

別 添

追加検査

(試験番号:0800 の計画書を変更して非 GLP の検査を実施)

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

別添目次

	頁
要約	1
I 試験方法	2
I-1 肺内の MWCNT の測定	2
I-2 気管支肺胞洗浄液の検査	2
I-3 胸腔洗浄液の検査	2
I-4 腹腔洗浄液中の MWCNT の有無の確認及び形態観察	3
II 数値処理と統計方法	3
II-1 数値の取り扱いと表示	3
II-2 統計処理	3
III 結果	4
III-1 肺内の MWCNT の測定	4
III-2 気管支肺胞洗浄液の検査	4
III-2-1 細胞学的検査及び生化学的検査	4
III-2-2 MWCNT の測定	5
III-3 胸腔洗浄液の検査	5
III-3-1 細胞学的検査	5
III-3-2 MWCNT の有無の確認及び形態観察	6
III-4 腹腔洗浄液中の MWCNT の有無の確認及び形態観察	6
IV 考察及びまとめ	7
V 結論	8
VI 文献	9

要約

本追加検査は、複層カーボンナノチューブ（MWCNT）の肺、胸膜及び腹膜に対する発がん性及び慢性毒性影響を検索する目的で、試験番号：0800（以下、本試験）から採取した臓器及び試料を用いて、非 GLP として、肺内の MWCNT の測定、気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査及び生化学的検査、同洗浄液中の MWCNT の測定、胸腔洗浄液の細胞学的検査、さらに胸腔及び腹腔洗浄液中の MWCNT の有無の確認を行った。

肺内の MWCNT の測定では、雌雄とも暴露濃度に対応した沈着が示された。雄の MWCNT の値は、右肺あたりの絶対量として、0.02 mg/m³ 群では 6.32±1.61 µg、0.2 mg/m³ 群は 100.44±12.78 µg、2 mg/m³ 群は 1161.07±94.30 µg であった。また、これを肺 1g あたりに換算すると、0.02 mg/m³ 群で 7.49±1.86 µg、0.2 mg/m³ 群で 102.93±15.54 µg、2 mg/m³ 群で 787.04±68.11 µg であった。雌では、0.02 mg/m³ 群で 5.53±1.25 µg、0.2 mg/m³ 群は 76.74±8.69 µg、2 mg/m³ 群は 747.19±50.27 µg であった。同じく肺 1g あたりでは、0.02 mg/m³ 群で 9.69±2.39 µg、0.2 mg/m³ 群で 115.02±16.68 µg、2 mg/m³ 群で 667.92±48.74 µg であった。

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査では、雌雄とも 2 mg/m³ 群で総細胞数が増加し、好酸球、リンパ球、好中球、マクロファージ（雌のみ）が増加していた。また、生化学的検査では、雌雄とも 0.2 mg/m³ 以上の群で総蛋白、アルブミン（雄は 0.02 mg/m³ 以上）、LDH 及び ALP の増加が認められた。また、気管支肺胞洗浄液中の MWCNT の測定では、0.02 及び 0.2 mg/m³ 群では定量下限以下であったが、2 mg/m³ 群では雌雄とも少量ながら（雄 0.26 µg、雌 0.36 µg）検出された。

胸腔洗浄液の細胞学的検査では、0.2 mg/m³ 群で総細胞数が増加した。観察された細胞のほとんどが肥満細胞と単核球様細胞で、少数がリンパ球と好酸球であった。また、中皮細胞と推察される脱落細胞が暴露濃度に対応して増加した。

胸腔及び腹腔洗浄液中の走査型電子顕微鏡（SEM）による MWCNT の観察では、雌雄の全暴露群で、直線状で分岐を持たない形態の MWCNT が暴露濃度に対応して確認された。これにより、MWCNT は肺外に移行し全身を循環していることが示唆された。

以上、暴露濃度に対応した MWCNT の肺内沈着が示され、0.2 mg/m³ 以上の群で肺への慢性毒性影響が認められた。さらに、雌雄の全暴露群で、MWCNT の胸腔、腹腔への移行が明らかとなった。

I 試験方法

I-1 肺内の MWCNT の測定

本試験の雌雄各群の定期解剖動物のうち、病理組織学的検査用に10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液中に固定、保存した動物番号の小さい雌雄各群10匹の右肺の一部を使用して、Ohnishiら（文献1）の方法でMWCNTを測定した。

I-2 気管支肺胞洗浄液の検査（細胞学的検査、生化学的検査、MWCNTの測定）

本試験の解剖時に肉眼的に単核球性白血病を示唆する所見、すなわち脾臓の腫大が認められなかった動物番号の小さい雌雄各群6匹の左肺を雄は5 ml、雌は4 mlの培養液（MEM）で洗浄し、洗浄液を回収した。洗浄液を用いて、細胞学的検査と生化学的検査を下記の項目について行った。検査方法はAPPENDIX Aに示す。また、合わせて洗浄液中のMWCNTをOhnishiら（文献1）の方法で測定した。

細胞学的検査：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：総蛋白、アルブミン、LDH、ALP

I-3 胸腔洗浄液の検査（細胞学的検査、MWCNTの有無の確認及び形態観察）

I-2 の気管支肺胞洗浄液の検査動物を除き、解剖時に肉眼的に単核球性白血病を示唆する所見、すなわち脾臓の腫大の認められなかった動物番号の小さい雌雄各群10匹以上の胸腔を雌雄とも8 mlのMEMで洗浄し、洗浄液を回収した。これらのうち、動物番号の小さい10匹の洗浄液を用いて、細胞学的検査（総細胞数測定と細胞分類）と偏光顕微鏡によるMWCNTの有無の確認を実施した。総細胞数の測定は、血球分析装置（XT-2000iv、シスメックス㈱）を用いた。細胞分類用の標本は、集細胞遠心装置（サイトスピン4、サーモフィッシャーサイエンティフィック㈱）を用いて作製し、May-Grünwald-Giemsaで染色した。これらの標本を用いて細胞分類を行った。

