

## 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  $\mu\text{m}$ ）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、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洞化が認められたが、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 は腸管内腔に、透明で一部に約 2  $\mu\text{m}$  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、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。

## 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。

## 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。

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ぺプチダーゼ( $\gamma$ -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,調整水群の対照群と30nm及び300nmPSの1000mg/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.

### C. 研究結果

#### C-1 被験物質の粒度分布

30nmのPS原液及び300nm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27.0nm及び297.6nm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300nmPS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300nmPSの1000mg/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30nmPSの1000mg/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30nmPSの40mg/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,300nmPSの40mg/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 5).

#### C-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 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 6)並びに軽微~軽度の粘膜上皮過形成(Figure 7)が認められた(Table 6).軽微な粘膜上皮再生像は,DSS水群の対照群,30nmPSの1000mg/kg体重/日投与群及び300nmPSの1000mg/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 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 9)がDSS水群の対照群,30nmPSの1000mg/kg体重/日投与群及び300nmPSの1000mg/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 7).

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30nm及び300nmPSの1000mg/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,をヘマトキシリン-エオジン染色及び水溶性封入剤による封入を施した.空腸,回腸の内腔に投与したPSのサイズにかかわらず,約2µmまでの透明な粒状物が確認された.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(Figure 10).

### D. 考察

これまでの検討から,分子量36-50kDa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、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。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

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

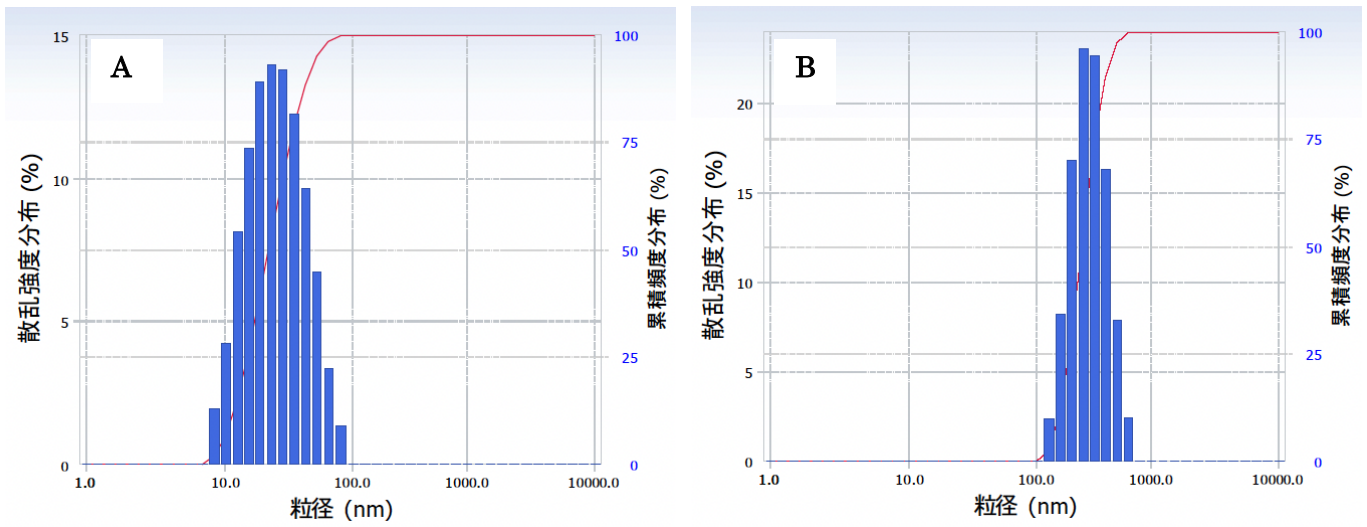


Figure 1. Particle size distribution analyzed by dynamic light scattering. A: 30 nm polystyrene, B: 300 nm polystyrene

