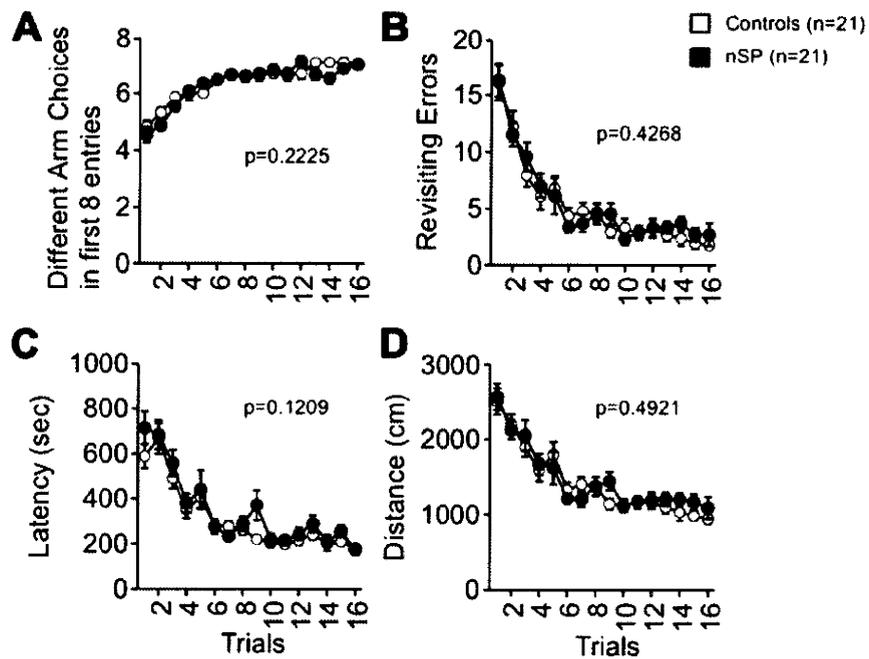


図11. 歩行機能。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、歩行解析装置に乗せ、ベルトコンベアーの上を走る様子を撮影し、前肢 (A) および後肢 (B) の歩行機能を解析したが、nSP暴露による成長後の歩行機能への影響は認められなかった。



**図12. 作業記憶機能。** 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、中央のプラットフォームとそこから8方向にのびた8本のアームから構成される8方向放射状迷路装置に入れ自由に探索させた。8本のアームの先端には報酬となるスクロースペレットを置いた。最初の8回のアームへの進入回数のうち異なるアームを選択して入った回数（正選択数）（A）、一度入ったアームに再び入った回数（誤選択数）（B）、8本のアーム全てに進入しペレットを食べるまでに要した時間（秒）（C）および総移動距離（cm）（D）を測定した。正選択数あるいは誤選択数を作業記憶の指標とした。nSPに暴露された経験がある仔の成長後の作業記憶に障害などは確認されなかった。

## ナノマテリアルの生殖器動態評価および繁殖毒性 (精子・卵子・受精卵)・胚発生毒性評価に関する研究

研究分担者 河合裕一 神戸学院大学薬学部 生命薬学部門 発生分化研究室

### 研究要旨

ナノマテリアルの体内動態は、経皮・経口を介し体内に吸収され、精巣や胎児などの生殖器官等へ移行することが明らかにされつつある。本研究においては、ナノマテリアルの卵管や子宮への移行に伴う受精や胚の初期発生への影響を想定し、受精から胚盤胞期そして誕生までの毒性を評価した。そこで、胚発生を「受精から2細胞期」、「2細胞期から胚盤胞期」、「胚盤胞期から誕生」の3つのカテゴリーに分け、体外受精や胚移植などの生殖補助技術を応用し、胚発生の毒性を評価した。モデルとなるナノマテリアルは、ナノシリカ (nano silica particle: nSP)、サブナノ白金 (sub nano platinum: snPt)、サブナノ銀 (sub nano Argentum: snAg) を用いた。また nSP は、蛍光 (赤色) 標識されており、70 nm (nSP70)、300 nm (nSP300)、1000 nm (mSP1000) の粒子径の nSP を用いた。さらに、nSP70 においては、表面を未修飾 (nSP70)、カルボキシル基修飾 (nSP70-C)、アミノ基修飾 (nSP70-N) されている各種修飾体を用いた。

「受精から2細胞期」までの影響は、精子の運動性および体外受精法を用い検討した。まず、粒子径の微小化に伴う精子の運動性への影響を検討するため、nSP70、nSP300、mSP1000 を培養液中の運動精子に曝露させ、運動性を観察した。その結果、nSP70 の曝露条件においてのみ、本来であれば培養液中を激しく泳ぎ回る精子が凝集した。そこで、nSP70 の各種修飾体を用い精子の凝集性への粒子表面性状との関連を検討した。その結果、nSP70-C では、精子の凝集が改善され (減少)、nSP70-N では精子の凝集は改善されなかった。また、snPt と snAg の曝露においても、精子の凝集が確認された。一方、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用い nSP70 と精子の結合を観察したところ、表面修飾の有無にかかわらず、精子頭部への nSP70 の結合が観察された。次に、受精への影響を解析するため、nSP70 による凝集が観察されない曝露量を用い、nSP70、nSP300、mSP1000 について体外受精法により検討した。その結果、nSP70 の曝露においてのみ、約 30% の受精阻害 (例: 卵子 30 個中の 3 割) が観察された。一方、「2細胞期から胚盤胞期」までの影響について、卵管還流法により採卵した 2細胞期胚を用いて検討したが、発生の阻害は観察されなかった。また、「胚盤胞期から誕生」までの影響を検討するため、着床後、約 1 日経過した雌マウスの子宮内へ nSP70、nPt、nAg を直接投与し、産仔数、仔マウスの体重を指標に検討した。その結果、snPt においてのみ、産仔数および仔マウスの体重低下が観察された。以上の研究成果より、ナノ素材特有の新たな生殖毒性が見出され、従来までの生殖毒性試験とは異なる安全性基準の必要性が示唆された。

### A. 研究目的

精巣や子宮などの生殖器官は、血液精巣関門、血液胎盤関門により保護されている。アミノ酸や

乳酸などの栄養物は、トランスポーターにより、選択的に取り込まれ、セルトリ細胞においては、複数のトランスポーターの発現が報告されてい

る。生体異物は、これらバリアにより侵入を制限されるため、ナノマテリアルも同様の理論により安全性の確保が想定される。しかし、種々実験動物を用いた解析から、精巣や胎児へのナノマテリアルの移行が報告され、生殖毒性（精子・卵子・受精卵）・胚発生毒性などの観点から、ナノマテリアルの安全性研究の必要性が世界的に求められている。そこで、「体外受精や胚移植などの生殖補助技術」を最大限に活用し、ナノマテリアル特有の生殖毒性（ナノ生殖毒性）が発現するかどうかおよびナノ生殖毒性独自の評価法や毒性指標を追求した。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料

ナノマテリアルは、ナノシリカ（nano silica particle: nSP）、サブナノ白金（sub nano platinum: nPt）、サブナノ銀（sub nano Argentum: nAg）を用いた。また nSP は、蛍光（赤色）標識されており、70 nm（nSP70）、300 nm（nSP300）、1000 nm（mSP1000）の粒子径の nSP を用いた。さらに、nSP70 においては、表面を未修飾（nSP70）、カルボキシル基修飾（nSP70-C）、アミノ基修飾（nSP70-N）された各種修飾体を用いた。

### 2. 精子の運動性への影響評価

11 週齢の雄性 ICR マウスから精巣上体尾部を採取し、精管とのつなぎ目付近から成熟精子（精子塊）を採取。BMOC-3 培地で 30 分前培養し、 $1 \times 10^6$  sperms/mL の精子に各 nSP（100  $\mu$ g/mL）、snPt（50 ppm）、snAg（100 ppm）のいずれかを曝露（15 分）、位相差顕微鏡で精子の運動性への影響を検討した。