また、雌雄各群1匹についてSEMによるMWCNTの形態観察を行った。MEM溶液を遠心分離してその上澄みを除去し、Clean 99K-200（㈱クリーンケミカル）により蛋白成分を除去し、ミリQ水で洗浄後、濃硫酸で線維質を溶解して、生体試料を完全に除去し、MWCNTを得た。この後、ポアサイズ0.2 μm のポリカーボネート製のフィルターでろ過して、フィルター上のMWCNTを走査型電子顕微鏡（SEM）で観察し、本数を計測した。

I-4 腹腔洗浄液中のMWCNTの有無の確認及び形態観察

I-2 の気管支肺胞洗浄液の検査動物と I-3 の胸腔洗浄液の検査動物を除き、単核球性白血病を示唆する所見、すなわち脾臓の腫大の認められなかった動物番号の小さい雌雄各群5匹の腹腔を雌雄とも40ml の生理食塩液で洗浄し、洗浄液を回収した。標本は、集細胞遠心装置（サイトスピン4、サーモフィッシャーサイエンティフィック株）を用いて標本を作製し、May-Grünwald-Giemsaで染色して偏光顕微鏡によるMWCNTの有無を確認した。

また、雌雄各群1匹についてSEMによるMWCNTの形態観察を行った。生理食塩液を遠心分離してその上澄みを除去し、Clean 99K-200（株）クリーンケミカル）により蛋白成分を除去し、ミリQ水で洗浄後、濃硫酸で線維質を溶解して、生体試料を完全に除去し、MWCNTを得た。この後、ポアサイズ0.2 μm のポリカーボネート製のフィルターでろ過し、フィルター上のMWCNTを走査型電子顕微鏡（SEM）で観察し、本数を計測した。

II 数値処理と統計方法

II-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、下記に示した単位と桁数により表示した。

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査と生化学的検査は APPENDIX A に示した単位と桁数により表示した。

肺内の MWCNT の測定は、右肺で行い μg を単位として、小数点以下第 2 位まで表示した。

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。

II-2 統計処理

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査と生化学的検査及び胸腔洗浄液検査の総細胞数の検査結果は、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。

III 結果

III-1 肺内のMWCNTの測定

MWCNTの測定結果をTABLE Aに示す。

—雄—

暴露濃度に対応した肺内沈着が示された。測定した右肺当たりの MWCNT の測定値（絶対量）は、0.02 mg/m³ 群では 6.32±1.61 µg、0.2 mg/m³ 群は 100.44±12.78 µg、2 mg/m³ 群は 1161.07±94.30 µg であった。また、これを肺 1 g あたりの量に換算すると、0.02 mg/m³ 群で 7.49±1.86 µg、0.2 mg/m³ 群で 102.93±15.54 µg、2 mg/m³ 群で 787.04±68.11 µg であった。

—雌—

暴露濃度に対応した肺内沈着が示された。測定した右肺当たりの MWCNT の測定値（絶対量）は、0.02 mg/m³ 群で 5.53±1.25 µg、0.2 mg/m³ 群は 76.74±8.69 µg、2 mg/m³ 群は 747.19±50.27 µg であった。また、これを肺 1 g あたりの量に換算すると、0.02 mg/m³ 群で 9.69±2.39 µg、0.2 mg/m³ 群で 115.02±16.68 µg、2 mg/m³ 群で 667.92±48.74 µg であった。

III-2 気管支肺胞洗浄液の検査

III-2-1 細胞学的検査及び生化学的検査

細胞学的検査結果をTABLE B 1、生化学的検査の結果をTABLE B 2に示す。

—雄—

細胞学的検査で、総細胞数が 2 mg/m³ 群で増加し、好酸球、リンパ球、好中球が増加していた。生化学的検査では、アルブミンが 0.02 mg/m³ 以上の群で、また、総蛋白、LDH 及び ALP の増加が 0.2 mg/m³ 以上の群で認められた。

—雌—

細胞学的検査で、総細胞数が 2 mg/m³ 群で増加し、好酸球、リンパ球、好中球、マクロファージが増加していた。また、生化学的検査では、総蛋白、アルブミン、LDH 及び ALP の増加が 0.2 mg/m³ 以上の群で認められた。

III-2-2 MWCNTの測定

MWCNT の測定結果を TABLE C に示す。

—雌雄—

MWCNTの測定を行ったが、0.02及び0.2 mg/m³群は定量下限以下で検出されなかった。2 mg/m³群は、雄で0.26±0.06 µg、雌で0.36±0.13 µgであった。

III-3 胸腔洗浄液の検査

III-3-1 細胞学的検査

細胞学的検査結果をTABLE D1, 2に示す。

塗抹状態が不均一で染色性の悪い標本や細胞崩壊が著しい標本については評価から除外した。その結果、評価に用いた標本数は、雄は、対照群で9匹、0.02 mg/m³群で8匹、0.2 mg/m³群で9匹、2 mg/m³群で10匹、雌では、対照群で9匹、0.02 mg/m³群で9匹、0.2 mg/m³群で8匹、2 mg/m³群で10匹であった。なお、これらの標本は、細胞観察を行う上で、肥満細胞が多く正確な白血球細胞の観察が困難であったため、肥満細胞を除く300個の細胞を観察し分類した。

