

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回目からは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的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。

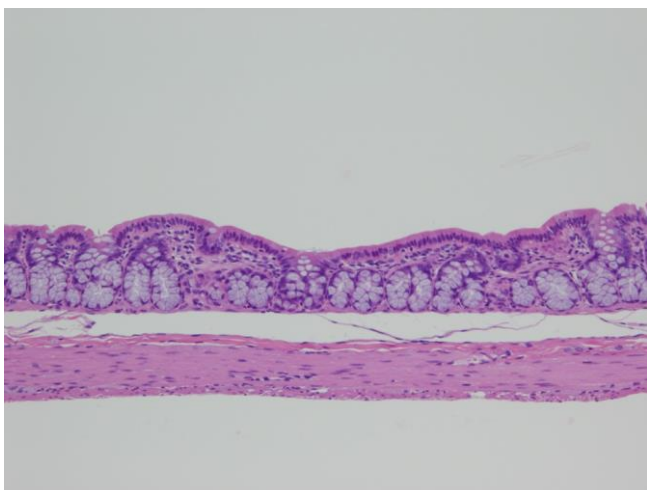
2. 実用新案登録

該当なし。

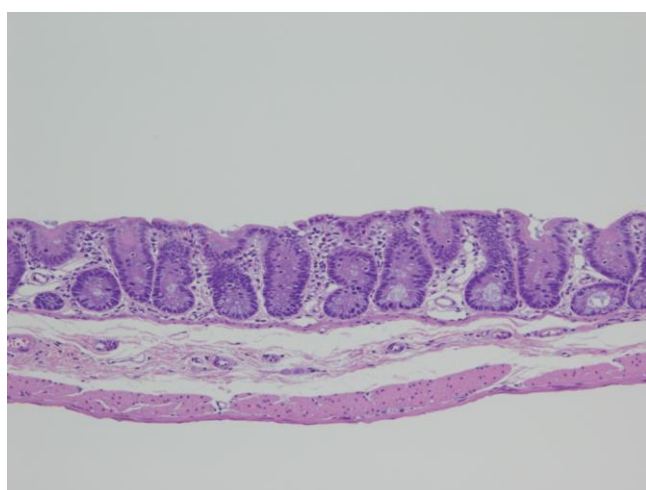
3. その他

該当なし。

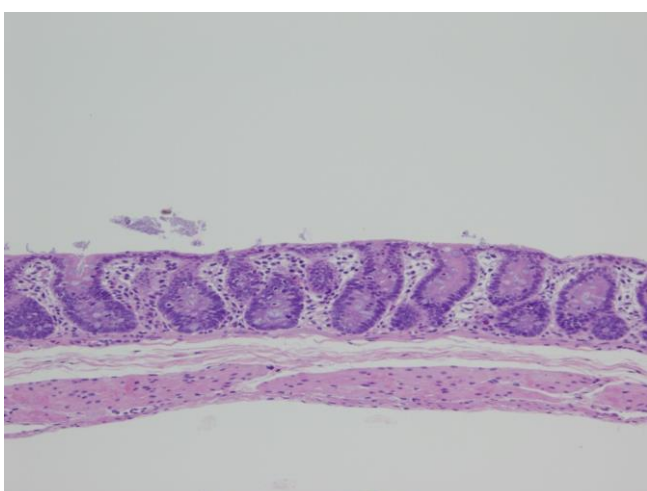
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

