

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラットを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号 : 0780

CAS No. 308068-56-6

2012年3月28日

中 央 労 働 災 害 防 止 協 会
日本バイオアッセイ研究センター

目次

標題
試験目的
試験法
GLP 対応
動物福祉
試験委託者
試験施設及び運営管理者
試験日程
試験関係者一覧
試資料の保管
試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付
陳述書
信頼性保証証明書
本文
TABLES	A ~ M2
FIGURES	1 ~ 8
PHOTOGRAPHS	1 ~ 3
APPENDICES	1 ~ 4
別添	

標題

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラットを用いた吸入による 13 週間毒性試験

試験目的

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) の吸入によるがん原性試験の投与濃度を決定する予備試験として、複層カーボンナノチューブ (MWCNT) をラットに 13 週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 413 (亜慢性吸入毒性 : 90 日試験 2009 年 9 月 7 日採択) を参考に実施した。

GLP 対応

本試験は、昭和 63 年 9 月 1 日付け、労働省告示第 76 号「試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP)」(一部改正。平成 12 年 3 月 29 日付け、労働省告示第 13 号) に準拠し、OECD GLP (1997 年 11 月 26 日採択) に準じて実施した。

動物福祉

本試験は、平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「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方針」及び平成 18 年 11 月 27 日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

試験委託者

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課
東京都千代田区霞が関 1-2-2

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラットを用いた
吸入による13週間毒性試験報告書

試験番号：0780

本文

本文目次

	頁
要約	1
試験材料	2
- 1 被験物質の性状等	2
- 1 - 1 名称等	2
- 1 - 2 構造式及び物理化学的性状	2
- 2 使用被験物質	2
- 3 試験動物	2
試験方法	3
- 1 投与	3
- 1 - 1 投与経路	3
- 1 - 2 被験物質の投与方法	3
- 1 - 3 投与期間	3
- 1 - 4 投与濃度	3
- 1 - 5 投与経路、投与期間、投与時間及び投与濃度の設定理由	3
- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整	4
- 1 - 7 被験物質濃度の測定	4
- 1 - 8 吸入チャンバー内の粒子径分布の測定	4
- 1 - 9 吸入チャンバー内の MWCNT の形態観察	5
- 2 動物管理	6
- 2 - 1 各群の使用動物数	6
- 2 - 2 群分け及び個体識別方法	6
- 2 - 3 飼育条件	6
(1) 飼育環境	6
(2) 飼料	7
(3) 飲水	7
- 3 觀察・検査項目及び方法	8
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	8

- 3 - 2 体重測定	8
- 3 - 3 摂餌量測定	8
- 3 - 4 血液学的検査	8
- 3 - 5 血液生化学的検査	8
- 3 - 6 尿検査	9
- 3 - 7 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査	9
- 3 - 8 病理学的検査	9
(1) 剖検	9
(2) 臓器重量	9
(3) 臓器の採取保存	9
(4) 脾臓中サイトカインの mRNA 発現量の測定のための組織の採取	10
(5) 病理組織学的検査	10
- 4 数値処理と統計方法	10
- 4 - 1 数値の取り扱いと表示	10
- 4 - 2 統計処理	11
試験成績	12
- 1 生死状況	12
- 2 一般状態	12
- 3 体重	12
- 4 摂餌量	12
- 5 血液学的検査	13
- 6 血液生化学的検査	13
- 7 尿検査	13
- 8 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査	13
- 8 - 1 BALF の細胞学的検査	13
(1) 細胞数及び細胞分類	13
(2) 細胞形態観察	14
- 8 - 2 BALF の生化学的検査	15
- 9 病理学的検査	15
- 9 - 1 剖検	15
- 9 - 2 臓器重量	15
- 9 - 3 病理組織学的検査	16

考察及びまとめ	18
文献	21
予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計 画書に従わなかつたこと	22

TABLES A ~ M2

FIGURES 1 ~ 8

PHOTOGRAPHS 1 ~ 7

APPENDICES 1 ~ 4

要約

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) の吸入によるがん原性試験の予備試験として、複層カーボンナノチューブ (MWCNT) をラットに 13 週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

本試験は、被験物質投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 80 匹を用いた。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、0.2、1 及び 5 mg/m³ とした。投与期間は 1 日 6 時間、1 週 5 日間の投与 (全身暴露による経気道投与) で 13 週間とした。投与期間中は、生死確認、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、尿検査を行い、投与期間後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

MWCNT の暴露の結果、動物の死亡はみられず、一般状態の観察でも変化はみられなかった。体重では、雄の 5 mg/m³ で投与期間中期まで低値がみられたが、その程度は軽微であった。血液学的検査では、雌の 1 mg/m³ 以上の群で好中球比の高値及び 5 mg/m³ 群でリンパ球比の低値がみられた。BALF の総細胞数の測定では、雌雄の 1 mg/m³ 以上の群で好中球とリンパ球の増加を主とする総細胞数の増加がみられ、5 mg/m³ 群では顕著であった。BALF の細胞分類では、1 mg/m³ 以上の群で好中球比とリンパ球比の高値がみられ、特に 5 mg/m³ 群では、好中球比とリンパ球比の高値が顕著であった。BALF 中の形態観察では、マクロファージに変化がみられた。0.2 mg/m³ 群では、対照群との大きな違いは認められなかつたが、1 mg/m³ 群では、雌雄とも腫大した肺胞マクロファージや小型の肺胞マクロファージが観察され、細胞サイズの多様化 (大小不同) が認められた。5 mg/m³ 群では、肺胞マクロファージの大小不同がより顕著となつた。変性細胞は、細胞質の濃染または淡染化が特徴で、核は縮小し、空胞は拡大した。BALF の生化学的検査では、雌雄の全投与群で総タンパク、アルブミン、LDH 及び ALP (雌は 1 mg/m³ 以上の群) が高値であった。剖検では、雌雄の 5 mg/m³ 群で、肺に白色斑と暗色が認められた。臓器重量では、雌雄とも 1 mg/m³ 以上の群で、肺重量の高値がみられた。病理組織学的検査では、肺、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、縦隔リンパ節 (肺関連リンパ節) に変化がみられた。肺では、雌雄の 1 mg/m³ 以上の群で軽度から中等度の肉芽腫性変化と軽度な肺胞壁の限局性肥厚が認められ、雄の 0.2 mg/m³ 群でも軽度な肉芽腫性変化が認められた。鼻腔と鼻咽頭では、雌雄の 1 mg/m³ 以上の群で杯細胞過形成がみられた。MWCNT の沈着は雌雄の全投与群の肺、鼻腔、喉頭、気管、縦隔リンパ節 (肺関連リンパ節) に観察された。