—雌雄—

雌雄とも総細胞数が 0.2 mg/m³ 以上の群で増加した。雌雄を比較すると、全群とも雌より雄の細胞数が多かった。

対照群、暴露群ともに認められた血球系細胞のほとんどが肥満細胞と単核球様細胞であり、少数がリンパ球と好酸球であった。単核球様細胞は、幼若な骨髓系細胞と単球系細胞（単球・マクロファージ）と推察されたが、現段階では明確に分類することはできず、その他の細胞として分類した。その結果、肥満細胞を除いた細胞のほとんどがその他の細胞となり、残りの少数がリンパ球、好酸球であった。雄では 0.2 mg/m³ 以上の群で好酸球がわずかに増加した。さらに、胸腔洗浄液には、血球系細胞とは明らかに異なる脱落細胞が観察された。脱落細胞のサイズは約 25～30 µm、細胞質は好塩基性で細胞膜は強染され膜境界は不明瞭、核は単核、類円形を有する細胞であった。これらの脱落細胞は、血球系細胞と比較して大きく、核形も明らかに異なっており、形態及び染色の特徴から中皮細胞と推察した。脱落細胞は雌雄の対照群にも観察されたが、発生動物数及び個体当たりの細胞数が暴露濃度に対応して増加した。

III-3-2 MWCNTの有無の確認及び形態観察

形態観察で認めたMWCNTの代表例をPHOTOGRAPH 1に示す。計測したMWCNTの本数をTABLE Eに示す。

—雌雄—

偏光顕微鏡観察では、暴露群の雌雄とも針状物を認めたがMWCNTであるとの断定には至らなかった。しかし、SEMによる観察で最低濃度の0.02 mg/m³から濃度に対応してMWCNTが認められた。詳細観察により、これらのMWCNTは、繊維径約70nm、繊維長約5 µmを中心とする分岐をもたない直線状の形態のものが単体で観察された。この胸腔洗浄液中のSEM観察により全暴露群で胸腔にMWCNTが到達したことが明らかとなった。

III-4 腹腔洗浄液中のMWCNTの有無の確認及び形態観察

形態観察で認めたMWCNTの代表例をPHOTOGRAPH 2に示す。計測したMWCNTの本数をTABLE Fに示す。

—雌雄—

偏光顕微鏡観察では、暴露群の雌雄とも針状物を認めたがMWCNTの断定には至らなかった。しかし、SEMによる観察で最低濃度の0.02 mg/m³から濃度に対応してMWCNTが認められた。観察されたMWCNTは、直線的な形態のものが単体で観察された。胸腔洗浄液中の検査で認められたMWCNTと、この腹腔洗浄液中に観察されたMWCNTの繊維径と繊維長はほぼ同様であった。この腹腔洗浄液中のSEM観察により全暴露群でMWCNTが確認されたことから、ラットの全身にMWCNTが分布したことが推察された。

IV 考察及びまとめ

本追加検査は、複層カーボンナノチューブ（MWCNT）の肺、胸膜及び腹膜に対する発がん性及び慢性毒性影響を検索する目的で、本試験から採取した臓器及び試料を用いて、非 GLP として、肺内の MWCNT の測定、気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査及び生化学的検査、同洗浄液中の MWCNT の測定、胸腔洗浄液の細胞学的検査、さらに胸腔及び腹腔洗浄液の MWCNT の有無の確認を行った。

肺内の MWCNT の測定では、雌雄とも暴露濃度に対応した沈着が示された。雄の MWCNT の値は、右肺あたりの絶対量として、0.02 mg/m³ 群では 6.32±1.61 µg、0.2 mg/m³ 群は 100.44±12.78 µg、2 mg/m³ 群は 1161.07±94.30 µg であった。また、これを肺 1 g あたりに換算すると、0.02 mg/m³ 群で 7.49±1.86 µg、0.2 mg/m³ 群で 102.93±15.54 µg、2 mg/m³ 群で 787.04±68.11 µg であった。雌では、0.02 mg/m³ 群で 5.53±1.25 µg、0.2 mg/m³ 群は 76.74±8.69 µg、2 mg/m³ 群は 747.19±50.27 µg であった。また、同じく肺 1 g あたりでは、0.02 mg/m³ 群で 9.69±2.39 µg、0.2 mg/m³ 群で 115.02±16.68 µg、2 mg/m³ 群で 667.92±48.74 µg であった。右肺あたりの MWCNT 量を雌雄間で比較すると、全投与群で雄が雌より多かった。本試験においては、雄では 0.2 mg/m³ 以上の群、雌は 2 mg/m³ 群で発がん性が認められた。今後の課題は、肺に残存する MWCNT の量と発がん性との関連性を明らかにしていくことである。