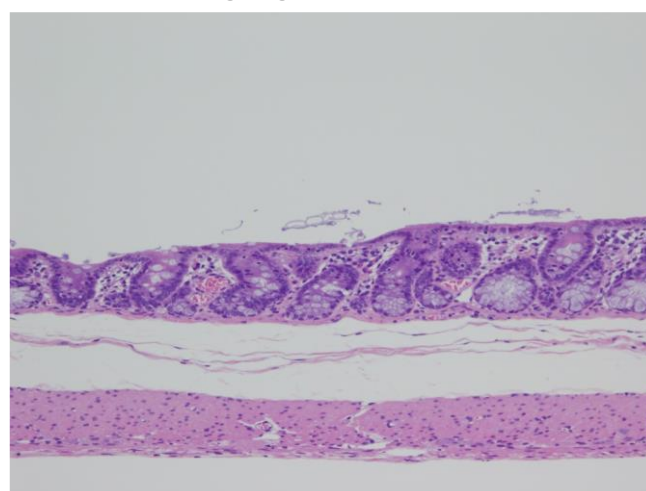
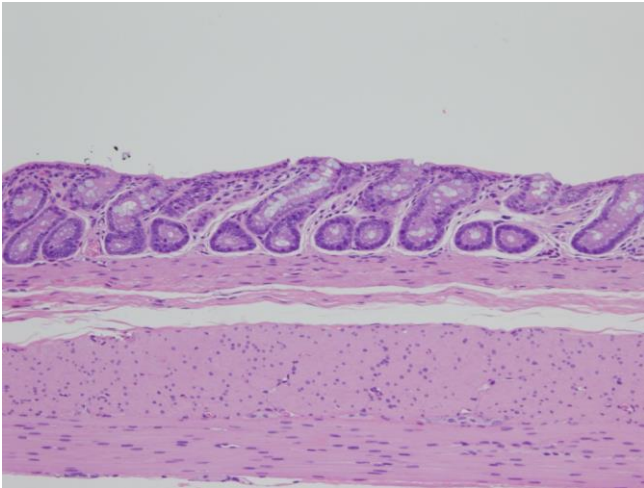
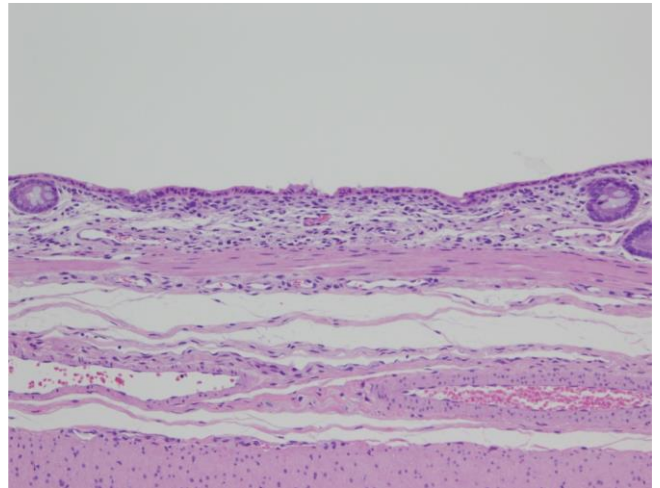


Figure 1. Representative histopathological finding in the colon of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration indicating crypts with increased number of cells showing decreased mucus production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

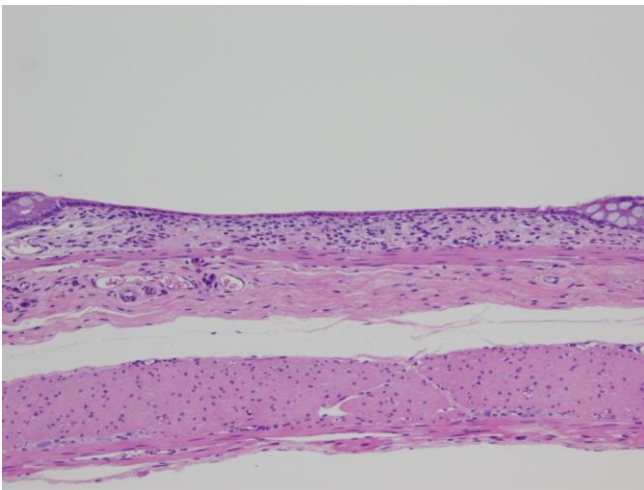
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