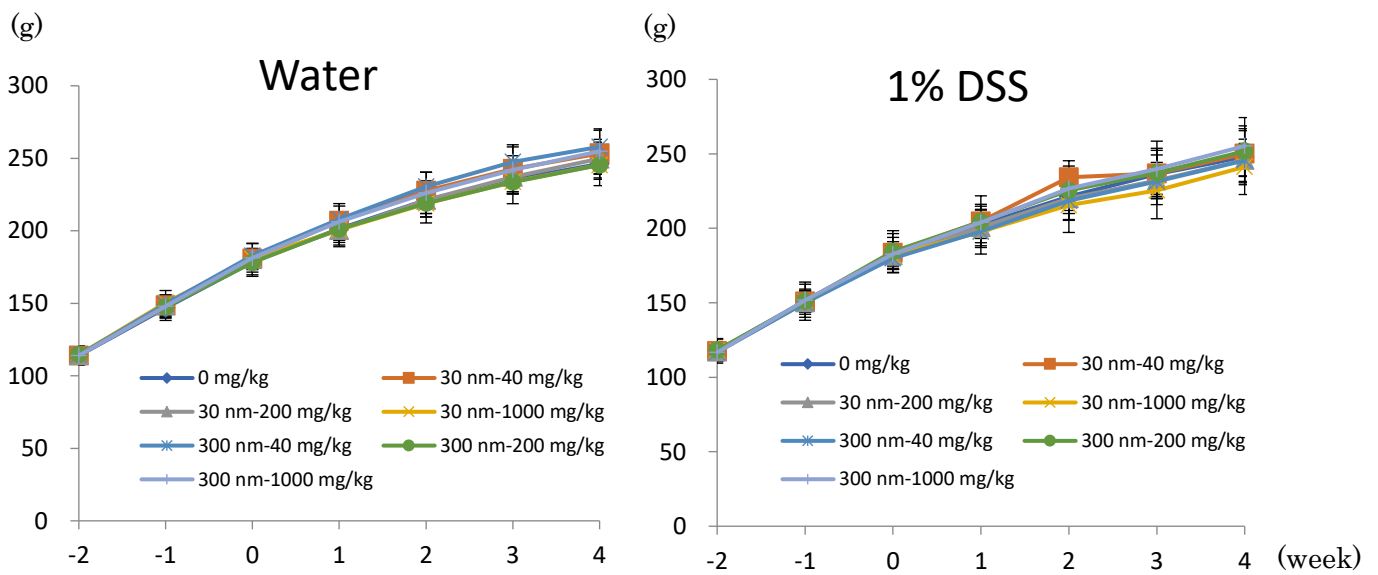


Figure 2. Body weight change of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

