

れる。

## E. 結論

カーボンナノファイバーの生体影響評価用サンプルの合成を目的として、FNW の形状制御と熱処理による変性の研究を行った。その結果、

- (1) 平均長さ 1.3  $\mu\text{m}$  の短い FNW の合成に成功した。
- (2) 水が FNW の安定性に影響を与えることが明らかになった。このことは、FNW の生分解性と密接に関係している。
- (3) 断面 TEM 観察により、多孔質の内部層と緻密な表面層からなる FNW のコア-シェル構造を明らかにした。
- (4) 900°C の真空熱処理により、FNW どうしの凝着が生じた。900°C で真空熱処理した FNW の密度は、熱処理前の密度とほぼ等しく、 $\text{C}_{60}$  のケージは、この熱処理によって、完全には破壊されないと考えられる。凝着は、 $\text{C}_{60}$  ケージ間の炭素-炭素結合によって生じたことが考えられる。

## 参考文献

- [1] T.Kuzumaki, K.Miyazawa, H.Ichinose and K.Ito, *J.Materials Research*, **13**[9](1998)2445.
- [2] A.Takagi, A.Hirose, T.Nishimura, N.Fukumori, A.Ogata, N.Ohashi, S.Kitajima and J.Kanno, *J. Toxicol.Sci.*, **33**(2008)105.
- [3] C. A. Poland, R. Duffin, I.Kinloch, A.Maynard, W. A. H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. Macnee and K.Donaldson, *Nature Nanotechnology*, **3**(2008)423.
- [4] S.Nudejima, K.Miyazawa, J. Okuda-Shimazaki and A. Taniguchi, "Biodegradation of  $\text{C}_{60}$  Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells", *ADVANCES IN BIOMEDICAL RESEARCH*, 2010, pp.89-94.
- [5] Z. -M. Wang, R. Kato, K. Hotta and K.

Miyazawa, *Journal of Physics: Conference Series* 159 (2009) 012013.

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

(論文発表)

1. K. Miyazawa and K. Hotta, "The effect of solvent ratio and water on the  $\text{C}_{60}$  nanowhiskers", *J. Cryst. Growth*, **312** (2010) 2764.
2. K.Miyazawa and K. Hotta, "The effect of water on the stability of  $\text{C}_{60}$  fullerene nanowhiskers", *Journal of Nanoparticle Research*, DOI 10.1007/s11051-010-0132-y.
3. R. Kato and K. Miyazawa, "Cross-sectional structural analysis of  $\text{C}_{60}$  nanowhiskers by transmission electron microscopy", *Diamond & Related Materials*, **20** (2011) 299.

(学会発表)

1. K. Miyazawa, K. Hotta and Y. Akasaka, "Growth control of  $\text{C}_{60}$  fullerene nanowhiskers", Abstract book, X Internatioal Conference on Nanostructured Materials, NANO2010, Roma, Italy, September 13-17, P.131.
2. R. Kato and K. Miyazawa, "Raman spectroscopy of  $\text{C}_{60}$  nanowhiskers under various exposure conditions of laser beam", Abstract book, X Internatioal Conference on Nanostructured Materials, NANO2010, Roma, Italy, September 13-17, P.16.
3. 櫛島真一, 宮澤薫一, 奥田順子, 谷口彰良, "マクロファージ様細胞を用いたフラーレンナノウィスカーと生体との相互作用の研究", *日衛誌*, 65[2](2010)338, 第 80 回日本衛生学会学術総会講演集, 2010 年 5 月 9 日(日)~11 日(火), 仙台国際センター.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 加藤良栄,宮澤薫一,“フラーレン細線の光重合体の製造方法”, 特願 2010-259653.
2. 実用新案登録  
(該当なし)
3. その他  
(該当なし)

研究課題名:ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を  
含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名:ナノマテリアルの基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究者:広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 室長  
研究協力者:平田 睦子 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究員  
研究協力者:小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究員  
研究協力者:高橋 美加 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 研究員  
研究協力者:加藤 日奈 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 研究員

#### 研究要旨

本研究では、健康影響評価研究の国際動向調査の一環として、各国が自主的に行うおこなうスポンサーシッププログラムへの日本政府の対応としてのデータ提供のサポートを行うと共に、OECDの産業用ナノマテリアル作業グループ(WPMN)の最新情報を収集することを目的としている。今年度は、我が国が担当しているスポンサーシッププログラム担当物質のうち、基礎的な毒性試験データ提供として単層型カーボンナノチューブ(SWCNT)およびフラーレン(C60)の皮膚刺激性試験(OECD\_TG404)と、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)及びSWCNT、C60の皮膚感作性試験(OECD\_TG406)を行った。その結果、皮膚刺激試験においては、直接貼付法と分散液添付法のいずれの手法においても両SWCNTとC60に刺激性は認められなかった。また、感作性試験においては、MWCNT,SWCNT および C60 のいずれも皮膚感作性は認められなかった。

#### A. 研究目的

ナノテクノロジーは、「ナノメートルサイズのスケールで原子や分子を自由に操作・制御し、物質の構造・配列を制御することで、新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術」とされ、国家戦略としてその開発が進められている。この中でも、フラーレンやカーボンナノチューブに代表されるナノサイズの新素材であるナノマテリアルは薬物輸送を含む医療への展開を初めとした各種の応用が急速に進んでいるところであるが、その物性を適切に考慮した評価研究の進展が望まれている。現在、国際的にも積極的に安全性評価に関する研究が進められており、国際的な調和を目的とした枠組みとしては、OECDにおいても産業用ナノマテリアルの作業グループが設置

され、国際的にも評価システムの検証作業が進行している。この作業グループの中でも代表的なナノマテリアルを用いた評価検証作業プロジェクト(SG3)において、各国が自主的に行うおこなうスポンサーシッププログラムが行われおり、日本はフラーレンおよび単層・多層カーボンナノチューブについてリード国として初期評価文書の作成を担当している。本研究は、OECDにおけるナノマテリアルの評価作業に関する動向調査と、日本政府のとしてのスポンサーシッププログラムへの対応をサポートする目的で、基礎的な毒性試験データを提供することを目的としている。

#### B. 研究方法

20年度は、単層型カーボンナノチューブ(SWCNT)

およびフラーレン (C60) の皮膚刺激性試験 (OECD\_TG404) と、2種類の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 及び SWCNT、C60 の皮膚感作性試験 (OECD\_TG406) を行った。また、2011年3月に行われた OECD の産業用ナノマテリアルの作業グループ会議およびスポンサーシッププログラムの概要について情報収集を行った。

