

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

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

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

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  $\mu\text{m}$ ）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  $\mu\text{m}$ ）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 週おきと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）を強制経口投与する 28 日間反復投与毒性試験（40, 200 及び 1000 mg/kg 体重/日）を実施し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、飲水量測定、尿検査、血液学的検査及び血清生化学的検査を行った。

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。

以上の検査項目においては、1000 mg/kg 体重/日の経口暴露による PS の毒性影響はないと考えられた。最終的な毒性影響についての判断は、分担研究者：赤根の実施した病理組織学的検査の結果も併せ、総合研究報告書にて考察する。

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  $\mu\text{m}$  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。研究代表者：松下は動物実験を実施し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、飲水量測定、尿検査、血液学的検査及び血清生化学的検査を担当した。

## 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ラット統計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 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)について測定した。

(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 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 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-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 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)。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 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 1)。

### C-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 2)。

### C-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)。

### C-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T-CHOの低値が認め

られた (Table 4)。

### C-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が認められた (Table 5)。

## 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。

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。

以上の検査項目においては、1000 mg/kg体重/日の経口暴露によるPSの毒性影響はないと考えられた。最終的な毒性影響についての判断は、分担研究者: 赤根の実施した病理組織学的検査の結果も併せ、総括研究報告書にて考察する。

## 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P

S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, 一般状態観察, 体重測定, 摂餌量測定, 飲水量測定, 尿検査, 血液学的検査及び血清生化学的検査においてPSの毒性影響は認められなかった。