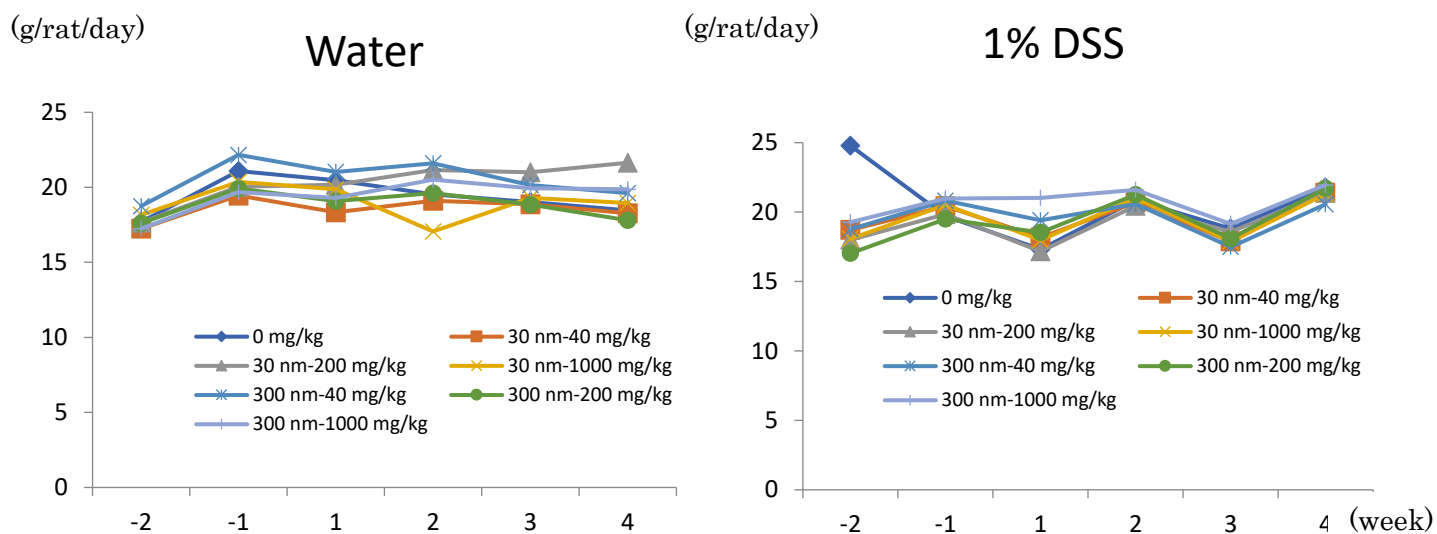


Figure 3. Water consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

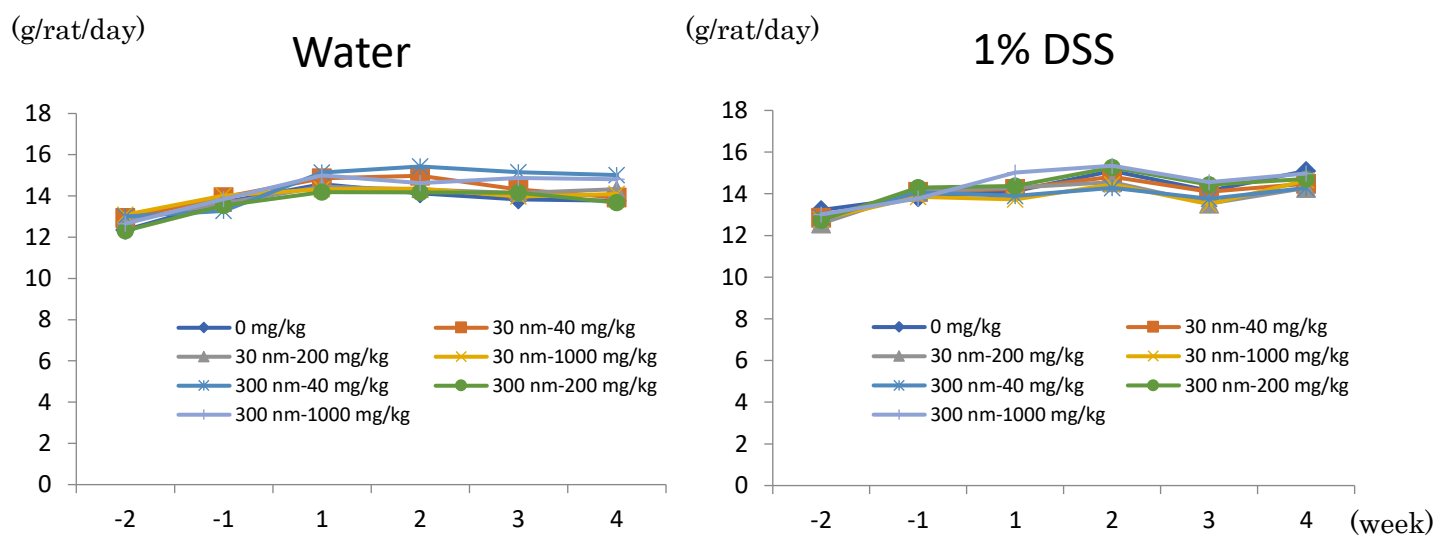
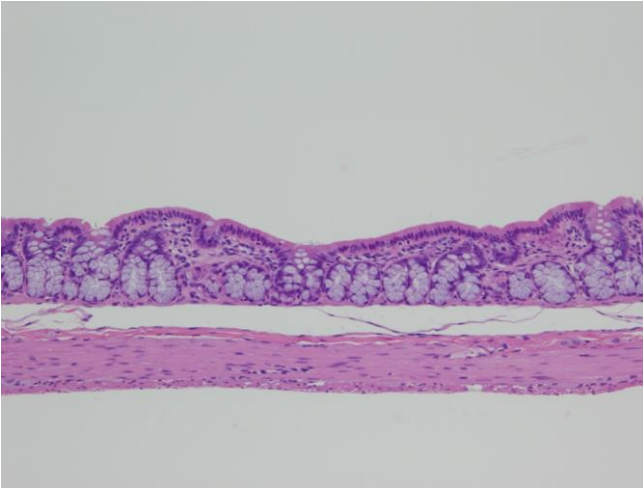
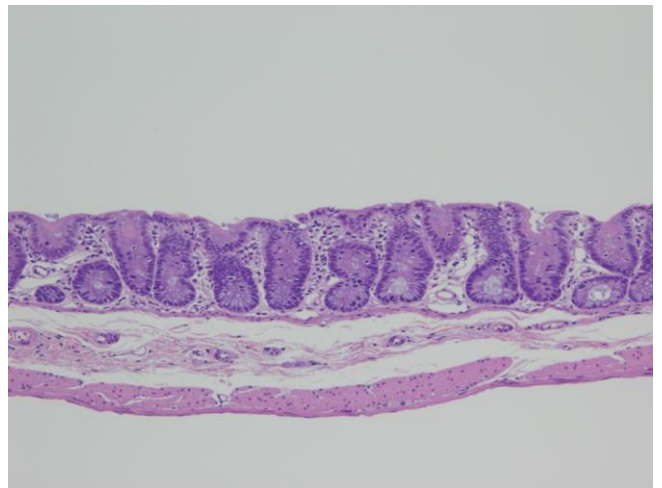


Figure 4. Food consumption of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water