## C. 研究結果

### 1. 皮膚刺激性試験

#### 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)

被検物質の適用量以外は、OECD\_TG404 に準拠したウサギを用いた皮膚刺激性試験として行った。まず、皮膚刺激性試験を行うための分散条件について検討した。昨年度の多層カーボンナノチューブでの検討結果を参考にして、固体状態のままリント布に載せる手法とシリコーンオイルと超音波ホモジナイザー (SONIFIER model 250、BRANSON) を用いて、肉眼的に分散して溶液状として扱うことが可能な 0.3% 溶液を用いる手法により実施することとした。具体的には、固体状態での適用手法では、被験物質 Nikkiso SWCNT (SW1862) を電子天秤で 0.02 g を量りとり、0.5 mL のシリコーンオイルで湿らせ、約 2.5×2.5 cm にカットしたリント布に伸べて、可能な限り均一に伸展させた。リント布に伸展させた状態を図 1 に示す。分散液を用いた手法では、0.06 g の必見物質を電子天秤を用いてピーカーに秤量し、シリコーンオイルを 20 mL を加えて 0.3% の濃度となるように分散液を調製し、超音波ホモジナイザーを用いて 5 分間を 4 回 (出力 4~5)、氷で冷却しながら超音波処理した。超音波処理は投与液が十分に冷却されていることを確認しながら、5~10 分間隔で実施した。被験物質の調製は投与当日に行った。調製した投与液 0.5 mL を約 2.5×2.5 cm にカットしたリント布に滴下した。リント布に伸展させた状態を図 2 に示す。また分散の程度を確認するため、分散液の少量をスライドガラスにのせ、光学顕微鏡下で写真撮影 (x 100) したものを、

図 3 に示した。

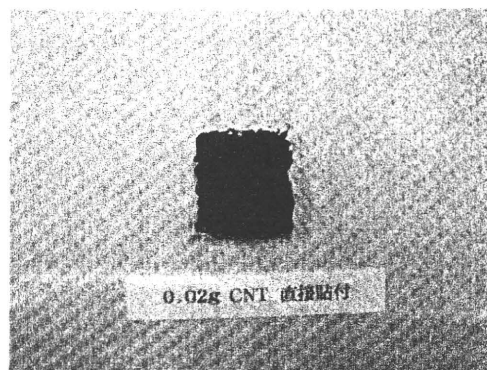


図 1 単層カーボンナノチューブ 0.02 g 直接貼付

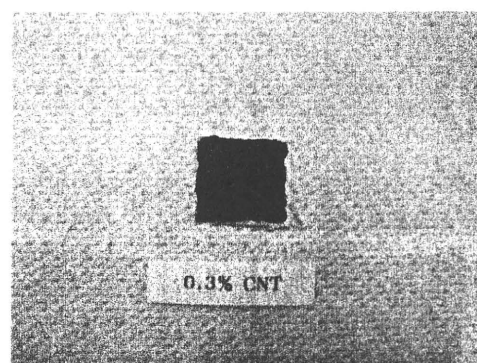


図 2 単層カーボンナノチューブ 0.3% 分散液 貼付

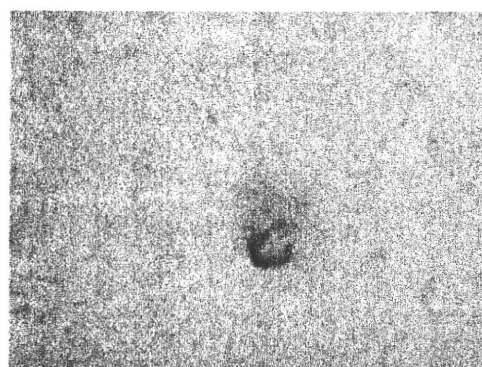


図 3 単層カーボンナノチューブ 0.3% 分散液 (x100)

上記で調製した被験物質を伸展あるいは滴下したリント布 (約 2.5×2.5 cm) を、背部の 3ヶ所に貼付した。その際、被験物質同士が干渉せず、判定に支障をきたさない程度の間隔を開けた。貼付後防湿ゴム (レディーカットダム、白水貿易株) で貼付部位を覆い、更にその上から粘性伸縮包帯 (フィクソルムル、テルモ株) で固定し、布製の固定バンドを巻き、保護した。閉塞貼付約 4 時間後に固定用包帯等を静かに剥がし、シリコーンオイルを含ませた脱脂綿で、皮膚に残留した被験

物質を除去した。

被験物質除去約 1, 24, 48, 72 時間後に表 1 の判定基準によって判定を行った。皮膚刺激性反応所見を表 2 に示すが、被験物質の直接貼付 (0.02 g) 及び 0.3 % 分散液、また媒体を貼付した部位では、除去 1 時間後から 72 時間後まで、いずれの観察時点においても紅斑及び浮腫は認められなかった。この結果は、各個体について被験物質除去約 1, 24, 48, 72 時間後の観察時における投与部位の紅斑及び浮腫の点数を合算し、観察数で割った後、各個体の点数を加算し、動物数で除して皮膚一次刺激評点(PII)を算出し、以下に従い評価した。

刺激性:	なし	:	PII=0
	軽度	:	0<PII≤2
	中等度	:	2<PII≤5
	強度	:	5<PII

その結果、皮膚一次刺激評点(PII)は 0.0 と算出され、単層カーボンナノチューブは刺激性なしに分類された。

#### フラーレン

まず、フラーレン( (nanom purple SU (C60 昇華精製品)、フロンティアカーボン(株) ) の分散方法の検討を行った。最初に 5%アラビアゴムを用いて 20%から検討を実施した。フラーレン 4 g を秤量し、20 mL のアラビアゴムを入れ、超音波ホモジナイザーを用いて超音波処理 (出力 4, 5 分間を 3 回) した。沈殿がみられたことから、超音波処理を 5 分 2 回追加した。(図 4)

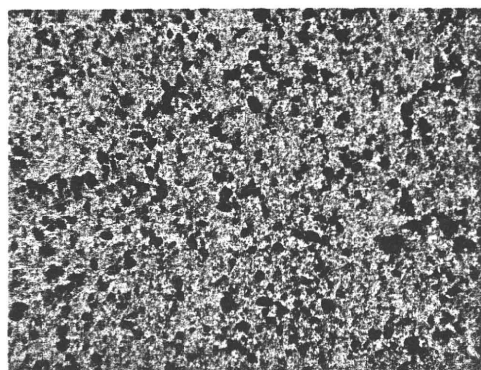


図 4 20% フラーレン 溶媒: 5% アラビアゴム

次に、シリコンオイルでの検討を行った。フラーレン 4 g を秤量し、20 mL のシリコンオイルを入れ、超音波ホモジナイザーを用いて超音波

処理 (出力 5, 5 分間を 3 回) した。沈殿がみられたことから、超音波処理を 5 分 2 回 (出力 7) 追加。(図 5) この溶媒では、超音波処理中にホモジナイザーの破砕ホーンにフラーレンが大量に付着してしまうため、濃度が低くなってしまう可能性があることが判明した。

