

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がん原性試験報告書

試験番号：0800

CAS No. 308068-56-6

2015 年 5 月 26 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 ~ R2
FIGURES	1 ~ 7
PHOTOGRAPHS	1 ~ 27
APPENDICES	1 ~ 2

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がん原性試験

試験目的

複層カーボンナノチューブ(MWCNT) (被験物質番号 1228) をラットに 104 週間全身暴露 (経気道投与) し、そのがん原性を検索する。

試験法

本試験は、平成 9 年 3 月 11 日付け、基発第 144 号「がん原性試験による調査の基準」及び OECD 化学品テストガイドライン 451 (発癌性試験 2009 年 9 月 7 日採択) に準じて実施した。

GLP 対応

本試験は、「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づく試験施設等が具備すべき基準 (安衛法 GLP)」 (昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正平成 12 年 12 月 25 日労働省告示第 120 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、「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 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針」 (平成 18 年 6 月 1 日厚生労働大臣官房厚生科学課長通知) 及び「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規定」 (平成 24 年 4 月 25 日規程第 17 号、最終改正平成 25 年 3 月 28 日規程第 12 号) を遵守する。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審査された (承認番号 0001)。

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がん原性試験報告書

試験番号：0800

本文

本文目次

	頁
要約	1
試験材料	4
- 1 被験物質の性状等	4
- 1 - 1 名称等	4
- 1 - 2 使用 MWCNT のロット等	4
- 1 - 3 構造及び物理化学的性状	4
- 2 試験動物	4
試験方法	5
- 1 投与	5
- 1 - 1 投与経路	5
- 1 - 2 MWCNT の投与方法	5
- 1 - 3 投与濃度	5
- 1 - 4 投与期間	5
- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由	5
- 1 - 6 MWCNT の暴露方法と濃度調整	6
- 1 - 7 吸入チャンバー内 MWCNT の濃度測定	6
- 1 - 8 吸入チャンバー内 MWCNT の粒子径測定	7
- 1 - 9 吸入チャンバー内 MWCNT の形態観察	7
- 2 動物管理	7
- 2 - 1 各群の使用動物数	7
- 2 - 2 群分け及び個体識別方法	7
- 2 - 3 飼育条件	8
(1) 飼育環境	8
(2) 飼料	8
(3) 飲水	9
- 3 観察・検査項目及び方法	9
- 3 - 1 動物の生死及び一般状態の観察	9
- 3 - 2 体重測定	9
- 3 - 3 摂餌量測定	9

- 3 - 4	血液学的検査	9
- 3 - 5	血液生化学的検査	10
- 3 - 6	尿検査	10
- 3 - 7	病理学的検査	10
(1)	肉眼的観察	10
(2)	臓器重量	10
(3)	病理組織学的検査	10
(4)	透過型電子顕微鏡検査	11
- 4	数値処理と統計方法	11
- 4 - 1	数値の取り扱いと表示	11
- 4 - 2	統計処理	12
	試験成績	13
- 1	吸入チャンバー内 MWCNT の濃度測定	13
- 2	吸入チャンバー内被験物質の粒子径測定	13
- 3	吸入チャンバー内 MWCNT の形態観察	13
- 4	生死状況	14
- 5	一般状態	14
- 6	体重	14
- 7	摂餌量	15
- 8	血液学的検査	15
- 9	血液生化学的検査	15
- 10	尿検査	16
- 11	病理学的検査	16
- 11 - 1	肉眼的観察	16
- 11 - 2	臓器重量	17
- 11 - 3	病理組織学的検査	17
- 11 - 4	透過型電子顕微鏡による肺組織中の MWCNT の観察	23
- 11 - 5	死因	23
	考察及びまとめ	24
	結論	27
	文献	27

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	29
---	----

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を検索するために、MWCNT を雌雄の F344/DuCrIj ラットに全身暴露した。

本試験は、MWCNT 投与 (暴露) 群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、雌雄各群とも 50 匹、合計 400 匹のラット (暴露開始時 6 週齢) を用いた。暴露濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、0.02、0.2 及び 2 mg/m³ とし、MWCNT (MWNT-7、保土谷化学工業) を 1 日 6 時間、1 週 5 日間で 104 週間全身暴露 (経気道投与) した。暴露期間中は、吸入チャンバー内の MWCNT の濃度測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) による MWCNT の形態観察、粒度分布測定及び空気動学的質量中位径 (MMAD) の算出、動物の生死及び一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、尿検査を行い、さらに、血液学的検査、血液生化学的検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量測定、病理組織学的検査及び透過型電子顕微鏡 (TEM) による肺中の MWCNT の観察を行った。

MWCNT の実測濃度は、0.02 mg/m³ 群で 0.020 ± 0.001 mg/m³、0.2 mg/m³ 群で 0.204 ± 0.014 mg/m³、2 mg/m³ 群で 2.018 ± 0.069 mg/m³ で、設定値に近似した濃度の暴露が確認された。形態観察からは、よく分散した繊維状の MWCNT が多数認められ、暴露濃度及びサンプリング時期の違いによる差は認められなかった。また、粒度分布測定でも暴露濃度及びサンプリング時期の違いによる差は認められず、MMAD は、1.2 ~ 1.4 µm、幾何標準偏差 (σ_g) は 2.6 ~ 3.0 であった。

動物の生死確認では、雌雄各群の生存動物は、対照群と暴露群との間に差は認められず、雄では 36 匹以上、雌では 34 匹以上生存した。一般状態の観察では特記すべき所見は認められなかった。

体重は、雄では対照群と暴露群との間に差は認められなかった。雌では、2 mg/m³ 群で暴露 1 週、暴露最終段階の 102 週と 104 週で低値が認められたが、その変化は僅かなものであった。

血液学的検査では、雄の 2 mg/m³ 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び白血球数の増加がみられた。雌では、白血球数が全暴露群で高値であった。尿検査及び血液生化学的検査では、雌雄に特記すべき変化はみられなかった。

解剖時の肉眼的観察では、雌雄の 0.2 mg/m³ 以上の群で肺の結節が観察され、さらに、雌雄とも 2 mg/m³ 群に肺の白色斑や黒色斑が全葉に散在性にみられた。臓器重量では、雄は 0.2 mg/m³ 以上の群、雌では 0.02 mg/m³ 以上の群から肺の重量増加が認められ、雌雄とも 2 mg/m³ 群の増加が顕著であった。

病理組織学的検査では、雌雄の肺に腫瘍の発生が認められた。雌雄とも細気管支 - 肺胞上皮癌の発生増加が認められ、雄では細気管支 - 肺胞上皮腺腫の発生増加も認められた。これらに加えて、雄で腺扁平上皮癌、雌で扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌が少数例認められた。これらの雄にみられた 2 種類の悪性腫瘍 (細気管支 - 肺胞上皮癌と腺

扁平上皮癌)を合わせた発生は 0.2 mg/m^3 以上の群で有意な増加を示し、雌にみられた 4 種類の悪性腫瘍(細気管支 - 肺胞上皮癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌)を合わせた発生は 2 mg/m^3 群で有意な増加を示した。

また、上記腫瘍に関連した病変である細気管支 - 肺胞上皮過形成及び肺胞上皮細胞過形成の発生増加が腫瘍の発生と同じく、雄は 0.2 mg/m^3 以上の群、雌は 2 mg/m^3 群でみられた。さらに、肺胞壁の限局性線維性肥厚と肉芽腫性変化の発生増加が雌雄の 0.2 mg/m^3 以上の群で、異型過形成、終末細気管支上皮過形成、肺胞マクロファージの浸潤及び肺胸膜(臓側胸膜)の線維性肥厚の発生増加が雌雄の 2 mg/m^3 群で認められた。壁側胸膜では、雄に中皮の単純過形成と限局性線維化の発生増加も観察された。上部気道では、雌雄とも鼻腔と鼻咽頭に杯細胞過形成、鼻腔に移行上皮の過形成とエオジン好性変化の発生増加が認められた。これらに加えて MWCNT の有無について検索を行った全臓器(鼻腔、喉頭、気管、肺、胸膜、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、嗅球及び大脳)に MWCNT が観察された。

以上、MWCNT を 0 、 0.02 、 0.2 及び 2 mg/m^3 の濃度で 2 年間にわたり雌雄の F344/DuCrI Crj ラットに全身暴露した結果、雄では 0.2 mg/m^3 以上の群、雌では 2 mg/m^3 群で肺の悪性腫瘍(癌)の発生増加が認められた。従って、MWCNT (MWNT-7) はラット雌雄への全身暴露により明らかながん原性を示すと結論する。

MWCNT のがん原性試験における肺の腫瘍発生（ラット 雄）

	投 与 濃 度 (mg/m ³)	0	0.02	0.2	2	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数	50	50	50	50		
良性腫瘍	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	1	7 *	5		
悪性腫瘍	細気管支-肺胞上皮癌	1	1	8 *	10 **	↑ ↑	↑ ↑
	腺扁平上皮癌	0	0	0	1		
	細気管支-肺胞上皮癌 + 腺扁平上皮癌	1	1	8 *	11 **	↑ ↑	↑ ↑
	細気管支-肺胞上皮腺腫 + 細気管支-肺胞上皮癌	2	2	13 **	15 **	↑ ↑	↑ ↑
	細気管支-肺胞上皮腺腫 + 細気管支-肺胞上皮癌 + 腺扁平上皮癌	2	2	13 **	16 **	↑ ↑	↑ ↑

MWCNT のがん原性試験における肺の腫瘍発生（ラット 雌）

	投 与 濃 度 (mg/m ³)	0	0.02	0.2	2	Peto 検定	Cochran- Armitage 検定
	検査動物数	50	50	50	50		
良性腫瘍	細気管支-肺胞上皮腺腫	3	1	4	3		
悪性腫瘍	細気管支-肺胞上皮癌	0	1	0	5 *	↑ ↑	↑ ↑
	扁平上皮癌	0	0	0	1		
	腺扁平上皮癌	0	0	0	1		
	低分化型腺癌	0	0	0	1		
	細気管支-肺胞上皮癌 + 扁平上皮癌 + 腺扁平上皮癌 + 低分化型腺癌	0	1	0	8 **	↑ ↑	↑ ↑
	細気管支-肺胞上皮腺腫 + 細気管支-肺胞上皮癌 + 扁平上皮癌 + 腺扁平上皮癌 + 低分化型腺癌	3	2	4	11 *	↑ ↑	↑ ↑