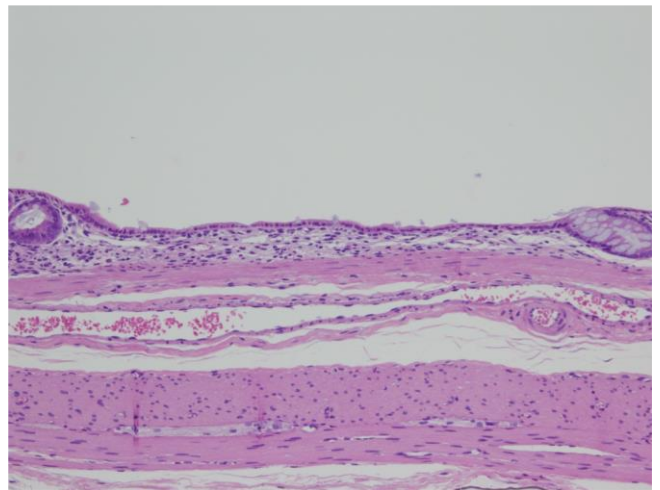
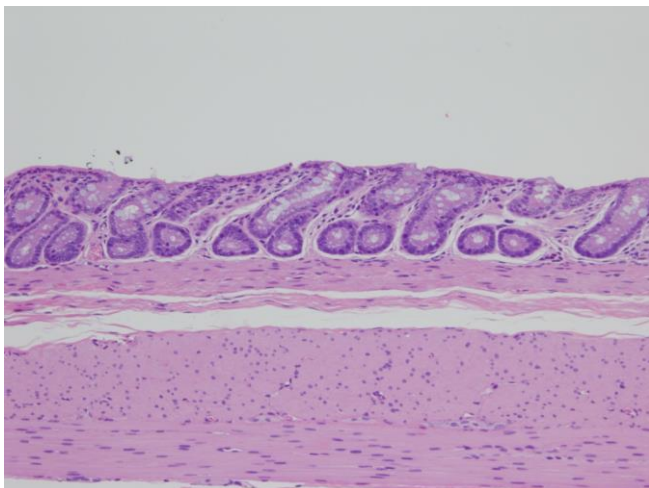
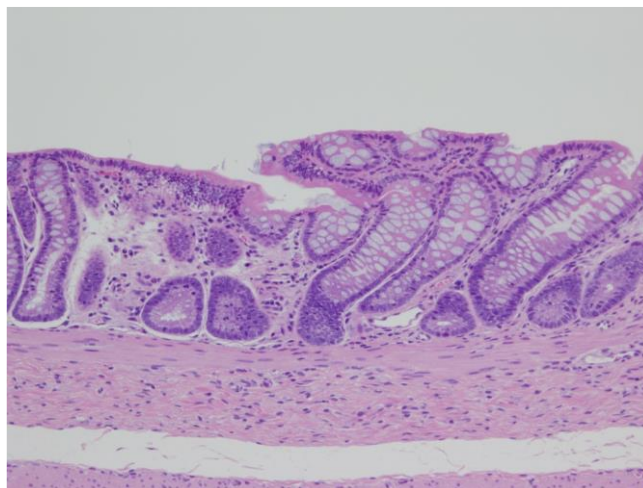


Figure 2. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration without crypts was observed in the mucosa of rats treated with DSS.