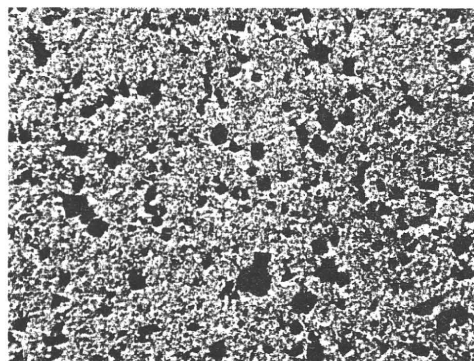


図 5. 20% フラーレン、溶媒: シリコンオイル

以上の結果、用いる溶媒はフラーレンの付着を考えると 5%アラビアゴムを用いた方が良いと思われた。

本試験では、さらに、ナノチューブで検討したように、固体状態のままリント布に載せる手法を実施した。被験物質フラーレンを電子天秤を用いて、0.02 g を量りとり、0.2 mL の 5%アラビアゴム水溶液で湿らせ、約 2.5x2.5 cm にカットしたリント布に伸べて、可能な限り均一に伸展させた。リント布に伸展させた状態を図 6 に示す。

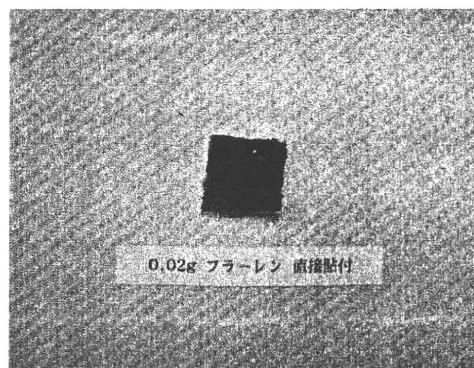


図 6 フラーレン 0.02 g 直接貼付

分散液を用いた手法では、被験物質 2 g を電子天秤を用いて秤量し、5%アラビアゴム水溶液を 10 mL を加えて 20%の濃度となるように分散液

を調製し、超音波ホモジナイザーを用いて5分間を3回(出力4~5)、氷で冷却しながら超音波処理した。超音波処理は投与液が十分に冷却されていることを確認しながら、5~10分間隔で実施した。被験物質の調製は前日に行って室温、遮光下で保管し、投与当日に氷冷下で5分間超音波処理した後使用した。投与液0.5 mLを約2.5~2.5 cmにカットしたリント布に滴下した。リント布に伸展させた状態を図7に示す。また分散の程度を確認するため、分散液の少量をスライドガラスののせ、光学顕微鏡下で写真撮影(x 100)したものを、図8に示した。

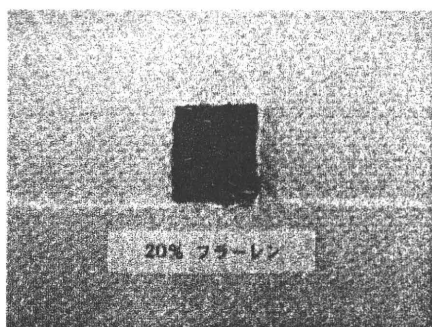


図7 フラールン 20%分散液貼付

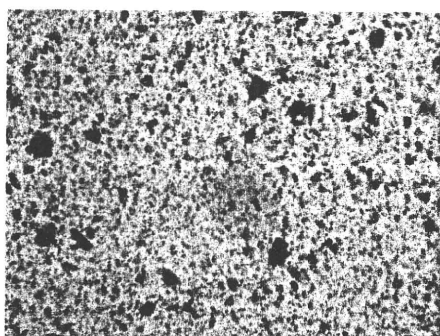


図8 フラールン 20%分散液 (x100)

添付方法や暴露時間、結果の判定基準等は、上述の単層ナノチューブでの刺激性試験と同様の方法で行った。結果として、表3に示す様に、被験物質の直接貼付(0.02 g)及び20%分散液、また媒体を貼付した部位では、除去1時間後から72時間後まで、いずれの観察時点においても紅斑及び浮腫は認められなかった。また、皮膚一次刺激評点(PII)は0.0と算出され、フラールンは刺激性なしに分類された。

## 2. 皮膚感作性試験

### 多層カーボンナノチューブ

H21年度に行った2種類のMWCNT(30ナノクラスCNT(Nikkiso)およびMWCNTパウダーサンプル(MWCNT-7:Mitsui)について)皮膚刺激性試験を行った。分散方法は、H21年度の皮膚刺激性試験における分散性の検討と試験結果を考慮して、被験物質液をシリコーンオイルを溶媒として用いて分散液を調製することとした。分散条件は、ホモジナイザー(POLYTRON PT-MR2100, KINEMATICA AG)を用いて目盛6の強さで、約20秒間処理、または0.25%分散液では、短時間に区切りながら2-3分処理後、約30分間超音波処理することとし、得られた分散液は2×2 cmにカットしたリント布に分散液0.2 mLをのせて馴染ませた後、試験に供することとした。試験方法はOECD\_TG406のBuehler法により評価することとした。用量設定試験(0.025~0.25%)の結果、最高濃度である0.25 w/v%において両方のMWCNT共に皮膚刺激性が認められなかったことから、感作濃度、惹起濃度ともそれぞれ0.25 w/v%と設定した。それぞれのMWCNTの0.25%分散液の光学顕微鏡下で写真撮影(x 200)したものを、図9および図10に示した。陽性対照物質試験は、通常使用されているDNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)を感作濃度1.0 w/v%、惹起濃度0.1 w/v%に設定して行った。



図9. 30ナノクラスCNT 0.25%分散液 (x200)



図10. MWCNT-7 0.25%分散液 (x200)

感作誘導処置としては、感作実施前日に、左側腹側部を電気バリカン及び電気シェーバーを用いて、刈毛して貼付（投与）部位を作製した。感作日に約 2 X 2 cm の適用部位に各被験物質をしみ込ませたリント布を貼付した。貼付後防湿ゴム（レディーカットダム、白水貿易㈱）で貼付部位を覆い、さらにその上からサージカルテープ（シルキーテックス、アルケア㈱）で覆い、固定した。6 時間閉塞し、シリコンオイルを含ませた脱脂綿で皮膚に残留した被験物質を拭き取った。再感作として、初回感作の 7 及び 14 日後に初回感作と同様の処置を行った。