* : p 0.05 で有意

** : p 0.01 で有意

(Fisher 検定)

↑ : p 0.05 で有意増加

↑ ↑ : p 0.01 で有意増加

(Peto, Cochran-Armitage 検定)

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 使用 MWCNT のロット等 (文献 1)

製 造 元： 保土谷化学工業(株)
製品コード： NT-7K (旧 MWNT-7)
ロット番号： 080126 (2012.06.15 ~ 2014.03.31 使用)
071223 (2014.03.31 ~ 2014.06.12 使用)
純 度： 99.8 % 99.6 % (保土谷化学工業(株) 検査成績データ)
比 表 面 積： 24 m²/g (保土谷化学工業(株) 検査成績データ)

- 1 - 3 構造及び物理化学的性状 (文献 2)

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)

繊維径： ロット番号 90.7 ± 20.9 nm、ロット番号 83.8 ± 27.1 nm

繊維長： ロット番号 5.7 ± 3.6 μm、ロット番号 5.2 ± 3.1 μm

保管条件： 室温で暗所に保管

(使用ロットの繊維径は 500 本以上、繊維長は 1000 本以上、Takaya ら (文献 3) の方法で計測し、結果はいずれも算術平均 ± 標準偏差で示した。)

- 2 試験動物

動物は、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/DuCr1Cr1j ラット (SPF) の雌雄を使用した。

雌雄各 222 匹を 4 週齢で導入し、検疫、馴化を各 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 200 匹（群構成時体重範囲、雄：112～131 g、雌：86～103 g）を選別し、試験に用いた。

なお、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 MWCNT 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、微粒子発生装置（セイシン企業（株）、特注）でエアロゾル化した MWCNT 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 投与濃度

投与濃度は 0.02、0.2 及び 2 mg/m³ の 3 段階に設定した。なお、対照群は清浄空気による換気のみとした。

- 1 - 4 投与期間

投与期間は、1 日 6 時間、1 週 5 日の暴露で 104 週間とし、計 492 回の暴露を行った。ただし、祝祭日の暴露は行わなかった。

- 1 - 5 投与経路、投与期間及び投与濃度の設定理由

投与経路は労働環境における暴露経路に合わせ、全身暴露による経気道投与とした。

投与期間は、がん原性試験による調査の基準（安衛法、文献 4）及び OECD 化学品テストガイドライン 451（発癌性試験、文献 5）に従い、2 年間（104 週間）とした。

投与時間は OECD 化学品テストガイドライン 451 に従い 1 日 6 時間とした。

投与濃度は、0.2、1 及び 5 mg/m³ (公比 5) の濃度で 13 週間、全身暴露した吸入試験結果 (試験番号 0780、文献 6) をもとに決定した。13 週間試験では、各群とも動物の死亡はみられず、体重増加の抑制も認められなかった。しかし、気管支肺胞洗浄液検査で 0.2 mg/m³ 群から濃度に対応して肺への影響が認められ、また、病理組織学的検査では変化の程度は軽度であるものの 0.2 mg/m³ 以上の群で肺の肉芽腫性変化、1 mg/m³ 以上の群で肺胞壁の限局性の線維性肥厚が認められた。これらのことから、がん原性試験に使用する吸入チャンバー (気積: 10 m³) で暴露可能な最高濃度の 2 mg/m³ をがん原性試験の最高濃度とした。また、中間濃度については、13 週間試験の 0.2 mg/m³ 群に肺の肉芽腫性変化が認められていることから、がん原性試験と 13 週間試験の毒性比較を行うことを考え、0.2 mg/m³ に設定した。最低濃度については、MWCNT の毒性に対する NOAEL を求めることを意図し、技術的に制御可能な最低濃度の 0.02 mg/m³ を設定した。

以上、がん原性試験の暴露濃度は、0、0.02、0.2、2 mg/m³ (公比 10) とした。

- 1 - 6 MWCNT の暴露方法と濃度調整

暴露濃度ごとに微粒子発生装置 (セイシン企業㈱、特注) を使用し、MWCNT エアロゾルを発生させた。このエアロゾルを各吸入チャンバー手前の供給空気導管に導入し、換気空気と混合して吸入チャンバーに送気した。

暴露中は、パーティクルコントローラー (OPC: Optical particle controller、OPC-AP-600、柴田科学㈱) で吸入チャンバー内 MWCNT の個数濃度 (CPM: Counts Per Minute) を連続測定しながら、OPC の上下限信号により微粒子発生装置に MWCNT を供給するフィーダー (フンケンビットフィーダー FS-B3-S、㈱粉研パウテックス) の運転を帰還制御し、吸入チャンバー内濃度を設定濃度に自動調整した。

- 1 - 7 吸入チャンバー内 MWCNT の濃度測定

暴露開始から終了まで OPC を使用して各群の吸入チャンバー内の MWCNT 濃度を連続測定した。暴露期間中は、2 週間ごとに、暴露開始 1、3、5 時間後に 3 回、フッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター (T60A20、55 mmΦ、㈱東京ダイレック) にチャンバー内の MWCNT を捕集して質量濃度 (mg/m³) を求めた。この値と質量濃度測定時の OPC の個数濃度平均値から個数濃度-質量濃度変換係数 (K 値) を算出し、個数濃度から変換した質量濃度を吸入チャンバー内の MWCNT 濃度として表示した。なお、暴露開始日は、暴露開始前 (暴露濃度調整時) に求めた K 値を使用してチャンバー内濃度を表示した。

- 1 - 8 吸入チャンバー内 MWCNT の粒子径測定

暴露期間中 3 ヶ月に 1 回、MOUDI (MOUDI:Micro-orifice uniform deposit impactor、MOUDI- 、MSP 社) を使用して、各暴露群の吸入チャンバー内の空気動力学的粒子径を測定した。

- 1 - 9 吸入チャンバー内 MWCNT の形態観察

暴露期間中 3 ヶ月に 1 回、各暴露群の吸入チャンバー内 MWCNT の形態観察を行った。金蒸着を施した 0.8 μm のポアサイズのポリカーボネートフィルター(47 mm ϕ 、Whatman 社) に吸入チャンバー内の MWCNT を捕集し、捕集した MWCNT を走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning electron microscope、SU8000 形、(株)日立ハイテクノロジーズ) を用いて観察した。

- 2 動物管理

- 2 - 1 各群の使用動物数

暴露群 3 群及び対照群 1 群の計 4 群を設け、雌雄各群 50 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	50 匹 (1001 ~ 1050)	50 匹 (2001 ~ 2050)
1	0.02 mg/m ³	50 匹 (1101 ~ 1150)	50 匹 (2101 ~ 2150)
2	0.2 mg/m ³	50 匹 (1201 ~ 1250)	50 匹 (2201 ~ 2250)
3	2 mg/m ³	50 匹 (1301 ~ 1350)	50 匹 (2301 ~ 2350)

- 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 7) 。

動物の個体識別は、検疫期間及び馴化期間では尾に油性マーカーによる色素塗布、暴露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

検疫期間中は検疫室（雄：713 室、雌：714 室）、馴化期間は吸入試験室（704 室）で全動物を飼育した。暴露期間中は、対照群と暴露群はそれぞれ別室（対照群：704 室、暴露群：712 室）の吸入チャンバー内で動物を飼育した。

検疫室、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す。検疫室、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 1 に示す。検疫室、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 : 検疫室； 23 ± 2 < 713 室； 23.1 ± 0.3 、714 室； 22.7 ± 0.1 >
吸入試験室； 22 ± 2 < 704 室； 21.8 ± 0.5 、712 室； 21.9 ± 0.6 >
吸入チャンバー内； 23 ± 2

湿 度 : 検疫室； $55 \pm 15 \%$ < 713 室； $53 \pm 1 \%$ 、714 室； $53 \pm 1 \%$ >
吸入チャンバー内； $50 \pm 20 \%$

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 : 検疫室；15～17 回 / 時
吸入試験室；7～9 回 / 時
吸入チャンバー内； 10 ± 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 : 検疫期間；群飼（5 匹）、馴化・暴露期間；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）
暴露期間；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)（東京都板橋区小豆沢 3-6-10）千葉工場製造の CRF-1 固型飼料（30kGy- γ 線照射滅菌飼料）を固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、定期解剖前日の夕方からは絶食させた。

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㈱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。

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を週 1 回行った。

- 3 - 2 体重測定

暴露開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）を行った。また、動物の死亡発見時、切迫屠殺時及び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

暴露開始後 14 週間は週 1 回、それ以降は 4 週に 1 回（104 週にも測定）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、イソフルラン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 2 に示す。

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、イソフルラン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 2 に示す。

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

暴露 104 週の検査時まで生存した動物から、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・ダイアグノスティクス社）を用いて、下記の項目について検査を行った。

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 病理学的検査

(1) 肉眼的観察

全動物について肉眼的に観察を行った。

(2) 臓器重量

定期解剖時まで生存した動物について、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。なお、非 GLP 試験として気管支肺胞洗浄液検査を行った動物は、左肺を培養液で洗浄したため測定は右肺のみとした。測定臓器を下記に示す。

測定臓器：副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳

(3) 病理組織学的検査

全動物について下記に示した器官・組織を摘出し、10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。また、喉頭、気管、肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、横隔膜（胸膜）、脳（大脳）、嗅球についてはケルンエヒトロート染色（注 1）により MWCNT の沈着を検

索した。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8）で切り出し（横断）、検査した。検査器官・組織を下記に示す。

検査器官・組織：鼻腔（3箇所を横断）、嗅球、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髓（大腿骨）
リンパ節（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、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）、
横隔膜膜（胸膜）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織

注1：ケルンエヒトロート染色は核を赤く染める染色法で、核を青紫色に染色するヘマトキシリンを用いた染色法に比較して黒色の繊維状物質（MWCNT）を容易に観察できる。