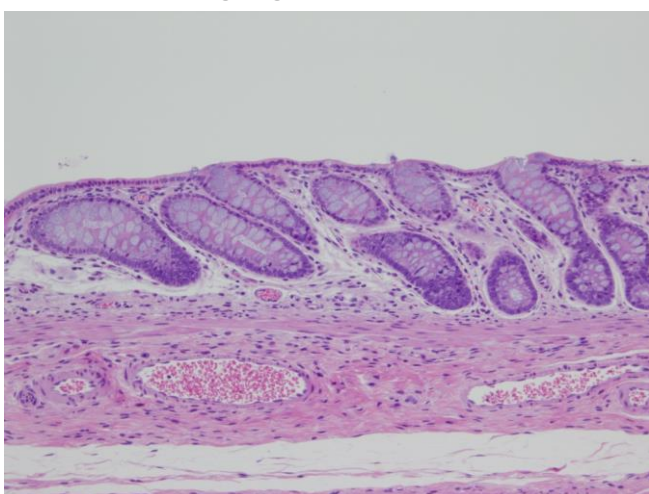
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

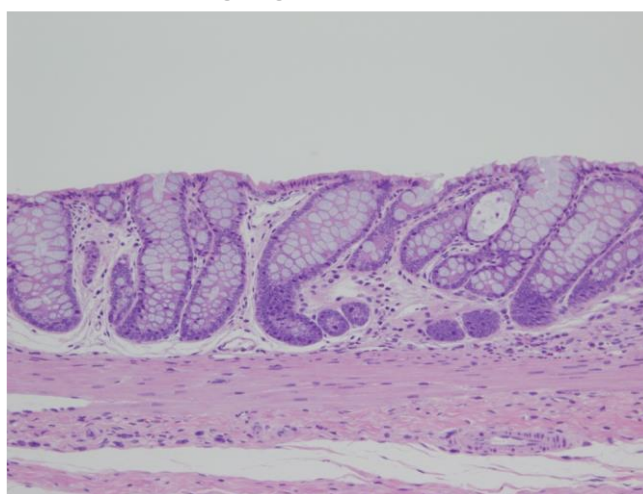
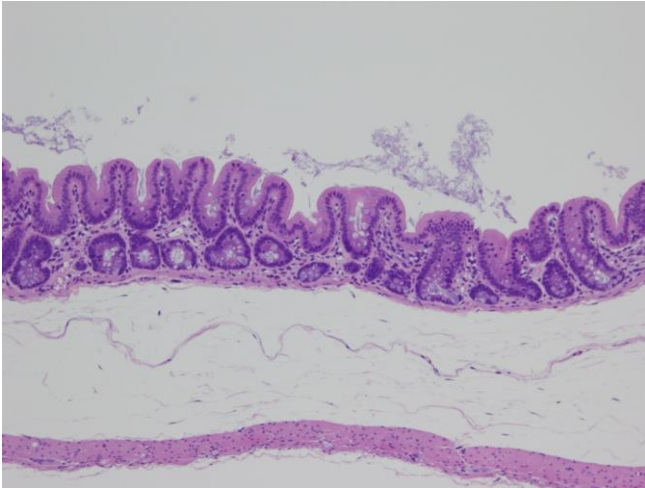
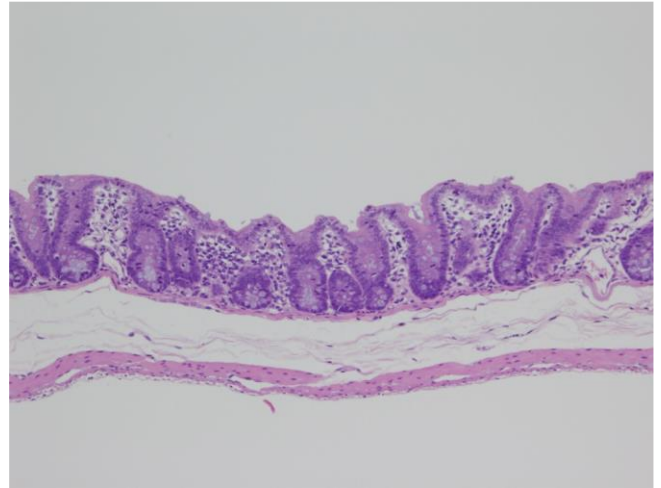


Figure 3. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild hyperplastic mucosal epithelium showing dilatate crypts were observed in the mucosa of rats treated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