以上、BALF の検査と病理組織学的検査の結果から無毒性量 (NOAEL) は求められず、最少毒性量 (LOAEL) は 0.2 mg/m³ であると考えられた。

試験材料

- 1 被験物質の性状等

- 1 - 1 名称等

名 称 : 複層カーボンナノチューブ (Multi-wall carbon nanotube: MWCNT)
 別 名 : 多層カーボンナノチューブ (Multi-wall carbon nanotube: MWCNT)
 CAS No. : 308068-56-6 (カーボンナノチューブとして)

- 1 - 2 構造及び物理化学的性状 (文献 1)

形 状 : 炭素による六員環ネットワーク構造を持ち、多層の同軸管状の針状型
 (ストレートタイプ)を呈する。
 性 状 : 黒色、固体
 比 重 : 0.005 – 0.01 g/cm³ (かさ比重)
 比 表 面 積 : 25 – 30 m²/g

- 2 使用被験物質 (文献 2)

製 造 元 : 保土谷化学工業(株)
 製品コード : MWNT-7 (文献 2)
 ロット番号 : 071223-43、080126-16
 純 度 : 99.6 %、99.8 % (保土谷化学工業(株)検査成績データ)
 保 管 条 件 : 室温で暗所に保管

- 3 試験動物

動物は、複層カーボンナノチューブ (MWCNT) のがん原性試験で使用する動物種及び系統に合わせ、日本チャールス・リバー(株)(厚木飼育センター:神奈川県厚木市下古沢 795) の F344/DuCr1Crlj ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 48 匹を 4 週齢で導入し、検疫及び馴化をそれぞれ 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い雌雄各 40 匹 (群構成時体重範囲、雄: 112 ~ 129g、雌: 90 ~ 109g) を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCr1Crlj ラット (SPF) を選択した理由は、遺伝的に安定していること、過去に多くのがん原性試験に用いたデータがあり、化学物質による腫瘍発生

の感受性が知られていることによる。

試験方法

- 1 投与

- 1 - 1 投与経路

投与経路は全身暴露による経気道投与とした。

- 1 - 2 被験物質の投与方法

投与は、試験動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した被験物質を含む空気を送り込み、動物に全身暴露することにより行なった。

- 1 - 3 投与期間

投与期間は、1日6時間、1週5日の暴露で13週間とし、土日、祝日を除く計62回の暴露を行なった。

- 1 - 4 投与濃度

投与濃度は0.2、1及び5mg/m³の3段階（公比5）に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

- 1 - 5 投与経路、投与期間、投与時間及び投与濃度の設定理由

投与経路は、被験物質を生産、使用する作業環境における労働者への主な暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、がん原性試験の投与濃度を決定するため、週5日の暴露で13週間とした。

投与時間はOECD化学品テストガイドライン413（文献3）に従い1日6時間とした。

投与濃度は2週間毒性試験（試験番号0773）の結果をもとに決定した。2週間試験では、雌雄各群各10匹のF344/DuCrI Crjラットに0、0.2、1、5mg/m³の濃度で10回の暴露を行った。半数（暴露終了時解剖群）の動物は、2週間の暴露後に解剖し、残りの半数（観察群）は4週間の観察を行った後に解剖した。全動物に死亡及び一般状態の変化は認められなかった。暴露期間及び暴露終了時の体重測定で全投与群に有意な体重増加の抑制がみられ

たが、4週間の観察期間中には有意差は認められなかった。気管支肺胞洗浄液(BALF)の検査で、暴露終了時解剖群及び観察群の $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群で総蛋白、アルブミン、LDH及びALP値の上昇、マクロファージ数の減少、好中球及び单球の増加、多核(2核以上)のマクロファージの増加が認められた。病理組織学的検査では、暴露終了時解剖群の $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群で鼻腔及び鼻咽頭に杯細胞の過形成が認められた。肺では、暴露終了時解剖群及び観察群の全投与群で肺胞マクロファージに貪食されたMWCNTの沈着が認められ、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群では非貪食のMWCNTの沈着も認められた。 $5\text{ mg}/\text{m}^3$ では、暴露終了時解剖群及び観察群にMWCNTを貪食したマクロファージの集簇も認められた。さらに、観察群の $5\text{ mg}/\text{m}^3$ では、多核巨細胞の出現も認められた。よって、これらの変化が出現した濃度の $5\text{ mg}/\text{m}^3$ を13週間試験の最高濃度とし、以下 $1\text{, }0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ (公比5)と決定した。

- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整

MWCNTエアロゾルの発生方法をFIGURE 1に示した。微粒子発生装置(セイシン企業(株)特注)を使用し、MWCNTエアロゾルを発生させ、吸入チャンバーに供給した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度はOPC(Optical particle controller、OPC-AP-600、柴田科学(株))で監視し、その上下限信号により微粒子発生装置へのMWCNTを供給するフィーダー(フンケンピットフィーダーF0型、(株)紛研パウテック)の運転を帰還制御し、吸入チャンバー内濃度の定常性を維持した。