（4）透過型電子顕微鏡検査

光学顕微鏡用に作製した標本を用いて、肺組織中のMWCNT及び組織を透過型電子顕微鏡（TEM：Transmission electron microscope、JEM-1400、(株)日本電子）で観察した。

- 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MWCNT濃度は、 mg/m^3 を単位とし、小数点以下第3位までを表示した。

粒子径の単位は μm とし、空気動力学的質量中位径は小数点以下第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 2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、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。

病理組織学的検査のうち非腫瘍性病変については、所見のみられなかった動物をグレード0、所見のみられた動物は、その所見の程度及び範囲などを基準にしてグレード1～4に分け、 χ^2 検定を行った。また、尿検査についても対照群と各暴露群間との χ^2 検定を行った。

腫瘍性病変については、各臓器の腫瘍ごとに、群ごとの総担腫瘍臓器数について、Peto検定（文献9）、Cochran-Armitage検定、Fisher検定を行った。また、Peto検定は病理組織学的検査時に付与されたコンテクス（注2）を用いて、死亡率法（コンテクス3, 4を付与された腫瘍についての検定）、有病率法（コンテクス0, 1, 2を付与された腫瘍についての検定）、死亡率法＋有病率法（コンテクス0～4の総計で検定）を行った。

各検定は5%の有意水準で、Peto検定、Fisher検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、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。

注2：Peto検定に用いるコンテクス

- 0：定期解剖動物にみつかった腫瘍
- 1：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に関係しない腫瘍
- 2：多分1だと思うが、確かでない腫瘍
- 3：多分4だと思うが、確かでない腫瘍
- 4：死亡／瀕死動物にみつかった腫瘍で、直接死因に係わっていた腫瘍

試験成績

- 1 吸入チャンバー内 MWCNT の濃度測定

濃度測定結果を TABLE A に示す。各暴露群の MWCNT 濃度は、0.02 mg/m³ 群では 0.020 ± 0.001 mg/m³、0.2 mg/m³ 群では 0.204 ± 0.014 mg/m³、2 mg/m³ 群では 2.018 ± 0.069 mg/m³ であった。各暴露群の MWCNT 濃度は設定濃度に対して極めて近い濃度であった。また、各濃度とも設定濃度で安定しており、各暴露群の濃度の変動係数（標準偏差 / 平均値 × 100）は、各々 5.0、6.9 及び 3.4 % であった。各濃度とも 2 年間にわたり濃度変動の少ない、安定した暴露環境であったことが確認された。

- 2 吸入チャンバー内 MWCNT の粒子径測定

MOUDI による各ステージの MWCNT 捕集量及び捕集量累積率を TABLE B に示す。また、その結果を対数正規確率紙に粒径累積頻度分布図としてプロットして、FIGURE 1 に示す。各図より空気動力学的質量中位径（MMAD）及び幾何標準偏差（σ_g）を求め、下表にまとめた。表のとおり MMAD は全暴露群で 1.2 ~ 1.4 μm、σ_g は 2.6 ~ 3.0 の範囲であり、暴露群間及び測定時期での差はなかった。すなわち、2 年間にわたり吸入チャンバー内 MWCNT エアロゾルの粒径分布は、全暴露群で均一に維持されたことを確認した。

群名称	0.02 mg/m ³ 群		0.2 mg/m ³ 群		2 mg/m ³ 群	
測定週	MMAD (μm)	σ _g	MMAD (μm)	σ _g	MMAD (μm)	σ _g
1	1.3	3.0	1.4	2.9	1.3	2.6
14	1.3	2.8	1.3	2.9	1.3	2.9
27	1.3	2.9	1.3	2.9	1.3	2.8
40	1.3	2.9	1.3	2.9	1.3	2.7
53	1.4	3.0	1.4	2.9	1.4	2.9
66	1.2	2.9	1.3	2.9	1.4	2.8
79	1.3	2.9	1.3	2.9	1.4	2.8
92	1.3	3.0	1.3	3.0	1.4	2.8
102	1.4	2.9	1.3	2.7	1.3	2.9

- 3 吸入チャンバー内 MWCNT の形態観察

SEM 写真を PHOTOGRAPH 1 ~ 9 に示す。良く分散した繊維状の MWCNT が多く認められ、形態や凝集性に暴露濃度や捕集時期による差異は認められなかった。

- 4 生死状況

生死状況を TABLE C1, 2、FIGURE 2, 3 に示す。

- 雄 -

暴露群の生存率に MWCNT の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：36 匹（72 %）、0.02 mg/m³ 群：42 匹（84 %）、0.2 mg/m³ 群：38 匹（76 %）、2 mg/m³ 群：37 匹（74 %）であった。

- 雌 -

暴露群の生存率に MWCNT の影響はみられなかった。

各群の 104 週における生存動物数（生存率）は、対照群：42 匹（84 %）、0.02 mg/m³ 群：34 匹（68 %）、0.2 mg/m³ 群：39 匹（78 %）、2 mg/m³ 群：36 匹（72 %）であった。

- 5 一般状態

一般状態の観察結果を TABLE D1, 2 に示す。

- 雄 -

MWCNT の影響と思われる一般状態の変化はみられなかった。

- 雌 -

MWCNT の影響と思われる一般状態の変化はみられなかった。

- 6 体重

体重の推移を TABLE E1 ~ 4、FIGURE 4, 5 に示す。

- 雄 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。

最終計測時（104 週）の各暴露群の体重は、対照群に対して 0.02 mg/m³ 群：98 %、0.2 mg/m³ 群：102 %、2 mg/m³ 群：100 %であった。

- 雌 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。

ただし、2 mg/m³ 群で暴露 1 週、暴露最終段階の 102 週と 104 週で軽度な低値が認められた。

最終計測時（104 週）の各暴露群の体重は、対照群に対して 0.02 mg/m³ 群：95 %、0.2 mg/m³ 群：100 %、2 mg/m³ 群：94 %であった。

- 7 摂餌量

摂餌量を TABLE F1 ~ 4、FIGURE 6, 7 に示す。

- 雄 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。ただし、暴露群で 66 週までしばしば摂餌量が高値であったが、これ以降、暴露終了時まで対照群との間に差はなかった。

- 雌 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。ただし、暴露群で 74 週までしばしば摂餌量が高値であったが、これ以降、暴露終了時まで対照群との間に差はなかった。

- 8 血液学的検査

血液学的検査の結果を TABLE G1, 2 に示す。

- 雄 -

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び白血球数の高値が 2 mg/m³ 群でみられた。白血球では対照群に極めて高い値を示した動物がいたため、2 mg/m³ 群の平均値は対照群より低値であったが、統計学上は有意に増加した。

なお、MCHC の低値と網赤血球数の高値が 0.02 mg/m³ 群でみられたが、暴露濃度と対応した変化ではないことから毒性影響とは考えなかった。その他、白血球分類で好酸球比の増加が 2 mg/m³ 群で示されたが、極軽微な変化であることから、毒性影響かどうかは不明であった。

- 雌 -

白血球数が全暴露群で高値であった。

その他、MCHC の低値が 0.02 mg/m³ 群、白血球分類の単球比の低値が 0.2 mg/m³ 群にみられたが、暴露濃度に対応した変化ではないことから毒性影響とは考えなかった。

- 9 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を TABLE H1, 2 に示す。

- 雄 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、総ビリルビンと ALT の低値が 0.02 mg/m³ 群、カリウムの低値が全暴露群、クロールの低値が 0.2 mg/m³ 以上の群、カルシウムの高値が 0.2 mg/m³ 群でみられた。しかし、これらの変化は、暴露濃度と対応した変化ではないことから毒性影響とは考えなかった。

- 雌 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、アルブミンとカリウムの低値が 0.02 mg/m³ 群と 2 mg/m³ 群、A/G 比の低値が全暴露群、CK の高値が 0.2 mg/m³ 以上の群、無機リンの高値が 0.02 mg/m³ 群でみられた。しかし、これらの変化は、軽微でありその毒性学的意義は不明であった。

- 10 尿検査

尿検査の結果を TABLE I1, 2 に示す。

- 雄 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、pH が 2 mg/m³ 群、蛋白が 0.02 mg/m³ 群、ケトン体で全暴露群に統計学的有意差が示された。pH については、対照群では pH 8.0 が多かったのに対し、2 mg/m³ 群では pH 7.5 が多かった。対照群での pH が高値であったため、統計学的な有意差が示されたものと考えた。また、蛋白とケトン体の変化に関しては、蛋白の変化は暴露濃度と対応したものではないこと、ケトン体の変化は減少性の変化であり、かつ、暴露濃度と対応したものではないことから、これらの変化は毒性影響とは考えなかった。

- 雌 -

MWCNT の影響と思われる変化はみられなかった。

なお、ケトン体の統計学的有意差が 0.02 mg/m³ 群で示されたが、この変化は暴露濃度と対応したものではないことから毒性影響とは考えなかった。

- 11 病理学的検査

- 11 - 1 肉眼的観察

解剖時の肉眼的観察結果を TABLE J1, 2 に示す。肉眼写真の代表例を PHOTOGRAPH 10, 11 に示す。

- 雄 -

肺の結節が 2 mg/m³ 群で 11 匹、0.2 mg/m³ 群の 9 匹に認められ、他の群（対照群 3 匹、0.02 mg/m³ 群 4 匹）に比較して多かった。また、肺の白色班が 2 mg/m³ 群の 46 匹に認められ、他の群（対照群 0 匹、0.02 mg/m³ 群 1 匹、0.2 mg/m³ 群 6 匹）に比較して多かった。さらに、肺の黒色班が 2 mg/m³ 群の 14 匹にみられた。これらの肺の結果に加えて、リンパ節（縦隔）の黒色調変化が 2 mg/m³ 群の 10 匹に観察された。

- 雌 -

肺の結節が 0.2 mg/m³ 群で 5 匹、2 mg/m³ 群の 7 匹に認められ、他の群（対照群 1 匹、0.02 mg/m³ 群 0 匹）に比較して多かった。また、肺の白色班が 2 mg/m³ 群の 48 匹に認められ、他の群（対照群 2 匹、0.02 mg/m³ 群 1 匹、0.2 mg/m³ 群 3 匹）に比較して多かった。