### 3. 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた nSP と精子頭部の結合に関する検討

11 週齢の雄性 ICR マウスから採取した成熟精子を BMOC-3 培地で 30 分前培養し、 $1 \times 10^6$  sperms/mL の精子に各 nSP（100  $\mu$ g/mL）を曝露（15 分）。精子頭部の DNA を Hoechst 33342 により標識し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000-D(OLYMPUS)で精子頭部と nSP が結合

するか否かについて検討した。

### 4. WST-1 を用いた精子ミトコンドリア脱水素酵素活性への影響評価

11 週齢の雄性 ICR マウスから採取した成熟精子を BMOC-3 培地で 30 分前培養し、 $1 \times 10^6$  sperms/mL の精子に各 nSP（100  $\mu$ g/mL）を曝露。6 時間後に 500  $\mu$ M の WST-1 と 125  $\mu$ M の NADH を添加。さらに、60 分後に Micro plate Reader で A405~450 nm の吸光度を測定し、精子ミトコンドリア脱水素酵素活性への影響を検討した。

### 5. 体外受精法を用いた受精過程への影響評価

11 週齢の雌性 ICR マウスの腹腔へ PMSG（pregnant mare serum gonadotropin: 妊馬血清性腺刺激ホルモン）と hCG（human chorionic gonadotropin: ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン）を投与（過排卵処理）。hCG 投与 14 時間後に、輸卵管の膨大部より未受精卵を採取。30 個の未受精卵に対し、11 週齢の雄性 ICR マウスから採取した成熟精子（ $1 \times 10^5$  sperms/mL）を添加し、培養液中で受精させた（体外受精）。nSP70（10  $\mu$ g/mL）、snPt（5 ppm）、snAg（10 ppm）のいずれかを媒精と共に添加し、受精過程におけるナノマテリアルの影響を検討した。

### 6. 卵管還流法を用いた胚の初期発生への影響評価

交尾を確認した 11 週齢の雌性 ICR マウスを用い、交尾 24 時間後に卵管を採取。卵管漏斗へ先端を平滑にした皮下 1/2R レギュラー針を挿入し、培養液で卵管内の受精卵（2 細胞期胚）を採取。30 個の 2 細胞期胚へ nSP70（300  $\mu$ g/mL）、nSP300（300  $\mu$ g/mL）、mSP1000（300  $\mu$ g/mL）を添加。胚の初期発生への影響を検討した。

### 7. 非外科的子宮内投与法を用いた着床後胚への影響評価

交尾を確認した 11 週齢の雌性 ICR マウスを用い、交尾 5 日後に子宮内へ nSP70（0.9 mg/mouse）、snPt（10  $\mu$ g/mouse）、snAg（10

µg/mouse) のいずれかを投与。子宮内への投与法は、先端を平滑にした 25G の針を膣から子宮頸管を通し、子宮内へ直接挿入する、非外科的子宮内投与法 (100 µL/mouse) を用いた。着床後胚の影響評価は、産仔数および仔マウスの平均体重を指標にした。

### C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

#### D. 考察

##### 1. 精子の運動性への影響評価

膣内に射精された精子は、鞭毛運動により子宮頸管から子宮を通り、受精の場である卵管へ移動する。精子の鞭毛運動は、培養液の中でも観察され、先天的・後天的な要因により運動性が阻害される。後天的な要因の一つに、不妊症女性血中に見出される精子不動化抗体がある。精子不動化抗体は、原因不明の不妊症女性患者から見出された、ヒトリンパ球にも存在する抗 CD52 抗体である。抗体のサイズは、数ナノメートル程度であることから、ナノマテリアルが精子不動化抗体と類似の作用を示し、精子の運動性を阻害することが想定される。そこで、培養液中の精子にナノマテリアルを添加し、精子の運動性を阻害するか否かを検討した。その結果、nSP300 や mSP1000 は精子の運動性に影響しなかったが、nSP70、snPt、snAg は精子の運動性を阻害した (図 1. A, B, E-H)。nSP70 や snPt による精子の運動性阻害は、鞭毛の動きは観察されたが、個々の精子が凝集し塊となった (図 1. A, G, H)。一方、snAg は、精子の凝集のみならず、鞭毛の不動化が観察され、精子不動化抗体と類似の影響が観察された (図 1. H)。また、nSP70 の修飾体を用いた解析により、粒子表面をカルボキシル基で修飾することによって、精子の凝集性が改善された (図 1. D)。以上より、ナノマテリアルによる精子の凝集性は、粒子表面性状を制御することで改善されると示唆された。

##### 2. 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた nSP と精子頭部の結合に関する検討

ナノマテリアルによる精子の運動性の阻害が、

精子頭部への結合によるものか、鞭毛への結合によるものか否かを検討するため、精子頭部 DNA を Hoechst 33342 により標識し共焦点レーザー走査型顕微鏡を用い検討した。その結果、nSP70、nSP70-C、nSP70-N のすべてにおいて、nSP と精子頭部との結合が観察された (図 2)。以上より、nSP と精子の結合は、粒子表面性状に関わらず精子頭部と結合することが明らかとなった。これら結果は、精子と結合したナノシリカが卵子内へ運ばれ、受精の発生に影響を与える毒性が示唆された。

##### 3. WST-1 を用いた精子ミトコンドリア脱水素酵素活性への影響評価

nSP による精子の凝集が、精子の生存率に影響するか否かを検討するため、WST-1 を用いた精子ミトコンドリア脱水素酵素活性を指標に、精子の生存率への影響を検討した。1.25 x 10<sup>6</sup>、2.5 x 10<sup>6</sup>、5 x 10<sup>6</sup> sperms/mL の精子濃度は、A450 が 0.1 から 0.14、そして 0.2 まで増加した。そこで、5 x 10<sup>6</sup> sperms/mL の精子に nSP70、nSP70-N を添加し、6 時間後の A450 を解析した。その結果、A450 は約 0.2 を示し精子ミトコンドリア脱水素酵素活性への影響は観察されなかった (図 3)。また、他の nSP においても、A450 は約 0.2 を示した (図 3)。すなわち、nSP の精子への毒性は、運動性を阻害または攪乱するが、精子の生死へは影響しないと示唆された。

##### 4. 体外受精法を用いた受精過程への影響評価

nSP が、受精を阻害するか否かを検討するため、生殖補助技術の体外受精法を用い、nSP70、nSP300、mSP1000 含有培地を用いた体外受精により検討した。また受精の有無は、2 細胞期胚への発生を指標とした。nSP の処置条件は、精子の凝集が観察されない nSP70 の最大量 (10 µg/mL) とした。無処置における体外での受精率は、約 85% であった (図 4)。nSP70 添加を添加することで、受精率が約 60% に減少し、受精阻害が観察された (図 4)。一方、nSP300 や mSP1000 では若干の受精率の低下傾向が観察されたが、誤

差範囲内であった(図4)。以上より、精子の運動性が阻害されない条件においても生殖毒性(受精阻害)が発現すると示唆された。

## 5. 卵管還流法を用いた胚の初期発生への影響評価

受精卵は、糖タンパク質の細胞外マトリックス(透明帯)により覆われており、この透明帯により過剰な精子の侵入や異物から保護される。そこで、透明帯による受精卵の保護作用がナノマテリアルにおいても機能するか否かを明らかにするため、2細胞期胚から胚盤胞期胚への発生を指標に検討した。無処置における胚盤胞への発生率は、約85%であった(図5)。また、nSP70、nSP300そしてmSP1000では、若干の発生率の増減が観察されたが、誤差範囲内であった(図5)。以上の結果より、nSPは、粒子径に関わらず胚発生への影響は確認されなかった。すなわち、透明帯による受精卵の保護作用が、ナノマテリアルにおいても適用されると示唆された。