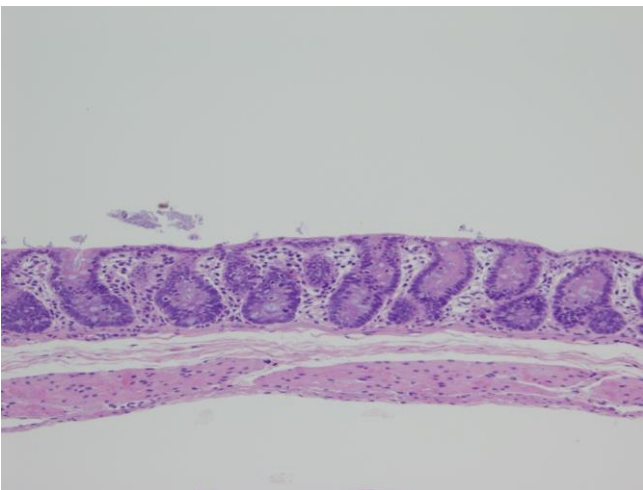
Water+0 mg/kg



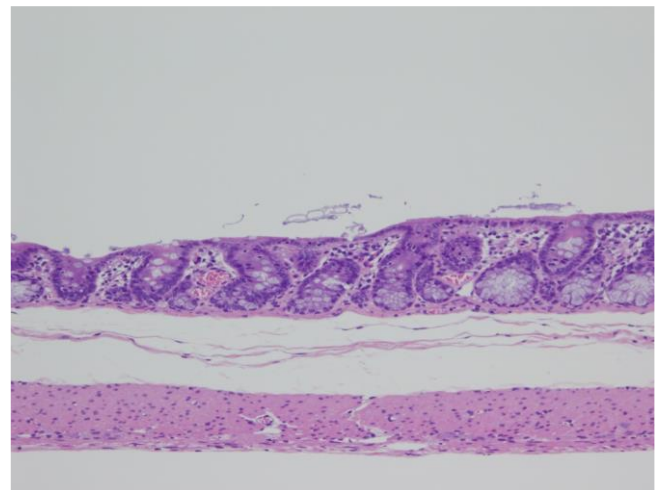
DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



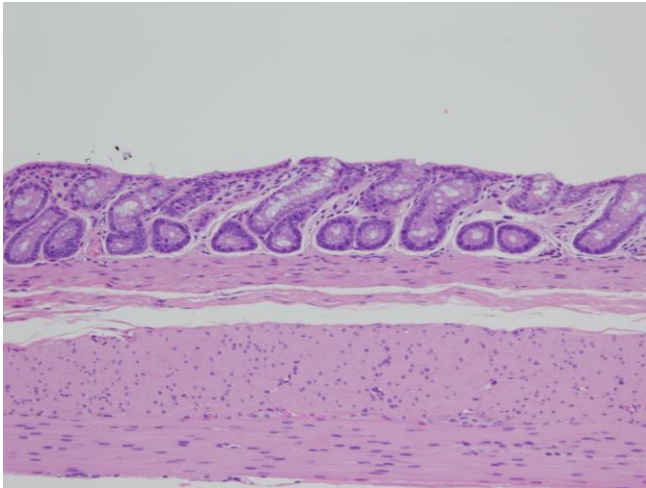
DSS+1000 mg/kg (300 nm)



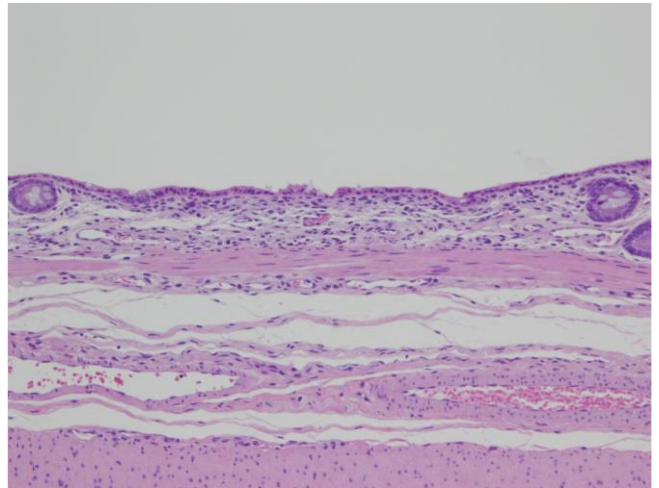
**Figure 5. Representative histopathological finding in the colon of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration indicating crypts with increased number of cells showing decreased mucus production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