- 1 - 7 被験物質濃度の測定

投与中に3回(暴露開始後1、3、5時間)、チャンバー内のMWCNTを55mmのフッ素樹脂処理ガラス纖維フィルターT60A20((株)東京ダイレック)に捕集した。捕集前後のフィルター重量の差(捕集量)を捕集空気量で除し、チャンバー内濃度(mg/m^3)を算出した。濃度測定結果をTABLE Aに示した。各投与群の被験物質濃度に関しては、その平均値と標準偏差は、 $0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ 群は $0.20 \pm 0.02\text{ mg}/\text{m}^3$ 、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 群は $1.01 \pm 0.11\text{ mg}/\text{m}^3$ 、 $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群は $5.02 \pm 0.25\text{ mg}/\text{m}^3$ であった。その平均値と設定濃度の差((平均値-設定濃度)/設定濃度×100)は最大でも1%、変動係数(標準偏差/平均値×100)は約5%~11%の範囲となり、高い精度でチャンバー内濃度が管理されていることが示された。

- 1 - 8 吸入チャンバー内の粒子径分布の測定

投与期間の1週、6週、13週の3回、MOUDI(Micro-orifice uniform deposit cascade impactor、MOUDI-、MSP社)を使用して、吸入チャンバー内のMWCNTの粒子径を測定した。吸入チャンバー内のMWCNTをMSP社製純正アルミホイル(47mm、シリ

コンオイルを塗布)に捕集し、各ステージの捕集重量を測定した。

各ステージの MWCNT 捕集重量と捕集重量累積率を APPENDIX 1 に示した。その結果をもとに確率対数による累積頻度分布グラフ(FIGURE 2~4)を作成し、グラフから空気動力学的質量中位径(MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter)及び幾何標準偏差(σg ; geometric standard deviation)を求めた。濃度毎に 3 回測定した MMAD 及び σg の結果を下記にまとめた。0.2 mg/m³ 群の MMAD 及び σg は、1.2~1.4 μm 及び 2.5~2.9、1 mg/m³ 群の MMAD 及び σg は、1.3~1.4 μm 及び 2.5~2.8、5 mg/m³ 群の MMAD 及び σg は、1.3~1.4 μm 及び 2.2~2.8 であった。MWCNT の粒子径は、暴露濃度及び捕集日にかかわらず空気動力学的に同じであった。

	0.2mg/m ³		1mg/m ³		5mg/m ³	
	MMAD (μm)	σg	MMAD (μm)	σg	MMAD (μm)	σg
1 週	1.4	2.5	1.4	2.5	1.4	2.2
6 週	1.3	2.8	1.4	2.6	1.3	2.8
13 週	1.2	2.9	1.3	2.8	1.3	2.8

- 1 - 9 吸入チャンバー内の MWCNT の形態観察

投与期間の 1 週、6 週、13 週の 3 回、吸入チャンバー内 MWCNT の形態観察を行なった。金蒸着を施した 0.8 μm のポアサイズのニュークリポアフィルター(47 mm、Whatman 社)に吸入チャンバー内 MWCNT を捕集した。捕集した MWCNT を走査電子顕微鏡(SEM; Scanning electron microscope SU8000 形、(株)日立ハイテクノロジーズ)を用いて観察し、SEM 像を PHOTOGRAPH 1-1~3-3 に示した。暴露濃度及び捕集日にかかわらず全ての SEM 像に大きな違いはなく、分散良好な MWCNT が確認された。

- 2 動物管理

- 2 - 1 各群の使用動物数

投与群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、各群雌雄各 10 匹の動物を用いた。

各群の使用動物数と動物番号

群番号	群名称	雄 使用動物数(動物番号)	雌 使用動物数(動物番号)
0	対照群	10 匹 (1001 ~ 1010)	10 匹 (2001 ~ 2010)
1	0.2 mg/m ³ 群	10 匹 (1101 ~ 1110)	10 匹 (2101 ~ 2110)
2	1 mg/m ³ 群	10 匹 (1201 ~ 1210)	10 匹 (2201 ~ 2210)
3	5 mg/m ³ 群	10 匹 (1301 ~ 1310)	10 匹 (2301 ~ 2310)

- 2 - 2 群分け及び個体識別方法

供試動物の各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から体重の中央値に近い雌雄各 40 匹を選別し、体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てるにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)により実施した(文献 4)。群分けは、被験物質投与開始日の前日(2011 年 7 月 19 日)に行なった。

動物の個体識別は、検疫・馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、投与期間では耳パンチにより行なった。また、ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

なお、動物はバリア区域内の独立した室(701、702 室)に収容し、室の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

- 2 - 3 飼育条件

(1) 飼育環境

全飼育期間中、吸入試験室(701、702 室)の吸入チャンバー内で動物を飼育した。吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境条件及び使用したケージを以下に示した。

吸入試験室の温度、湿度は実測値(平均値 ± 標準偏差)を < > 内に、また、吸入チャンバー内環境の測定結果は APPENDIX 2 に示した。吸入試験室及び吸入チャンバー内の環境

には、動物の健康状態に影響を与えるような変化は認められなかった。

温 度 : 吸 入 試 験 室 ; 21 ± 2
 < 701 室 ; 20.4 ± 0.4 、 702 室 ; 19.8 ± 0.3 >
 吸入チャンバー内 ; $20 \sim 24$

湿 度 : 吸 入 試 験 室 ; $55 \pm 15\%$
 < 701 室 ; $52 \pm 4\%$ 、 702 室 ; $54 \pm 4\%$ >
 吸入チャンバー内 ; $30 \sim 70\%$

明暗サイクル : 12 時間点灯 (8:00 ~ 20:00) / 12 時間消灯 (20:00 ~ 8:00)

換気回数 : 吸 入 試 験 室 ; 15 ~ 17 回 / 時
 吸入チャンバー内 ; 12 ± 1 回 / 時

圧 力 : 吸入チャンバー内 ; $0 \sim -15 \times 10\text{Pa}$

ケージへの動物の収容方法 : 単飼

ケージの材質・形状・寸法等 :