## 6. 非外科的子宮内投与法を用いた着床後胚への影響評価

胚盤胞期胚は、着床に至る過程で透明帯の殻から抜け出し、子宮内膜上皮細胞層と接着(着床)する。交尾後6日目以降の妊娠マウスへのナノマテリアルの投与は、仔マウスへのナノマテリアルの移行といくつかの障害が報告されている。すなわち、ナノマテリアルは血液胎盤関門を通過し、胎児まで移行、さらに胎仔への毒性を発現することが示唆されている。本検討では、母体への影響を最小限に抑え、着床後胚への純粋な毒性を明らかにすることを目的に、生殖補助技術の非外科的子宮内移植法を応用し、子宮内の胚へ直接ナノマテリアルを曝露した。無処置の条件(無処置または培養液のみ子宮内へ投与)では、約7匹の産仔数および平均体重が2.0gの仔マウスであった(図6. A, B)。nSP70、snAgは約7匹と約9匹日の産仔数および平均体重が約2.0gの仔マウスであった(図6. A, B)。一方、snPtは、産仔数が約5匹と減少傾向が観察され、仔マウスの平均

体重についても1.9gと減少傾向が観察された(図6. A, B)。すなわち、snPtのみ、胚への直接的な毒性が発現すると示唆された。しかしながら、現在までの報告は、子宮内の胎仔について検討しており、本解析においても胎仔を対象とし検討する予定である。

## E. 結論

本検討では、精子や卵子および受精卵を用い、受精過程や胚の初期発生へのナノマテリアル特有の生殖毒性について探索および検討した。そこで、現在までに確立されている生殖補助技術を最大限に活用した。その結果、精子の運動性や受精過程を阻害するナノマテリアル特有の生殖毒性を新たに見出した(図1. B, C, G, H, 図4. 図6)。また、2細胞期胚から胚盤胞期胚までの発生過程においては、透明帯のバリアにより保護された(図5)。一方、透明帯の殻を抜け出した、着床後の胚においてはsnPtにおいてのみ影響が観察された(図6)。今後、精子不動態抗体との関連解析および着床後胚を対象とした非外科的子宮内投与法の実験条件・検討方法の最適化により、ナノ特有の生殖毒性を明らかにする。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

なし

【総説・その他】

なし

### ② 学会発表

【シンポジウム等】

なし

【国内学会発表：合計3件】

1. 小野寺章、内海雄太、陶山裕平、吉岡靖雄、吉川友章、真弓忠範、堤康央、河合裕一：Surface charge modification of silica nanoparticles reduces mouse sperm nanotoxicology, 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010年12月.

2. 陶山裕平、小野寺章、内海雄太、吉岡靖雄、吉川友章、真弓忠範、堤康央、河合裕一： ナノシリカ表面の電荷制御によるマウス精子へのナノ毒性軽減., 日本薬学会 第 131 年会., 静岡, 2011 年 3 月.
3. 内海雄太、小野寺章、陶山裕平、吉岡靖雄、吉川友章、真弓忠範、堤康央、河合裕一： ナノシリカはマウス精子頭部に結合し特有の毒性を発現させる., 日本薬学会 第 131 年会., 静岡, 2011 年 3 月.

**【国際学会発表：合計 0 件】**

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

**その他**

なし

**研究協力者**

神戸学院大学薬学部、細谷奈央、内海雄太、陶山裕平、木村咲絵、井戸絵愛、敷名希実子、高宮柴乃、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、田中敦士、諸澤英、根津菜摘、宝諸あい、小野寺章。

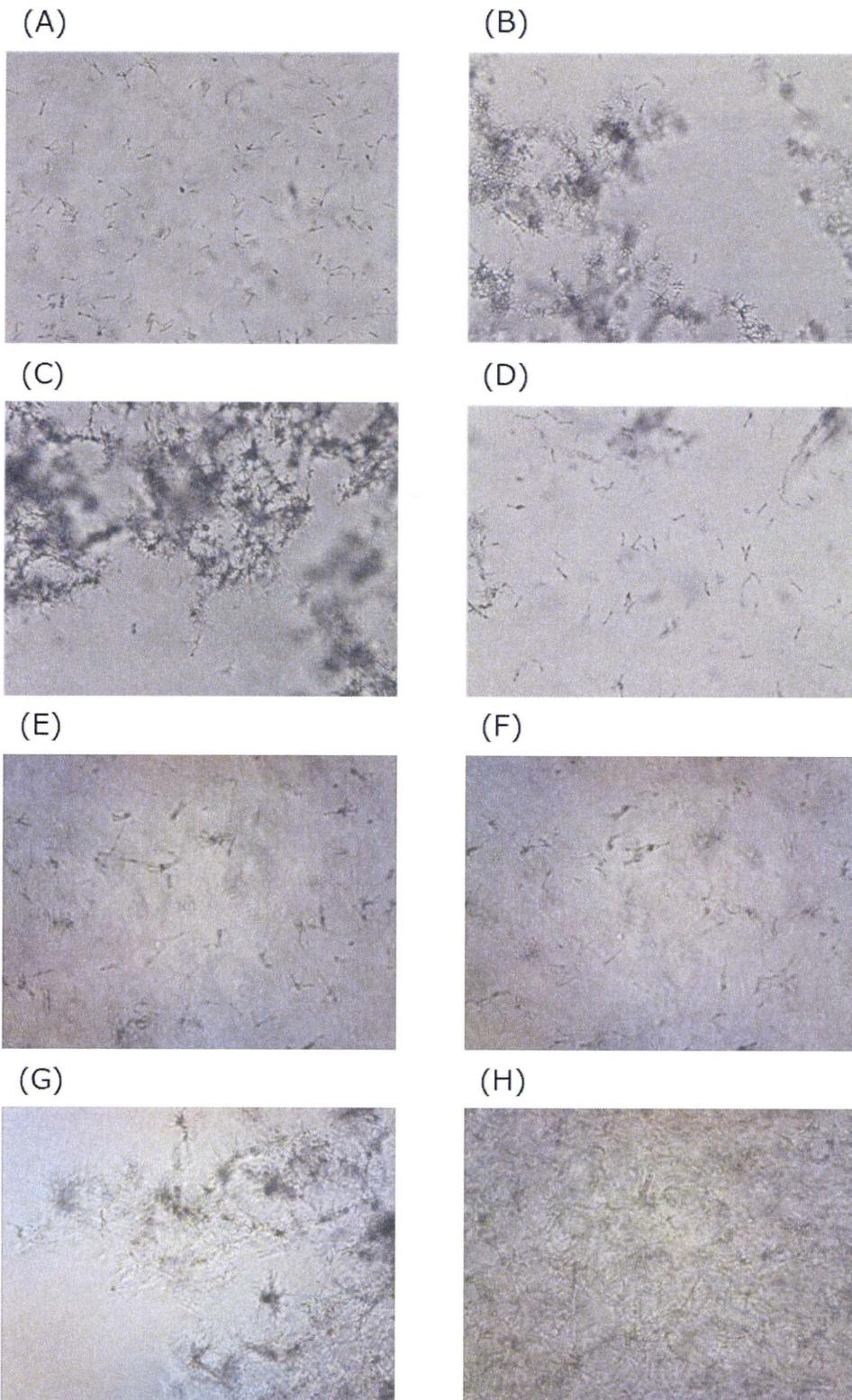


図1. ナノマテリアルによる精子の凝集. 培養液中の運動精子 (  $1 \times 10^6$  cells/mL ) へナノマテリアルを添加、15分後の運動性を位相差顕微鏡により観察した。(A) 無処置, (B) nSP70 (100  $\mu$ g/mL), (C) nSP-N (100  $\mu$ g/mL), (D) nSP-C (100  $\mu$ g/mL), (E) nSP300 (100  $\mu$ g/mL), (F) mSP1000 (100  $\mu$ g/mL), (G) snPt (50 ppm), (H) snAg (100 ppm) .