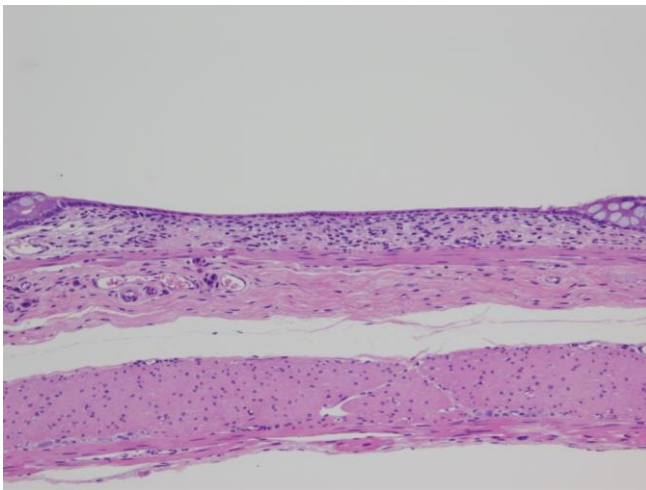
Water+0 mg/kg



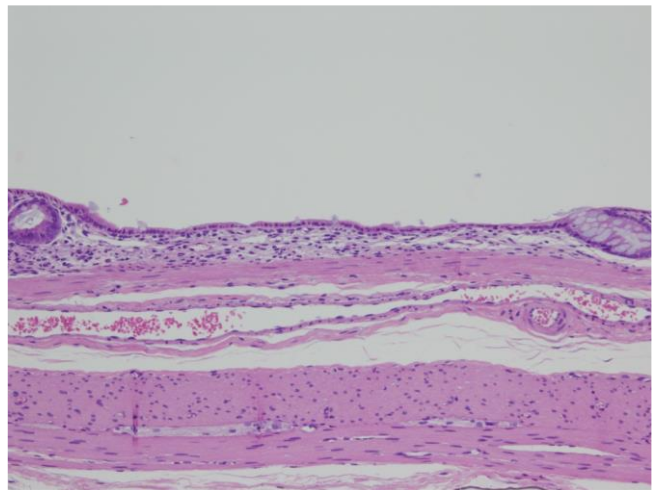
DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)



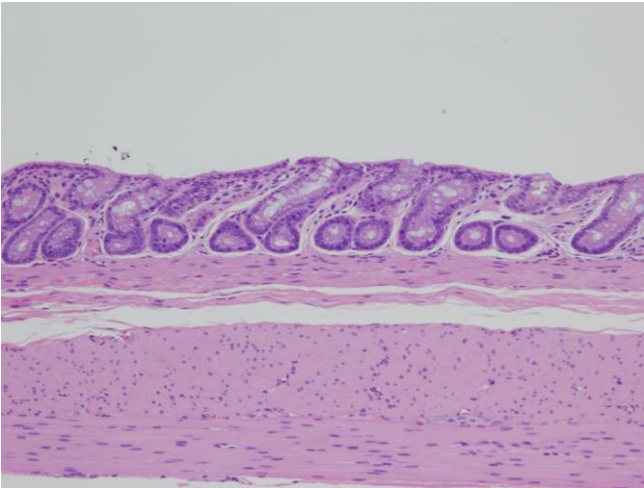
DSS+1000 mg/kg (300 nm)



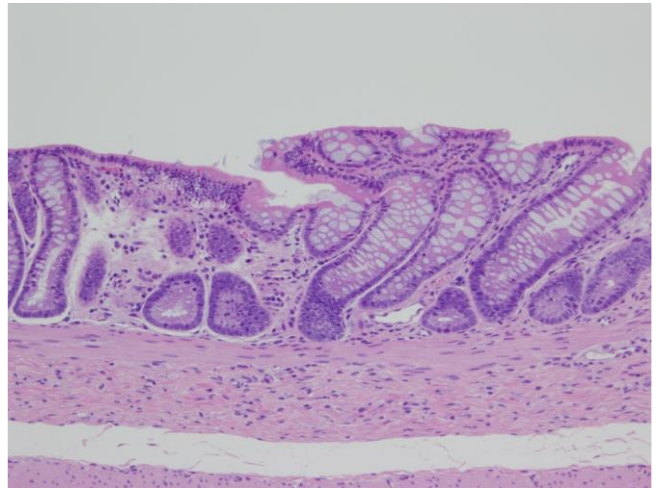
**Figure 6. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Moderate to severe regeneration without crypts was observed in the mucosa of rats treated with DSS.**



