

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2週間毒性試験報告書

試験番号 : 0773

CAS No. 308068-56-6

2011年5月27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	.....
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	.....
本文	.....
TABLES	A ~ K4
FIGURES	1 ~ 6
PHOTOGRAPHS	1 ~ 3
APPENDICES	1 ~ 3

## 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 2 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 13 週間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 2 週間全身暴露し、その生体影響を検索した。

## 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。

## 試験法

本試験は OECD 化学品テストガイドライン 412 (反復投与吸入毒性：28 日試験、2009 年 9 月 7 日採択) を参考にして実施した。

## 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2週間毒性試験報告書

試験番号：0773

本文

## 本文目次

	頁
要約 .....	1
試験材料 .....	3
- 1 被験物質の性状等 .....	3
- 1 - 1 名称等 .....	3
- 1 - 2 構造式及び物理化学的性状 .....	3
- 2 使用被験物質 .....	3
- 3 試験動物 .....	3
試験方法 .....	4
- 1 投与 .....	4
- 1 - 1 投与経路 .....	4
- 1 - 2 被験物質の投与方法 .....	4
- 1 - 3 投与期間 .....	4
- 1 - 4 投与濃度 .....	4
- 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 .....	4
- 1 - 6 被験物質の発生方法と濃度調整 .....	5
- 1 - 7 被験物質濃度の測定 .....	5
- 1 - 8 吸入チャンバー内の粒子径分布の測定 .....	5
- 1 - 9 吸入チャンバー内の MWCNT の形態観察 .....	6
- 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 .....	7
(1) 飼育環境 .....	7
(2) 飼料 .....	7
(3) 飲水 .....	8
- 3 観察・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	9
- 3 - 6	気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査	9
- 3 - 7	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)	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	10
	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	気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査	14
- 7 - 1	BALF の細胞学的検査	14
(1)	細胞数及び細胞分類	14
(2)	細胞形態観察	15
- 7 - 2	BALF の生化学的検査	15
- 8	病理学的検査	16
- 8 - 1	剖検	16
- 8 - 2	臓器重量	16
- 8 - 3	病理組織学的検査	16
	考察及びまとめ	21
- 1	用量 - 反応関係	21

文献 .....25

予見することのできなかつ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 .....26

TABLES                   A ~ K 2

FIGURES                   1 ~ 6

PHOTOGRAPHS           1 ~ 3

APPENDICES              1 ~ 3

## 要約

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) のがん原性試験の投与濃度決定試験 (13 週間試験) の予備試験として、その生体影響を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による 2 週間の試験を実施した。

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/m<sup>3</sup> 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 2 週間とした。さらに、各群の半数の動物は投与終了後 4 週間の観察を行った。投与期間及び観察期間中は、生死確認、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、投与期間及び観察期間終了後、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。雌雄の各投与群で体重増加の抑制が投与期間の 1 週目にみられ、投与期間及び観察期間を通じて、投与群の体重は対照群より低値であった。これらの変化は、投与群間に投与濃度との相関性がみられないことから被験物質の影響とは考えなかった。血液学的及び血液生化学的検査では主に 5 mg/m<sup>3</sup> 群で軽微な変化が認められた。

BALF の細胞学的検査では、投与終了時解剖群の主に 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で好中球比と単球比の高値及び肺胞マクロファージ比の低値がみられ、特に、5 mg/m<sup>3</sup> 群では好中球比の高値と肺胞マクロファージ比の低値が顕著であった。形態観察では、全投与群で MWCNT を貪食した肺胞マクロファージが認められ、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で顕著に増加した。また、MWCNT を貪食した肺胞マクロファージには、細胞の大きさの大小不同が観察された。貪食肺胞マクロファージは、細胞の腫大を起こした後に次第に細胞質が淡染化し、最終的に核のみを残し消失した。さらに、マクロファージでは、単核のマクロファージ比の低値及び 2 核と 3 核以上のマクロファージ比の高値がみられ、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で投与濃度に相関して増加した。生化学的検査では、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で総タンパク、アルブミン及び ALP の高値がみられた。

観察群では、BALF の細胞学的検査で 5 mg/m<sup>3</sup> に好中球比、単球比の高値及び肺胞マクロファージ比の低値がみられた。形態観察では、投与終了時と同様な変化が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群でみられたが、発現数は、投与終了時よりも減少した。また、単核のマクロファージ比の低値及び 2 核あるいは 3 核以上のマクロファージ比の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で認められた。生化学的検査では、総タンパク、アルブミン及び LDH の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群でみられ、ALP の高値が 5 mg/m<sup>3</sup> でみられた。BALF の検査で、4 週間の観察期間内に肺胞マクロファージ及び肺への影響は回復しないことが示された。

剖検観察では、投与終了時解剖群及び観察群とも、MWCNT の影響と思われる変化は、みられなかった。臓器重量では、雄の投与終了時解剖群で肺 (左) の重量増加が 5 mg/m<sup>3</sup> 群