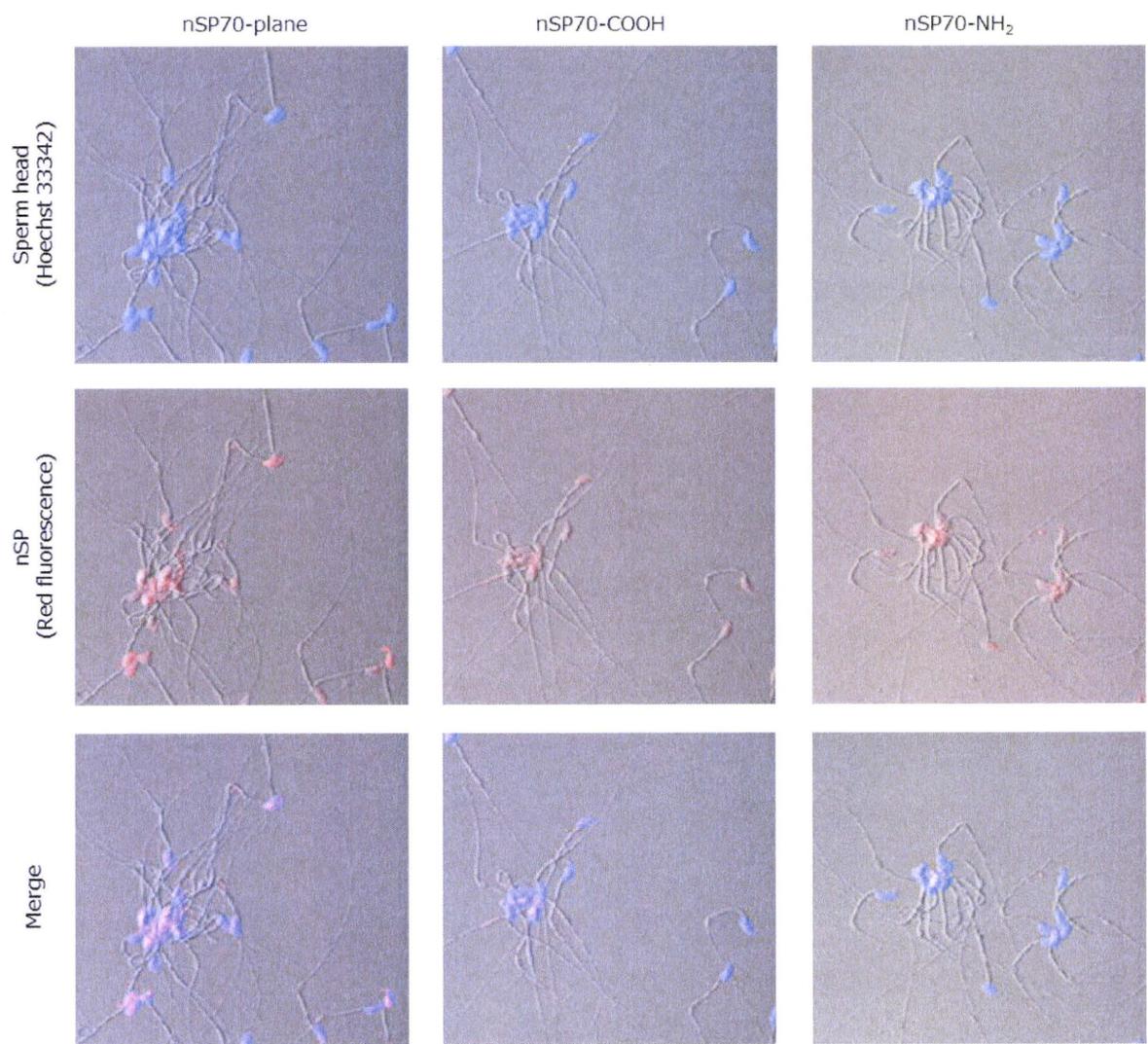
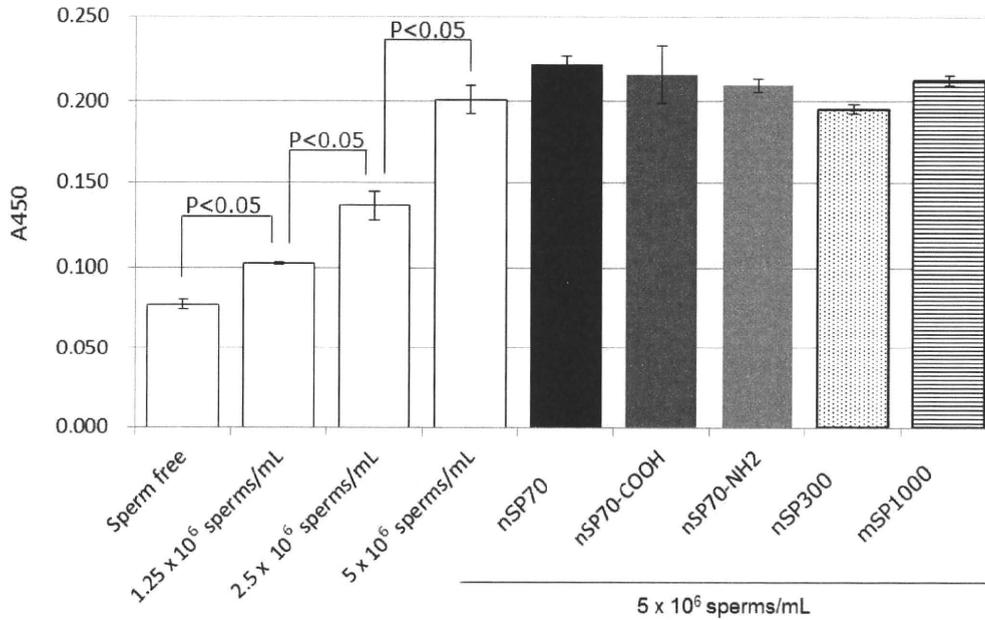
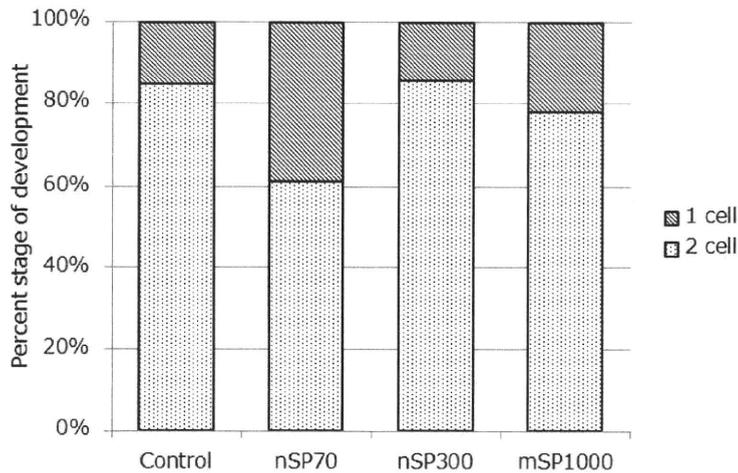