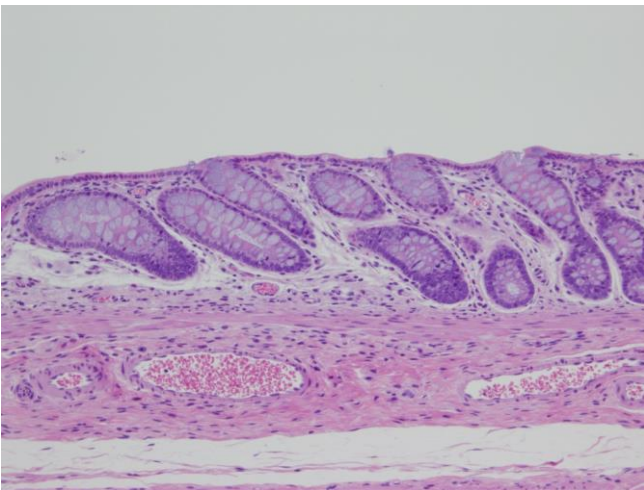
Water+0 mg/kg



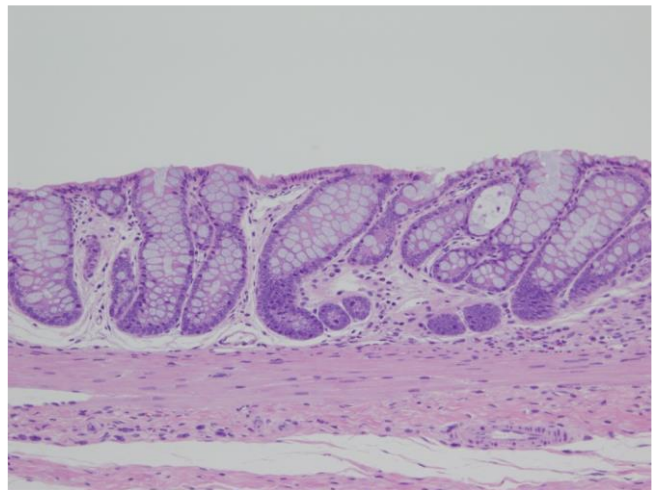
DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)

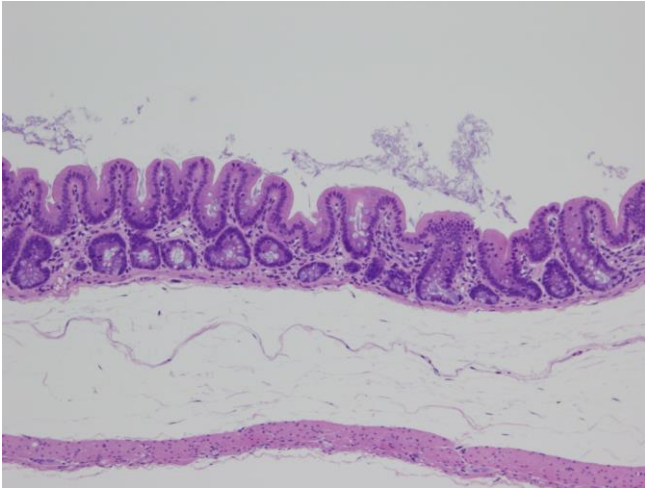


DSS+1000 mg/kg (300 nm)

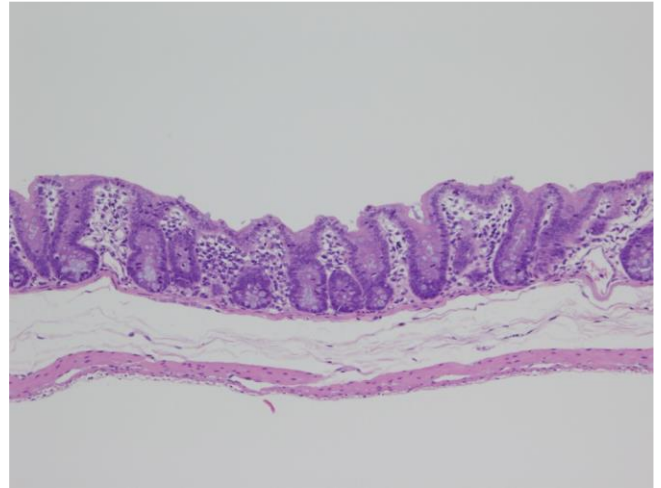


**Figure 7. Representative histopathological finding in the rectum of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild hyperplastic mucosal epithelium showing dilatate crypts were observed in the mucosa of rats treated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