にみられた。観察群では各臓器とも重量に変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、投与終了時解剖群の  $1 \text{ mg/m}^3$  以上の群で鼻腔と鼻咽頭に杯細胞増生がみられた。鼻腔での杯細胞は鼻腔中央の鼻中隔や鼻甲介まで広がって認められた。MWCNT の沈着が鼻腔（呼吸上皮）、肺（気管支、肺胞腔、肺胞壁、気管支関連リンパ組織）及び縦隔リンパ節に認められた。鼻腔への MWCNT の沈着は  $1 \text{ mg/m}^3$  以上の群にみられ、主として呼吸上皮に観察された。肺では、気管支、肺胞腔、肺胞壁、肺内の気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着が認められ、気管支と肺胞腔では全ての投与群に沈着がみられた。気管支と肺胞腔にみられた MWCNT は、ほとんどが肺胞マクロファージに貪食された状態で観察されたが、 $1 \text{ mg/m}^3$  以上の群では、肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT もわずかに認められた。肺胞壁の MWCNT の沈着については、 $5 \text{ mg/m}^3$  群では、MWCNT を貪食したマクロファージの集簇が肺胞壁内に認められたのに対し、 $1 \text{ mg/m}^3$  群と  $0.2 \text{ mg/m}^3$  群では、肺胞壁内に MWCNT を貪食したマクロファージの集簇はみられなかった。 $5 \text{ mg/m}^3$  群では、縦隔（気管周囲）リンパ節に MWCNT が認められた。

観察群では、 $5 \text{ mg/m}^3$  群で鼻腔の杯細胞の増生が雄 1 匹にみられた。この所見は、鼻腔中央（レベル 2）の鼻中隔まで広がって認められた。MWCNT の沈着は鼻腔（呼吸上皮）、肺（気管支、肺胞腔、肺胞壁、気管支関連リンパ組織）及び縦隔（気管周囲）リンパ節に認められた。鼻腔への MWCNT の沈着は  $5 \text{ mg/m}^3$  群にみられ、沈着部位は投与終了時と同様であった。肺では、気管支、肺胞腔、肺胞壁、肺内の気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着が認められ、気管支と肺胞腔では全ての投与群に MWCNT の沈着がみられた。気管支と肺胞腔にみられた MWCNT のほとんどが肺胞マクロファージに貪食された状態であったが、 $1 \text{ mg/m}^3$  以上の群では、肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT も少数例に認められた。 $5 \text{ mg/m}^3$  群では、MWCNT を貪食したマクロファージの集簇が肺胞壁や肺胞腔に認められた。また、わずかではあるが、多核巨細胞が認められ、これらは、集簇したマクロファージとともに観察されるものと肺胞壁に単独で観察されるものがあつた。一方、 $1 \text{ mg/m}^3$  群と  $0.2 \text{ mg/m}^3$  群ではマクロファージの集簇も多核巨細胞も認められなかった。縦隔（気管周囲）リンパ節では、 $1 \text{ mg/m}^3$  以上の群で MWCNT が認められた。

## 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/cm<sup>3</sup> (かさ比重)  
比表面積 : 25 - 30 m<sup>2</sup>/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  
純 度 : 99.8 % (保土谷化学工業 (株) 検査成績データ)  
ロット番号 : MWNT-7 080126  
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/DuCrIj ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 48 匹を 5 週齢で導入し、検疫・馴化を 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 ~ 125g、雌: 87 ~ 95g) を選別し、試験に用いた。

なお、がん原性試験に F344/DuCrIj 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2週間とし、計10回の暴露を行った。

##### - 1 - 4 投与濃度

投与濃度は0.2、1及び5 mg/m<sup>3</sup>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13週間試験の投与濃度を決定するため、週5日の暴露で2週間とした。

投与時間はOECD化学品テストガイドライン412（文献3）に従い1日6時間とした。

投与濃度は、以下のように決定した。すなわち、高濃度については、米国連邦職業安全衛生庁（OSHA）により勧告されている人工カーボングラファイトの許容暴露限界値（permissible exposure limit：PEL）5.0 mg/m<sup>3</sup>（Respirable fraction）（文献4）を参考に5 mg/m<sup>3</sup>と決定した。以下、公比5で中間濃度は1 mg/m<sup>3</sup>、低濃度は0.2 mg/m<sup>3</sup>とした。

#### - 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（フンケンビットフィーダー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

投与日に 1 日、3 回（暴露開始後 1、3、5 時間）、チャンバー内の MWCNT を 55 mm のテフロンバインダーフィルター（（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<sup>3</sup>）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は、その平均値と設定濃度の差（（平均値 - 設定濃度）/ 設定濃度 × 100）が 7% 以内、変動係数（標準偏差 / 平均値 × 100）が 12% 以内であり、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

投与期間中に 1 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ール（47 mm、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。その結果を基に確率対数による累積頻度分布グラフを作成し（FIGURE 2~4）、空気動学的質量中位径（MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter）及び幾何標準偏差（ $g$ ; geometric standard deviation）を求め、下記に示した。投与群の吸入チャンバー内 MWCNT の MMAD は 1.2~1.4  $\mu$ m、 $g$  は 2.4~3.4 となり、投与群間に大きな差はみられなかった。

群 名 称	MMAD ( $\mu$ m )	$g$
0.2 mg/m <sup>3</sup> 群	1.3	2.7
1 mg/m <sup>3</sup> 群	1.2	3.4
5 mg/m <sup>3</sup> 群	1.4	2.4

### - 1 - 9 吸入チャンバー内の MWCNT の形態観察

投与期間中に 1 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  $\mu\text{m}$  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、捕集した MWCNT を走査電子顕微鏡（SEM; Scanning electron microscope、（株）日立ハイテクノロジーズ SU8000 形）を用いて観察した。

各投与群の吸入チャンバーから捕集した MWCNT の SEM 写真を PHOTOGRAPH 1 ~ 3 に示した。投与群間に大きな差はみられず、分散良好な MWCNT 像が確認された。