惹起処置としては、最終感作（3 回目の感作）の 14 日後、除毛した部位に陰性対照群及び被験物質感作群は 0.25 % の被験物質 0.2 mL を感作時と同様の方法で右側腹側部に適用した。陰性対照群は各の MWCNT サンプルが干渉しない程度の間隔を開けて右側腹側部に適用した。陽性対照群及び陽性対照非感作群はともに、0.1% の DNCB 0.2 mL を適用した。6 時間閉塞後、アセトンを含ませた脱脂綿で皮膚に残留した被験物質又は DNCB を除去した。感作、惹起共に閉塞貼付除去 24 及び 48 時間後に塗布部位の皮膚反応を以下の判定基準に従い評価した。

膚反応の評価基準	評点
肉眼的変化なし	0
散在性または斑状の紅斑	1
中等度びまん性紅斑	2
強い紅斑と浮腫	3

データの評価法は、各評価時点での評点を合計し、平均評価点を求め、さらに陽性率（陽性動物数 / 当該群の動物総数）X 100 を求めた。また、得られた陽性率から、以下の表 2 の評価基準を用いて感作性の程度を評価した。ただし陽性率 0% の場合は感作性陰性とした。

肉眼的変化なし	0
散在性または斑状の紅斑	1
中等度びまん性紅斑	2
強い紅斑と浮腫	3

投与部位の評価結果を表 4 に示した。陰性対照群 5 例では、閉塞解除 24 時間及び 48 時間後の全動物の 30 ナノクラス CNT 及び MWCNT パウダーサンプルの惹起部位に皮膚反応は認められず、いずれも平均評価点は 0.0、陽性率は 0% であった。また、各被験物質感作群（30 ナノクラス CNT 及び MWCNT パウダーサンプル）20 例においても惹起の閉塞解除 24 及び 48 時間後の全動物の惹起部位に皮膚反応は認められず、いずれも平均評価点は 0.0、陽性率は 0% であった。一方、陽性対照群では、閉塞解除 24 時間後に評点 1 あるいは 2 の紅斑、48 時間後には評点 1 の紅斑が認められ、閉塞解除 24 時間後の平均評価点は 1.8 で陽性率は 100%、48 時間後は 1.0 で陽性率は 100% であった。また、陽性対照非感作群では全例の DNCB の惹起部位に皮膚反応は認められず、平均評価点は 0.0、陽性率 0% であり、本試験の有効性は確認された。以上の結果から、30 ナノクラス CNT 及び MWCNT パウダーサンプルはいずれも「感作性陰性」と判断された。

#### 単層カーボンナノチューブ (SWCNT)

試験方法は、多層カーボンナノチューブと同様に、OECD\_TG406 の Buehler 法に従って行うこととした。分散方法は、皮膚刺激性試験の検討を参考に、被験物質の SWCNT (Nikkiso SWCNT, SW1862) を 0.06 g をビーカーに秤量し、シリコンオイルを 20 mL 加えた。その後超音波ホモジナイザー (SONIFIER model 250, BRANSON) を用いて 5 分間を 4 回（出力 4~5）、氷で冷却しながら超音波処理した。超音波処理は投与液が十分に冷却されていることを確認しながら、5~10 分間隔で実施した。被験物質の調製は投与当日に行った。用量設定試験（0.0375~0.3%）の結果、最高濃度である 0.3 w/v % においても皮膚刺激性が認められなかったことから、感作濃度、惹起濃度ともそれぞれ 0.3 w/v % と設定した。SWCNT の 0.3% 分散液の光学顕微鏡下で写真撮影 (x 1000) したものを、図 11 に示した。



図 11. SWCNT 0.3%分散液 (x1000)

感作処置、惹起処置および判定基準は、上記の多層カーボンナノチューブと同じ手法を用いて行った。

投与部位の評価結果を表 5 に示した。陰性対照群 10 例では、閉塞解除 24 時間及び 48 時間後の全動物の惹起部位に皮膚反応は認められず、いずれも平均評価点は 0.0、陽性率は 0%であった。また、0.3% CNT 感作群 20 例においても惹起の閉塞解除 24 時間及び 48 時間後の全動物の惹起部位に皮膚反応は認められず、いずれも平均評価点は 0.0、陽性率は 0%であった。

陽性対照群では、第 2 回目感作 48 時間後の観察時に 1 例に痂皮形成が認められた。惹起時の閉塞解除 24 時間及び 48 時間後には評点 1 あるいは 2 の紅斑が認められ、閉塞解除 24 時間後の平均評価点は 1.6 で陽性率は 100%、48 時間後は 1.2 で陽性率 100%であった。なお、陽性対照非感作群では閉塞解除 24 時間及び 48 時間後ともに全例の DNCB の惹起部位に皮膚反応は認められず、平均評価点は 0.0、陽性率 0%であった。以上の結果から、Nikkiso SWCNT は「感作性陰性」と判断された。

### フラーレン

試験方法は、上記単層カーボンナノチューブと同時期に、同じ OECD\_TG406 の Buehler 法に従って行うこととした。分散方法は 20%溶液としては、皮膚刺激性試験の検討を参考に、被検物質フラーレン (nanom purple SU (C60 昇華精製品)、フロンティアカーボン(株)) をピーカーに 2 g 秤量し、5%アラビアゴム水溶液を 10 mL 加えた。その後

超音波ホモジナイザー (SONIFIER model 250, BRANSON) を用いて 5 分間を 3 回 (出力 4~5)、氷で冷却しながら超音波処理した。超音波処理は投与液が十分に冷却されていることを確認しながら、5~10 分間隔で実施した。被験物質の調製は投与前日に行って室温、遮光下で使用時まで保管し、投与当日に氷冷下で 5 分間超音波処理した後使用した。用量設定試験 (2.5~20%) の結果、最高濃度である 20 w/v %においても皮膚刺激性が認められなかったことから、感作濃度、惹起濃度ともそれぞれ 20 w/v %と設定した。フラーレンの 0.3%分散液の光学顕微鏡下で写真撮影 (x 1000) したものを、図 12 に示した。

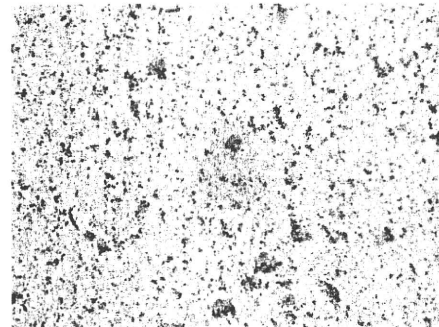


図 12. フラーレン 20%分散液 (x1000)