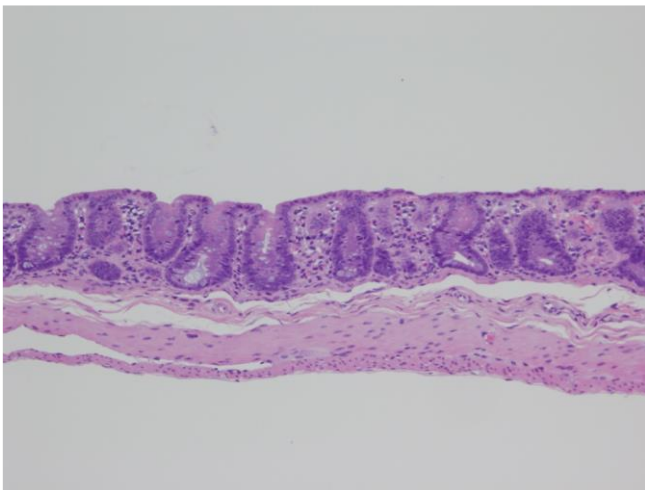
Water+0 mg/kg



DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

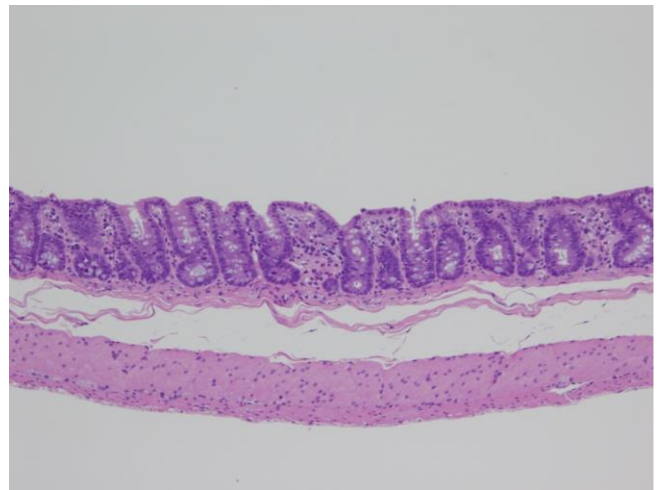
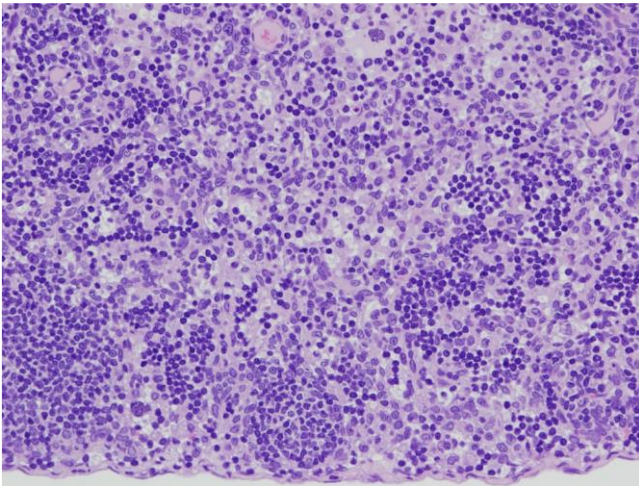
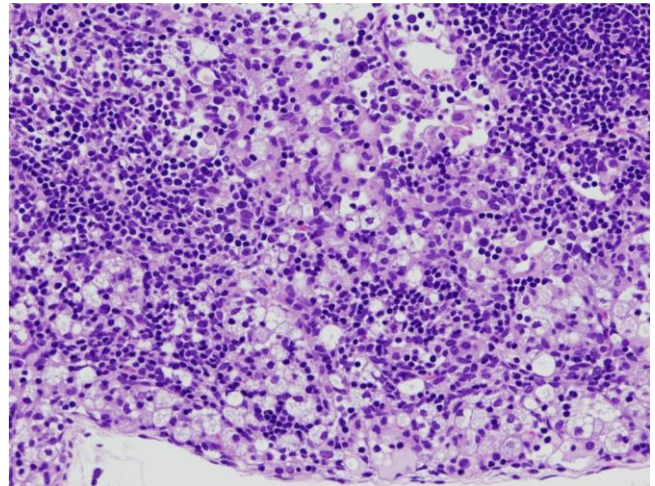


Figure 4 Representative histopathological finding in the cecum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal regeneration was observed in the mucosal epithelium of rats treated with DSS.