検疫期間 ; ステンレス製群飼網ケージ (340(W) × 294(D) × 176(H) mm/5 匹)

馴化期間 ; ステンレス製6連網ケージ (125(W) × 216(D) × 176(H) mm/匹)

投与期間 ; ステンレス製5連網ケージ (150(W) × 216(D) × 176(H) mm/匹)

(2) 飼料

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株) (千葉工場 : 千葉県千葉市美浜区新港 8-2) の CRF-1 固型飼料 (30kGy- 線照射滅菌飼料) を飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、被験物質暴露中及び定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

なお、試験に使用した飼料中の栄養成分と夾雑物についてはオリエンタル酵母工業(株)から分析データを使用ロットごとに入手し保管した。また、飼料中の夾雑物は試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

(3) 飲水

飲水は、全飼育期間を通して、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。ただし、被験物質暴露中は給水しなかった。

なお、飲水は、試験施設として実施している定期サンプリングによる飲水を(財)食品薬品安全センター秦野研究所 (神奈川県秦野市落合 729-5) に依頼して、水道法を参考にして規定した項目について分析し、結果を試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認し、保管した。

- 3 観察・検査項目及び方法

- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察

検疫及び馴化期間中は、生死及び瀕死の確認を毎日 1 回以上行った。一般状態の詳細な観察は、検疫開始日(導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に行った。投与期間中では、暴露を行った日は暴露の前後、暴露しなかった日は午前に生死及び瀕死の確認を行った。一般状態の詳細な観察は、週1回暴露の前に行つた。

- 3 - 2 体重測定

検疫及び馴化期間中は、全動物について、検疫開始日(導入時)、検疫終了・馴化開始日及び馴化最終日(群構成時)に体重を測定した。投与期間中は、全動物について、週 1 回体重測定を行い、定期解剖動物の搬出時にも体重(搬出時体重)を測定した。

- 3 - 3 摂餌量測定

摂餌量は週 1 回、給餌量及び残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日当たりの摂餌量を算出した。

- 3 - 4 血液学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にペントバルビタール(腹腔内投与)麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管に採血した血液を用いて、下記の項目について検査を行なった。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類

- 3 - 5 血液生化学的検査

定期解剖時に生存していた採血可能な動物について、剖検直前にペントバルビタール(腹腔内投与)麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿を用いて、下記の項目について検査を行なった。検査方法は APPENDIX 3 に示した。

検査項目：総蛋白、アルブミン、A/G 比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロー

ル、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン

- 3 - 6 尿検査

投与期間終期に全動物から、新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノстиクス社）を用いて、下記の項目について検査を行なった。

検査項目：pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン

- 3 - 7 気管支肺胞洗浄液（BALF）の検査

血液学的検査及び血液生化学的検査用に採血を終えた動物の左肺の肺門部気管支を結紮して、右肺を生理食塩水で洗浄し回収した BALF を使用して、下記の項目について検査を行なった。検査方法は APPENDIX 4 に示した。

細胞学的検査項目：総細胞数、細胞分類（マクロファージ、リンパ球、好中球、その他）

生化学的検査項目：総蛋白、アルブミン、LDH、ALP

- 3 - 8 病理学的検査

(1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行なった。

(2) 臓器重量

全動物について、下記に示した臓器の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、各臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

測定臓器：胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、左肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 臓器の採取保存

全動物について、下記の器官、組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。ただし、脾臓については、臓器重量測定後、脾臓中サイトカインのmRNA発現量の測定用と病理組織学的検査用を横断二分割して切り分け、病理組織学的検査用脾臓を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺は浸透固定、右肺は注入固定）、骨髓（大腿骨）、リンパ節（縦隔等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、胰臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精

囊、前立腺、卵巣、子宮、腔、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、胸郭、横隔膜

（4）脾臓中サイトカインのmRNA発現量の測定のための組織の採取

（3）で二分割したサイトカインのmRNA 発現量測定用脾臓については、重量を記録した後、10%牛胎児血清入り RPMI1640(ME⁺)培養液に浸した。mRNA の発現量の測定は、北里大学医学部衛生学教室で行なった。

（5）病理組織学的検査

全動物について、下記の器官、組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリソ・エオジン染色を行い、光学顕微鏡により検査した。また、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺及びリンパ節（縦隔等）については、纖維状物質の診断のために Kernechtrot（ケルンエヒトロート）染色、コラーゲン線維の確認のため Masson trichrome（マッソントリクローム）染色を行なった。なお、鼻腔については切歯の後端（レベル1）、切歯乳頭（レベル2）、第一臼歯の前端（レベル3）の3ヶ所（文献5）で切り出し（横断）、検査した。

鼻腔（3箇所を横断）、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（縦隔、腋窩、鼠径等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、肺臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、卵巣、子宮、腔、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、横隔膜、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

- 4 数値処理と統計方法

- 4 - 1 数値の取り扱いと表示

各数値データは測定機器の精度に合わせて表示した。

吸入チャンバー内の被験物質濃度は mg/m³ を単位として表示した。電子天秤の mg 基準で小数点以下第3位まで測定し、捕集空気量で除し、小数点以下第2位までを表示した。

粒子径の単位は、μm を単位とし、平均粒子径等は小数点以下第1位まで表示した。

体重は g を単位とし、整数値の1の位まで測定し、表示した。

摂餌量は g を単位とし、給餌量及び残餌量を小数点以下第1位まで測定し、給餌量値から残餌量値を減じて摂餌量とした。この値を測定期間の日数で除し、1日当たりの平均摂餌量を算出し、小数点以下第2位を四捨五入して小数点以下第1位までを表示した。

臓器実重量は g を単位とし、小数点以下第3位まで測定し、表示した。臓器重量体重比は臓器実重量値を搬出時体重で除し、パーセント単位で小数点以下第4位を四捨五入し、小数点以下第3位までを表示した。