### - 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。各群雌雄各 5 匹は暴露終了時に解剖を行い、残りの各群雌雄各 5 匹は暴露終了後 4 週間の観察期間後に解剖を行った。

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	5 匹 (1001 ~ 1005)	5 匹 (2001 ~ 2005)
	対照群：4 週間観察群	5 匹 (1006 ~ 1010)	5 匹 (2006 ~ 2010)
1	0.2 mg/m <sup>3</sup> 群	5 匹 (1101 ~ 1105)	5 匹 (2101 ~ 2105)
	0.2 mg/m <sup>3</sup> 群：4 週間観察群	5 匹 (1106 ~ 1110)	5 匹 (2106 ~ 2110)
2	1 mg/m <sup>3</sup> 群	5 匹 (1201 ~ 1205)	5 匹 (2201 ~ 2205)
	1 mg/m <sup>3</sup> 群：4 週間観察群	5 匹 (1206 ~ 1210)	5 匹 (2206 ~ 2210)
3	5 mg/m <sup>3</sup> 群	5 匹 (1301 ~ 1305)	5 匹 (2301 ~ 2305)
	5 mg/m <sup>3</sup> 群：4 週間観察群	5 匹 (1306 ~ 1310)	5 匹 (2306 ~ 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かった動物を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ことにより、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 5）。

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、投与期間及び観察期間では耳パンチにより行った。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大きな変化は認められなかった。

温 度 : 吸 入 試 験 室 ;  $21 \pm 2$   
< 701 室 ;  $20.1 \pm 0.3$  、 702 室 ;  $20.1 \pm 0.3$  >  
吸入チャンバー内 ; 20 ~ 24

湿 度 : 吸 入 試 験 室 ;  $55 \pm 15\%$   
< 701 室 ;  $55 \pm 3\%$ 、 702 室 ;  $55 \pm 4\%$  >  
吸入チャンバー内 ; 30 ~ 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 ;  $12 \pm 1$  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・馴化期間 ; ステンレス製 6 連網ケージ ( 125(W) × 216(D) × 176(H) mm / 匹 )

投与及び観察期間 ; 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

動物の生死及び瀕死の確認を毎日1回、また、一般状態の詳細な観察は週1回行った。

##### - 3 - 2 体重測定

体重測定は週1回行った。また、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、 $\gamma$ -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 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。

細胞学的検査項目：総細胞数、炎症細胞数、細胞形態観察

生化学的検査項目：総蛋白、アルブミン、LDH、ALP

なお、投与期間終了時の検査において、生化学的検査用の BALF を一旦、凍結 ( - 80 ) し、解凍後に検査を行ったため、LDH の測定値は正確ではない ( 活性低下 ) と判断し、検査結果から除外した。

### - 3 - 7 病理学的検査

#### (1) 剖検

全動物について肉眼的に観察を行った。

#### (2) 臓器重量

定期解剖時の生存動物について、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。



鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺は浸透固定、右肺は注入固定）、骨髄（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、膵臓、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、膣、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、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

#### （４）病理組織学的検査

全動物について、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、リンパ節（縦隔等）、肝臓及び腎臓を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・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、繊維状物質の診断のため、Kernechtrot（ケルンエヒトロート）染色を行った。

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６）で切り出し（横断）、検査した。

#### - 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  $\text{mg}/\text{m}^3$  を単位として表示した。電子天秤の  $\text{mg}$  基準で小数点以下第 3 位まで測定し、被験物質濃度  $\text{mg}/\text{m}^3$  は小数点以下第 2 位までを表示した。

粒子径の単位は、 $\mu\text{m}$  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  $\text{g}$  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  $\text{g}$  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  $\text{g}$  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。

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。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、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った。また、分散の等しくない場合には、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 型の多重比較を行った。

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った。

## 試験成績

### - 1 生死状況

生死状況を TABLE B1, B2 に示した。

- 雌雄 -

投与期間及び観察期間を通じて、動物の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。

- 雌雄 -

投与期間及び観察期間を通じて、被験物質の影響と思われる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 -

各投与群とも投与期間の 1 週目に軽度な体重増加の抑制がみられ、体重は投与期間及び観察期間を通じて対照群より低値であった。

投与群の投与期間終了時の体重は対照群に対し、0.2 mg/m<sup>3</sup> 群：95%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：97%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：93%、観察期間終了時の最終体重は対照群に対し、0.2 mg/m<sup>3</sup> 群：98%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：98%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：95%であった。

- 雌 -

各投与群とも投与期間の 1 週目に軽度な体重増加の抑制がみられ、体重は投与期間及び観察期間を通じて対照群より低値であった。

投与群の投与期間終了時の体重は対照群に対し、0.2 mg/m<sup>3</sup> 群：94%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：94%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：94%、観察期間終了時の最終体重は対照群に対し、0.2 mg/m<sup>3</sup> 群：95%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：96%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：95%であった。

### - 4 摂餌量

摂餌量を TABLE E1 ~ E4 に示した。

- 雌雄 -

投与期間及び観察期間を通じて、被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

## - 5 血液学的検査

血液学的検査の投与期間終了時の結果を TABLE F1, F2、観察期間終了時の結果を TABLE F3, F4 に示した。

### [ 投与終了時解剖群 ]

- 雄 -

ヘマトクリット値の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられた。

その他、白血球百分率で好中球比とリンパ球比の変化が 1 mg/m<sup>3</sup> 群にみられたが、投与濃度との相関がみられず、被験物質の影響と判断しなかった。

