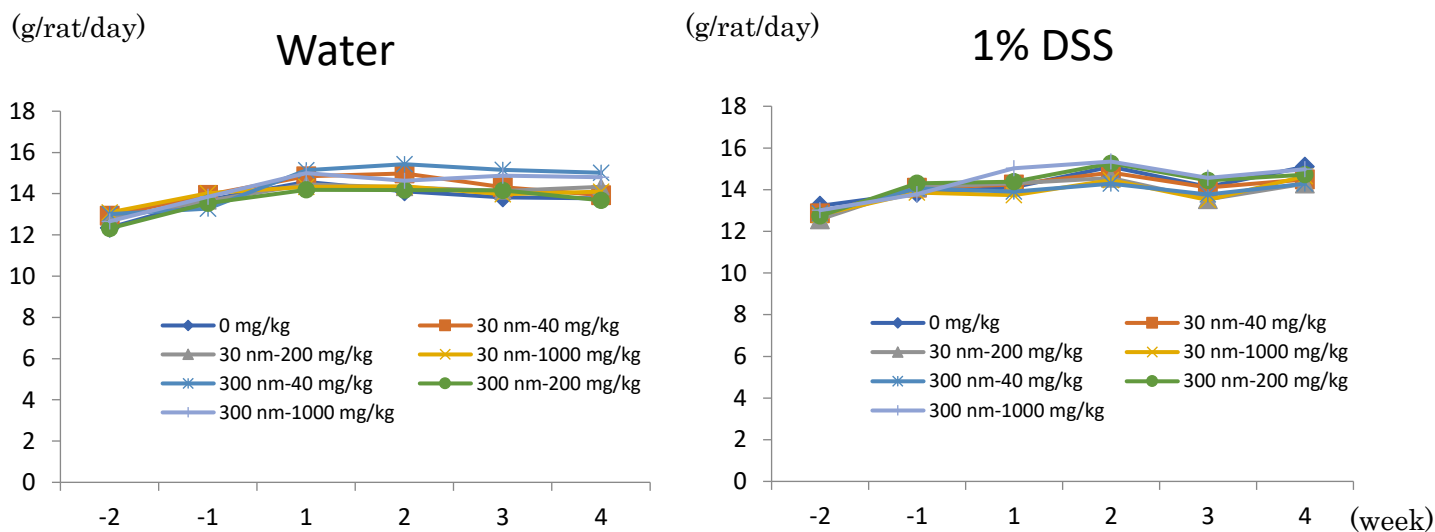


Figure 3-4. Food consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

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	
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		
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		
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		
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	0.04 ± 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		
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 $p < 0.05$

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					