血液学的検査、血液生化学的検査は APPENDIX 3 に示した単位と桁数により表示した。気管支肺胞洗浄液（BALF）の細胞学的検査及び生化学的検査は、APPENDIX 4 に示した単位と桁数により表示した。

なお、各数値データの平均値及び標準偏差は、上記に示した桁数と同様になるよう四捨五入を行い表示した。

- 4 - 2 統計処理

各群の有効動物数は、供試動物より事故等の理由で外された動物数を減じた動物数とした。病理組織学的検査は、臓器ごとに検査不能臓器を除いた臓器数、その他の検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

各検査及び測定は、実施できた動物数を検査（測定）数とした。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液（BALF）及び臓器重量の測定値は、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は、Dunnett の多重比較により平均値の検定を行なった。また、分散の等しくなかった場合には、各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較を行なった。また、尿検査及び病理組織学的検査（非腫瘍性病変）については、² 検定を行なった。なお、各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% 及び 1% の有意水準の表示を行なった。

試験成績

- 1 生死状況

生死状況を TABLE B1, B2 に示した。

- 雄 -

死亡はみられなかった。

- 2 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE C1,C2 に示した。

- 雄 -

動物の状態に変化はみられなかった。

- 3 体重

体重の推移を TABLE D1 ~ D4 及び FIGURE 5, 6 に示した。

- 雄 -

5 mg/m^3 群で投与期間の 3 週及び 5 週から 9 週にかけて体重の低値がみられた。

投与期間終了時の体重は、対照群に対し、 0.2 mg/m^3 群：96%、 1 mg/m^3 群：101%、 5 mg/m^3 群：94% であった。

- 雌 -

各投与群とも順調な体重増加が認められた。

投与期間終了時の体重は、対照群に対し、 0.2 mg/m^3 群：102%、 1 mg/m^3 群：100%、 5 mg/m^3 群：102% であった。

- 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E1 ~ E4 及び FIGURE 7, 8 に示した。

- 雄 -

0.2 mg/m^3 群で投与期間の 7 週から 11 週、 5 mg/m^3 群で投与期間の 10 週に摂餌量の低値がみられた。

投与期間最終週の摂餌量は、対照群に対し、 0.2 mg/m^3 群：95%、 1 mg/m^3 群：100%、 5 mg/m^3 群：95% であった。

- 雌 -

対照群と各投与群に差はみられなかった。

投与群の投与期間最終週の摂餌量は対照群に対し、 0.2 mg/m^3 群：99%、 1 mg/m^3 群：96%、 5 mg/m^3 群：98%であった。

- 5 血液学的検査

血液学的検査の測定結果を TABLE F1, F2 に示した。

- 雄 -

0.2 mg/m^3 群と 1 mg/m^3 群でヘマトクリット値の高値がみられたが、投与濃度に対応した変化ではなかった。

- 雌 -

1 mg/m^3 以上の群で好中球比の高値がみられた。 5 mg/m^3 群でリンパ球比の低値がみられた。

- 6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の測定結果を TABLE G1, G2 に示した。

- 雄 -

全投与群でリン脂質の低値がみられた。その他、全投与群で無機リンの高値、 0.2 mg/m^3 群と 1 mg/m^3 群で CK とカルシウムの高値がみられ、 5 mg/m^3 群でカリウムの低値がみられたが、これらは投与濃度に相關した変化ではなかった。

- 雌 -

全投与群でカリウムの低値がみられた。

- 7 尿検査

尿検査の測定結果を TABLE H1, H2 に示した。

- 雌雄 -

雌雄とも、全投与群で被験物質の影響はみられなかった。

- 8 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査

- 8 - 1 BALF の細胞学的検査

BALF の細胞学的検査の結果を I1 ~ I4 に示した。

(1) 細胞数及び細胞分類

- 雄 -

1 mg/m³以上の群で総細胞数が増加した。細胞分類では、全投与群で好中球比とリンパ球比の高値、肺胞マクロファージ比の低値がみられた。特に、5 mg/m³群では、好中球比(42.6%、対照群；0.0%)とリンパ球比(15.3%、対照群；0.0%)の増加が顕著であった。なお、0.2 mg/m³群では、好中球比とリンパ球比の高値が示されたが、その値は0.7%と0.3%と僅かであった。また、肺胞マクロファージ比の低値については、好中球比とリンパ球比の高値による相対的なもので、マクロファージ総数に変化はなかった。肺胞マクロファージでは、全投与群で単核のマクロファージ比の低値、2核及び3核以上のマクロファージ比の高値がみられた。

- 雌 -

1 mg/m³以上の群で総細胞数が増加した。細胞分類では、全投与群で好中球比の高値と肺胞マクロファージ比の低値、1 mg/m³以上の群でリンパ球比の高値がみられた。特に、5 mg/m³群では、好中球比(47.4%、対照群；0.1%)とリンパ球比(14.5%、対照群；0.1%)の増加が顕著であった。なお、0.2 mg/m³群では、好中球比の高値が示されたが、その値は1.5%と僅かであった。また、肺胞マクロファージ比の低値については、好中球比とリンパ球比の高値による相対的なもので、マクロファージ総数に変化はなかった。肺胞マクロファージでは、全投与群で単核のマクロファージ比の低値と2核のマクロファージ比の高値が認められ、1 mg/m³群では、3核以上のマクロファージ比の高値がみられた。この他、1 mg/m³群では好酸球比の増加がみられたが、統計学的な数値処理によるものであり、生物学的に意味のある変化とは考えなかった。

(2) 細胞形態観察

- 雌雄 -

雌雄とも、対照群のBALF中の細胞では、肺胞マクロファージが大多数を占めた。BALF中には、この他にもBALF処理によって脱落した気管支・細気管支の細胞が散在していた。マクロファージは、ほぼ球形の形態で、入り組んだ細胞膜と一次リボゾームと推測される小空を持ち、大型の丸い核を有していた。一部の細胞膜は、偽足状を示し活発に遊走していた。脱落した上皮細胞が単細胞や集簇した状態で認められ、これらは、纖毛を有するもの、不明瞭なもの、消失しているもの等様々であった。