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査では、雌雄とも 2 mg/m³ 群で総細胞数が増加し、好酸球、リンパ球、好中球、マクロファージ（雌のみ）が増加していた。また、生化学的検査では、雌雄とも 0.2 mg/m³ 以上の群で総蛋白、アルブミン（雄は 0.02 mg/m³ 以上）、LDH 及び ALP の増加が認められた。2 mg/m³ 群の肺毒性は、他の群よりも顕著であったが、肺内の MWCNT 量の濃度相関性が低濃度の 0.02 mg/m³ から高濃度の 2 mg/m³ まで良好であることから、クリアランス機構は生理的に正常な範囲に保たれていると考えた。すなわち、MWCNT の肺への沈着とクリアランスのバランスが大きく崩れ肺内量が急上昇する、いわゆる過負荷現象（impaired clearance）（文献 2、3）は、本試験の最高濃度の 2 mg/m³ でも起こらなかったと解釈した。さらに、気管支肺胞洗浄液中からは、0.02 及び 0.2 mg/m³ 群に MWCNT は検出されなかったが、2 mg/m³ 群では雌雄とも少ないながらも（雄 0.26 µg、雌 0.36 µg）検出された。この気管支肺胞洗浄液検査は、MWCNT の暴露終了から 1 日経た動物の肺から回収したものである。従って、溶液中に存在する MWCNT は、鼻から肺に至る気道での幾つかの除去機構（慣性衝突、電気的な沈着、繊維状物質特有の引っ掛かり）によって除去され、かつリンパ経路等の排泄機構や肺胞マクロファージの貪食によるクリアランスを経た後のものと考えることができる。肺内の MWCNT の測定結果と気管支肺胞洗浄液検査を総合して考えると、2 年間にわたる長期間の暴露では、1 日当たりに肺胞に沈着する MWCNT は微量ではあるものの、一定量ずつ暴露濃度と対応して MWCNT は肺に蓄積していったものと考えた。

胸腔洗浄液の細胞観察では、雌雄とも対照群及び暴露群で肥満細胞と単核球様細胞が多く認められ、一部がリンパ球と好酸球であった。また、洗浄液には、形態及び染色の特徴から中皮細胞と推定される脱落細胞が観察された。脱落細胞は雌雄の対照群にも観察されたが、暴露濃度に対応して発生動物数及び個体当たりの細胞数が増加した。また、SEM の観察では、MWCNT が胸腔で認められており、本試験の病理組織学的検査において中皮の過形成が認められている。過形成を構成する中皮細胞の細胞接着は脆弱と思われ、洗浄工程中に剥離した可能性は否定できない。

SEM による胸腔及び腹腔洗浄液の観察では、繊維径約 70 nm 程度で繊維長 5 μm 付近の分岐をもたない直線状の MWCNT が単体として確認され、暴露濃度に対応して増加した。この観察結果に加え、本試験の光学顕微鏡検索により、肺以外の多くの臓器に MWCNT の沈着が観察されたことから、MWCNT の全身移行が明らかとなった。観察された MWCNT の形態上の特徴から、肺外移行には、直線状の形態を持つことが必要条件である可能性が示された。また、この形態的特徴が、本試験で中皮腫が発生しなかったことの要因の一つと推察された。今後、検査動物数を増やし、胸腔及び腹腔の MWCNT の本数並びに繊維分布の詳細を明らかにしていく予定である。

V 結論

本検査は、複層カーボンナノチューブ（MWCNT）の肺、胸膜及び腹膜に対する発がん性及び慢性毒性影響を検索する目的で、本試験から採取した臓器及び試料を用いて、非 GLP として、肺内の MWCNT の測定、気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査及び生化学的検査、同洗浄液中の MWCNT の測定、胸腔洗浄液の細胞学的検査、さらに胸腔及び腹腔洗浄液中の MWCNT の有無の確認を行った。

その結果、暴露濃度に対応した MWCNT の肺内沈着が示された。また、0.2 mg/m^3 以上の群で肺への慢性毒性影響が認められた。雌雄とも胸腔及び腹腔内洗浄検査で 0.02 mg/m^3 群から MWCNT の胸腔、腹腔への移行が明らかとなった。

VI 文献

1. Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, et al. 2013. Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. *J Occup Med Toxicol* 8:30. doi: 10.1186/1745-6673-8-30.
2. Oberdörster G. 2002. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhal Toxicol*.14:29-56.
3. Vincent JH, Johnston AM, Jones AD, Bolton RE, Addison J. 1985. Kinetics of Deposition and Clearance of Inhaled Mineral Dusts during Chronic Exposure. *Br J Ind Med*. 42:707-715.

TABLES

TABLE A	AMOUNT OF MWCNT IN THE LUNG
TABLE B1	BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID:CYTOLOGICAL ANALYSIS
TABLE B2	BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID:BIOCHEMICAL ANALYSIS
TABLE C	AMOUNT OF MWCNT IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID
TABLE D1	PLEURAL LAVAGE FLUID CYTOLOGICAL ANALYSIS:MALE
TABLE D2	PLEURAL LAVAGE FLUID CYTOLOGICAL ANALYSIS:FEMALE
TABLE E	NUMBERS OF MWCNT IN THE PLEURAL LAVAGE FLUID
TABLE F	NUMBERS OF MWCNT IN THE ABDOMINAL LAVAGE FLUID

TABLE A

AMOUNT OF MWCNT IN THE LUNG

TABLE A AMOUNT OF MWCNT IN THE LUNG

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Right Lung Weight (g)	Amount of MWCNT	
				µg in the Right Lung	µg in 1g Lung
Male	0	10	0.816 ± 0.052	0	0
	0.02	10	0.843 ± 0.032	6.32 ± 1.61	7.49 ± 1.86
	0.2	10	0.984 ± 0.115	100.44 ± 12.78	102.93 ± 15.54
	2	10	1.478 ± 0.089	1161.07 ± 94.30	787.04 ± 68.11
Female	0	10	0.535 ± 0.038	0	0
	0.02	10	0.574 ± 0.041	5.53 ± 1.25	9.69 ± 2.39
	0.2	10	0.671 ± 0.045	76.74 ± 8.69	115.02 ± 16.68
	2	10	1.120 ± 0.048	747.19 ± 50.27	667.92 ± 48.74

TABLE B1

BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID:
CYTOLOGICAL ANALYSIS

TABLE B1 BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID:CYTOLOGICAL ANALYSIS