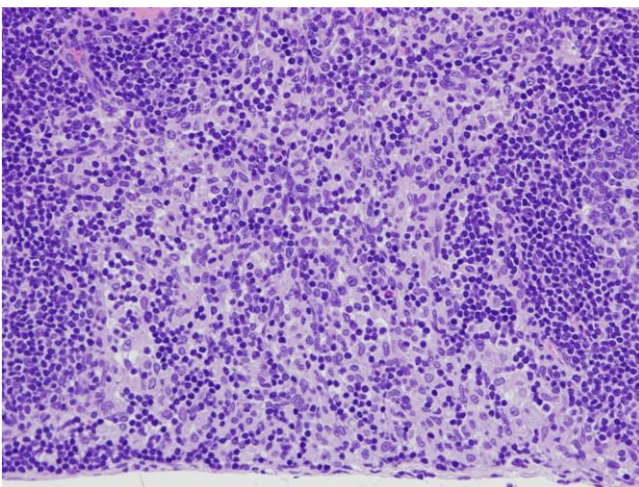
Water+ 0 mg/kg



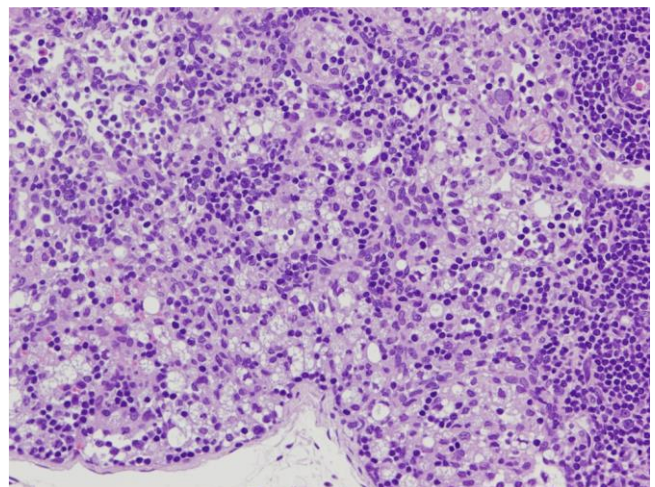
DSS+ 0 mg/kg



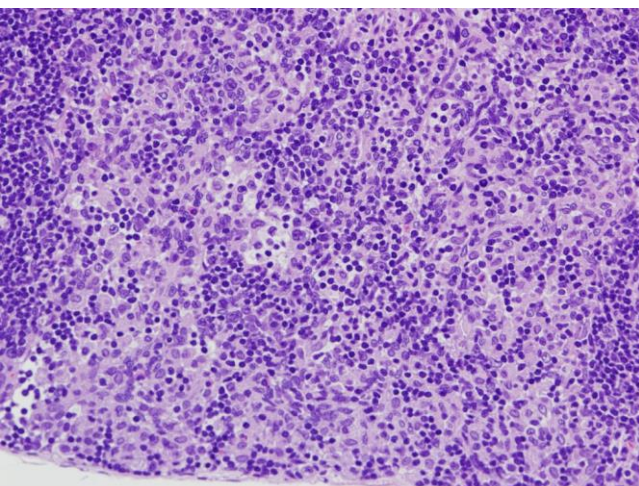
Water+1000 mg/kg (30 nm)