0.2 mg/m³群では、雌雄とも比較的均一なサイズのマクロファージが多く観察され、対照群との大きな違いは認められなかった。約半数のマクロファージにMWCNTの貪食がみられた。稀に、肺胞マクロファージの腫大や細胞内小空の拡大したマクロファージがみられたが、その程度は軽度であった。脱落上皮細胞は対照群と同程度であった。

1 mg/m³群では、雌雄とも腫大した肺胞マクロファージや小型の肺胞マクロファージが観察され、細胞サイズの多様化が認められた。MWCNTを取り込んだ多核巨細胞には、10核以上の核を有する細胞も散見された。脱落上皮細胞は、0.2 mg/m³群に比べて多く観察され

た。

5 mg/m³ 群では、雌雄ともに 1 mg/m³ 群で認められた肺胞マクロファージの大小不同がより顕著となった。変性マクロファージは、細胞質の濃染または淡染化が特徴で、核は縮少し、空胞は拡大した。特に、腫大したマクロファージは、紫状に濃染するものが多かった。MWCNT は、マクロファージに貪食されていたが、貪食マクロファージの細胞死による MWCNT の再放出が認められた。多核細胞の出現は、1 mg/m³ 群に比べて同程度かそれ以下であった。脱落上皮細胞は、1 mg/m³ 群と比べてやや多い程度であった。その他、BALF 内には多量の粘液が認められた。粘液内には MWCNT や貪食マクロファージ、炎症細胞等が混在した。

- 8 - 2 BALF の生化学的検査

BALF の生化学的検査結果を J1, J2 に示した。

- 雄 -

全投与群で総タンパク、アルブミン、LDH 及び ALP の高値がみられた。

- 雌 -

全投与群で総タンパク、アルブミン及び LDH の高値がみられ、1 mg/m³ 群以上の群で ALP の高値がみられた。

- 9 病理学的検査

- 9 - 1 剖検

- 雄 -

5 mg/m³ 群で、肺に白色班と暗色がそれぞれ 10 匹中 10 匹に認められた。

- 雌 -

5 mg/m³ 群で、肺に白色班が 10 匹中 9 匹と暗色が 10 匹に認められた。

- 9 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量と体重比について、TABLE K1, K2 及び TABLE L1, L2 に示した。

- 雄 -

1 mg/m³ 以上の群で、肺(左)の実重量と体重比の高値がみられた。この肺の実重量と体重比の変化については、1 mg/m³ 群では対照群の 119% と 118%、同じく 5 mg/m³ 群では

対照群の 128% と 136% であった。また、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ 群で副腎、脾臓及び心臓の体重比の高値がみられた。なお、 $0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ 群でも肺の実重量と体重比は、統計学的な有意差は認められないものの対照群よりも高値であった。

- 雌 -

$1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群で、肺(左)の実重量と体重比の高値がみられた。この肺の実重量と体重比の変化については、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 群では、両者とも対照群の 119%、同じく $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群では、対照群の 133% と 128% であった。また、 $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群で脾臓の実重量の高値がみられた。その他、 $0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ 群と $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 群で心臓の体重比の低値がみられたが、これらの変化は投与濃度と対応したものではなかった。なお、 $0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ 群でも肺の実重量と体重比は、統計学的な有意差は認められないものの対照群よりも高値であった。

- 9 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を TABLE M1, M2、PHOTOGRAPH 4 ~ 7 に示した。

- 雄 -

肺、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、縦隔リンパ節(肺関連リンパ節)に変化がみられた。肺では、肉芽腫性変化が $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群の全動物(軽度; 6 匹、中等度; 4 匹)に認められた。 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 群では 8 匹(軽度)に認められ、 $0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ 群でも 1 匹(軽度)に認められた。また、肺胞壁の限局性肥厚が認められ、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群で全動物(軽度)に認められた。肉芽腫性変化は、細気管支と肺胞の境界部を中心に認められ、MWCNT を貪食した肺胞マクロファージ数個の小集簇巣から肺内気管支腔や肺胞腔を狭窄するような比較的大きな病変まで一連の変化として観察された。肺胞壁の限局性肥厚は、肉芽腫性変化に伴って、肺胞管の限局した肥厚としてみられた。また、マッソントリクローム染色により、コラーゲン線維の増生が肉芽腫性変化から肺胞管の肺胞壁まで連続して観察された。肺内の気管支には、全投与群で肺胞マクロファージに貪食された纖維状物質の沈着(軽度)と肺胞マクロファージに貪食されていない纖維状物質の沈着(軽度)が認められた。沈着していた纖維状物質は、黒色の針状型を示しており、暴露した MWCNT に相当するものであった。肺胞腔では、全投与群に肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着(軽度~中等度)と肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT の沈着(軽度)が認められた。肺胞腔内の MWCNT は、ほとんどが肺胞マクロファージに貪食され、肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT は僅かであった。肺胞壁に MWCNT の沈着(軽度)が全投与群に認められた。また、肺内の気管支関連リンパ組織にも MWCNT の沈着(軽度)が全投与群に認められた。これらの MWCNT の肺内の沈着所見は、いずれも $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群では、全動物に認められ、沈着の程度は $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群で強く、暴露濃度に相関していた。

鼻腔では、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群の全動物に杯細胞過形成(軽度~中等度)が認められた。こ

の病変は呼吸上皮の粘液を分泌する杯細胞の数が増加した所見である。この他、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群の全動物に呼吸上皮のエオジン好性変化(軽度)と嗅上皮のエオジン好性変化(軽度～中等度)の発生増加が認められた。さらに、全投与群に呼吸上皮領域の粘膜上皮や粘膜固有層内に MWCNT の軽度な沈着がみられた。