感作処置、惹起処置および判定基準は、上記の多層カーボンナノチューブと同じ手法を用いて行った。但し、本感作性試験は上記の SWCNT と同時に行ったため、陽性対照を用いた試験は行っていない。

投与部位の評価結果を表 6 に示した。陰性対照群 10 例では、閉塞解除 24 時間及び 48 時間後の全動物の惹起部位に皮膚反応は認められず、いずれも平均評価点は 0.0、陽性率は 0%であった。また、被験物質感作群 20 例においても惹起の閉塞解除 24 時間及び 48 時間後の全動物の惹起部位に皮膚反応は認められず、いずれも平均評価点は 0.0、陽性率は 0%であった。以上の結果から、フラーレンは「感作性陰性」と判断された。

### 3. OECD スポンサーシッププログラム動向

#### 第 8 回 OECD 工業ナノ材料作業部会

(WPMN8) 会合が 2011 年の 3 月に開催され、



その直前に、工業ナノ材料の試験に関するスポンサーシッププログラム会合が開かれた。各工業ナノ材料の試験進捗状況及び利用されるテスト方法を一覧としたマトリックスが各スポンサー国によって作成され、プログラム全体の現在の進捗状況を俯瞰すると共に、同じエンドポイントの材料間の横断的な評価に適用可能であることが認識された。各リードスポンサーからの進捗報告において、物理化学特性と哺乳類毒性試験は順調だが環境関連試験の進捗が遅いことが確認され、Phase1の終了を2021年の第10回会合を目処にすることが目標とされた。そのために、一層の努力が必要であるとともに、SGの内部と外部とのコミュニケーションの必要性が指摘された。また、SG3の下で、Phase1のDossierを完成させるための追加的なガイダンスを作成に関してタスクグループを設置して、米国とECが共同議長となり、BIAC、ドイツ、フランスがサポートすることとなった。その過程では、ロバスト・スタディ・サマリーの作成が必要であることが認識された。また、2011年1月に開催されたスポンサーシッププログラムのPhase2に関するワークショップからの勧告等を踏まえ、引き続き、ドイツとオランダがリードしつつ検討を進めることとなった。

ナノ材料の有害性評価という点において、WPMNとSIAMにおいて行っているOECD Cooperative Chemicals Assessment Programme(CCAP)との連携についてSG6内での議論を経る必要があるものの、おおむね前向きな方向で検討することとなった。

#### D. 考察

本研究班では、OECDの産業用ナノマテリアル作業部会WPNMのスポンサーシッププログラムに提供できるデータの作成を目的の一つとしており、この分担研究では、C60と単層および多層カーボンナノチューブの皮膚刺激性試験と皮膚感作性試験を行うこととしている。両試験については、OECDのガイドラインに沿った実験を行うことを基本とするが、ナノマテリ

アルの物理学的特性上、実験に供する試験サンプルは通常の化学物質と同じように適用することは困難であった。特にカーボンナノチューブについては、重量あたりの体積かなり大きく、ガイドラインで要求されている0.5gは皮膚に塗布することは不可能であった。SWCNTでは直接添付方として0.02g程度が適用できる上限であった。また、分散液を使った手法でも、溶媒に対する分散性も悪く、肉眼的な許容範囲としても0.3%溶液程度までが、適用できる上限の分散液濃度であると考えられた。一方フラーレンは、直接添付法はナノチューブ同様に0.02gの適用であったが、20%程度までの分散液はを作成することが可能であり、これを上限として刺激性試験と感作性試験を行った。昨年度のMWCNTの結果も含めて、MWCNT、SWCNT、およびフラーレンについて、ガイドライン上の最大要求量は満たしていないものの、物理的な暴露限界を適用した範囲では、皮膚刺激性および皮膚感作性の無いことが示された。

OECDの産業用ナノマテリアル作業部会WPNMのスポンサーシッププログラムの進捗状況においては、Phase1の成果としてDossierの作成が2012年を目処に作成されることになり、OECDの化学物質評価会議との共同活動へ供されることになると考えられる

#### E. 結論

我が国が担当しているスポンサーシッププログラム担当物質のうち、基礎的な毒性試験データ提供として単層型カーボンナノチューブ(Nikkiso SWCNT)およびフラーレン(nanom purple SU (C60昇華精製品))の皮膚刺激性試験(OECD\_TG404)と、多層カーボンナノチューブ(Nikkiso MWCNT)及びSWCNT、C60の皮膚感作性試験(OECD\_TG406)を行った。その結果、皮膚刺激試験においては、直接貼付法と分散液添付法のいずれの手法においても両SWCNTとC60に刺激性は認められなかった。また、感作性試験においては、MWCNT、SWCNTおよびC60のいずれも皮膚感作性は認められなかった。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Wako, K., Kotani, Y., Hirose, A., Doi, T., Hamada, S.  
(2010) Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 35, 437-446.

菅野純、広瀬明彦(2010) ナノマテリアルの有害性評価とカーボンナノチューブの生体影響、「ナノ材料のリスク評価と安全性対策」、フロンティア出版, pp.11-21.

広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江大、樋野興夫、菅野純  
(2011) ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性. *薬学雑誌*, 131, 195-201.

### 2. 学会発表

Hirose, A. NIHS efforts on nanomaterials health

hazard evaluation and Food Safety Commission (FSC) survey report of safety information on nanotechnology application in Japanese food sector. Workshop on Risk Assessment for Nanotechnology-enabled Food Products [英国食料環境研究庁 (fera)、英国・ヨーク、2010.5.27]  
広瀬明彦、はじめに、第99回日本病理学会総会 シンポジウム「環境発がんーアスベスト・ナノを中心としてー」[京王プラザホテル、平成22年4月27日]

## F. 知的財産

権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得: 該当なし
2. 実用新案登録: 該当なし
3. その他: 該当なし

表1

## a : Erythema and eschar formation

0: No erythema

1: Very slight erythema (barely perceptible)

2: Well defined erythema

3: Moderate to severe erythema

4: Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema

## b : Edema formation

0: No edema

1: Very slight edema (barely perceptible)

2: Slight edema (edges of area well defined by definite raising)

3: Moderate edema (raised approximately 1 mm)

4: Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)