- 雌 -

ヘマトクリット値の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられた。

### [ 観察群 ]

- 雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、赤血球数、MCH、MCHC、白血球数の変化が投与群にみられたが、それぞれ投与濃度との相関がみられず、被験物質の影響と判断しなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、MCV の高値が全投与群にみられたが、投与濃度との相関がみられず、被験物質の影響と判断しなかった。

## - 6 血液生化学的検査

血液生化学的検査の投与期間終了時の結果を TABLE G1, G2、観察期間終了時の結果を TABLE G3, G4 に示した。

### [ 投与終了時解剖群 ]

- 雄 -

アルブミンの高値が 5 mg/m<sup>3</sup> 群にみられた。

その他、総蛋白、AST、ALP、カリウム、クロールの変化が投与群にみられたが、それぞれ投与濃度との相関がみられず、被験物質の影響と判断しなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、総蛋白、A/G 比、AST、ALT、CK の変化が投与群にみられたが、それぞれ投与濃度との相関がみられず、被験物質の影響と判断しなかった。

## [ 観察群 ]

- 雄 -

カルシウムの高値が全投与群に、アルブミン、LDHの高値が5 mg/m<sup>3</sup>群にみられた。

その他、総蛋白、ALP、カリウムの変化が投与群にみられたが、それぞれ投与濃度との相関がみられず、被験物質の影響と判断しなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、CK、尿素窒素、カリウム、カルシウムの変化が投与群にみられたが、それぞれ投与濃度との相関がみられず、被験物質の影響と判断しなかった。

## - 7 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の検査

## - 7 - 1 BALF の細胞学的検査

BALF の細胞学的検査について、投与期間終了時の結果を H1 ~ H4、観察期間終了時の結果を TABLE H7 ~ H10 に示した。

## (1) 細胞数及び細胞分類

## [ 投与終了時解剖群 ]

- 雄 -

総細胞数の低値が全投与群でみられたが、1 mg/m<sup>3</sup>群と5 mg/m<sup>3</sup>群の低下は同程度であった。細胞分類では、好中球比の高値が全投与群、単球比の高値が1 mg/m<sup>3</sup>以上の群、好酸球比の高値が5 mg/m<sup>3</sup>群及び肺胞マクロファージ比の低値が全投与群にみられた。特に5 mg/m<sup>3</sup>群では好中球比の高値(24.1%)と肺胞マクロファージ比の低値(72.3%)が顕著であった。

- 雌 -

総細胞数の低値が0.2 mg/m<sup>3</sup>群と1 mg/m<sup>3</sup>群でみられ、高値が5 mg/m<sup>3</sup>群でみられた。細胞分類では、好中球比と単球比の高値が1 mg/m<sup>3</sup>以上の群、リンパ球比と好酸球比の高値が5 mg/m<sup>3</sup>群及び肺胞マクロファージ比の低値が1 mg/m<sup>3</sup>以上の群でみられた。特に5 mg/m<sup>3</sup>群では好中球比の高値(24.4%)と肺胞マクロファージ比の低値(69.5%)が顕著であった。

## [ 観察群 ]

- 雄 -

総細胞数の低値が全投与群にみられたが、1 mg/m<sup>3</sup>群と5 mg/m<sup>3</sup>群の低値は同程度であった。細胞分類では、好中球比(1.3%)と単球比の高値(0.6%)及び肺胞マクロファージ

比の低値 (97.7%) が 5 mg/m<sup>3</sup> 群でみられた。

- 雌 -

総細胞数の低値が全投与群にみられたが、その低値は全投与群とも同程度であった。細胞分類では、好中球比の高値 (2.9%) と肺胞マクロファージ比の低値 (94.5%) が 5 mg/m<sup>3</sup> 群でみられた。

## (2) 細胞形態観察

### [ 投与終了時解剖群 ]

雌雄の全投与群で MWCNT を貪食した肺胞マクロファージが認められ、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で顕著に増加した。MWCNT を貪食した肺胞マクロファージには、細胞の大きさの大小不同が観察された。また、貪食肺胞マクロファージは、細胞の腫大を起こした後、次第に細胞質が淡染化し、最終的に核のみを残し消失することが観察され、これらの変化は、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で投与濃度に相関して増加した。

また、雄では、単核のマクロファージ比の低値及び 2 核と 3 核以上のマクロファージ比の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられた。雌では、単核のマクロファージ比の低値及び 2 核のマクロファージ比の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群、3 核以上のマクロファージ比の高値が全投与群にみられた。

### [ 観察群 ]

投与終了時と同様の変化がみられ、肺胞マクロファージの傷害が認められた。投与終了時と特に形態的に程度の異なる傷害像は認められなかったが、傷害肺胞マクロファージの数は全投与群とも投与終了時解剖群より減少した。

また、雄では、単核のマクロファージ比の低値及び 2 核のマクロファージ比の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群、3 核以上のマクロファージ比の高値が 5 mg/m<sup>3</sup> 群にみられた。また、雌では、単核のマクロファージ比の低値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群、2 核のマクロファージ比の高値が 5 mg/m<sup>3</sup> 群、3 核以上のマクロファージ比の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられた。

## - 7 - 2 BALF の生化学的検査

BALF の生化学的検査について、投与期間終了時の結果を H5, H6、観察期間終了時の結果を TABLE H11, H12 に示した。

### [ 投与終了時解剖群 ]

- 雌雄 -

総タンパク、アルブミン及び ALP の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられた。

## [ 観察群 ]

- 雌雄 -

総タンパク、アルブミン、LDH の高値が  $1 \text{ mg/m}^3$  以上の群及び ALP の高値が  $5 \text{ mg/m}^3$  群にみられた。