図2. nSP70と精子頭部の結合. 培養液中の運動精子 ( $1 \times 10^6$  cells/mL) ヘナノマテリアルを添加、その5分後にHoechst 33342により標識、さらに10分後に4%パラホルムアルデヒドで固定、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いnSP( $\lambda_{ex} = 350$  nm,  $\lambda_{em} = 461$  nm) と精子頭部のHoechst 33342 ( $\lambda_{ex} = 569$  nm,  $\lambda_{em} = 585$  nm) の局在を観察。



**図3. WST-1を用いた精子生存率の解析.** 培養液中の運動精子ヘナノマテリアルを添加、6時間後にWST-1およびNADHを添加。さらに1時間後、上清を回収し遠心分離によりナノマテリアルを除去、WST-1の吸光度 (A405) を測定。各粒子の処置条件は、nSP70 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ,nSP-N (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ,nSP-C (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ,nSP300 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ,mSP1000 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とした。P<0.05 vs indicated sample (ANOVA and tukey's HSD test)



**図4. IVF (体外受精) へのnSPの影響.** 体外受精は、250  $\mu\text{L}$ の培養液中で30個の未受精卵と1 x 10<sup>5</sup> sperms/mLの運動精子をインキュベータ内で5時間反応させ、24時間後の2細胞期胚への発生を指標に検討した。ナノマテリアルは、体外受精培地へあらかじめ添加し受精過程への影響を検討した。各粒子の処置条件は、培養液中で精子の凝集が確認されなかったnSP70の濃度を用いた (nSP70 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ,nSP300 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ,mSP1000 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) )。

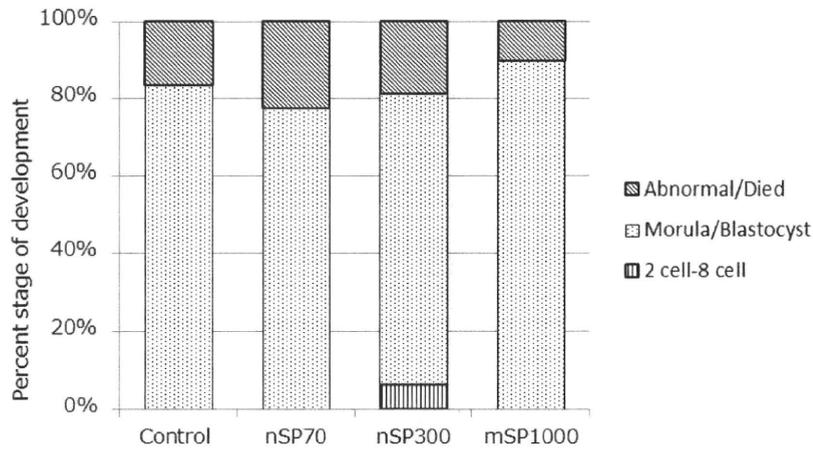


図5. 2細胞期から胚盤胞期への発生におけるnSPの影響。卵管遠流法により採卵した受精卵（2細胞期胚）を、30個/群として各粒子径のnSP含有培地で4~5日培養。胚盤胞期胚への正常な発生を指標にnSPの胚発生への影響を検討した。

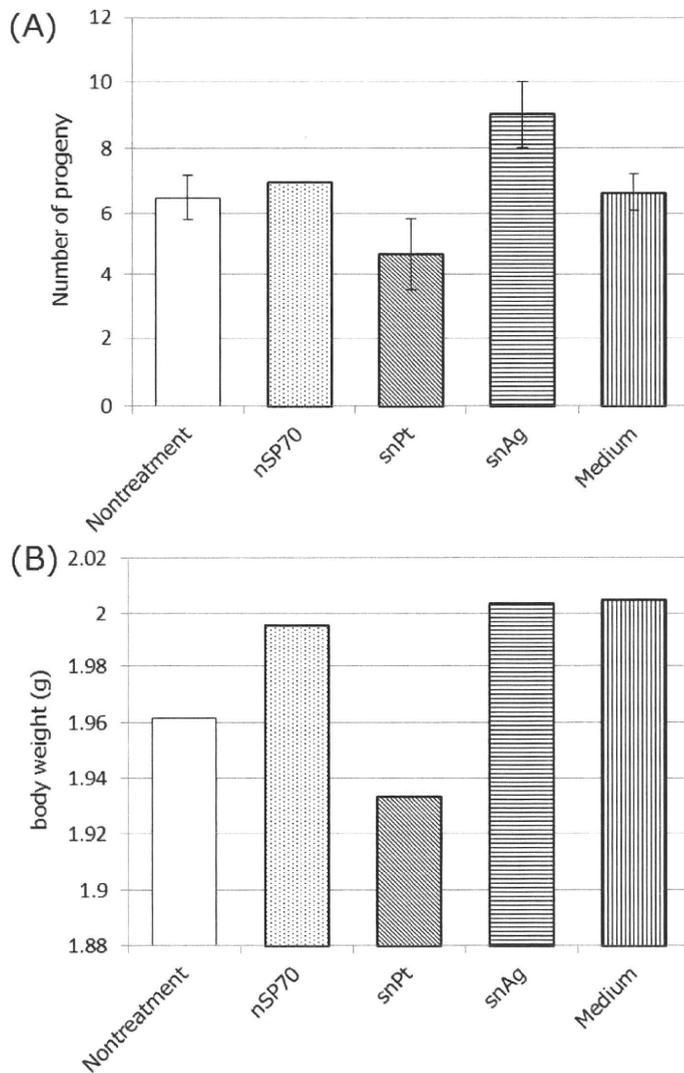


図6. 着床後胚へのナノマテリアルの影響。交尾5日後の雌性ICRマウスの子宮内へ非外科的子宫内投与法によりnSP70 (0.9 mg/mice)、snPt (10  $\mu$ g/mice)、snAg (10  $\mu$ g/mice)のいずれかを投与。15日後の産仔数 (A)および仔マウスの体重 (B)を指標に検討した。

## フラーレンおよびカーボンナノチューブのラットにおける 28 日間 反復経皮投与毒性に関する研究

研究分担者 桑形麻樹子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部

### 研究要旨

ナノマテリアルの安全性に関する試験の一環として、OECD TG410 に準じてフラーレンおよびカーボンナノチューブをラットに 28 日間反復経皮投与し生体への影響について評価した。雌雄の SD ラットに、溶媒(コーン油、注射用水)、C60、PVP-C60、SW-CNT、MW-CNT あるいは PVP-K30 を 1 日 6 時間、4 週間にわたり経皮投与し、一般状態の変化、体重および摂餌量の推移を観察し、解剖前に尿検査を実施した。動物は投与 4 週に剖検し、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、病理組織検査を実施した。その結果、いずれの検査項目においても被験物質投与によると考えられる顕著な変化はなかった。本試験の結果から、本条件下においては、28 日間のフラーレンあるいはカーボンナノチューブの経皮投与により、生体への重篤な影響は認められないと考えられた。

### A. 研究目的

ナノマテリアルの安全性に関する試験の一環として、OECD 化学物質毒性試験法ガイドライン 410 に準拠し、ナノマテリアルを雌雄ラットに 28 日間反復経皮投与した際の生体への影響について評価した。本試験に先立って大阪大学にて実施されている同試験において得られた結果との施設間比較も兼ねる。

### B. 研究方法

#### 1. 被験物質および投与方法

被験物質は大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野から提供されたものを用いた。被験物質、投与用量、群構成は表 1 に示す。

投与量設定は、先立って大阪大にて実施された 28 日間反復経皮投与試験で用いた用量を基に設定した。即ち、9 週齢の雄 Wistar ラットに SW-CNT あるいは MW-CNT を 200  $\mu$ g/200  $\mu$ L/body/day で、C60 あるいは PVP-C60 を 10 mg/200  $\mu$ L/body/day で、それぞれ、28 日間反復経皮投与した試験である。Wistar ラットの平均体重を 200 g として計算すると、SW-CNT あ