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Total Cells (No./μL)	Differential of Cells								Macrophage (No./μL)
				Neutro (No./μL)		Lympho (No./μL)		Eosino (No./μL)		Baso (No./μL)		
Male	0	5	222 ± 51	22 ± 16	38 ± 18	12 ± 11	0 ± 0	150 ± 37				
	0.02	6	238 ± 44	40 ± 20	28 ± 12	20 ± 6	0 ± 0	150 ± 40				
	0.2	5	296 ± 67	38 ± 15	60 ± 19	22 ± 16	0 ± 0	176 ± 56				
	2	5	486 ± 86 **	126 ± 21 **	134 ± 38 **	44 ± 22 **	0 ± 0	182 ± 33				
Female	0	5	178 ± 59	42 ± 19	34 ± 21	4 ± 5	0 ± 0	96 ± 33				
	0.02	5	196 ± 63	24 ± 22	28 ± 15	4 ± 5	0 ± 0	140 ± 37				
	0.2	5	296 ± 74	58 ± 23	86 ± 53	14 ± 11	0 ± 0	138 ± 30				
	2	6	622 ± 119 **	170 ± 63 **	103 ± 42 **	70 ± 32 **	0 ± 0	278 ± 64 **				
Significant difference; *:p≤0.05 **:p≤0.01 Test of Dunnett												

TABLE B2

BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID:
BIOCHEMICAL ANALYSIS

TABLE B2 BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID:BIOCHEMICAL ANALYSIS

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Total Protein (µg/mL)	Albumin (µg/mL)	LDH (U/L)	ALP (U/L)
MALE	0	5	67 ± 18	3 ± 5	22 ± 4	65 ± 12
	0.02	6	96 ± 33	16 ± 7 *	23 ± 3	81 ± 24
	0.2	5	126 ± 29 *	25 ± 7 **	42 ± 5 **	131 ± 12 **
	2	5	373 ± 40 **	68 ± 9 **	158 ± 22 **	264 ± 32 **
FEMALE	0	5	74 ± 23	11 ± 9	21 ± 3	59 ± 15
	0.02	5	127 ± 117	29 ± 28	31 ± 17	72 ± 23
	0.2	5	143 ± 23 **	36 ± 6 **	41 ± 8 **	117 ± 17 **
	2	6	516 ± 193 **	122 ± 47 **	188 ± 29 **	272 ± 40 **
Significant difference; *:p≤0.05 **:p≤0.01 Test of Dunnett						

TABLE C

AMOUNT OF MWCNT

IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID

TABLE C AMOUNT OF MWCNT IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID

Male					Female			
(mg/m ³)	0 (n=5)	0.02 (n=6)	0.2 (n=5)	2.0 (n=5)	0 (n=5)	0.02 (n=5)	0.2 (n=5)	2.0 (n=6)
(µg) SD	0	LOQ [*]	LOQ	0.26 ±0.06	0	LOQ	LOQ	0.36 ±0.13

* limit of quantitation (0.2 µg)

TABLE D1

PLEURAL LAVAGE FLUID CYTOLOGICAL ANALYSIS:
MALE

TABLE D1 PLEURAL LAVAGE FLUID CYTOLOGICAL ANALYSIS:MALE

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Total Cells * ¹ (10 ³ /μL)
Male	0	10	1.88 ± 0.44
	0.02	10	2.16 ± 0.43
	0.2	10	2.31 ± 0.30 *
	2	10	2.66 ± 0.31 **

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Differential of PLF (%) * ²			
			Neutro	Lympho	Eosino	Other
Male	0	9	1.08 ± 1.16	4.14 ± 2.26	1.33 ± 0.70	93.44 ± 2.94
	0.02	8	1.01 ± 0.51	3.58 ± 1.72	1.74 ± 1.36	93.68 ± 1.56
	0.2	9	0.82 ± 0.66	2.74 ± 0.92	3.87 ± 2.11 **	92.57 ± 2.26
	2	10	1.04 ± 0.64	2.75 ± 1.13	5.69 ± 2.78 **	90.52 ± 2.99 *
Significant difference: *:p≤0.05 **:p≤0.01 Test of Dunnett						

*¹ Include mast cells*² Not included mast cells

TABLE D2

PLEURAL LAVAGE FLUID CYTOLOGICAL ANALYSIS:
FEMALE

TABLE D2 PLEURAL LAVAGE FLUID CYTOLOGICAL ANALYSIS:FEMALE

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Total Cells * ¹ (10 ³ /μL)
Female	0	10	1.32 ± 0.27
	0.02	10	1.53 ± 0.14
	0.2	10	1.63 ± 0.23 *
	2	10	1.83 ± 0.45 **

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Differential of PLF (%) * ²			
			Neutro	Lympho	Eosino	Other
Female	0	9	1.01 ± 0.64	3.19 ± 0.93	1.59 ± 1.24	94.21 ± 1.72
	0.02	9	0.73 ± 0.54	4.66 ± 2.81	1.56 ± 1.29	93.06 ± 3.21
	0.2	8	1.15 ± 1.23	3.66 ± 1.22	3.59 ± 1.80	91.60 ± 3.18
	2	10	0.70 ± 0.58	1.96 ± 0.61 *	4.92 ± 2.36 **	92.42 ± 2.17
Significant difference: *:p≤0.05 **:p≤0.01 Test of Dunnett						

*¹ Include mast cells

*² Not included mast cells

TABLE E

NUMBERS OF MWCNT IN THE PLEURAL LAVAGE FLUID

TABLE E NUMBERS OF MWCNT IN THE PLEURAL LAVAGE FLUID

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Numbers of MWCNT*
Male	0	-	-
	0.02	1	38
	0.2	1	134
	2	1	1468
Female	0	-	-
	0.02	1	23
	0.2	1	240
	2	1	847