表2

## SKIN IRRITATION STUDY OF CNT IN RABBITS

## THE TEST SITE OBSERVATION DATA

STUDY NO. 11102

GROUP NO.	TEST CHEMICAL	ANIMAL NO.	Findings	Time after removal of the closed patch				Total Score	Average Score	Irritation Score	Irritation Index
				1h	24h	48h	72h				
1	Silicone oil	11102001	Er. <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
			Ed. <sup>b</sup>	0	0	0	0				
		11102002	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
		11102003	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
	0.02g CNT	11102001	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
		11102002	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
		11102003	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
0.3% CNT	11102001	Er.	0	0	0	0	0	0.0			
		Ed.	0	0	0	0					
	11102002	Er.	0	0	0	0	0	0.0			
		Ed.	0	0	0	0					
	11102003	Er.	0	0	0	0	0	0.0			
		Ed.	0	0	0	0					

表3

## SKIN IRRITATION STUDY OF FULLERENE IN RABBITS

## THE TEST SITE OBSERVATION DATA

STUDY NO. 11104

GROUP NO.	TEST CHEMICAL	ANIMAL NO.	Findings	Time after removal of the closed patch				Total Score	Average Score	Irritation Score	Irritation Index
				1h	24h	48h	72h				
1	5% Gum arabic	11104001	Er. <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
			Ed. <sup>b</sup>	0	0	0	0				
		11104002	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
		11104003	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
	0.02g Fullerene	11104001	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
		11104002	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
		11104003	Er.	0	0	0	0	0	0.0		
			Ed.	0	0	0	0				
20% Fullerene	11104001	Er.	0	0	0	0	0	0.0			
		Ed.	0	0	0	0					
	11104002	Er.	0	0	0	0	0	0.0			
		Ed.	0	0	0	0					
	11104003	Er.	0	0	0	0	0	0.0			
		Ed.	0	0	0	0					

表 4

SKIN SENSITIZATION STUDY OF CARBONNANOTUBE IN GUINEA PIGS  
THE TEST SITE OBSERVATION DATA IN SKIN - DETERMINATION  
STUDY NO. 10115

Group	Sensitization	Challenge	No. of animals	Challenge			
				Time after removal of the closed patch			
				24h		48h	
Mean score	Positive rate (%)	Mean score	Positive rate (%)				
Negative control	Silicone oil	0.25% 30 nano-class CNT	10	0.0	0	0.0	0
		0.25% MWCNT powder sample		0.0	0	0.0	0
Test material sensitized	0.25% 30 nano-class CNT	0.25% 30 nano-class CNT	20	0.0	0	0.0	0
Test material sensitized	0.25% MWCNT powder sample	0.25% MWCNT powder sample	20	0.0	0	0.0	0
Positive control	1% DNCB	0.1% DNCB	5	1.8	100	1.0	100
Non-sensitized positive control	Acetone	0.1% DNCB	5	0.0	0	0.0	0

Mean score = Sum (score) / number of animals

Positive rate = Number of animals with skin reactions / total number of animals x 100

表 5

SKIN SENSITIZATION STUDY OF SINGLE WALL CARBONNANOTUBE IN GUINEA PIGS  
THE TEST SITE OBSERVATION DATA IN SKIN - DETERMINATION  
STUDY NO. 11103

Group	Sensitization	Challenge	No. of animals	Challenge			
				Time after removal of the closed patch			
				24h		48h	
Mean score	Positive rate (%)	Mean score	Positive rate (%)				
Negative control	Silicone oil	0.3% CNT	10	0.0	0	0.0	0
Test material sensitized	0.3% CNT	0.3% CNT	20	0.0	0	0.0	0
Positive control	1% DNCB	0.1% DNCB	5	1.6	100	1.2	100
Non-sensitized positive control	Acetone	0.1% DNCB	5	0.0	0	0.0	0

Mean score = Sum (score) / number of animals

Positive rate = Number of animals with skin reactions / total number of animals x 100

表 6

SKIN SENSITIZATION STUDY OF FULLERENE IN GUINEA PIGS  
THE TEST SITE OBSERVATION DATA IN SKIN - DETERMINATION  
STUDY NO. 11105

Group	Sensitization	Challenge	No. of animals	Challenge			
				Time after removal of the closed patch			
				24h		48h	
Mean score	Positive rate (%)	Mean score	Positive rate (%)				
Negative control	5% Gum arabic	20% Fullerene	10	0.0	0	0.0	0
Test material sensitized	20% Fullerene	20% Fullerene	20	0.0	0	0.0	0

Mean score = Sum (score) / number of animals

Positive rate = Number of animals with skin reactions / total number of animals x 100

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

著者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wako, K., Kotani, Y., Hirose, A., Doi, T., Hamada, S.	Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity.	The Journal of Toxicological Sciences	35	437-446	2010
菅野純、広瀬明彦	ナノマテリアルの有害性評価とカーボンナノチューブの生体影響、「ナノ材料のリスク評価と安全性対策」	フロンティア出版		11-21	2010
広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江大、樋野興夫、菅野純	ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性	薬学雑誌	131	195-201	2011
Sakamoto Y, Nakae D, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O and Ogata A	Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT)	The Journal of Toxicological Sciences	35	265-270	2010
Horibata, K, Ukai A, Koyama N, Takagi A, Kanno J, Kimoto T, Miura D, Hirose A, Honma M	Fullerene (C60) is negative in the in vivo pig-A gene mutation assay	Genes and Environment	33	27-31	2011
Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, Tsuda H	Involvement of macrophage inflammation protein 1{alpha} (MIP1{alpha}) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying	Carcinogenesis	31(5)	927-35	2010
Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A	Biodegradation of C60 Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells	ADVANCES IN BIOMEDICAL RESEARCH	1	89-94	2010

Tsuda H.	Risk assesment studies of nanomaterials in Japan and other countries.	Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	10, DIMS 30th Anniversary Supplement	11-12	2010
西村哲治	ナノテクノロジーと環境リスク	公衆衛生	74(4)	305-308	2010
Kokubo T., Kakinuma S., Kobayashi T., Watanabe F., Iritani R., Tateno K., Nishimura M., Nishikawa T., Hino O., Shimada Y.	Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model.	Cancer Sci	101	616-623	2010
Inami K., Abe M., Takeda K., Hagiwara Y., Maeda M., Segawa T., Suyama M., Watanabe S. and Hino O.	Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo	Cancer Sci.	101	969-974	2010
Yoshida C., Sogawa C., Tsuji A., Sudo H., Sugyo A., Uehara T., Hino O., Yoshii Y., Fujibayashi Y., Fukumura T., Koizumi M., Arano Y. and Saga T.	Development of positron emission tomography imaging by <sup>64</sup> Cu-labeled Fab for detecting ERC/mesothelin in mesothelioma mouse model.	Nuclear Medicine Communications, in press.			2011
Sudo H., Tsuji A., Sugyo A., Kohda M., Sogawa C., Yoshida C., Harada Y., Hino O. and Saga T.	Knockdown of COPA, identified by loss-of-functiuon screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model.	Genomics, in press.			2011
Zhang D., Kobayashi T., Kojima T., Kanenishi K., Hagiwara Y., Abe M., Okura H., Hamano Y., Sun G., Maeda M., Jishage K., Noda T. and Hino O.	Deficiency of the Erc/mesothelin gene ameliorates renal carcinogenesis in Tsc2 knockout mice.	Cancer Science in press..			2011
K. Miyazawa and K. Hotta	"The effect of solvent ratio and water on the C60 nanowhiskers"	J. Cryst. Growth	312	2764-2770	2010
K. Miyazawa and K. Hotta	"The effect of water on the stability of C60 fullerene nanowhiskers"	Journal of Nanoparticle Research			2010