## - 8 病理学的検査

## - 8 - 1 剖検

- 雌雄 -

投与終了時解剖群及び観察群とも、被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

## - 8 - 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、投与期間終了時の結果を TABLE I1, I2 と J1, J2 に、観察期間終了時の結果を TABLE I3, I4 と J3, J4 に示した。

## [ 投与終了時解剖群 ]

- 雄 -

肺(左)の体重比の高値が  $5 \text{ mg/m}^3$  群にみられ、実重量も対照群よりやや高値であった。

なお、胸腺と肝臓の実重量の低値及び精巣、脳の体重比の高値が  $5 \text{ mg/m}^3$  群にみられたが、これらの変化は同群の搬出時体重の低値によるものと思われる。また、脾臓の体重比の高値が  $0.2 \text{ mg/m}^3$  群と  $1 \text{ mg/m}^3$  群にみられたが、投与濃度に相関したものではなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

## [ 観察群 ]

- 雄 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

- 雌 -

被験物質の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、脾臓の体重比の高値が  $1 \text{ mg/m}^3$  群にみられたが、投与濃度に相関したものではなかった。

## - 8 - 3 病理組織学的検査

病理組織学的検査は鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、リンパ節(縦隔等)、肝臓及び腎臓について行い、投与期間終了時の結果を TABLE K1, K2 に、観察期間終了時の結果を

TABLE K3, K4 に示した。

[ 投与終了時解剖群 ]

- 雄 -

5 mg/m<sup>3</sup> 群では、鼻腔、鼻咽頭、肺、縦隔（気管周囲）リンパ節に変化がみられた。

鼻腔に杯細胞過形成（中等度）が 5 匹中 5 匹、呼吸上皮に繊維の沈着（軽度）が 4 匹に認められた。鼻咽頭に杯細胞過形成（軽度）が 5 匹に認められた。肺の気管支には、肺泡マクロファージに貪食された繊維の沈着（軽度）が 5 匹、肺泡マクロファージに貪食されていない繊維の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。沈着していた繊維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、肺泡マクロファージに貪食された繊維（MWCNT）の沈着（軽度）が 5 匹、肺泡マクロファージに貪食されていない MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。また、肺胞壁に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。縦隔（気管周囲）リンパ節には MWCNT の沈着（軽度）が 1 匹に認められた。

1 mg/m<sup>3</sup> 群では、鼻腔、鼻咽頭、肺に変化がみられた。

鼻腔に杯細胞過形成（軽度）が 5 匹中 3 匹、呼吸上皮に MWCNT の沈着（軽度）が 1 匹に認められた。鼻咽頭に杯細胞過形成（軽度）が 2 匹に認められた。肺の気管支には、肺泡マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、肺泡マクロファージに貪食されていない MWCNT の沈着（軽度）が 4 匹に認められ、肺胞腔では、マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、肺泡マクロファージに貪食されていない MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。また、肺胞壁に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。

0.2 mg/m<sup>3</sup> 群では、肺に MWCNT の沈着がみられた。

肺の気管支には、肺泡マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹中 3 匹、肺胞腔には、肺泡マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。

- 雌 -

5 mg/m<sup>3</sup> 群では、鼻腔、鼻咽頭、肺、縦隔（気管周囲）リンパ節に変化がみられた。

鼻腔に杯細胞過形成（中等度）が 5 匹中 5 匹、呼吸上皮に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。鼻咽頭に杯細胞過形成（軽度）が 5 匹に認められた。肺の気管支には、肺泡マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、貪食されていない MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められ、肺胞腔では、肺泡マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、貪食されていない MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。また、肺胞壁に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。縦隔（気管周囲）リンパ節には MWCNT の沈着（軽度）が 3 匹に認められた。

1 mg/m<sup>3</sup> 群では、鼻腔と肺に変化がみられた。



鼻腔に杯細胞過形成（軽度）が5匹中1匹、呼吸上皮にMWCNTの沈着（軽度）が2匹に認められた。肺の気管支には、肺胞マクロファージに貪食されたMWCNTの沈着（軽度）が5匹、貪食されていないMWCNTの沈着（軽度）が3匹に認められ、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）が5匹、貪食されていないMWCNTの沈着（軽度）が5匹に認められた。また、肺胞壁にMWCNTの沈着（軽度）が5匹、気管支関連リンパ組織にMWCNTの沈着（軽度）が2匹に認められた。

0.2 mg/m<sup>3</sup> 群では、肺に繊維の沈着がみられた。

肺の気管支には、マクロファージに貪食されたMWCNTの沈着（軽度）が5匹中4匹、肺胞腔には、マクロファージに貪食されたMWCNTの沈着（軽度）が5匹に認められた。また、肺胞壁にMWCNTの沈着（軽度）が1匹に認められた。