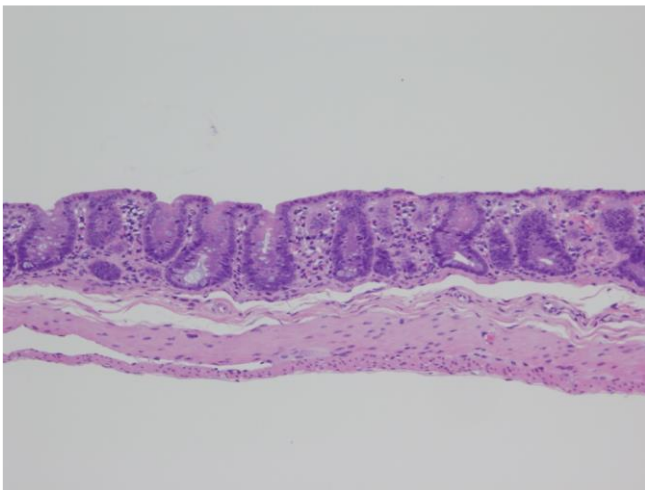
Water+0 mg/kg



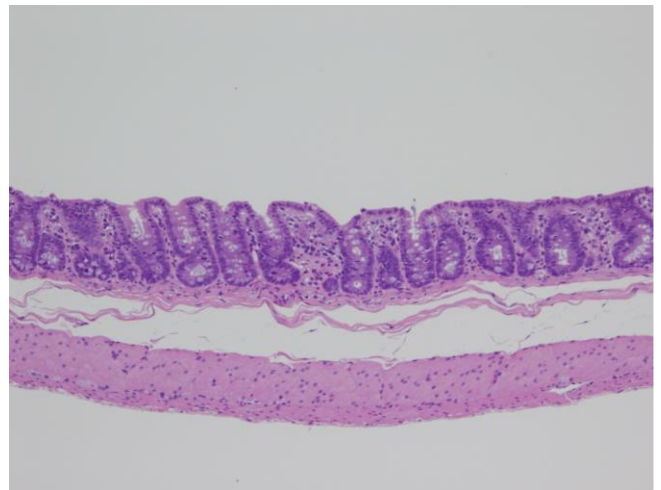
DSS+0 mg/kg



DSS+1000 mg/kg (30 nm)