*: Numbers of MWCNT in the 8 mL pleural lavage fluid counted with the SEM

TABLE F

NUMBERS OF MWCNT IN THE ABDOMINAL LAVAGE FLUID

TABLE F NUMBERS OF MWCNT IN THE ABDOMINAL LAVAGE FLUID

Group Name (mg/m ³)		No. of Animals	Numbers of MWCNT*
Male	0	-	-
	0.02	1	16
	0.2	1	161
	2	1	2429
Female	0	-	-
	0.02	1	34
	0.2	1	291
	2	1	3329

*: Numbers of MWCNT in the 30 mL abdominal lavage fluid conted with the SEM

PHOTOGRAPHS

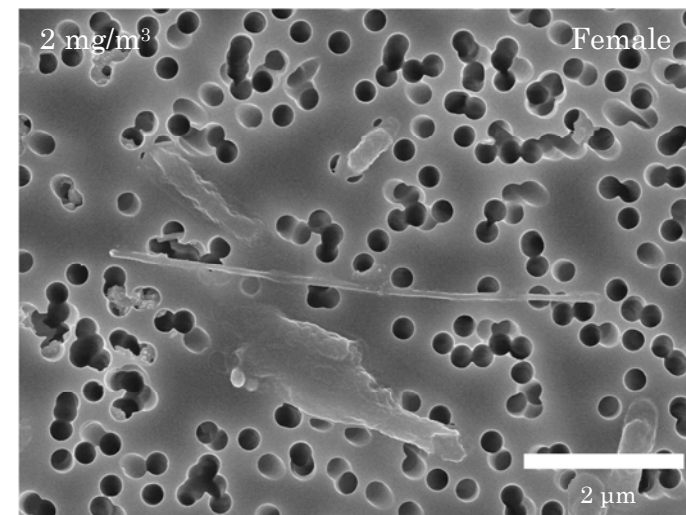
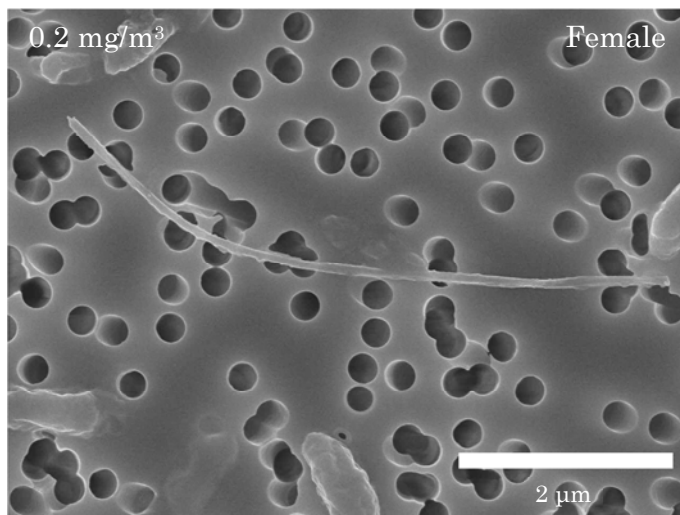
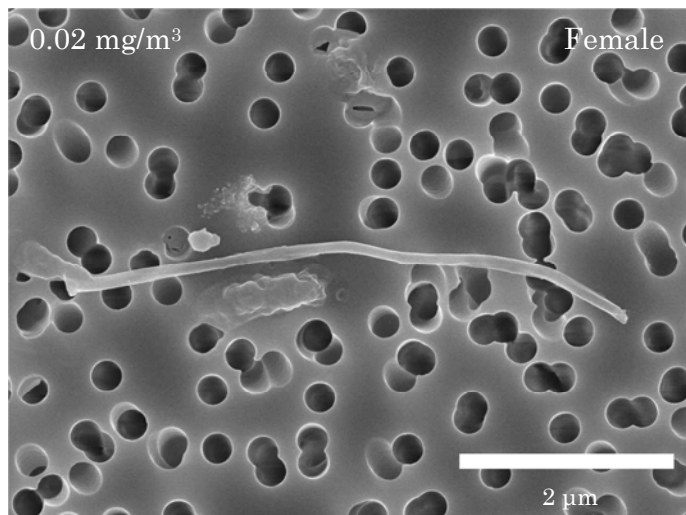
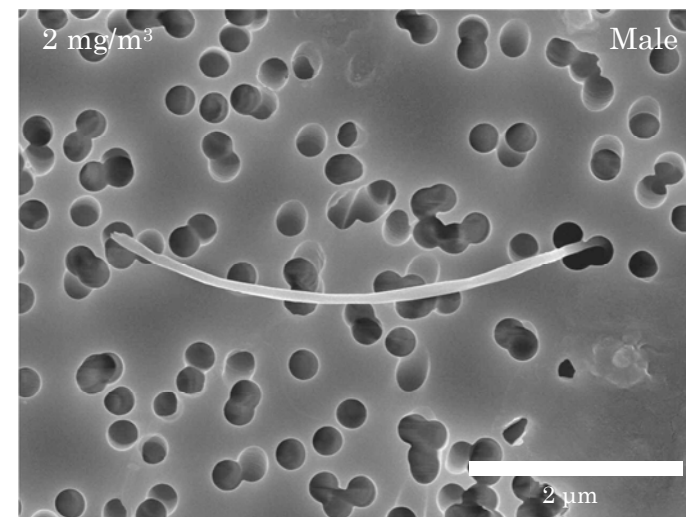
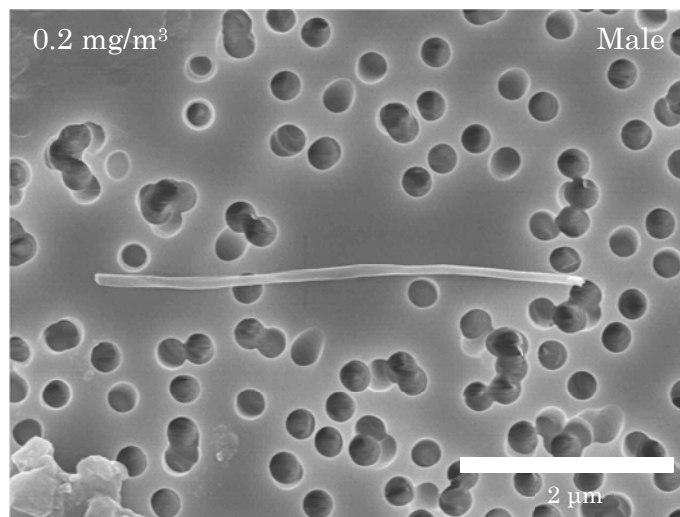
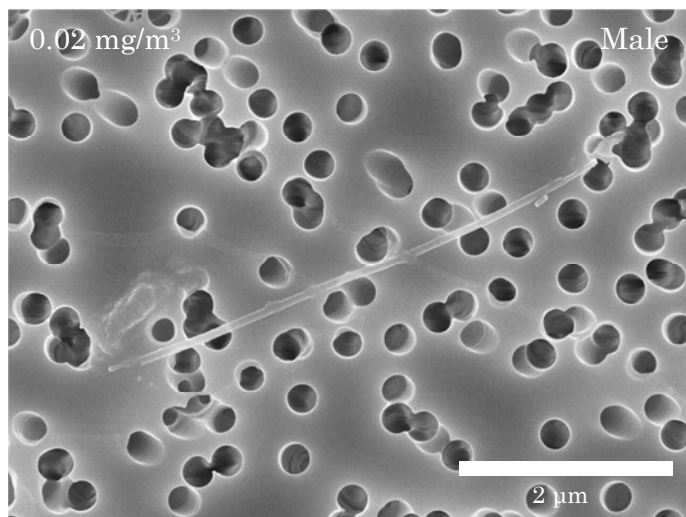
PHOTOGRAPH 1 PLEURAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM

PHOTOGRAPH 2 ABDOMINAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM

PHOTOGRAPHS 1

PLEURAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM

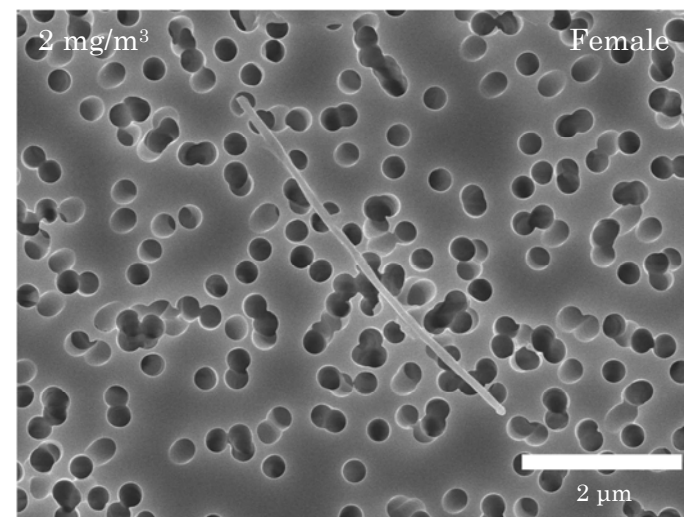
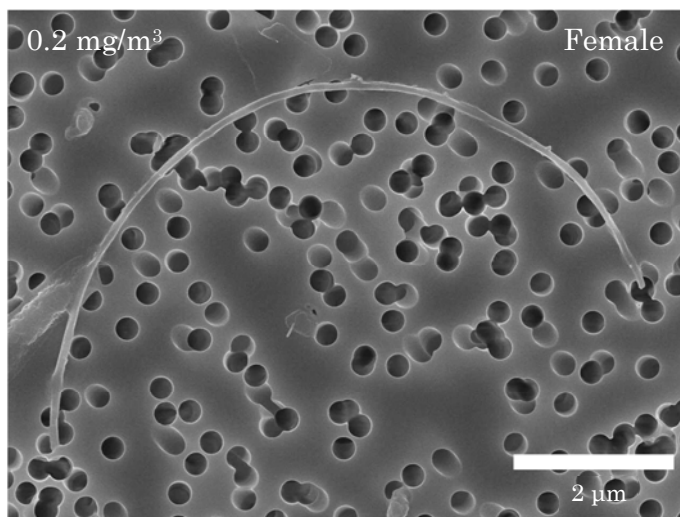
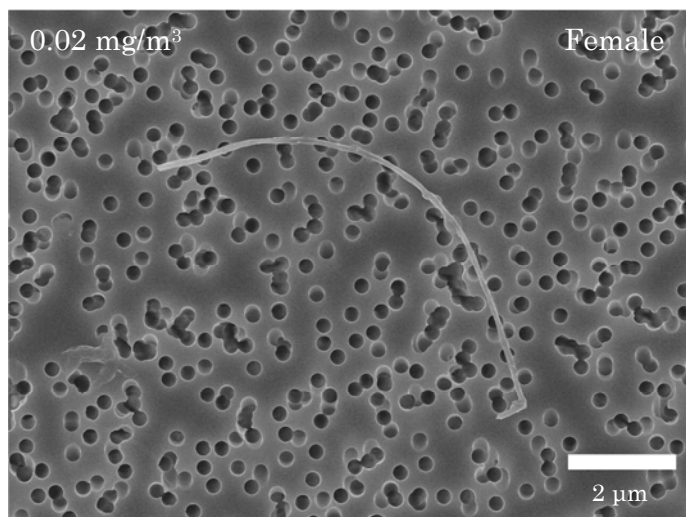
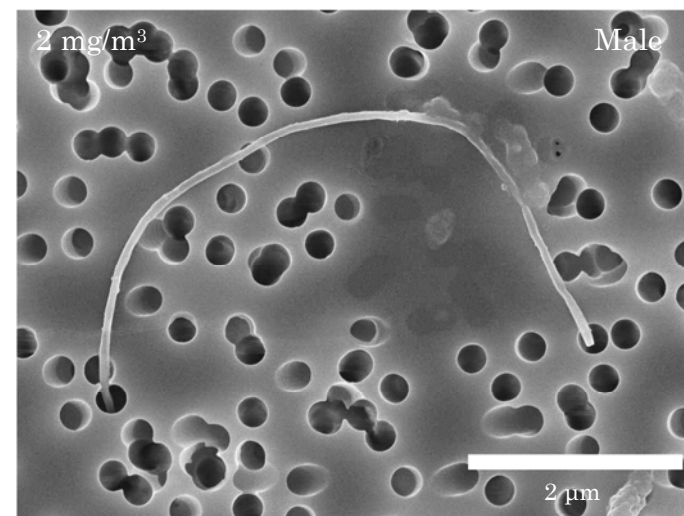
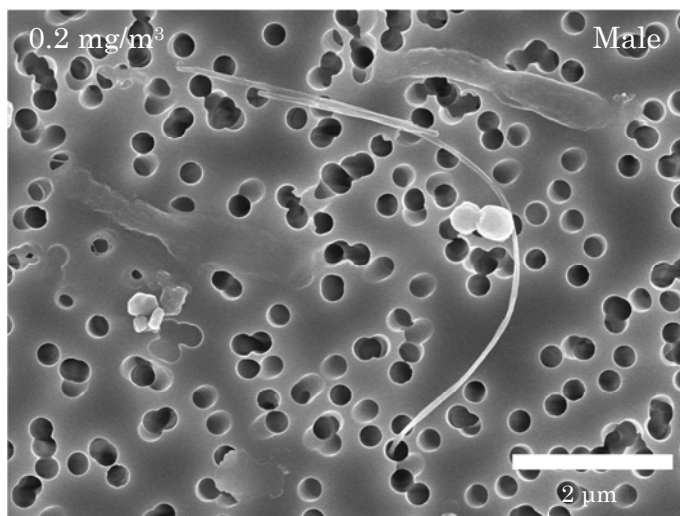
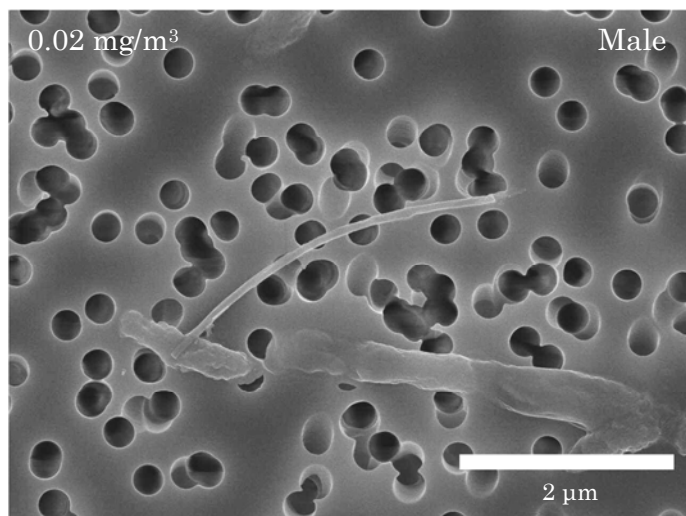
PHOTOGRAPH 1 PLEURAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM



PHOTOGRAPHS 2

ABDOMINAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM

PHOTOGRAPH 2 ABDOMINAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM



APPENDICES

- APPENDIX 1 METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR CYTOLOGY AND
BIOCHEMISTRY OF BALF
- APPENDIX 2 METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR CYTOLOGY OF
PLF

APPENDIX 1

METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR CYTOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF BALF

APPENDIX 1 METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR CYTOLOGY AND
BIOCHEMISTRY OF BALF

	Method	Unit	Decimal place
Cytology			
Total cell count	Flow Cytometry method ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2
Differential	Flow Cytometry method ¹⁾	%	2
Biochemistry			
Total protein(TP)	Pyrogallol red method ²⁾	$\mu\text{g/mL}$	0
Albumin (Alb)	Immuno-nephelometry ²⁾	$\mu\text{g/mL}$	0
Lactate dehydrogenase (LDH)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Alkaline phosphatase (ALP)	JSCC method ²⁾	U/L	0

1) Automatic blood cell analyzer (XT-2000iV Sysmex Corporation.)

2) Automatic analyzer (Hitachi 7080 : Hitachi,Ltd.)

APPENDIX 2

METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR CYTOLOGY OF PLF

APPENDIX 2 METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR CYTOLOGY OF PLF

	Method	Unit	Decimal place
Cytology			
Total cell count	Flow Cytometry method ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2
Differential	Visual observation method (May-Grunwald-Giemsa stain)	%	1

1) Automatic blood cell analyzer (XT-2000iV Sysmex Corporation.)