病理組織学的所見について、病変の広がりを含め再度まとめて以下に記述する。

鼻腔と鼻咽頭には杯細胞過形成が1 mg/m<sup>3</sup>以上の群にみられた。鼻腔の杯細胞過形成は粘液を分泌する杯細胞の数が増加した所見である。鼻腔での杯細胞の分布は、通常、鼻腔前方（レベル1）の鼻中隔に存在するが、暴露の影響により鼻腔中央（レベル2）の鼻中隔や鼻甲介まで杯細胞が広がって認められた。MWCNTは鼻腔（呼吸上皮）、肺（気管支、肺胞腔、肺胞壁、気管支関連リンパ組織）及び縦隔（気管周囲）リンパ節に認められた。鼻腔へのMWCNTの沈着は1 mg/m<sup>3</sup>以上の群にみられ、この所見は鼻腔のレベル1からレベル2に認められるが、主にレベル1の繊毛のない呼吸上皮に観察された。肺では、気管支、肺胞腔、肺胞壁、肺内の気管支関連リンパ組織にMWCNTが認められ、気管支と肺胞腔では全ての投与群にMWCNTの沈着がみられた。気管支と肺胞腔にみられたMWCNTは、ほとんどが肺胞マクロファージに貪食された状態で観察されたが、1 mg/m<sup>3</sup>以上の群では、肺胞マクロファージに貪食されていないMWCNTもわずかではあるが認められた。5 mg/m<sup>3</sup>群では、MWCNTを貪食したマクロファージの集簇（小肉芽形成と思われる）が肺胞壁や肺胞腔内に認められたのに対し、1 mg/m<sup>3</sup>群と0.2 mg/m<sup>3</sup>群ではMWCNTを貪食したマクロファージの集簇はみられなかった。縦隔（気管周囲）リンパ節では5 mg/m<sup>3</sup>群でMWCNTが認められた。

#### [ 観察群 ]

- 雄 -

5 mg/m<sup>3</sup>群では、鼻腔、肺、縦隔（気管周囲）リンパ節に変化がみられた。

鼻腔に杯細胞過形成（軽度）が1匹、呼吸上皮にMWCNTの沈着（軽度）が5匹に認められた。肺の気管支には、肺胞マクロファージに貪食されたMWCNTの沈着（軽度）が5匹、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4匹に認められた。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）が5匹、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5匹に認められた。また、肺胞

壁に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。縦隔（気管周囲）リンパ節に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。

1 mg/m<sup>3</sup> 群では、肺と縦隔（気管周囲）リンパ節に MWCNT の沈着がみられた。

肺の気管支には、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、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 2 匹に認められ、肺胞腔では、マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、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 2 匹に認められた。また、肺胞壁に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着（軽度）が 4 匹に認められた。縦隔（気管周囲）リンパ節には MWCNT の沈着（軽度）が 1 匹に認められた。

0.2 mg/m<sup>3</sup> 群では、肺に MWCNT の沈着がみられた。

肺の気管支には、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 2 匹、肺胞腔には、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。また、肺胞壁には MWCNT の沈着（軽度）が 2 匹に認められた。

- 雌 -

5 mg/m<sup>3</sup> 群では、鼻腔、肺、縦隔（気管周囲）リンパ節に MWCNT の沈着がみられた。

鼻腔に呼吸上皮に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。肺の気管支には、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、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 2 匹に認められた。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）が 5 匹、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 1 匹に認められた。また、肺胞壁に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着（軽度）が 4 匹に認められた。縦隔（気管周囲）リンパ節には MWCNT の沈着（軽度）が 4 匹に認められた。

1 mg/m<sup>3</sup> 群では、肺と縦隔（気管周囲）リンパ節に MWCNT の沈着がみられた。

肺の気管支には、肺胞マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、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 1 匹に認められ、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）が 5 匹、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 1 匹に認められた。また、肺胞壁に MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹、気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着（軽度）が 2 匹に認められた。縦隔（気管周囲）リンパ節には MWCNT の沈着（軽度）が 1 匹に認められた。

0.2 mg/m<sup>3</sup> 群では、肺に MWCNT の沈着がみられた。

肺の気管支には、マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 2 匹、肺胞腔には、マクロファージに貪食された MWCNT の沈着（軽度）が 5 匹に認められた。

病理組織学的所見について、病変の広がりを含め再度まとめて以下に記述する。

鼻腔には杯細胞過形成が 5 mg/m<sup>3</sup> 群の雄 1 匹にみられた。この所見は、鼻腔中央（レベル 2）の鼻中隔まで杯細胞が広がって認められた。MWCNT の沈着は鼻腔（呼吸上皮）、肺（気管支、肺胞腔、肺胞壁、気管支関連リンパ組織）及び縦隔（気管周囲）リンパ節に認められた。鼻腔への MWCNT の沈着は 5 mg/m<sup>3</sup> 群にみられ、沈着部位は投与終了時と同様であった。肺では、気管支、肺胞腔、肺胞壁、肺内の気管支関連リンパ組織に MWCNT の沈着が認められ、気管支と肺胞腔では全ての投与群に MWCNT の沈着がみられた。気管支と肺胞腔にみられた MWCNT のほとんどが肺胞マクロファージに貪食された状態であったが、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群では、肺胞マクロファージに貪食されていない MWCNT も少数例に認められた。なお、5 mg/m<sup>3</sup> 群では MWCNT を貪食したマクロファージの集簇（小肉芽形成と思われる）が肺胞壁や肺胞腔に認められた。また、わずかではあるが、多核巨細胞が認められ、これらは、集簇したマクロファージとともに観察されるものと、肺胞壁に単独で観察されるものがあった。一方、1 mg/m<sup>3</sup> 群と 0.2 mg/m<sup>3</sup> 群ではマクロファージの集簇も多核巨細胞も認められなかった。縦隔（気管周囲）リンパ節では MWCNT が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で観察された。

## 考察及びまとめ

MWCNT のがん原性試験の投与濃度決定試験（13 週間試験）の予備試験として、その生体影響を検索する目的で F344/DuCr1Cr1j ラットを用いた吸入による 2 週間の試験を実施した。