最終的な毒性影響についての判断は, 分担研究者: 赤根の実施した病理組織学的検査の結果も併せ, 総括研究報告書にて考察する。

#### **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

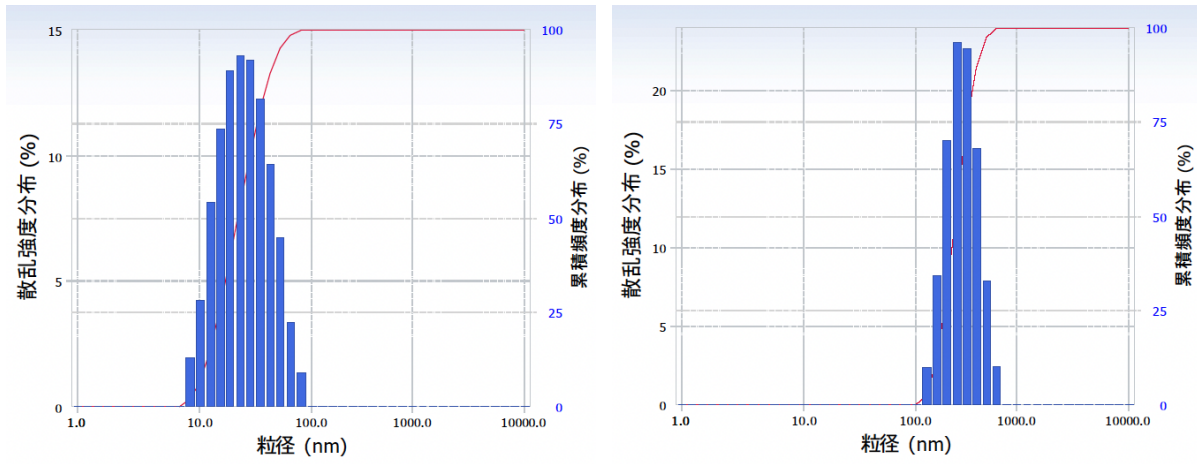
該当なし。

##### 2. 実用新案登録

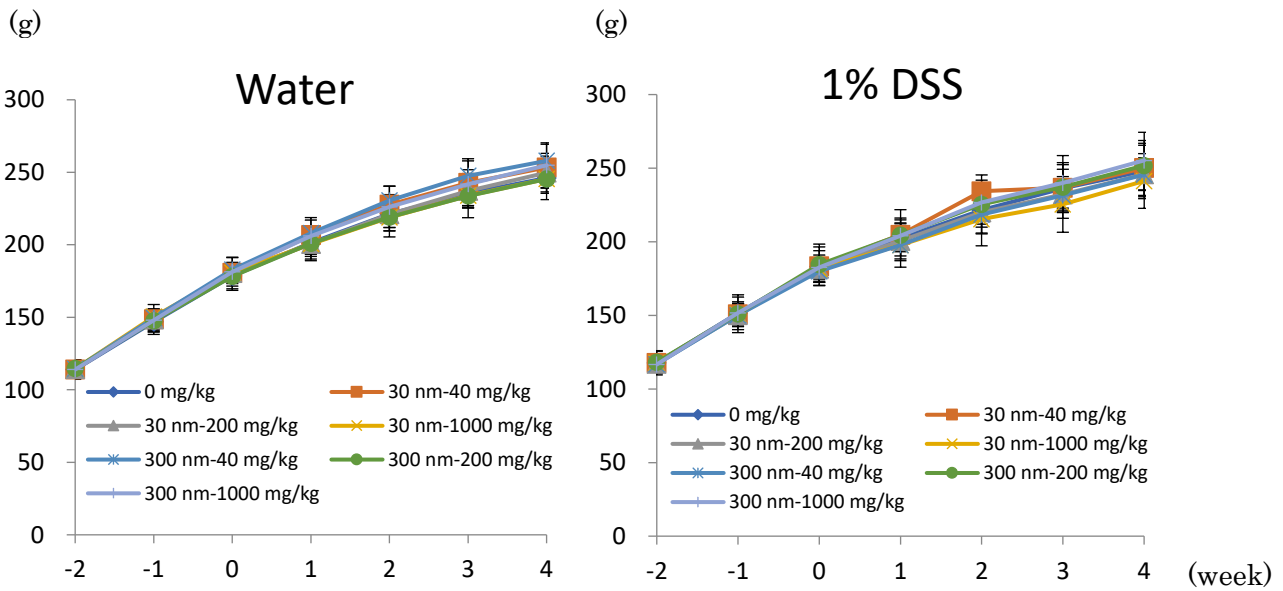
該当なし。

##### 3. その他

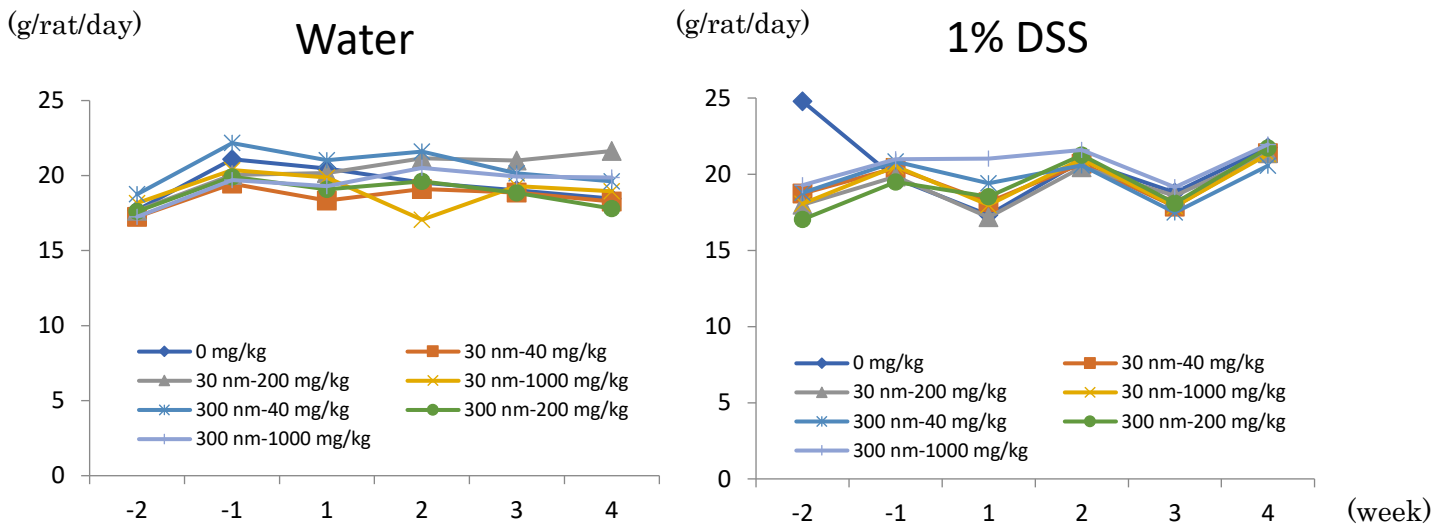
該当なし。



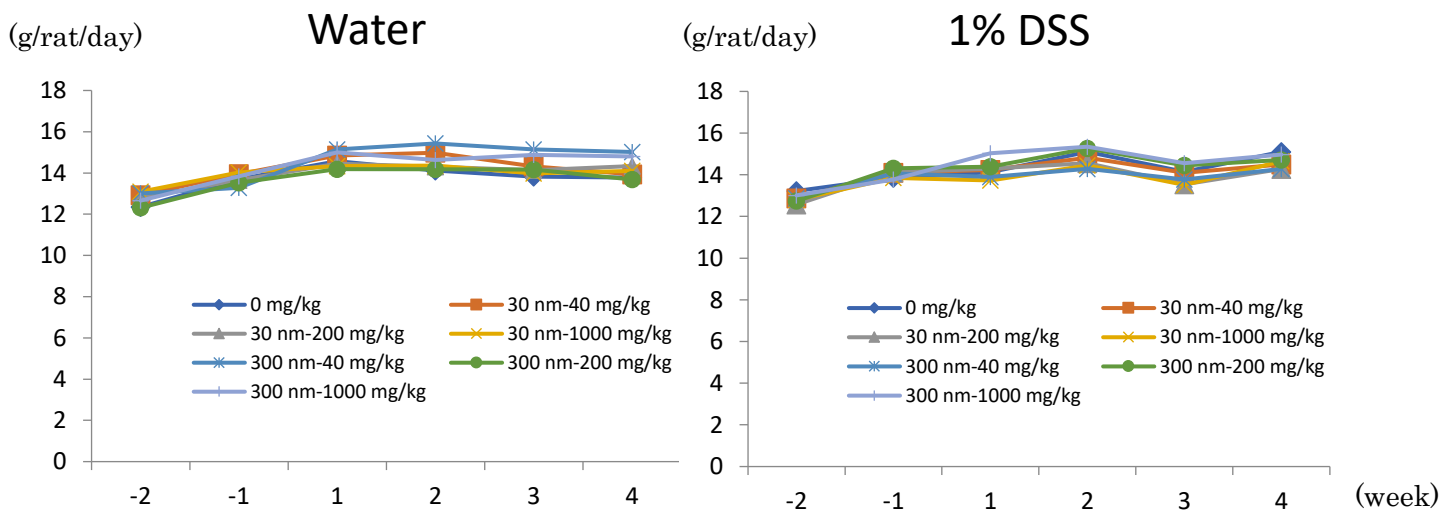
**Figure 1. Particle size distribution analyzed by dynamic light scattering. A: 30 nm polystyrene, B: 300 nm polystyrene**



**Figure 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. 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 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. 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
		飲水の種類			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		

300 nm-1000 mg/kg	Bloody stool	0	0	0	0	1	0
	Loose stools	0	1	12	11	14	25
	Diarrhea	0	1	2	4	14	6
	Bloody stool	0	0	0	1	3	0

---



Table 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
Specific gravity	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	5
Leukocytes	-	3	1	3	2	2	0	0	0	0	2	0	4	0	2	
	25 / $\mu$ l	1	3	1	3	2	2	3	0	2	2	1	1	1	2	
	75 / $\mu$ l	1	0	1	0	1	3	2	4	2	1	3	0	2	1	
	250 / $\mu$ 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. 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	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 <sup>#</sup>	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 ± 0.2	49.5 ± 0.4	49.9 ± 0.4	49.6 ± 0.6	49.6 ± 0.6	49.4 ± 0.7	49.7 ± 0.6