さらに、肺の黒色班が 2 mg/m³ 群の 10 匹にみられた。これらの肺の結果に加えて、リンパ節（縦隔）の黒色調変化が 2 mg/m³ 群の 9 匹に観察された。

- 11 - 2 臓器重量

定期解剖時に測定した臓器の実重量を TABLE K1, 2、体重比を TABLE L1, 2 に示す。

- 雄 -

肺の実重量と体重比の暴露濃度に対応した増加が 0.2 mg/m³ 以上の群にみられた。

その他、副腎の実重量の高値が 0.02 mg/m³ 群にみられたが、この変化は暴露濃度と対応したものではないことから毒性影響とは考えなかった。

- 雌 -

肺の実重量と体重比の暴露濃度に対応した増加が全暴露群で認められた。また、副腎の実重量と体重比の高値が 2 mg/m³ 群でみられたが、後述する病理組織学的検査で関連する明らかな変化が観察されていないことからこの毒性学的意義は不明であった。

その他、脾臓の体重比の高値が 0.02 mg/m³ 群と 2 mg/m³ 群で、心臓、腎臓、脾臓、肝臓及び脳の体重比の高値が 2 mg/m³ 群で認められたが、これらは解剖時体重の低値に起因するものと考え、毒性影響とは考えなかった。また、副腎の実重量の低値が 0.02 mg/m³ 群でみられたが、暴露濃度との対応がみられないことから毒性影響とは考えなかった。

- 11 - 3 病理組織学的検査

検査結果のうち、腫瘍性病変の結果は、腫瘍の種類別の発生数を TABLE M1, 2 に、統計解析（Peto 検定、Cochran-Armitage 検定、Fisher 検定）の結果を TABLE N1, 2 に示す。また、腫瘍のうち統計学的に有意差が認められた腫瘍について、日本バイオアッセイ研究センターにおける最近 10 年間に行ったがん原性試験（吸入暴露）のヒストリカルコントロールデータを TABLE O1, 2 に示す。さらに、非腫瘍性病変を TABLE P1, 2、各臓器（大脳を除く）における MWCNT の沈着を TABLE P1, 2 に、転移性病変を TABLE Q1, 2 に示す。病理組織所見の代表例は PHOTOGRAPH 12～25 に示す。

- 雄 -

1) 腫瘍性病変

< 肺 >

細気管支 - 肺胞上皮癌の発生が対照群で 1 匹、0.02 mg/m³ 群で 1 匹、0.2 mg/m³ 群で 8 匹、2 mg/m³ 群で 10 匹認められた。Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定では、0.2 mg/m³ 群と 2 mg/m³ 群に増加がみられた。また、これらの群の発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲（最小 0 %～最

大 4 %、平均発生率 1.0 %) を超えた。また、細気管支 - 肺胞上皮腺腫の発生が対照群で 1 匹、0.02 mg/m³ 群で 1 匹、0.2 mg/m³ 群で 7 匹、2 mg/m³ 群で 5 匹認められ、Fisher 検定により 0.2 mg/m³ 群に増加が示された。0.2 mg/m³ 群の発生率は 14 %で、当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 2 % ~ 最大 12 %、平均発生率 5.8 %) を超えた。さらに、細気管支 - 肺胞上皮腺腫と細気管支 - 肺胞上皮癌を合わせた発生も Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 0.2 mg/m³ 以上の群に増加がみられた。また、これらの群の発生率は当センターのヒストリカルコントロールデータの範囲 (最小 2 % ~ 最大 12 %、平均発生率 6.8 %) を超えた。従って、肺の細気管支 - 肺胞上皮腺腫と細気管支 - 肺胞上皮癌の発生増加は MWCNT の暴露によるものと判断した。

細気管支 - 肺胞上皮腺腫では、細気管支または肺胞上皮細胞由来の腫瘍細胞が細気管支や肺胞の内腔を埋める増殖が認められた。また、細気管支 - 肺胞上皮癌では、異型性を示す腫瘍細胞が既存の肺胞構築を破壊する増殖が認められた。

これらの腫瘍に加えて、2 mg/m³ 群では腺扁平上皮癌の発生が 1 匹認められた。腺扁平上皮癌は腺癌と扁平上皮癌の両組織が混在する細気管支 - 肺胞上皮癌と同様の上皮系悪性腫瘍であった。また、腺扁平上皮癌は当センターのヒストリカルコントロールデータにはみられない稀な腫瘍である。

上述の肺にみられた 2 種類の悪性腫瘍 (細気管支 - 肺胞上皮癌と腺扁平上皮癌) を合わせた発生は Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 0.2 mg/m³ 以上の群に増加がみられた。また、肺にみられた 3 種類の腫瘍 (細気管支 - 肺胞上皮腺腫、細気管支 - 肺胞上皮癌及び腺扁平上皮癌) を合わせた発生は、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 0.2 mg/m³ 以上の群に増加がみられた。

なお、肉眼的観察による肺の結節のほとんどは肺腫瘍であり、一部の結節は他臓器腫瘍からの転移であった。

< その他 >

胸膜、腹膜を含め、その他の臓器には暴露による腫瘍の発生増加は認められなかった。

2) 非腫瘍性病変

< 鼻腔 >

鼻腔の呼吸上皮領域において、移行上皮の過形成が全暴露群にみられ、0.2 mg/m³ 以上の群で発生匹数の増加が認められた。この病変の程度はいずれも軽度であった。また、0.2 mg/m³ 以上の群で杯細胞過形成の発生増加が認められ、病変の程度は軽度から中等度であり、暴露濃度に対応した増強もみられた。さらに、呼吸上皮のエオジン好性変化が 0.2 mg/m³ 以上の群でみられ、その程度はおおむね軽度であった。嗅上皮では、重度のエオジン好性変

化が 0.2 mg/m^3 以上の群の多くにみられ、 2 mg/m^3 群では、病変の程度の増強が認められた。移行上皮の過形成は線毛を持たない呼吸上皮（移行上皮）が分布する鼻腔前方（レベル 1）の鼻甲介先端部を中心に認められた。杯細胞過形成は呼吸上皮の粘液産生細胞である杯細胞の増加による病変である。

< 鼻咽頭 >

杯細胞過形成が 0.2 mg/m^3 以上の群で増加した。病変の程度はいずれも軽度であった。

< 肺 >

肺胞壁の限局性肥厚と肉芽腫性変化が 0.02 mg/m^3 群からみられ、 0.2 mg/m^3 以上の群で増加した。細気管支 - 肺胞上皮過形成と肺胞上皮細胞過形成が 0.2 mg/m^3 以上の群で増加した。また、異型過形成、終末細気管支上皮過形成及び肺胞マクロファージの浸潤が 2 mg/m^3 群で増加した。

これらの所見のうち、細気管支 - 肺胞上皮細胞過形成は、細気管支または肺胞由来の上皮細胞が内腔に突出する増生であった。異型過形成は上皮細胞の配列不整や核の大小不同が目立ち、上皮下の線維化、MWCNT を貪食した肺胞マクロファージや多核巨細胞が随伴して認められ、暴露群のみにみられる特徴的变化であった。肺胞上皮細胞過形成は、豊富な細胞質を持つ型肺胞上皮細胞の増生であった。また、終末細気管支上皮過形成は、細気管支終末部に丈の高い円柱上皮の増生がみられ、その一部に線毛が認められる変化であった。これらの肺胞上皮細胞過形成と終末細気管支上皮過形成の病変部には、肺胞マクロファージの浸潤や崩壊像もみられた。肉芽腫性変化は MWCNT を貪食した肺胞マクロファージや多核巨細胞からなる小結節性病変であり、線維化を伴う像が多く観察された。肺胞壁の限局性肥厚は線維化による肥厚であり、肉芽腫性変化と隣接して観察された。肺胞マクロファージの浸潤は、MWCNT を貪食したマクロファージが肺胞腔内に充満する病変であり、胸膜直下や細気管支周囲の肺胞に認められる傾向があった。

肺胸膜（臓側胸膜）では、肥厚が 0.02 mg/m^3 群と 0.2 mg/m^3 群の少数例にみられ、 2 mg/m^3 群で増加した。この病変は線維化による肥厚であり、病変部に隣接する肺胞腔内においても肺胞マクロファージの集簇や崩壊像が認められ、肺胸膜下には炎症性細胞浸潤もみられた。

< 壁側胸膜 >

限局性線維化と中皮の単純過形成の増加が認められた。

胸膜の限局性線維化は 0.2 mg/m^3 群に 2 匹、 2 mg/m^3 群に 6 匹認められ、暴露濃度に対応して増加した。また、中皮の単純過形成は、 2 mg/m^3 群で 12 匹に認められ、対照群の 3 匹に比較して増加した。中皮の単純過形成は横隔膜の胸腔側の中皮や縦隔の表面を覆う中皮の限局性増生として認められ、胸膜下に炎症性細胞浸潤を伴って観察されることが多かった。

< 縦隔 >

炎症性細胞浸潤が 2 mg/m³ 群で増加した。この変化は縦隔胸膜下にリンパ球等の単核細胞を主体とした浸潤として認められ、縦隔の表面を覆う中皮には単純過形成を伴うものもみられた。

< その他 >

0.02 mg/m³ 群と 2 mg/m³ 群の精巣の間細胞過形成が対照群との間に統計学的に有意な差を示したが、暴露濃度に対応した変化ではなかった。また、0.02 mg/m³ 群で骨髄の造血低下、0.2 mg/m³ 群で心臓の心筋線維症、2 mg/m³ 群で鼻腔の鉍質沈着が減少した。また、他の臓器には、特記すべき変化は認められなかった。

3) MWCNT の沈着

光学顕微鏡検査により鼻腔、喉頭、気管、肺、胸膜、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、嗅球及び大脳における MWCNT の有無を検索したところ、全ての臓器に MWCNT が認められた。また、MWCNT の沈着は、大脳では 0.2 mg/m³ 以上の群、鼻腔、喉頭、気管、肺、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、胸膜及び嗅球では全暴露群に認められ、暴露濃度に対応した匹数の増加がみられた。沈着量の程度は、肺の肺胞腔内、気管支関連リンパ組織及び縦隔リンパ節で強く、中等度を示す動物数は暴露濃度に対応して増加した。一方、鼻腔、喉頭、気管、胸膜、縦隔以外のリンパ節（腋窩、鼠径、頸部及び腓リンパ節）、脾臓、肝臓、腎臓、嗅球及び大脳では、MWCNT の沈着量の程度は全て軽度であった。なお、大脳については各群 10 匹を検索した。その結果、MWCNT の観察された匹数は 0.02 mg/m³ 群で 0 匹、0.2 mg/m³ 群で 9 匹、2 mg/m³ 群で 10 匹であった。