るいは MW-CNT は 1 mg/kg、C60 あるいは PVP-C60 は 50 mg/kg がほぼ同等量の投与量となる。また、投与容量はリント布(3 x 3 cm)の大きさを考慮し、2 mL/kg とした(図 1)。

被験物質の調製は、超音波ホモジナイザー US-600T(株式会社日本精機製作所)を用いて、氷冷下にて 200  $\mu$ A、5 分間攪拌して用時調製した後直ちに投与に用いた。

投与は、化粧品、塗装、剥離した物質として経皮的に吸収された場合の毒性を検討するために背部に閉塞貼付した(経皮投与)。3 x 3 cm のリント布に被験物質を滴下した後、皮膚にリント布とテガダーム(非吸収性フィルム)を貼付し、プラスチックラップを巻いて被覆固定した。その上に粘着フォームパット(伸縮性粘着包帯)を巻き、固定した。

投与回数は 1 日 6 時間、週 5 日(土、日は休薬)として、雄は投与 29 日(投与初日 = 投与 1 日)、雌は投与 30 日に解剖した。毎日、投与時間終了後には、貼付領域を被験物質の媒体(コーン油あるいは注射用水)を用いて清塗した。

なお、投与に先立ち、背部をバリカンにて剪毛した(剪毛から被験物質投与まで24時間以上あく様に考慮した。)

## 2. 動物および飼育条件

動物は5週齢の雌雄SD系ラットを購入し、温度(21.0~25.0℃)および湿度(40.0~75%)、換気回数(約15回/時間)、明暗サイクル(7時~19時まで点灯)が統御された飼育室に金属製金網床ケージにて個別に飼育し、固形飼料(CE-2、日本クレア株)および水道水を自由に摂取させた。1週間の検疫・馴化期間の後、1群雌雄各5匹になるように検疫終了時の体重を基に群分けした。投与開始時週齢は6週齢である。

## 3. 観察項目

全例について、投与期間中は毎日、投与前および投与後(除去後)に一般状態を観察した。体重は投与1日、8、15、22、28日および解剖日(雄は28日、雌は29日)に、摂餌量は投与1-2、8-9、15-16、22-23日に測定した。投与23日(雄)、投与24日(雌)に動物を代謝ケージに移して新鮮尿を採取し尿検査試験紙を用いて、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンを検査した。

剖検前に18-24時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下にて、腹部下行大静脈から採血した。EDTA 2Kを抗凝固剤として採取した血液を用いて、血液自動分析装置XT-2000IV(シスメックス)にて、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、白血球分類、網状赤血球比率、血小板数(PLT)、ヘマトクリット値(Ht)、血色素量(Hb)、平均赤血球容積(MCV;  $Ht \times 1000 / RBC$ )、平均赤血球血色素量(MCH;  $Hb \times 1000 / RBC$ )、平均赤血球血色素濃度(MCHC;  $Hb \times 100 / Ht$ )を測定し、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液から得た血漿を用いて、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、プロトロンビン時間(PT)を測定した(血液学的検査)。

さらに、ヘパリンを抗凝固剤として採血した血液から得た血漿にて、自動分析装置

JCA-BM6010(日本電子)にて、総蛋白濃度(TP)、アルブミン濃度(ALB)、A/G比;  $ALB / (TP - ALB)$ 、グルコース濃度、総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度、クレアチニン濃度、尿素窒素濃度(BUN)、カルシウム濃度(Ca)、無機リン濃度、総ビリルビン濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性(ALT)、アルカリフォスファターゼ活性(ALP)、 $\gamma$ グルタミルトランスペプチターゼ( $\gamma$ -GTP)、乳酸脱水素酵素(LDH)を、全自動電解質分析装置EA05(エイアンドティー)にて、ナトリウムイオン濃度(Na)、カリウムイオン濃度(K)、塩素イオン濃度(Cl)を測定した(血液生化学的検査)。

剖検時には器官、組織の肉眼的観察を実施するとともに、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣(雄)、卵巣(雌)の組織重量を測定した。さらに、皮膚(貼付部)、胸腺、心臓、肺・気管支、肝臓、下顎リンパ節、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節、精巣および精巣上体(雄)、卵巣、子宮および陰(雌)、病変部について、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的に観察した。

## 4. データの解析法

データは各被験物質投与群について、それぞれの溶媒対照群との間で有意差検定を行った。体重、摂餌量、器官重量、血液学的検査、血液生化学的検査値は、まず、各群についてF検定を行い、等分散の場合はStudentのt検定を、不等分散の場合はAspen-Welchのt検定を実施した。病理組織学検査については、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定を、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率の片側検定を行った。なお、有意水準は対照群を繰り返し用いることによる第1種の過誤を防ぐためにボンフェルヌイの補正を加えた。有意水準は注射用水を媒体としたPVP-C60群およびPVP-K30群は3%、コーン油を媒体とするC60、SW-CNT、MW-CNTは2%とした。

## C. 研究結果(次項Dにまとめて記載する)

#### D. 考 察

一般状態の変化として投与 3 週以降に、雌雄とも、投与部位周辺部テーピング領域の皮膚に痂皮形成が 1-2 例観察された例が対照群を含み認められた(表 1、表 2)。このうち雌の PVP-K30 群の 1 例では、自傷行為により皮膚からの出血が観察された。しかし、いずれも投与部位には異常はなかった。体重推移および摂餌量においても、雌雄とも対照群と各被験物質投与群との間に差はなかった(表 3、表 4、表 5、表 6)。

血液学的検査の結果(表 7、表 8)、雄ではいずれの項目においても対照群と各被験物質投与群との間に差はなかった。雌では、SW-CNT 群のヘマトクリット値が溶媒対照群と比較して有意に高値を示し、PVP-K30 群の APTT 時間が溶媒対照群と比較して有意に延長したが、その程度は僅かであり、毒性学的に意味のある変化ではないと判断した。

血液生化学検査の結果(表 9、表 10)、雄では、SW-CNT 群および MW-CNT 群の AST 値および ALT 値が溶媒対照群と比較して有意に低値を示した。しかし、肝臓の逸脱酵素の低値は毒性学的に意義が乏しいことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。さらに MW-CNT 群の ALP 値が溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。ALP 値は肝臓、骨における異常の他、低栄養時や ALP 合成に影響がある場合に低値を示すが、今回、MW-CNT 群の体重推移には対照群と差は認められていない。また、剖検時に骨の異常所見は認められておらず、肝臓重量や肝臓の病理組織学検査においても異常は観察されていないことから毒性学的に意味のある変化ではないと判断した。また、PVP-C60 群の 1 例において剖検時に肝臓に白色領域が認められ、病理組織学的には限局性の壊死像が観察された。このため、この動物の AST 値、ALP 値、LDH 値が高値を示し、群平均の SD 値が大きくなった。しかし、肝臓の所見はこの 1 例においてのみ観察されたこと、この白色領域がみられた部位は肝臓が間膜により腹腔に固定さ

れ、物理的刺激を受けやすい領域であり、壊死(白色班)が起こりやすい部位であることから、PVP-C60 投与により肝臓に発現した所見ではないと考えられた。その他、血清蛋白とその内訳、血中グルコース濃度、脂質代謝と栄養状態、腎機能、電解質の各項目には対照群と各被験物質投与群との間に差はなかった。雌では、A/G 比が PVP-C60 群で溶媒対照群と比較して有意に高値を示した。総蛋白濃度およびアルブミン濃度から、グロブリン濃度の低値が推察されたが、その差は僅かであったことから、偶発的な所見であると考えられた。また、PVP-C60 群の 1 例の AST 値および ALT 値が溶媒対照群の約 2 倍の値を示したため、同項目の平均値の SD 値が大きくなった。しかし、この動物の肝臓重量や肝臓の病理組織学検査には異常は認められなかったことや 1 例にのみ観察された変化であることから、PVP-C60 投与により肝臓障害を誘発したという根拠は少ないと考えられた。その他、血中グルコース濃度、脂質代謝と栄養状態、腎機能、電解質の各項目には被験物質投与による変化は認められなかった。