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



Water+1000 mg/kg (300 nm)



DSS+1000 mg/kg (300 nm)

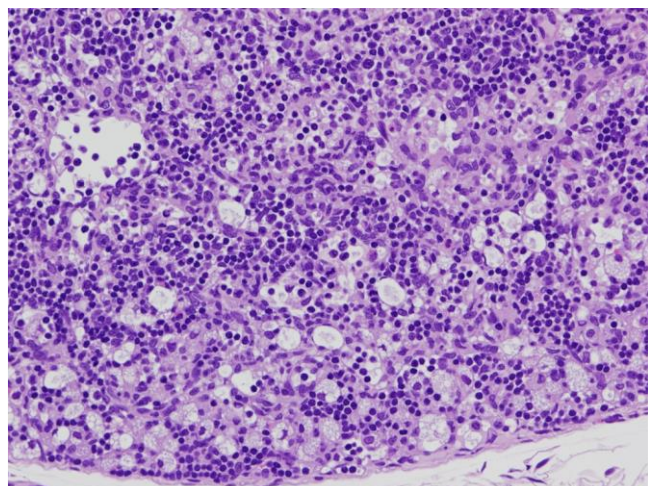
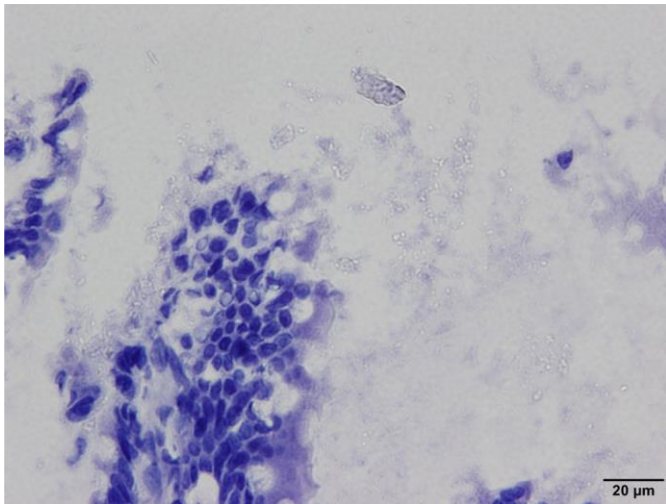


Figure 5. Representative histopathological finding in the mesentery lymph node of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild macrophage infiltration showing vacuolation was observed in rats treated with DSS.

Water+1000 mg/kg (30 nm)



Water+1000 mg/kg (300 nm)

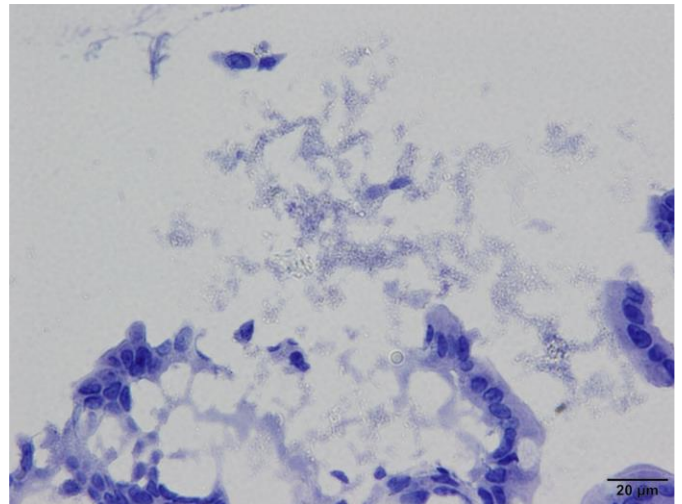


Figure 6. Representative histopathological observation of luminal materials in frozen section of the small intestine of rats administered 30 nm or 300 nm diameter polystyrene for 4 weeks. Translucent particles approximately less than 2 μm with smaller particle as their background were noticed in both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

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。