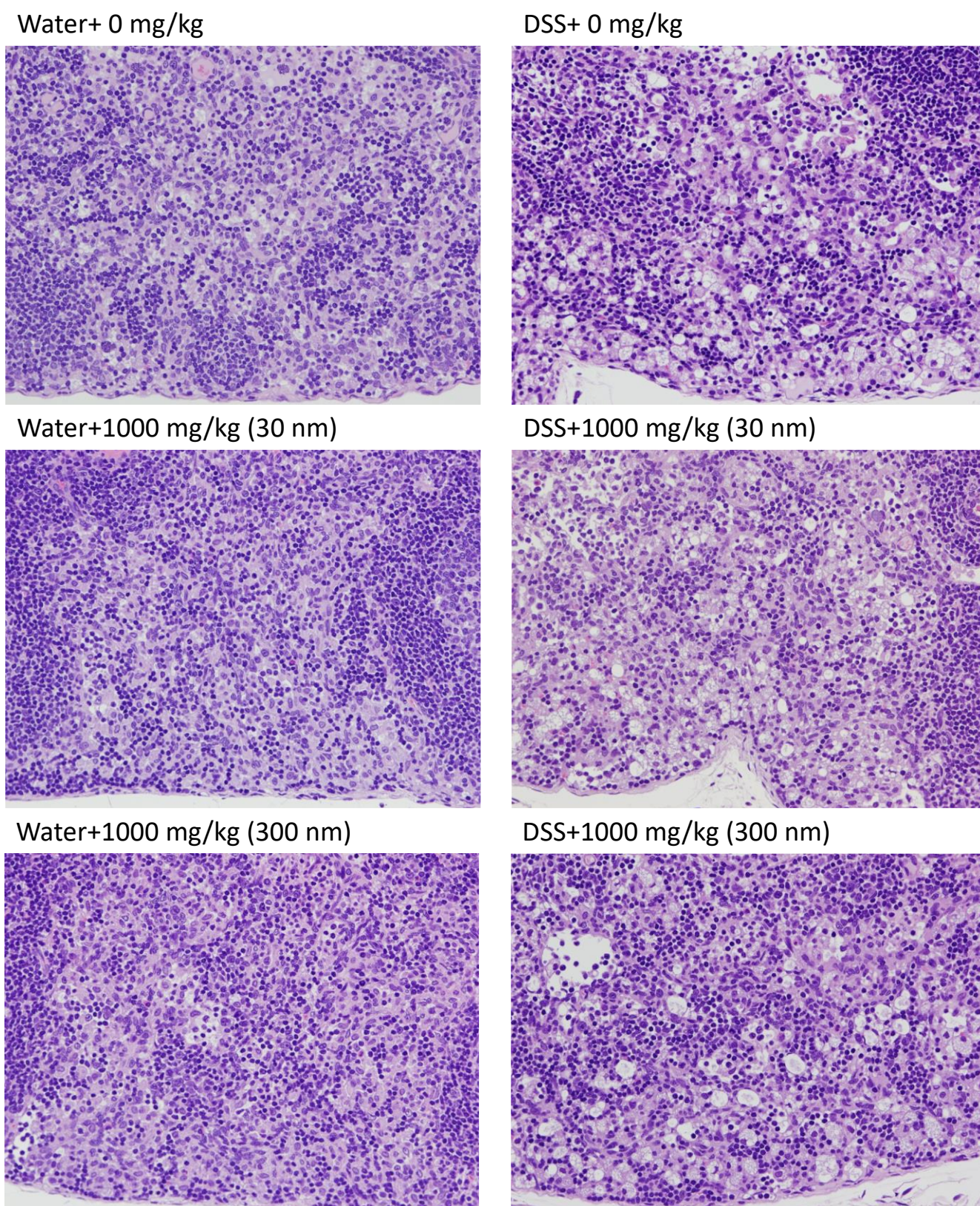


DSS+1000 mg/kg (300 nm)



**Figure 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.**

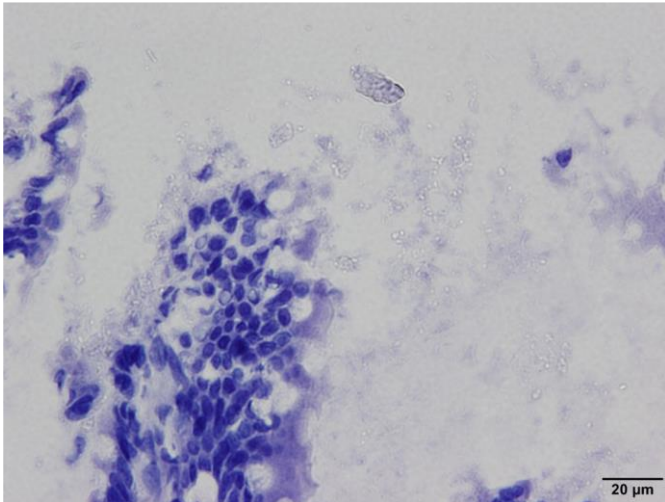




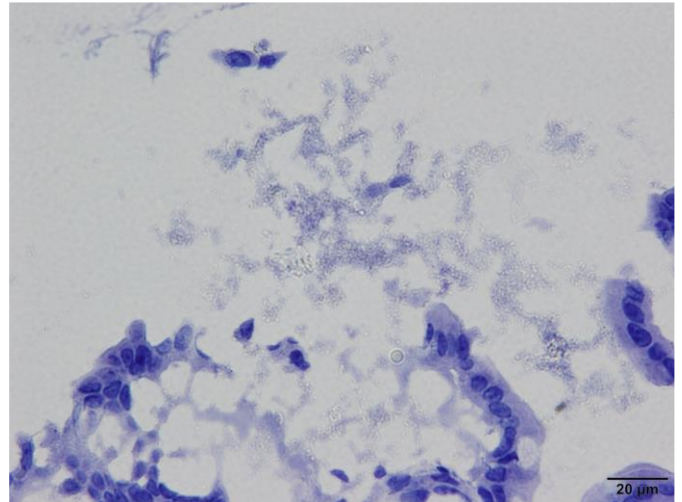
**Figure 9. Representative histopathological finding in the mesentery lymph node of F344 male rats administered 30 nm or 300 nm in diameter polystyrene for 4 weeks with or without 1% DSS in drinking water. Minimal to mild macrophage infiltration showing vacuolation was observed in rats treated with DSS.**



Water+1000 mg/kg (30 nm)



Water+1000 mg/kg (300 nm)



**Figure 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. 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 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
Nitrite	–	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 / $\mu$ 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	Dose (mg/kg BW/day)	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	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	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 $\pm$ 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 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					
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					
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  $p < 0.05$

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

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	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 <sup>(4)</sup>	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 <sup>(4)</sup>	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 <sup>(4)</sup>	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 <sup>(4)</sup>	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 <sup>(4)</sup>	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 <sup>(4)</sup>	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 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	Dose (mg/kg BW/day)	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	5	
	Colon		0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rectum		0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>DSS</i>											
	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5	
	Colon	Erosion/ulcer	0	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)	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)	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)	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)	5 (2/3/0/0)	

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

**Table 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 <sup>a</sup>			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
	Metaplasia, squamous cell, transitional epithelium		0	0	0	0	0	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
Ovary			0	0	0	0	0	0
Oviduct			0	0	0	0	0	0
Uterus			0	0	0	0	0	0
Mammary gland			0	0	0	0	0	0
Vagina			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

<sup>a</sup>:The number of samples for exceptional cases were indicated as denominator.

±:minimal, +:mild