尿検査の結果には対照群と被験物質投与群との間に差はなかった(表 11、表 12)。

雄の剖検所見(表 15)では、注射用水群の 1 例で腎臓の大型化、下顎リンパ節の大型化、脾臓の大型化が、同群の別の 1 例で皮膚の痂皮形成(テーピング領域)がみられた。また PVP-C60 群では、肝臓の白色領域(先述)が 1 例に、CW-CNT 群および PVP-K30 群では下顎リンパ節の大型化が各 1 例にみられた。また、雌の剖検所見(表 16)では、注射用水群の 1 例に下顎リンパ節の大型化が観察された。雄の注射用水群で剖検時に観察された腎臓、下顎リンパ節、脾臓には、病理組織学検査および血液生化学検査の結果から、異常は認められなかった。また、下顎リンパ節の大型化がみられた例では、病理組織学的には異常はなかった。

器官重量(表 13、表 14)では、雄の C60 群の肝臓重量ならびに雌の PVP-C60 群の腎臓重量がそれぞれの溶媒対照群と比較して有意に低値を示

したが、その程度はごく僅かであり比体重値には差がないこと、病理組織学的検査では異常はないことから、これらの変化は偶発的な変化であると判断した。また、雌の卵巢実測重量が C60 群および MW-CNT 群で有意に高値を示した。卵巢の病理組織学的検査では形態に異常はなかった。剖検時(10 週齢)は性周期が回帰する時期であり性周期による重量の変化が平均値の差に影響を及ぼしていると考えられた。雄の副腎重量が C60 群および SW-CNT 群で有意に高値を示した。病理組織学検査では腎臓皮質の束状帯の細胞がごく僅かに腫大している傾向がうかがわれたが明瞭な所見ではなかった。

病理組織学的検査の結果(表 17、表 18)、雌雄ともに観察した組織には対照群を含めて組織学的変化が観察された。しかし、その所見には、被験物質投与により、頻度や程度が強くなる傾向は認められなかった。

#### E. 結論

本条件下では、フラーレンおよびカーボンナノチューブを 28 日間反復経皮投与した結果、貼付した皮膚には被験物質投与による変化は観察されず、一般毒性学的指標においても生体へ悪影響を及ぼす変化は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### ①論文発表

該当なし。

##### 【総説・その他】

該当なし。

##### ② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 0 件】

【国内学会発表 : 合計 0 件】

【国際学会発表 : 合計 0 件】

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ① 特許取得

該当なし。

##### ② 実用新案登録

該当なし。

##### その他

該当なし。

##### 研究協力者

高島宏昌、永田伴子(財団法人食品薬品安全センター)

図1 群構成

群	投与物質	媒体	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量* (mL/kg)	動物番号	
						雄	雌
対照群-1	コーン油		0	0	2	M01001~	F01001~
						M01005	F01005
対照群-2	注射用水		0	0	2	M02001~	F02001~
						M02005	F02005
3	C60 (Fullerene)	コーン油	1	0.05	2	M03001~	F03001~
						M03005	F03005
4	PVP-C60 (Polyvinylpyrrolidone- fullerene complex)	注射用水	50	2.5	2	M04001~	F04001~
						M04005	F04005
5	SW-CNT (Single-walled Carbon nanotube)	コーン油	1	0.05	2	M05001~	F05001~
						M05005	F05005
6	MW-CNT (Multi-walled Carbon nanotube)	コーン油	1	0.05	2	M06001~	F06001~
						M06005	F06005
7	PVP-K30 (Polyvinylpyrrolidone K30)	注射用水	50	2.5	2	M07001~	F07001~
						M07005	F07005

\*:最近時の体重をもとに個体別の投与液量を算出した。

表1 一般状態(雄)

Table 1. General conditions of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of males and general conditions	Days of administration																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Corn oil (control 1)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Distilled water (control 2)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C60	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PVP-C60	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	9	4	4	9	8	8	10	10	10	5	5	10	10	
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SW-CNT	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	8	3	3	10	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW-CNT	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	9	4	4	10	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PVP-K30	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Numerals represent the total number of animals showing clinical signs at pre- and post observations.

表2 一般状態(雌)

Table 2. General conditions of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of females and general conditions	Days of administration																													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Corn oil (control 1)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	10	10	9	4	4	7	6	8	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Distilled water (control 2)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	9	4	4	10	10	10	5	5	10	10	10	5	5	10	10	
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C60	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	7	2	2	7	6	6	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PVP-C60	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	8	3	3	8	6	9	10	5	5	10	10	5	5	10	10	
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SW-CNT	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	9	4	4	9	8	8	10	10	5	5	10	10	5	5	10	10
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MW-CNT	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	8	3	3	9	9	10	9	4	4	10	10	5	5	10	10	
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PVP-K30	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5	10	10	10	7	2	2	10	10	10	5	5	10	10	9	4	4	10	10	
	Skin, crust formation by taping (except exposure area)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Numerals represent the total number of animals showing clinical signs at pre- and post observations.

表3 体重推移(雄)

Table 3 . Body weights of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Com oil (control 1)	Distilled water (control 2)	C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
Number of males	5	5	5	5	5	5	5
Days of administration							
1	198.4 ± 6.4	192.0 ± 4.4	196.5 ± 6.5	199.2 ± 3.9	197.7 ± 5.9	192.6 ± 6.0	194.3 ± 6.9
8	246.2 ± 12.4	241.8 ± 3.8	249.8 ± 9.7	249.9 ± 7.0	248.9 ± 14.2	245.0 ± 8.7	247.7 ± 14.4
15	287.7 ± 18.7	293.8 ± 10.0	302.2 ± 14.5	293.2 ± 20.4	294.3 ± 23.2	295.1 ± 12.0	295.2 ± 12.3
22	324.9 ± 22.1	337.9 ± 17.1	344.0 ± 19.4	330.8 ± 27.5	338.3 ± 27.9	336.4 ± 18.3	333.7 ± 18.9
28	352.7 ± 25.7	367.3 ± 23.6	370.6 ± 27.7	357.7 ± 34.1	366.9 ± 34.4	364.6 ± 21.9	363.6 ± 23.5

Each value shows mean (g) ± S.D.

表4 体重推移(雌)

Table 4 . Body weights of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Com oil (control 1)	Distilled water (control 2)	C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
Number of females	5	5	5	5	5	5	5
Days of administration							
1	151.3 ± 5.1	157.5 ± 7.9	159.6 ± 7.1	151.7 ± 9.1	152.2 ± 6.2	151.1 ± 6.7	153.3 ± 8.8
8	173.6 ± 13.1	176.4 ± 7.4	182.2 ± 7.6	168.5 ± 14.3	171.0 ± 9.8	177.5 ± 6.6	172.6 ± 15.1
15	191.3 ± 21.4	191.2 ± 7.7	198.7 ± 10.7	182.8 ± 14.6	188.5 ± 9.7	197.5 ± 9.5	195.7 ± 15.5
22	204.1 ± 22.1	208.8 ± 9.0	218.3 ± 18.3	196.0 ± 20.2	198.9 ± 13.7	216.5 ± 9.9	212.0 ± 17.9
28	219.8 ± 25.9	221.2 ± 11.2	232.9 ± 19.8	207.0 ± 22.2	213.1 ± 11.6	232.4 ± 9.0	225.8 ± 19.9

Each value shows mean (g) ± S.D.