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/m<sup>3</sup> 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 2 週間とした。さらに、各群の半数の動物は投与終了後 4 週間の観察を行った。投与期間及び観察期間中は、生死及び一般状態の観察、体重、摂餌量の測定を行い、投与期間及び観察期間終了後、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。

### - 1 用量 - 反応関係

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、雌雄の各投与群で増加の抑制が投与期間の 1 週目にみられ、投与期間及び観察期間を通じて、投与群の体重は対照群より低値であったが、この程度は軽微であり、また、群間に投与濃度との相関性がみられないことから被験物質の影響とは考えなかった。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/m<sup>3</sup> 群：95%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：97%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：93%、雌は 0.2 mg/m<sup>3</sup> 群：94%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：94%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：94%、観察期間終了時の最終体重は対照群に対し、雄は 0.2 mg/m<sup>3</sup> 群：98%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：98%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：95%、雌は 0.2 mg/m<sup>3</sup> 群：95%、1 mg/m<sup>3</sup> 群：96%、5 mg/m<sup>3</sup> 群：95%であった。摂餌量には MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。

血液学的検査では、雌雄の投与終了時解剖群でヘマトクリット値の高値が 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられたのみであった。観察群では雌雄とも変化はみられなかった。

血液生化学的検査では、雄で投与終了時解剖群にアルブミンの高値が 5 mg/m<sup>3</sup> 群、観察群にカルシウムの高値が全投与群に、アルブミン、LDH の高値が 5 mg/m<sup>3</sup> 群にみられた。雌では投与終了時解剖群及び観察群とも暴露の影響と思われる変化はみられなかった。

BALF の総細胞数の測定では、投与終了時解剖群に、雌の 5 mg/m<sup>3</sup> 群を除き全投与群で総細胞数の低下がみられた。観察群でも、雌雄とも全投与群で低値となり、雌では有意差が示された。しかし、両解剖期の雌雄とも総細胞数の低下に投与濃度との対応はみられなかった。BALF の細胞分類では、投与終了時解剖群の 1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群の雌雄で好中球比の高値（雄は全投与群）、単球比の高値、肺胞マクロファージ比の低値（雄は全投与群）がみられ、5 mg/m<sup>3</sup> 群の雌雄で好酸球比の高値、雌にリンパ球比の高値がみられた。特に 5 mg/m<sup>3</sup> 群では、肺胞マクロファージ比の低値（雄：約 72%、雌：約 70%）と好中球比の高値（雌雄：約 24%）が顕著であった。この結果から、投与群でみられた総細胞数の低値はマクロファージの減少に

よるものと考えられた。なお、5 mg/m<sup>3</sup> 群での総細胞数の低値の鈍化は、同群で顕著であった好中球の増加によるものと考えられた。観察群では、5 mg/m<sup>3</sup> 群で雌雄に好中球比の高値と肺胞マクロファージ比の低値がみられ、この他、雄で単核比の高値がみられた。

形態観察では、投与終了時解剖群の雌雄の全投与群で MWCNT を貪食した肺胞マクロファージが認められ、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で顕著に増加した。MWCNT を貪食した肺胞マクロファージには、細胞の大きさの大小不同が観察された。また、貪食肺胞マクロファージは、細胞の腫大を起こした後、次第に細胞質が淡染化し、最終的に核のみを残し消失することが観察された。観察群でも、変化の程度は投与終了時解剖群と変わらなかったが、傷害を受けた肺胞マクロファージの数は投与終了時より減少した。肺胞マクロファージでは、投与終了時解剖群で単核のマクロファージ比が減少し、これに変わって2核と3核のマクロファージ比が増加した。この変化は、ほぼ雌雄の1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で認められた。観察群でも投与終了時解剖群と同様、単核のマクロファージ比の低値が雌雄の1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群でみられ、2核のマクロファージ比の高値が雄で1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群、雌では5 mg/m<sup>3</sup> 群、3核以上のマクロファージ比の高値が雄で5 mg/m<sup>3</sup> 群、雌で1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられた。

BALF の生化学的検査では、投与終了時解剖群に、総タンパク、アルブミン及び ALP の高値が雌雄とも1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群にみられた。観察群では、総タンパク、アルブミン、LDH の高値が雌雄の1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群、ALP の高値が雌雄の5 mg/m<sup>3</sup> 群にみられた。これらの生化学的パラメータの高値は、MWCNT の投与により肺胞マクロファージや肺胞が傷害され、その結果、細胞成分の漏出や肺の血管透過性が亢進して検出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。

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、投与終了時解剖群の1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群から投与濃度に相関して肺胞マクロファージは減少し、好中球を中心とする炎症細胞が増加した。この変化は特に、5 mg/m<sup>3</sup> 群で顕著であった。また、5 mg/m<sup>3</sup> 群では4週間の観察期間を経ても同様の変化が認められ、回復の遅延傾向が示唆された。さらに、肺の炎症性変化を示す生化学パラメータ(総タンパク、アルブミン、LDH、ALP)の多くが投与終了時解剖群及び観察群の1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群から投与濃度に対応して高値であった。MWCNT による傷害を受けた肺胞マクロファージからサイトカインが放出され、これにより炎症細胞が誘導されると推察されるが、生化学パラメータの動向と肺胞マクロファージの傷害及び炎症細胞の出現数は良く一致していた。また、肺胞マクロファージでは、1 mg/m<sup>3</sup> 以上の群で2核および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傷害を示唆するものと考えられた。