R. Kato and K. Miyazawa	“Cross-sectional structural analysis of C60 nanowhiskers by transmission electron microscopy” microscopy”	iamond & Related Materials	20	299-303	2011
-------------------------	---	----------------------------	----	---------	------



#### IV. 研究成果の刊行物・別冊

Original Article

## Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity

Kiyoshi Wako<sup>1</sup>, Yuri Kotani<sup>1</sup>, Akihiko Hirose<sup>2</sup>, Takuya Doi<sup>1</sup> and Shuichi Hamada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Medience Corporation, 14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki 314-0255, Japan

<sup>2</sup>Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received October 27, 2009; Accepted February 24, 2010)

**ABSTRACT** — Since there is a possibility of inhaling the fibers of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) without any agglomeration, it is important that the pulmonary toxicity is evaluated by intratracheal instillation without agglomeration. MWCNT suspended in an artificial lung surfactant (ALS) with or without grinding in an agate mortar was instilled once intratracheally to rats to determine whether differences of the effects to pulmonary toxicity by different amounts of agglomerated MWCNT particle. The MWCNT suspension preparation method with grinding was effective at reducing agglomerates and in increasing uniform dispersion of the fibers. The ground MWCNT induced higher LDH levels and neutrophil ratios in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). There were no remarkable responses in rats in the non-ground MWCNT group, with the exception of inflammatory responses in the early phase. Some histopathological findings varied between rats given the ground MWCNT and non-ground MWCNT. A major difference was an MWCNT-laden macrophage infiltration site in the lung, which were in the alveolus in the ground MWCNT group, and in the interstitium in non-ground MWCNT group. Accordingly, the preparation method with grinding is considered to be effective at reducing agglomerates and ensuring uniform dispersion of the fibers. These findings lead us to conclude that the amount of agglomerates in the suspension is an important factor affecting the pulmonary toxicity of MWCNT.

**Key words:** Multi-wall carbon nanotube (MWCNT), Rats, Lung toxicity, Inflammation

### INTRODUCTION

The production of multi-wall carbon nanotube (MWCNT), a representative industrial nanomaterial, is increasing worldwide due to their high potentials in industrial usage. Recent reports (Lam *et al.*, 2006; Donaldson *et al.*, 2006) suggested that the health effects of such materials must be evaluated properly. It is estimated that a possible exposure route of MWCNT is inhalation, especially in occupational environments. The shape of MWCNT is similar to asbestos and has been reported to induce mesothelioma like lesions (Takagi *et al.*, 2008; Poland *et al.*, 2008). Therefore, assessment of pulmonary toxicity of MWCNT with experimental animals is important to ascertain the possible effects on human health. The first evaluation of MWCNT inducing pulmonary toxicity was

made by an intratracheal instillation with rodents. However, the information regarding MWCNT induced pulmonary toxicity in rodents is limited (Muller *et al.*, 2005).

It is well known that MWCNT tends to agglomerate into large particles, such as in the micrometer-order scale (Lam *et al.*, 2006). Studies in which large particulate of MWCNT are intratracheally administered and evaluated may lead to a misunderstanding of its pulmonary toxicity. Therefore, the preparation method of finely dispersing MWCNT is essential to assess its pulmonary toxicity.

The present study examined the preparation methods of MWCNT suspensions for intratracheally instilling finely dispersed fibers as well as the effects of different dispersion conditions of MWCNT fibers in suspensions on pulmonary toxicity in rats.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental animals

Female Crl:CD(SD) rats with a body weight range of 170 to 200 g were obtained from Charles River Laboratories Japan, Inc. (Kanagawa, Japan). The animals were kept in an animal room of the Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Medicine Corporation (Ibaraki, Japan), which was maintained at temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative humidity of  $55 \pm 20\%$ , with a 12 hr light-dark cycle. They were given tap water and a diet for experimental animals (MF: Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) *ad libitum*. The rats were 8 weeks old at dosing. The present study was carried out in accordance with the Guidelines for Animal Studies (Toxicological Science Division, Mitsubishi Chemical Medicine Corporation). Moreover, the protocol of this study was approved by the Committee for Ethics in Animal Studies of the Kashima Laboratory prior to commencing the study.

### Materials

MWCNT (MITSUI MWCNT-7, Lot No. 060125-01k) and crystalline silica (Min-U-Sil #5: provided by Hayashi-Kasei Co., Ltd., Osaka, Japan) were used in this study. The property of the MWCNT is the same as those formerly reported (Takagi *et al.*, 2008). Briefly, MWCNT has a density of  $3.55 \times 10^{11}$  particles/g. The length and width were examined with a scanning electron microscope and are indicated in Fig. 1. MWCNT contained; Fe (approximately 3,500 ppm), sulfur (470 ppm), and chlorine (20 ppm) as well as fluorine (5 ppm) and bromide

(40 ppm) that were below the detection levels.

### Preparation of particle suspension

There were large numbers of agglomerates in suspensions prepared using media such as, 0.5% CMC-Na solution, 0.1% Tween 80 solution, or 0.5% CMC-Na solution containing 0.1% Tween 80. In contrast, the numbers of agglomerates decreased when an artificial lung surfactant (ALS, Surfacten®: Mitsubishi Tanabe Pharma Corp., Osaka, Japan) was used as the suspension media. Therefore, the ALS was selected as the suspension media for this study. Surfacten® is an extraction from bovine lung, which include a constant ratio of phospholipids, free fatty acids, and triglyceride. ALS was prepared by dissolving Surfacten® at 120 mg into sterilized saline (Otsuka Normal Saline: Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, Japan) at 4 ml. MWCNT was suspended in ALS at a concentration of 10 mg/ml with or without grinding in an agate mortar, the suspension was subjected to sonication for 3 min with an ultrasonic disruptor (UD-201: Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo, Japan). The grinding was conducted under wet conditions: ground after addition of a small amount of ALS to an adequate amount of MWCNT, and filled up to the proper volume with ALS to make target concentrations. The dispersion conditions were evaluated with a light microscope, transmission electron microscope (H-7600: Hitachi, Tokyo, Japan), and scanning electron microscope (JSM-5200: JEOL, Tokyo, Japan).