MCH	(pg)	16.9 ± 0.2	16.8 ± 0.1	16.9 ± 0.1	16.9 ± 0.2	16.9 ± 0.2	16.9 ± 0.3	16.8 ± 0.2
MCHC	(g/dL)	34.0 ± 0.3	34.0 ± 0.3	33.9 ± 0.2	34.1 ± 0.2	34.0 ± 0.2	34.1 ± 0.2	33.9 ± 0.1
RET	(%)	2.56 ± 0.25	2.72 ± 0.24	2.57 ± 0.34	2.72 ± 0.34	2.57 ± 0.25	2.41 ± 0.24	2.44 ± 0.25
PLT	(×10 <sup>3</sup> /μl)	599.4 ± 231.7	736.0 ± 104.0	588.4 ± 179.5	722.2 ± 53.3	766.0 ± 30.5	704.6 ± 69.7	708.6 ± 42.6
WBC	(×10 <sup>3</sup> /μl)	3.93 ± 1.15	4.09 ± 0.54	3.30 ± 1.11	4.61 ± 1.40	4.83 ± 0.67	3.60 ± 0.95	5.24 ± 0.89
Differential cell count								
Neutrophils	(%)	29.0 ± 5.7	26.5 ± 2.3	26.4 ± 4.6	27.6 ± 9.3	24.9 ± 4.9	25.6 ± 6.0	23.2 ± 3.8
Lymphocyte	(%)	66.1 ± 6.3	68.9 ± 2.2	68.4 ± 5.4	67.6 ± 9.6	71.1 ± 5.0	69.6 ± 7.1	72.3 ± 5.2
Momocytes	(%)	3.4 ± 0.8	3.4 ± 0.3	3.6 ± 1.0	3.2 ± 0.5	3.0 ± 0.6	3.3 ± 0.5	3.1 ± 0.8
Eosinophils	(%)	1.2 ± 0.7	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.6	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.1 ± 0.8
Basophils	(%)	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.0

Values are mean ± S.D.

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

**Table 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 <sup>#</sup>		
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 <sup>**</sup>	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					

## 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。