鼻咽頭では、全投与群で $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群の全動物と $0.2\text{ mg}/\text{m}^3$ 群の 1 匹に杯細胞過形成(軽度)が認められた。

喉頭では、全投与群で粘膜上皮や粘膜固有層内に MWCNT の沈着(軽度)が認められた。

気管では、全投与群で粘膜上皮や粘膜固有層内に MWCNT の沈着(軽度)が認められた。

縦隔部の肺関連リンパ節では、全投与群で MWCNT の沈着(軽度)が認められた。

- 雌 -

肺、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、縦隔リンパ節(肺関連リンパ節)に変化がみられた。

肺では、肉芽腫性変化が $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群の全動物(軽度；9匹、中等度；1匹)に認められ、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 群では 4 匹(軽度)に認められた。肺胞壁の限局性肥厚(軽度)が $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群の全動物、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 群では 9 匹に認められた。これらの病変の形態的特徴は、雄と同様であった。肺内の気管支には、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着(軽度)及び肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT の沈着(軽度)が全投与群に認められた。肺胞腔では、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着(軽度～中等度)、肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT の沈着(軽度)が全投与群に認められた。肺胞腔内の MWCNT は、ほとんどが肺胞マクロファージに貪食され、肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT は僅かであった。肺胞壁に MWCNT の沈着(軽度)が全投与群に認められた。また、気管支関連リンパ組織にも MWCNT の沈着(軽度)が全投与群に認められた。

鼻腔では、 $5\text{ mg}/\text{m}^3$ 群の全動物に杯細胞過形成(軽度；2匹、中等度；8匹)が認められ、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 群でも全動物に杯細胞過形成(軽度)が認められた。病変の形態的特徴は雄と同様であった。また、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群に呼吸上皮のエオジン好性変化(軽度)と嗅上皮のエオジン好性変化(軽度～中等度)の発生増加が認められた。呼吸上皮の粘膜上皮や粘膜固有層に MWCNT の沈着(軽度)が全投与群に認められた。

鼻咽頭でも、 $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 以上の群で全動物に杯細胞過形成(軽度)が認められた。

喉頭では、全投与群で粘膜上皮や粘膜固有層内に MWCNT の沈着(軽度)が認められた。

気管では、全投与群で粘膜上皮や粘膜固有層内に MWCNT の沈着(軽度)が認められた。

縦隔部の肺関連リンパ節では、全投与群で MWCNT の沈着(軽度)が認められた。

考察及びまとめ

MWCNT のがん原性試験の予備試験として、その生体影響を検索する目的で F344/DuCrI/Crlj ラットを用いた吸入による 13 週間試験を実施した。

本試験は、投与群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、各群雌雄とも 10 匹とし、合計 80 匹を用いた。投与濃度は、雌雄とも 0 (対照群) 0.2、1 及び 5 mg/m³ とした。投与期間は 1 日 6 時間、1 週 5 日間の投与 (全身暴露による経気道投与) で 13 週間とした。投与期間中は、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定を行い、投与期間終了後、動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査、剖検観察、臓器重量の測定及び病理組織学的検査を行った。

MWCNT の暴露の結果、動物に死亡はみられず、一般状態の観察でも変化はみられなかつた。体重では、雄の 5 mg/m³ で投与期間中期まで低値がみられたが、その程度は軽微であった。投与群の投与期間終了時の体重は対照群に対し、雄は、0.2 mg/m³ 群 : 96%、1 mg/m³ 群 : 101%、5 mg/m³ 群 : 94% であった。同じく雌は、0.2 mg/m³ 群 : 102%、1 mg/m³ 群 : 100%、5 mg/m³ 群 : 102% であった。摂餌量は、雄の 0.2 mg/m³ 群と 5 mg/m³ 群で軽度な低値を示した週が散見されたが、MWCNT の影響とは考えなかつた。

血液学的検査では、雌の 1 mg/m³ 以上の群で好中球比の高値がみられ、5 mg/m³ 群でリンパ球比の低値がみられた。

血液生化学的検査では、雌雄ともに特記すべき変化は認められなかつた。

BALF の検査では、雌雄の 1 mg/m³ 以上の群で好中球とリンパ球の増加を主とする総細胞数の増加がみられ、特にこの変化は 5 mg/m³ 群で顕著であった。BALF の細胞分類でも、1 mg/m³ 以上の群で好中球比とリンパ球比の高値がみられた。特に 5 mg/m³ 群では、好中球比 (雄 : 43%、雌 : 47%) とリンパ球比 (雌雄 : 15%) の高値が顕著であった。BALF 中の細胞の形態観察では、主にマクロファージに変化がみられた。0.2 mg/m³ 群では、雌雄とも比較的均一なサイズのマクロファージが多く観察された。稀に、肺胞マクロファージの腫大や細胞内小空の拡大等の変性したマクロファージがみられる程度で、対照群との大きな違いは認められなかつた。1 mg/m³ 群では、雌雄とも腫大した肺胞マクロファージや小型の肺胞マクロファージが観察され、細胞サイズの多様化 (大小不同) が認められた。MWCNT を取り込んだ多核巨細胞には、10 核以上の核を有する細胞も散見された。また、脱落上皮細胞が、0.2 mg/m³ 群に比べて多く観察された。5 mg/m³ 群では、肺胞マクロファージの大小不同がより顕著となつた。変性細胞は、細胞質の濃染または淡染化が特徴で、核は縮小し、空胞は拡大した。特に、腫大したマクロファージは、紫状に濃染するものが多かつた。MWCNT は、マクロファージに貪食されていたが、貪食マクロファージの細胞死による MWCNT の再放出が認められた。多核細胞の出現は、1 mg/m³ 群に比べて同程度かそれ以下であった。脱落上皮細胞は、1 mg/m³ 群と比べてやや多い程度であった。その他、BALF 内には多量の粘液が認められ、粘液内には MWCNT や貪食マクロファージ、炎症細胞等が混在した。BALF