Min-U-Sil #5 was also suspended in ALS at a concentration of 10 mg/ml, and sonicated for 3 min.

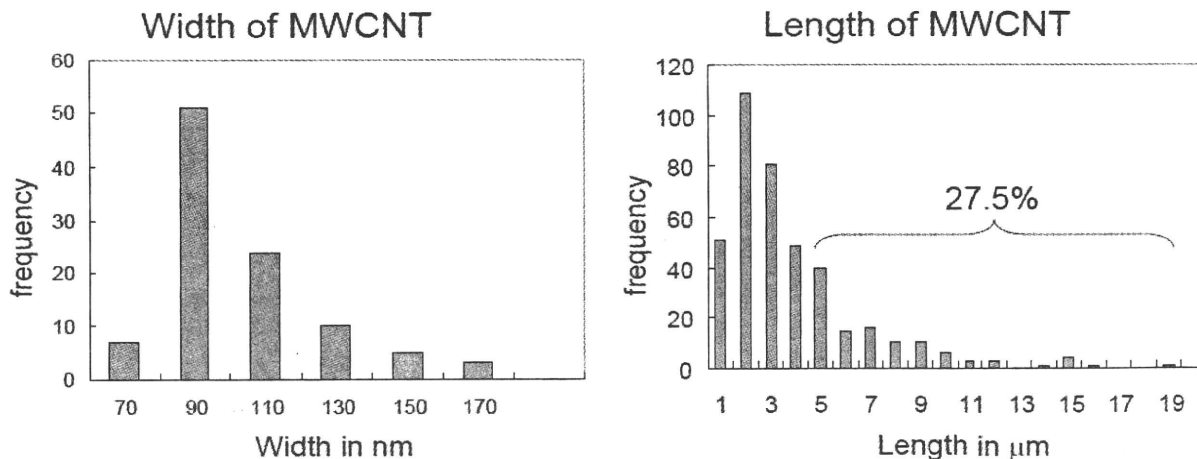


Fig. 1. Width and length distribution of MWCNT: The average width was about 100 nm, and 27.5% of the particles were longer than 5 μm.

### Particle instillation

The light anesthetization was achieved by ether inhalation. An 18-G intravenous catheter (Terumo Corp., Tokyo, Japan) was inserted to the larynx as a guide to insert a narrow catheter. The suspensions (volume: 0.5 ml/animal) were instilled to the trachea via the narrow catheter (outside diameter: 0.80 mm).

### General experimental design

The suspensions of the ground MWCNT, non-ground MWCNT, Min-U-Sil, and ALS alone (as a negative control) were administered intratracheally at a dose of 5 mg/animal with a dosage volume of 0.5 ml/animal to 12 rats/group. Since it was reported that the dose at 5 mg/head of MWCNT had toxicological effects on the lung according to Muller *et al.* (2005), this dose was selected for this study. Furthermore, this dosage volume is widely used in similar studies. The day of administration was designated as Day 1. Three rats from each group were subjected to necropsy on Days 2, 8, 29, and 92 after peritoneal injection of pentobarbital sodium (Nembutal®: Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was obtained from all rats on each day of necropsy. The difference in the effects on pulmonary toxicity by the amount of agglomerated particles in the instilled suspension was assessed by BALF analysis and histological examination.

### BALF analysis

Firstly, the right lung lobes after ligating of the left bronchus were lavaged three times with 3 ml of saline (Otsuka Normal Saline: Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.) heated up to 37°C in advance for the cell-counting procedure. A cell pellet was obtained from the BALF after centrifugation (300 × g, 10 min) at about 4°C. The cell pellet was re-suspended in 0.1% BSA containing phosphate buffered saline (PBS-) + 0.05 mM EDTA-2K and cell count and differential ratio were examined with a hemocytometer (XT-2000iV: Sysmex Corp., Hyogo, Japan). Secondly, the right lung lobes were lavaged once with 2 ml of saline. The obtained BALF was mixed with the previously obtained supernatant and centrifuged (300 × g, 10 min) at about 4°C. The supernatant thus obtained was subjected to the quantification of protein (Biuret method) and LDH (UV-rate method, JSCC modified method) with an automatic analyzer (TBA-200FR: Toshiba Corp., Tokyo, Japan).

### Histological examination

The left lung lobes and bronchiolar lymph nodes were removed and fixed in 10% phosphate-buffered formalin.

After conventional processing, paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined histopathologically under a light microscope. Moreover, a part of the lung was collected from one animal of each group and fixed in 2.5% glutaraldehyde with negative pressure. The lungs were embedded in epoxy resin and stained with uranyl acetate and lead citrate for examination with a transmission electron microscope (H-7600: Hitachi).

### Statistical analysis

The cell differential ratio as well as protein and LDH concentrations in BALF were statistically compared with the control values for each time point. Initially, the variance was assessed with Bartlett's test. When the variance was equal, one-way analysis of variance was used; otherwise, the Kruskal-Wallis test was used. When significant differences were seen between the groups, they were evaluated with Dunnett's method (homogeneous variance) or a Dunnett's type (Steel method; non-homogeneous variance) multiple comparison test. The significance was judged at the 0.01 and 0.05 probability levels. Additionally, the above values were examined between the non-ground MWCNT and ground MWCNT groups. Initially, the variance was assessed with the F test with a significant level of 5%. Significant differences between the groups were then analyzed using the Student's t test when the variance was equal; otherwise, the Aspin-Welch's test was used.

## RESULTS

### Grinding effects

The effects of grinding with an agate mortar were evaluated by observation of the suspensions with a light microscope and electron microscope (Figs. 2, 3, and 4). The agglomerates in the ground MWCNT were smaller than those in the non-ground MWCNT. The number of fibers finely dispersed was observed in the ground MWCNT. The length of the fiber in the ground MWCNT was smaller than those in the non-ground MWCNT.

### BALF analysis

The following results were obtained as compared to the control values. The total cell count in BALF elevated in rats given the ground MWCNT on Day 8 and Min-U-Sil on Day 91. Higher neutrophil ratios in BALF were observed in rats given the non-ground MWCNT and ground MWCNT on Day 2, ground MWCNT and Min-U-Sil on Day 29, and Min-U-Sil on Day 91 (Fig. 5). Higher LDH concentrations in BALF were observed in rats given