沈着していた MWCNT の形状と沈着部位は臓器によって特徴がみられた。鼻腔では、主に移行上皮（鼻腔前方）の粘膜固有層内に MWCNT の沈着が認められた。移行上皮分布領域の中でも特に鼻甲介先端部を中心として認められ、他の組織に沈着したものに比較して径が太く、分岐を持つ MWCNT や凝集した MWCNT もみられた。喉頭や気管では、MWCNT は主に喉頭や気管の粘膜固有層内に認められた。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 はわずかであった。肺胞腔内にみられた MWCNT は比較的長いものが目立っていた。

縦隔リンパ節や肺の気管支関連リンパ組織では、MWCNT を大量に貪食した肺胞マクロファージが容易に観察された。一方、縦隔以外のリンパ節では、光学顕微鏡下の観察で一本として認識されるものが多く、数本の集合体としてみられることもあった。脾臓では、特定の場所に局限した沈着ではなく、濾胞、濾胞辺縁帯、赤脾髄を問わず各所に認められ、MWCNT の沈着の状態は縦隔以外のリンパ節と同様であった。

肝臓では類洞内に観察され、クッパー細胞に貪食された MWCNT もあった。腎臓では主に系球体に認められた。嗅球や大脳では沈着部位に局在はなかった。壁側胸膜では主に横隔

膜中央部（臍中心）から縦隔胸膜にかけて認められた。これらの臓器ではMWCNTは一本の沈着として観察され、沈着繊維の周囲組織には炎症等の組織反応は認められなかった。

- 雌 -

1) 腫瘍性病変

< 肺 >

細気管支 - 肺胞上皮癌の発生が、対照群で 0 匹、0.02 mg/m³ 群で 1 匹、0.2 mg/m³ 群で 0 匹、2 mg/m³ 群で 5 匹認められた。これらの発生は Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2 mg/m³ 群に増加が示された。また、細気管支 - 肺胞上皮癌は当センターのヒストリカルコントロールデータにはみられない稀な腫瘍であった。従って、細気管支 - 肺胞上皮癌の発生は MWCNT の暴露によるものと判断した。

2 mg/m³ 群では、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌の発生が各 1 匹に認められた。扁平上皮癌は角化（錯角化）を伴う扁平上皮細胞の腫瘍性増殖であり、肺胞構築の破壊を示す悪性腫瘍であった。また、低分化型腺癌は主に細胞質の乏しい小型の細胞で形成され、わずかに腺構築を示す腫瘍であり、胸膜への転移を示す悪性腫瘍であった。扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌は当センターのヒストリカルコントロールデータではみられない稀な腫瘍である。従って、これらの腫瘍の発生も MWCNT の暴露によるものと判断した。

上記の肺にみられた 4 種類の悪性腫瘍（細気管支 - 肺胞上皮癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌）を合わせた発生は Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2 mg/m³ 群で増加が示された。また、肺にみられた良性または悪性腫瘍（細気管支 - 肺胞上皮腺腫、細気管支 - 肺胞上皮癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌）を合わせた発生は、Peto 検定（有病率法）と Cochran-Armitage 検定で増加傾向を示し、Fisher 検定で 2 mg/m³ 群に増加がみられた。

なお、肉眼的観察による肺の結節のほとんどは肺腫瘍であり、一部の結節は他臓器腫瘍からの転移であった。

< 子宮 >

子宮内膜間質性ポリープの発生は、対照群で 9 匹、0.02 mg/m³ 群で 8 匹、0.2 mg/m³ 群で 5 匹、2 mg/m³ 群で 5 匹であり、Peto 検定（死亡率法）で増加傾向を示した。しかし、その発生は当センターのヒストリカルコントロールの範囲内（最小 6 % ~ 最大 26 %、平均発生率 14.5 %）であった。従って、子宮内膜間質性ポリープの発生増加は MWCNT の暴露によるものと判断しなかった。また、腺癌の発生は対照群で 2 匹、0.02 mg/m³ 群で 0 匹、0.2 mg/m³ 群で 1 匹、2 mg/m³ 群で 3 匹であり、Peto 検定（有病率法）で増加傾向を示した。このうち、対照群の 2 匹は死因に関与した腫瘍であり、2 mg/m³ 群でみられた 3 匹は

死因に関与しない腫瘍であった。従って、MWCNT の暴露による腺癌の発生増加は起きていないと判断した。

< その他 >

胸膜を含め、他の臓器には暴露による腫瘍の発生増加は認められなかった。

2) 非腫瘍性病変

< 鼻腔 >

鼻腔の呼吸上皮領域においては、移行上皮の過形成が 0.2 mg/m³ 以上の群で観察され、2 mg/m³ 群に発生匹数の増加が認められた。この病変の程度はいずれも軽度であった。また、杯細胞過形成が 0.2 mg/m³ 以上の群で発生増加した。病変の程度は軽度から中等度あり、2 mg/m³ 群では程度の増強もみられた。さらに、呼吸上皮のエオジン好性変化が 0.2 mg/m³ 群で発生増加し、有意ではないものの 2 mg/m³ 群でも発生が多い傾向にあった。これらの病変の程度はいずれも軽度であった。嗅上皮では、重度のエオジン好性変化が 0.2 mg/m³ 以上の群で多くみられ、2 mg/m³ 群では病変の程度の増強がみられた。固有層の腺には、呼吸上皮化生の発生(中等度)が 2 mg/m³ 群で多くみられ、病変の程度の増強が認められた。

< 鼻咽頭 >

杯細胞過形成の発生が全暴露群で増加を示したが、病変の程度はいずれも軽度であった。

< 肺 >

肺胞壁の限局性肥厚と肉芽腫性変化が 0.02 mg/m³ 群からみられ、0.2 mg/m³ 以上の群で増加した。また、細気管支 - 肺胞上皮細胞過形成、異型過形成、肺胞上皮細胞過形成、終末細気管支上皮過形成及び肺胞マクロファージの浸潤が 2 mg/m³ 群で増加を示した。

肺胸膜の線維性肥厚が、0.02 mg/m³ 群と 0.2 mg/m³ 群で少数例にみられ、2 mg/m³ 群では増加した。これらの変化は何れも雄と同様であった。

< 壁側胸膜 >

限局性線維化と中皮の単純過形成が観察された。

限局性線維化は 2 mg/m³ 群のみに 3 匹みられた。また、中皮の単純過形成は 2 mg/m³ 群で 10 匹認められ、対照群の 3 匹に比較してやや多かった。

< その他 >

0.2 mg/m³ 群で下垂体の嚢胞状の程度の増強が認められたが、暴露濃度に対応した変化ではなかった。その他の臓器には、特記すべき変化は認められなかった。

3) MWCNT の沈着

光学顕微鏡検査により鼻腔、喉頭、気管、肺、胸膜、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、嗅球及び大脳について MWCNT の有無を検索したところ、全ての臓器に MWCNT が認められた。MWCNT の沈着は、胸膜と嗅球では 0.2 mg/m^3 以上の群、鼻腔、喉頭、気管、肺、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓及び大脳では全暴露群に認められ、暴露濃度に対応した発生匹数の増加がみられた。沈着量の程度は肺の肺胞腔内及び縦隔リンパ節で強く、中等度を示す動物数は暴露濃度に対応して増加した。一方、鼻腔、喉頭、気管、胸膜、縦隔以外のリンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、嗅球及び大脳では、MWCNT の沈着量の程度は全て軽度であった。沈着していた MWCNT の形態と沈着部位は雄と同様であった。なお、大脳については各群 10 匹を検索した。その結果、MWCNT の観察された匹数は 0.02 mg/m^3 群で 2 匹、 0.2 mg/m^3 群で 10 匹、 2 mg/m^3 群で 10 匹であった。

- 11 - 4 透過型電子顕微鏡 (TEM) による肺組織中の MWCNT の観察

肺組織中の MWCNT を TEM で観察した。その代表例を PHOTOGRAPH 26, 27 に示す。

- 雌雄 -

TEM の観察により肺組織中に中空構造を持つ繊維状物質が認められた。この特徴的な形状から、これらは MWCNT と同定した。また、TEM 観察により、病理組織学的検査で認められた繊維状物質を MWCNT と判断した。

- 11 - 5 死因

病理学的にみた死亡 / 瀕死の原因を TABLE S1, 2 に示す。

- 雌雄 -

暴露群に特定の病変あるいは腫瘍による死亡の増加はみられず、特に、肺腫瘍や肺病変による死亡はみられなかった。

IV 考察及びまとめ

複層カーボンナノチューブ (MWCNT) の吸入によるがん原性を検索するために、MWCNT を雌雄の F344/DuCrI CrIj ラットに全身暴露した。

本試験は、MWCNT 投与 (暴露) 群 3 群と対照群 1 群の計 4 群の構成で、雌雄各群とも 50 匹、合計 400 匹のラット (暴露開始時 6 週齢) を用いた。暴露濃度は、雌雄とも 0 (対照群)、0.02、0.2 及び 2 mg/m³ とし、MWCNT (MWNT-7、保土谷化学工業) を 1 日 6 時間、1 週 5 日間で 104 週間全身暴露 (経気道投与) した。暴露期間中は、吸入チャンバー内の MWCNT の濃度測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) による MWCNT の形態観察、粒度分布測定及び空気動学的質量中位径 (MMAD) の算出、動物の生死及び一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、尿検査を行い、さらに、血液学的検査、血液生化学的検査、解剖時の肉眼観察、臓器重量測定、病理組織学的検査及び透過型電子顕微鏡 (TEM) による肺中の MWCNT の観察を行った。