病理学的検査のうち、剖検では投与終了時解剖群及び観察群とも、MWCNT の影響と思われる変化はみられなかったが、臓器重量では雄の投与終了時解剖群で肺(左)の重量増加が5 mg/m<sup>3</sup> 群にみられた。観察群では各臓器とも重量に変化はみられなかった。

病理組織学的検査は鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、リンパ節(縦隔等)、肝臓及び腎臓に

ついて実施した。

鼻腔と鼻咽頭の杯細胞過形成が  $1 \text{ mg/m}^3$  以上の投与終了時解剖群に認められた。杯細胞過形成の程度は  $5 \text{ mg/m}^3$  群では中等度から軽度、 $1 \text{ mg/m}^3$  群では軽度であった。杯細胞過形成は刺激物の反復吸入暴露による反応として認められる（文献 7）。従って、MWCNT の暴露により鼻腔と鼻咽頭の上皮は反復刺激を受けていた可能性がある。一方、観察群では鼻腔の杯細胞過形成が  $5 \text{ mg/m}^3$  群の 1 匹に認められ、その程度は軽度であった。従って、この刺激に対する病変は暴露後 4 週間の観察期間でほとんどの動物が回復したと考えられた。なお、杯細胞過形成以外に鼻腔や鼻咽頭に組織変化は認められなかった。

MWCNT の沈着が投与終了時解剖群の全投与群の肺（気管支、肺胞腔、肺胞壁）に認められ、 $1 \text{ mg/m}^3$  以上の群では、鼻腔（呼吸上皮）、肺の気管支関連リンパ組織及び縦隔（気管周囲）リンパ節にも認められた。沈着の程度はいずれも軽度であった。肺胞腔にみられた MWCNT のほとんどは肺胞マクロファージに貪食されていた。このことは暴露した MWCNT が肺胞腔まで達し、肺胞マクロファージに貪食されたことを示すものである。これらの MWCNT の沈着は観察群でも投与終了時解剖群と同様に認められた。このことは気管支、肺胞腔及び肺胞壁に沈着した MWCNT は 4 週間の観察期間を経ても肺内に残存していることを示した。また、投与終了時解剖群の  $5 \text{ mg/m}^3$  群で肺胞腔や肺胞壁に MWCNT を貪食したマクロファージの集簇（小肉芽形成と思われる）が認められた。このマクロファージの集簇は観察群の  $5 \text{ mg/m}^3$  群でも肺胞腔や肺胞壁に認められ、わずかではあるが、多核巨細胞も観察された。この観察群の変化は肺内に停滞している MWCNT を除去するために、投与終了時にはみられなかった多核巨細胞が出現したものと考えられる。多核巨細胞は肉芽腫の構成成分の一つとして観察される細胞である（文献 8）。気管支関連リンパ組織及び縦隔（気管周囲）リンパ節では、MWCNT の沈着は投与終了時解剖群と観察群とともに  $5 \text{ mg/m}^3$  群に認められ、観察群では  $1 \text{ mg/m}^3$  群にも認められた。肺に沈着した MWCNT は投与期間及び観察期間を通してリンパ行性に移動したと考えられた。また、鼻腔の呼吸上皮にも投与終了時解剖群、観察群ともに 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と 4 週間の観察期間を経ても鼻腔内に停滞していることを示した。

なお、 $5 \text{ mg/m}^3$  群の肺の重量増加に対応した組織学的変化はみられなかった。

以上、 $0.2$ 、 $1$ 、 $5 \text{ mg/m}^3$  の濃度で MWCNT を 1 日 6 時間、1 週 5 日間、2 週間吸入暴露した結果、雌雄の各投与群で体重増加の抑制が投与期間の 1 週目にみられ、投与期間及び観察期間を通じて、投与群の体重は対照群より低値であった。また、雄の投与終了時解剖群で肺（左）の重量増加が  $5 \text{ mg/m}^3$  群にみられた。投与終了時に実施した BALF の検査により  $1 \text{ mg/m}^3$  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。投与終了時の病理組織学的検査では、最高投与群の  $5 \text{ mg/m}^3$  でも明らかな毒性影響は認められなかったが、今後  $5 \text{ mg/m}^3$  の濃度で 13 週間の吸入試験を実施した場合、2 週間吸入試験よりも暴露総量及び肺内の接触時間が長くなると予想される。従って、 $5 \text{ mg/m}^3$  の 13 週間暴露では、2

週間吸入試験よりも肺胞マクロファージや肺胞への影響はより強くなると推察されることから、小肉芽形成と思われるマクロファージの集簇や多核巨細胞が進展し肉芽腫が出現する可能性があると考えられた。また、暴露終了後4週間の観察(回復)期間を設けても、 $1\text{ mg/m}^3$ 以上の群でも、MWCNTを貪食したマクロファージやMWCNTは肺内にとどまっていること、BALF検査でマクロファージ比の低値やマクロファージの核数の異常が認められていること、さらに総タンパク、アルブミン、LDH、ALPの高値が認められていることなどから肺胞マクロファージ及び肺胞に対する傷害は完全に回復していないことが示された。これらのことから $1\text{ mg/m}^3$ の濃度で13週間暴露を実施した場合でも病理組織学的変化を含めた毒性影響が生ずる可能性はあると考えられた。

## 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). 2009. Subacute-inhalation Toxicity: 28-day Study. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development. (Adopted: 7 September 2009)
4. ACGIH. 2008. Graphite (synthetic): Guide to Occupational Exposure Values. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
5. 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 .
6. 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.
7. 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.
8. 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つ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つ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。