の生化学的検査では、雌雄の全投与群で総タンパク、アルブミン、LDH 及び ALP（雌は 1 mg/m³ 以上の群）が高値であった。

通常、BALF 中にみられる細胞のほとんどは肺胞マクロファージであるが、本試験では、1 mg/m³ 群から好中球やリンパ球の炎症細胞が増加した。さらに、肺の炎症性変化を示す生化学パラーメータ（総タンパク、アルブミン、LDH、ALP）のほとんどで雌雄とも最低濃度の 0.2mg/m³ から投与濃度に相関して高値となった。生化学的パラーメータの高値は、MWCNT の投与により肺胞マクロファージや肺胞上皮が傷害され、肺胞の血管透過性が亢進した結果、細胞成分の遊走と液性成分の漏出によりもたらされたものと考えられ、肺胞マクロファージや肺胞への毒性を示す変化と考えられた。炎症細胞の誘導の一要因は、傷害を受けた肺胞マクロファージからのサイトカインの放出の結果と推察され、生化学パラーメータの動向と肺胞マクロファージの傷害や炎症細胞の出現は良く一致していた。また、肺胞マクロファージでは、0.2 mg/m³ 以上の群で 2 核及び 3 核以上の多核の肺胞マクロファージが増加したことが特徴で、この変化は肺胞マクロファージの細胞分裂障害を示唆するものと考えた。

剖検観察では、雌雄の 5 mg/m³ 群で肺の暗色と白色斑が認められた。

臓器重量では、肺の重量増加が 1 mg/m³ 以上の群にみられた。

病理組織学的検査は肺、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、リンパ節（縦隔等）に曝露による変化が認められた。

肺では軽度から中等度の肉芽腫性変化が 5 mg/m³ 群の雌雄の全動物に認められ、雌では 1 mg/m³ 群まで、雄では 1 匹ではあるが 0.2 mg/m³ 群にも認められた。また、軽度な肺胞壁の限局性肥厚が認められ、1 mg/m³ 以上の群の全動物に認められた。肉芽腫性変化は、感染や異物に対する慢性炎症の特異的な組織表現型の 1 つとされている（文献 6）。本試験でみられた肉芽腫性変化は、異物（MWCNT）を貪食したマクロファージが集簇し線維化を伴った結節性病巣であった。また、肺胞壁の限局性肥厚は、肉芽腫性変化に伴って、肺胞管に限局した肥厚としてみられた。マッソントリクローム染色により、コラーゲン線維の増生が肉芽腫性変化から肺胞管の肺胞壁まで連続して観察された。肺内の気管支には、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT と貪食されていない MWCNT の軽度な沈着が全投与群に認められた。肺胞腔では、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の軽度から中等度の沈着、肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT の軽度な沈着が全投与群に認められた。肺胞腔内の MWCNT は、ほとんどが肺胞マクロファージに貪食されており、貪食されていない MWCNT は僅かであった。肺胞壁には、MWCNT の軽度な沈着が全投与群に認められた。これらの MWCNT の肺内の沈着所見は、いずれも 1 mg/m³ 以上の群では、10 匹全てに認められ、沈着の程度は 5 mg/m³ 群で強く、暴露濃度に相関していた。

鼻腔と鼻咽頭の杯細胞過形成が 1 mg/m³ 以上の群に認められた。杯細胞過形成は、刺激物の反復吸入曝露による反応として認められる（文献 7）ことから、MWCNT の曝露により鼻腔と鼻咽頭の上皮は反復刺激を受けていたと考えられた。また、鼻腔の呼吸上皮や、喉頭、

気管の粘膜上皮や粘膜固有層にも MWCNT の沈着が認められた。このことは、上部気道からも MWCNT が体内に侵入する可能性やリンパや血管を介した MWCNT の粘膜固有層内への沈着の可能性を示した。また、肺内の気管支関連リンパ組織や縦隔部にみられる肺関連リンパ節に MWCNT の沈着が雌雄ともに全投与群に認められ、吸入により肺に沈着した MWCNT はリンパ流路から体内へ移行したと考えられた。

以上、0.2、1、5 mg/m³の濃度で MWCNT を 1 日 6 時間、1 週 5 日間、13 週間吸入暴露した結果、肺（左）の重量増加が雌雄の 1 mg/m³ 以上の群にみられた。BALF の検査により、雌雄の 0.2 mg/m³ 以上の投与群で肺胞マクロファージ及び肺胞への毒性影響が認められた。病理組織学的検査では、雄は 0.2 mg/m³ 以上、雌は 1 mg/m³ の投与群で肉芽腫性変化が認められた。従って、本試験では無毒性量（NOAEL）は求められず、最少毒性量（LOAEL）は 0.2 mg/m³ であると考えられた。

文献

1. 保土谷化学工業株式会社 . ナノマテリアル情報提供シート . 材料名 多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) . 公表平成22年3月 .
2. Hodogaya Chemical Co,LTD. 2010. Multi-Walled Cabon Nanotube Inspection Sheet. No.2010-0001.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guideline for the Testing of chemicals. 413. 2009. Subchronic inhalation Toxicity: 90-Day Study. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. (Adopted: 7 September 2009)
4. 阿部正信 . 1986 . 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立 . 薬理と治療14 : 7285-7302 .
5. Nagano K, Katagiri T, Aiso S, Senoh H, Sakura Y, Takeuchi T. 1997. Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. Exp Toxic Pathol. 49:97-104.
6. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, March T, Nagano K, Pino M, Rittinghausen S, Rosenbruch M, Tellier P, Wohrmann T. 2009. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse, respiratory tract. Toxicol Pathol. 37(Supplement): 5S-73S.
7. 森川茂 . 1995 . 炎症性反応 (肉芽腫) . 現代病理学大系 . 炎症と感染 : 117-194 .

予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

予見することのできなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。