MWCNT の実測濃度は、0.02 mg/m³ 群で 0.020 ± 0.001 mg/m³、0.2 mg/m³ 群で 0.204 ± 0.014 mg/m³、2 mg/m³ 群で 2.018 ± 0.069 mg/m³ で、設定値に近似した濃度の暴露が確認された。形態観察からは、よく分散した繊維状の MWCNT が認められ、暴露濃度及びサンプリング時期の違いによる差は認められなかった。また、粒度分布測定でも暴露濃度及びサンプリング時期の違いによる差は認められず、MMAD は、1.2 ~ 1.4 µm、幾何標準偏差 (σ_g) は 2.6 ~ 3.0 であった。

動物の生死確認では、雌雄各群の生存動物は、対照群と暴露群との間に差は認められず、雄では 36 匹以上、雌では 34 匹以上生存した。一般状態の観察では特記すべき所見は認められなかった。

体重は、雄では対照群と暴露群との間に差は認められなかった。雌では、2 mg/m³ 群で暴露 1 週、暴露最終段階の 102 週と 104 週で低値が認められたが、その変化は僅かなものであった。

血液学的検査では、雄の 2 mg/m³ 群で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値及び白血球数の増加がみられた。雌では、白血球数が全暴露群で高値であった。尿検査及び血液生化学的検査では、雌雄に特記すべき変化はみられなかった。

解剖時の肉眼的観察では、雌雄の 0.2 mg/m³ 以上の群で肺の結節が観察され、さらに、雌雄とも 2 mg/m³ 群に肺の白色斑や黒色斑が全葉に散在性にみられた。肺の結節のほとんどは病理組織学的検査で肺腫瘍であったが、一部の結節は他臓器腫瘍からの転移であった。肺の白色斑は胸膜の線維性肥厚や肺胞腔内へのマクロファージ浸潤に対応する変化であり、肺の黒色斑や縦隔リンパ節の黒色調変化は MWCNT の沈着に対応した変化であった。

臓器重量では、雄は 0.2 mg/m³ 以上の群、雌では 0.02 mg/m³ 以上の群から肺の重量増加が認められ、雌雄とも 2 mg/m³ 群の増加が顕著であった。雄の 0.2 mg/m³ 以上の群と雌の 2 mg/m³ 群での肺重量の増加は、腫瘍や肺胞マクロファージ浸潤や肺胞壁の線維性肥厚等の

肺の病理組織学的変化に対応するものと考えたが、雌の 0.2 mg/m^3 以下の暴露群では肺重量の増加に対応する病理組織学的変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、雌雄の肺に腫瘍や腫瘍に関連する病変が認められ、鼻腔、鼻咽頭、肺、胸膜にも MWCNT 暴露による非腫瘍性変化が認められた。また、MWCNT の沈着が鼻腔、喉頭、気管、肺、胸膜、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、嗅球及び大腦に観察された。

肺には雌雄とも細気管支 - 肺胞上皮癌の発生増加がみられた。さらに雄では腺扁平上皮癌、雌では扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌の発生が認められた。細気管支 - 肺胞上皮癌の発生増加は、雄では 0.2 mg/m^3 以上の群、雌では 2 mg/m^3 群で認められた。また、細気管支 - 肺胞上皮由来の腫瘍の前段階と考えられる細気管支 - 肺胞上皮細胞過形成 (文献 10) も腫瘍の発生と同じ濃度で増加を示した。これらに加えて、雄で腺扁平上皮癌、雌で扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌が少数例認められた。これらの腫瘍は、いずれも当センターのヒストリカルコントロールデータではみられない稀な腫瘍であった。従って、肺癌 (細気管支 - 肺胞上皮癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌) の発生増加は雌雄のラットに対するがん原性を示す証拠と考えた。

上記腫瘍及び腫瘍関連病変に加えて、異型過形成が雌雄とも 2 mg/m^3 群で増加した。異型過形成は異型を伴った上皮細胞の増殖性病変であるが、しばしば腫瘍細胞との鑑別が困難となる病変であり、細気管支 - 肺胞上皮癌の一部は、異型過形成から進展した可能性がある。

また、肺胞上皮細胞過形成が雄の 0.2 mg/m^3 以上の群と雌の 2 mg/m^3 群で増加し、終末細気管支上皮過形成が雌雄の 2 mg/m^3 群で増加した。肺胞上皮細胞過形成は Ⅱ型肺胞上皮細胞の増生による変化であり、Ⅱ型肺胞上皮細胞は Ⅰ型肺胞上皮細胞に傷害が起こると分裂増殖し、傷害を受けた細胞に置き換わることが知られている (文献 11)。従って、肺胞上皮細胞過形成は肺胞上皮の傷害に対する反応性の過形成と考えられる。また、終末細気管支上皮過形成は細気管支上皮細胞の増殖性病変、あるいは Ⅱ型肺胞上皮細胞が化生 (分化転換) を起こしたことによる可能性があり (文献 10)、今回観察された形態的特徴からどちらかに分類することは困難であるが、MWCNT 暴露による反応性の変化と考えた。

さらに、肺胞壁の限局性線維性肥厚及び肉芽腫性変化が、雌雄とも 0.2 mg/m^3 以上の群で増加した。この変化は 13 週間試験 (文献 6) でもみられた MWCNT 暴露特有の変化であった。これらに加え、肺胸膜の線維性肥厚は雌雄とも 2 mg/m^3 群で増加した。肺胸膜の線維性肥厚は、胸膜下に炎症性細胞浸潤を伴って認められた。この病変は、肺胸膜に隣接する肺腔内に MWCNT を貪食した肺胞マクロファージの集簇や崩壊像を伴っていた。肺胞内の異物を排泄する経路には、細気管支や血管周囲のリンパ流路に加え、胸膜下のリンパ流路があることが知られており (文献 12)、上記の病変は MWCNT の肺からのクリアランスに関連した変化と考えた。

壁側胸膜では、限局性線維化と中皮の単純過形成が 2 mg/m^3 群で増加した。限局性線維化は暴露群のみにみられたことから MWCNT 暴露による変化と考えた。一方、中皮の単純過形成は対照群にもみられる変化であり、暴露濃度に対応した発生の増加がみられた。中皮

の単純過形成は横隔膜や縦隔の表面を覆う中皮に観察され、炎症性細胞浸潤を伴うことが多かった。本試験を補完するために非 GLP 下で行った、SEM 観察による胸腔洗浄液中の MWCNT 計測結果では、濃度に対応した本数の増加が認められ、中皮の単純過形成の発生増加は胸腔洗浄液中の MWCNT 量と対応していた。

MWCNT の発がん性に関しては、p53 遺伝子欠損マウスを使用した腹腔内投与(文献 13)や F344 ラットの陰嚢内への投与(文献 14)によって中皮腫の発生が報告されている。また、最近では Wistar ラットの腹腔内へ長さや形態が異なる 4 種類の MWCNT をそれぞれに投与した結果、いずれの MWCNT においても腹膜中皮腫が発生したと報告された(文献 15)。しかしながら、MWCNT の全身吸入暴露による本試験では、胸膜中皮に反応性過形成は認められたが、胸膜や腹膜に中皮腫の発生増加はみられなかった。本試験を補完するために非 GLP 下で行った胸腔及び腹腔洗浄液中の SEM 観察で、MWCNT は暴露濃度に対応して増加した。特筆すべきは、これらの洗浄液中には、直径 70 nm、長さ 5 μ m 付近の分岐を持たない直線的で、凝集していない単独の MWCNT しか観察されなかったことである。前述の MWCNT の腹腔内あるいは陰嚢内投与による報告では、投与液中に MWCNT の凝集体も多く含まれ、MWCNT の形態は多種多様であり、本試験の体腔液中に存在する MWCNT の量と形態とは大きく異なっていた。従って、MWCNT の形態と量の差異が本試験で中皮腫の発生に至らなかった一つの要因と推察された。

本試験に用いた MWCNT は直線性の繊維状構造を持ち、表面の化学的性質は異なるが、細くて長い形態や機械的強度といった物理学的特徴は、アスベストに類似すると考えられている。アスベストの吸入暴露による雄ラットを用いたがん原性試験では、肺腫瘍と中皮腫の発生が報告されている。発生した肺腫瘍の種類は、アモサイトでは腺腫、腺癌、扁平上皮癌及び分類不能肺癌であり(文献 16)、クリソタイルでは腺腫、腺癌、扁平上皮癌(文献 17)であった。本試験でもこれらと同様な肺の腺腫及び癌の発生が示され、アスベストとの類似性が認められた。一方、胸膜中皮腫の発生は、アモサイトやクリソタイルの試験では少数認められているが、本試験での発生はなかった。

鼻腔では雌雄とも呼吸上皮領域の移行上皮の過形成、杯細胞過形成及びエオジン好性変化並びに嗅上皮のエオジン好性変化の発生増加や程度の増強が 0.2 mg/m³ 以上の群で認められ、雌で固有層の腺の呼吸上皮化生が 2 mg/m³ 群で増加した。また、鼻咽頭においても杯細胞過形成が雄の 0.2 mg/m³ 以上の群と雌の全暴露群で増加した。移行上皮の過形成は、鼻腔前方(レベル 1)鼻甲介の先端部を中心に認められ MWCNT の沈着部位と一致していた。特に異型を持った細胞がみられなかったことから、本試験でみられた移行上皮の過形成は MWCNT の機械的刺激に対する反応性の過形成と考えた。また、杯細胞過形成や腺組織の呼吸上皮化生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 10)ことから、MWCNT の暴露により反復刺激を受けた結果発生したと考えた。その他、呼吸上皮と嗅上皮エオジン好性変化は加齢によりラットにみられる変化(文献 8)ではあるが、MWCNT の 13 週間吸入暴露でみられていることから(文献 6)、加齢性変化のみならず MWCNT

の暴露による刺激に対する反応性または適応性の変化と考えた。

V 結論

MWCNT を 0、0.02、0.2 及び 2 mg/m³ の濃度で 2 年間にわたり雌雄の F344/DuCrI Crj ラットに全身暴露した結果、雄では 0.2 mg/m³ 以上の群、雌では 2 mg/m³ 群で肺の悪性腫瘍の発生増加が認められた。従って、MWCNT (MWNT-7) はラット雌雄への全身暴露により明らかながん原性を示すと結論する。

文献

1. Hodogaya Chemical Co., Ltd. 2010. Multi-Walled Carbon Nanotube Inspection Sheet. No.2010-0001
2. 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．
3. Takaya M, Serita F, Yamazaki K, Aiso S, Kubota H, Asakura M, et al. 2010. Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats. Ind Health. 48: 452-459.
4. 労働省労働基準局長. 1997. がん原性試験による調査の基準. 基発第 144 号, 平成 9 年 3 月 11 日
5. OECD. 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals 451 “Carcinogenicity Studies”. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
6. 日本バイオアッセイ研究センター．2012．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．神奈川：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．
7. 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.
8. 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.

9. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. 1980. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. Lyon: IARC. IARC Monographs Suppl 2:311-426.
10. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, et al. 2009. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicol Pathol* 37: 5S-73S.
11. Hanspeter R, Jerald A. Toxic Responses of the Respiratory System. 2001. In: Casarett & Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons, 6th ed. (Klaassen CD, ed). New York : McGraw-Hill Companies, Inc, 595-617.
12. Morrow PE. 1972. Lymphatic drainage of the lung in dust clearance. *Ann N Y Acad Sci.* 29: 46-65.
13. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, et al. 2008. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.*33: 105-116.
14. Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, et al. 2009. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 34: 65-76.
15. Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A, et al. 2014. The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part Fibre Toxicol.* 11:59.
16. Davis JM, Addison J, Bolton RE, Donaldson K, Jones AD, Smith T. 1986. The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection. *Br J Exp Pathol.* 67: 415-430.
17. Davis JM, Jones AD. 1988. Comparisons of the pathogenicity of long and short fibres of chrysotile asbestos in rats. *Br J Exp Pathol.* 69: 717-737.

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。

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
試験方法	2
- 1 肺内の MWCNT の測定	2
- 2 気管支肺胞洗浄液の検査	2
- 3 胸腔洗浄液の検査	2
- 4 腹腔洗浄液中の MWCNT の有無の確認及び形態観察	3
数値処理と統計方法	3
- 1 数値の取り扱いと表示	3
- 2 統計処理	3
結果	4
- 1 肺内の MWCNT の測定	4
- 2 気管支肺胞洗浄液の検査	4
- 2 - 1 細胞学的検査及び生化学的検査	4
- 2 - 2 MWCNT の測定	5
- 3 胸腔洗浄液の検査	5
- 3 - 1 細胞学的検査	5
- 3 - 2 MWCNT の有無の確認及び形態観察	6
- 4 腹腔洗浄液中の MWCNT の有無の確認及び形態観察	6
考察及びまとめ	7
結論	8
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 $6.32 \pm 1.61 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群は $100.44 \pm 12.78 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群は $1161.07 \pm 94.30 \mu\text{g}$ 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 $7.49 \pm 1.86 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群で $102.93 \pm 15.54 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群で $787.04 \pm 68.11 \mu\text{g}$ であった。雌では、0.02 mg/m³ 群で $5.53 \pm 1.25 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群は $76.74 \pm 8.69 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群は $747.19 \pm 50.27 \mu\text{g}$ であった。同じく肺 1g あたりでは、0.02 mg/m³ 群で $9.69 \pm 2.39 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群で $115.02 \pm 16.68 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群で $667.92 \pm 48.74 \mu\text{g}$ 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。

試験方法

- 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。

- 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

- 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）

- 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、シスメックス株）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株）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（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。

- 4 腹腔洗浄液中のMWCNTの有無の確認及び形態観察

- 2 の気管支肺胞洗浄液の検査動物と - 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。

数値処理と統計方法

- 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。

- 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。

結果

- 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 $6.32 \pm 1.61 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群は $100.44 \pm 12.78 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群は $1161.07 \pm 94.30 \mu\text{g}$ 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 $7.49 \pm 1.86 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群で $102.93 \pm 15.54 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群で $787.04 \pm 68.11 \mu\text{g}$ 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 $5.53 \pm 1.25 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群は $76.74 \pm 8.69 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群は $747.19 \pm 50.27 \mu\text{g}$ 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 $9.69 \pm 2.39 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群で $115.02 \pm 16.68 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群で $667.92 \pm 48.74 \mu\text{g}$ であった。

- 2 気管支肺胞洗浄液の検査

- 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。

- 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。

- 3 胸腔洗浄液の検査

- 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。

- 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/m^3 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 $5 \mu\text{m}$ 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。

- 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/m^3 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 $6.32 \pm 1.61 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群は $100.44 \pm 12.78 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群は $1161.07 \pm 94.30 \mu\text{g}$ 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 $7.49 \pm 1.86 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群で $102.93 \pm 15.54 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群で $787.04 \pm 68.11 \mu\text{g}$ であった。雌では、0.02 mg/m³ 群で $5.53 \pm 1.25 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群は $76.74 \pm 8.69 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群は $747.19 \pm 50.27 \mu\text{g}$ であった。また、同じく肺 1 g あたりでは、0.02 mg/m³ 群で $9.69 \pm 2.39 \mu\text{g}$ 、0.2 mg/m³ 群で $115.02 \pm 16.68 \mu\text{g}$ 、2 mg/m³ 群で $667.92 \pm 48.74 \mu\text{g}$ 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	150 ± 40					
	0.2	5	296 ± 67	38 ± 15	60 ± 19	22 ± 16	176 ± 56					
	2	5	486 ± 86 **	126 ± 21 **	134 ± 38 **	44 ± 22 **	182 ± 33					
Female	0	5	178 ± 59	42 ± 19	34 ± 21	4 ± 5	96 ± 33					
	0.02	5	196 ± 63	24 ± 22	28 ± 15	4 ± 5	140 ± 37					
	0.2	5	296 ± 74	58 ± 23	86 ± 53	14 ± 11	138 ± 30					
	2	6	622 ± 119 **	170 ± 63 **	103 ± 42 **	70 ± 32 **	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

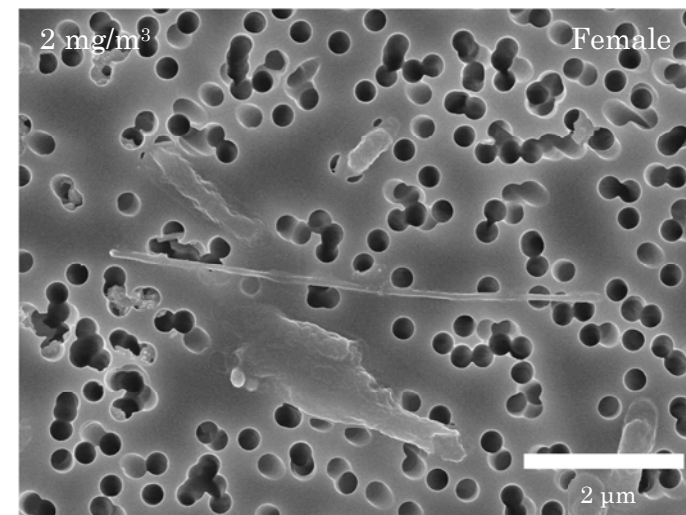
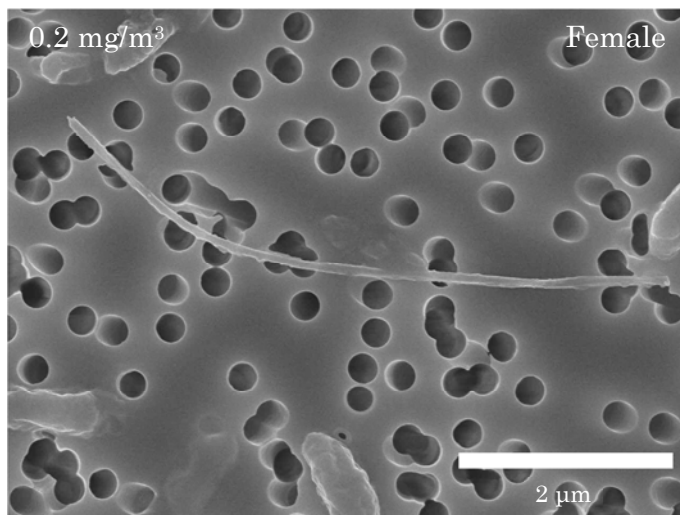
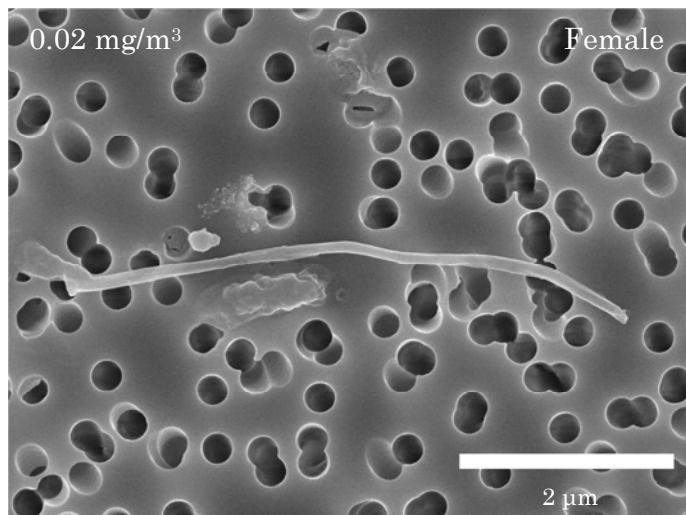
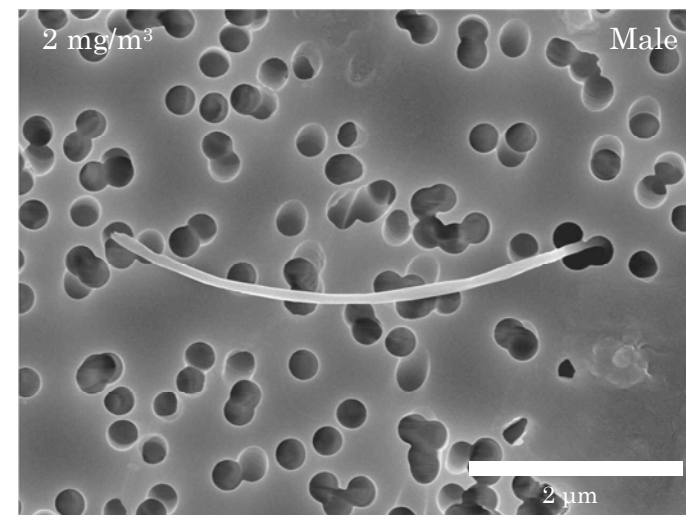
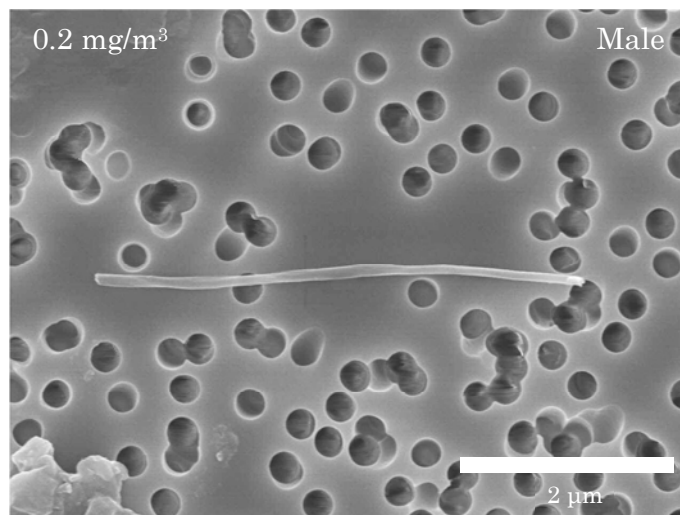
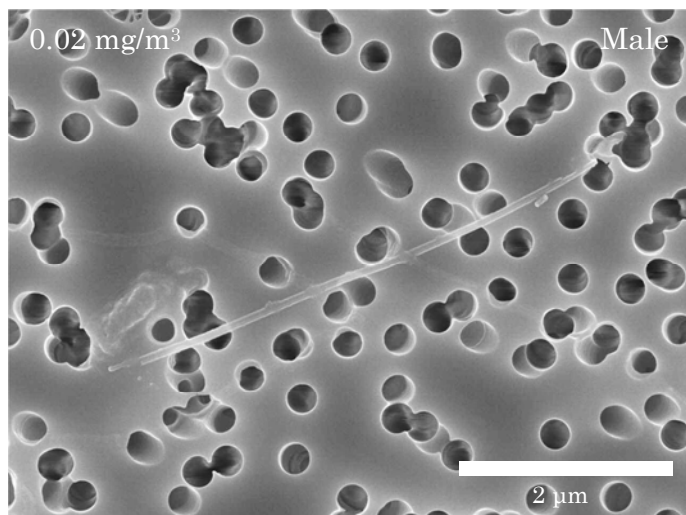
PHOTOGRAPH 1 PLEURAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM

PHOTOGRAPH 2 ABDOMINAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM

PHOTOGRAPHS 1

PLEURAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM

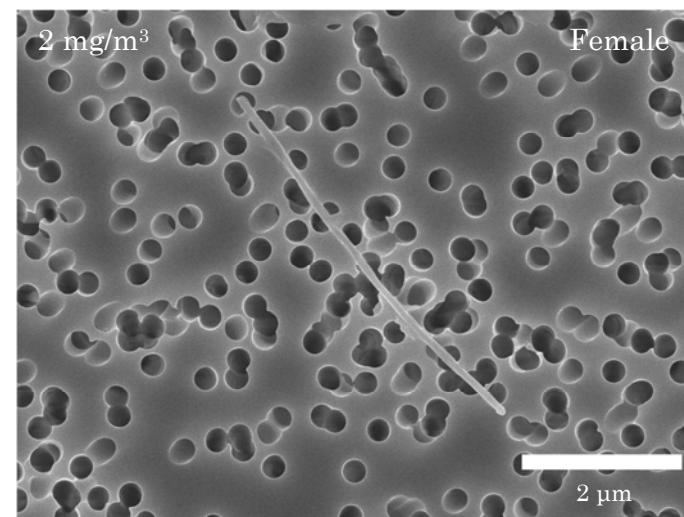
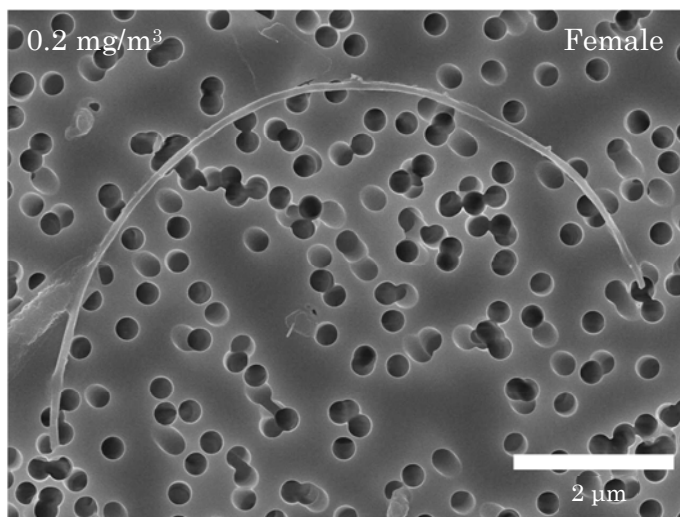
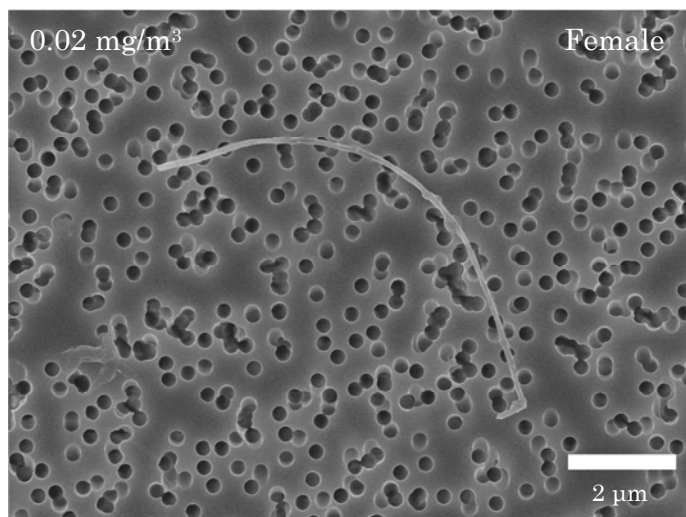
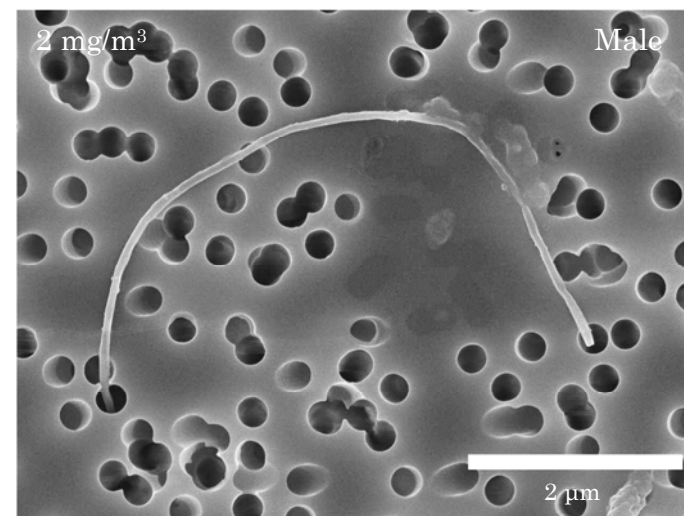
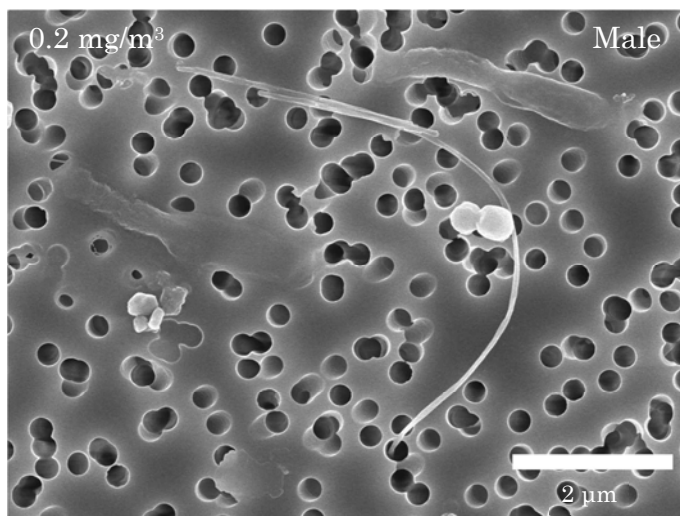
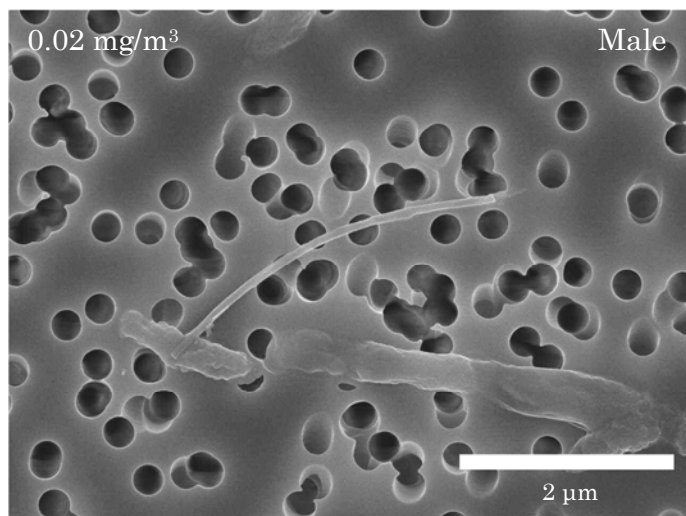
PHOTOGRAPH 1 PLEURAL LAVAGE FLUID OBSERVATION BY SEM



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.)