表5 摂餌量(雄)

Table 5 . Food consumption of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Com oil (control 1)	Distilled water (control 2)	C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
Number of males	5	5	5	5	5	5	5
Days of administration							
2	24.8 ± 2.0	22.9 ± 1.5	23.1 ± 1.8	22.4 ± 1.0	24.3 ± 2.2	23.6 ± 1.0	23.6 ± 1.3
9	26.3 ± 2.9	24.6 ± 1.0	25.9 ± 1.6	26.9 ± 2.4	27.8 ± 1.2	25.4 ± 1.6	26.4 ± 2.1
16	30.0 ± 2.0	28.3 ± 2.3	28.5 ± 1.8	27.6 ± 3.0	30.1 ± 1.2	28.0 ± 0.9	27.4 ± 0.8
23	30.1 ± 3.6	29.2 ± 2.6	27.7 ± 2.6	28.5 ± 4.4	29.2 ± 2.9	29.1 ± 1.1	30.1 ± 3.5

Each value shows mean (g) ± S.D.

表6 摂餌量(雌)

Table 6 . Food consumption of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Com oil (control 1)	Distilled water (control 2)	C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
Number of females	5	5	5	5	5	5	5
Days of administration							
2	18.3 ± 3.2	19.6 ± 1.7	19.4 ± 1.2	16.7 ± 2.3	18.8 ± 1.4	19.1 ± 1.5	17.3 ± 1.7
9	19.4 ± 2.6	19.6 ± 1.7	19.8 ± 2.4	18.6 ± 1.4	19.1 ± 2.5	17.6 ± 2.3	18.6 ± 3.1
16	22.5 ± 1.6	20.7 ± 2.5	22.5 ± 2.6	19.6 ± 2.1	18.9 ± 2.6	21.8 ± 2.0	21.2 ± 2.7
23	23.5 ± 1.8	21.2 ± 2.4	23.1 ± 3.2	20.8 ± 3.5	21.5 ± 1.4	23.7 ± 0.9	22.9 ± 3.0

Each value shows mean (g) ± S.D.

表7 血液学检查(雄)

Table 7. Hematological findings of male rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	RBC (x10 <sup>12</sup> /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (x10 <sup>9</sup> /μL)	PT (sec)	APTT (sec)
Corn oil (control 1)	5	781 ±34	14.8 ±0.2	44.3 ±0.8	56.8 ±2.4	19.0 ±0.6	33.4 ±0.6	102.7 ±10.9	18.9 ±3.6	22.2 ±1.6
Distilled water (control 2)	5	773 ±29	14.7 ±0.5	44.4 ±1.7	57.5 ±3.2	19.0 ±0.9	33.0 ±0.3	115.0 ±15.3	20.0 ±2.6	21.3 ±1.5
C60	5	790 ±28	14.9 ±0.3	45.2 ±0.9	57.3 ±2.4	18.8 ±0.6	32.8 ±0.5	105.4 ±6.6	19.4 ±3.9	21.9 ±2.2
PVP-C60	5	818 ±39	15.3 ±0.5	46.0 ±1.3	56.4 ±1.6	18.8 ±0.4	33.3 ±0.4	111.2 ±8.0	18.1 ±3.5	22.5 ±3.0
SW-CNT	5	762 ±50	14.9 ±0.7	45.0 ±2.4	59.1 ±1.5	19.6 ±0.5	33.1 ±0.4	115.3 ±14.7	18.5 ±4.1	22.7 ±1.2
MW-CNT	5	734 ±59	14.3 ±1.0	43.8 ±2.8	59.8 ±1.6	19.5 ±0.5	32.5 ±0.5	110.5 ±7.7	17.3 ±1.8	22.5 ±1.6
PVP-K30	5	771 ±28	14.9 ±0.5	45.4 ±0.7	58.9 ±1.5	19.3 ±0.3	32.8 ±0.6	103.3 ±9.4	18.8 ±3.9	23.4 ±2.3

Group	Number of animals	WBC (x100/μL)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Reticulocyte (%)
Corn oil (control 1)	5	101.2 ±26.1	18.2 ±3.9	1.0 ±0.3	0.0 ±0.0	3.9 ±0.9	76.9 ±3.7	3.32 ±0.34
Distilled water (control 2)	5	98.7 ±40.6	18.6 ±6.5	1.0 ±0.4	0.0 ±0.1	4.0 ±0.8	76.3 ±7.0	3.71 ±0.32
C60	5	81.1 ±14.6	15.1 ±2.4	1.4 ±0.2	0.0 ±0.0	3.7 ±0.4	79.6 ±2.4	3.38 ±0.71
PVP-C60	5	85.1 ±17.1	17.9 ±4.9	1.5 ±0.4	0.1 ±0.1	4.3 ±1.1	76.2 ±4.5	3.60 ±0.27
SW-CNT	5	86.5 ±2.8	17.4 ±4.6	1.4 ±0.6	0.0 ±0.0	3.4 ±0.5	77.7 ±5.3	3.60 ±0.38
MW-CNT	5	92.4 ±32.3	15.1 ±8.6	1.3 ±0.3	0.0 ±0.1	2.8 ±0.7	80.7 ±8.6	4.17 ±1.03
PVP-K30	5	88.6 ±21.3	16.3 ±4.0	1.3 ±0.5	0.1 ±0.1	3.9 ±0.8	78.5 ±4.4	3.46 ±0.42

Each value shows mean ± S.D.

表8 血液学检查(雌)

Table 8. Hematological findings of female rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	RBC (x10 <sup>12</sup> /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (x10 <sup>9</sup> /μL)	PT (sec)	APTT (sec)
Corn oil (control 1)	5	763 ±48	14.7 ±0.7	43.5 ±1.6	57.1 ±2.0	19.3 ±0.6	33.9 ±0.6	102.0 ±9.1	12.7 ±0.9	16.6 ±1.5
Distilled water (control 2)	5	745 ±45	14.5 ±0.7	43.3 ±1.6	58.1 ±2.5	19.5 ±0.7	33.6 ±0.7	109.4 ±16.3	13.3 ±1.2	17.0 ±1.2
C60	5	757 ±32	14.5 ±0.2	42.8 ±0.8	56.6 ±2.4	19.1 ±0.6	33.8 ±0.5	106.9 ±11.5	13.3 ±0.9	16.7 ±1.3
PVP-C60	5	766 ±50	15.0 ±0.8	44.3 ±2.6	57.9 ±1.5	19.6 ±0.5	33.9 ±0.3	106.7 ±24.0	13.2 ±0.5	16.4 ±1.4
SW-CNT	5	798 ±25	15.4 ±0.5	46.1 * ±3.0	57.8 ±1.1	19.3 ±0.3	33.4 ±0.6	109.0 ±16.3	13.8 ±1.4	18.1 ±1.1
MW-CNT	5	779 ±71	15.0 ±1.1	44.4 ±3.0	57.2 ±2.1	19.3 ±0.5	33.7 ±0.4	124.0 ±20.9	12.9 ±0.7	18.5 ±1.4
PVP-K30	5	788 ±41	15.0 ±0.6	45.1 ±1.5	57.3 ±1.7	19.1 ±0.7	33.4 ±0.4	112.3 ±16.8	12.9 ±0.7	19.1 # ±1.1

Group	Number of animals	WBC (x100/μL)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Reticulocyte (%)
Corn oil (control 1)	5	53.0 ±17.7	10.4 ±2.3	2.0 ±0.4	0.0 ±0.0	2.9 ±1.1	84.7 ±2.7	3.04 ±0.31
Distilled water (control 2)	5	65.7 ±9.4	14.4 ±4.4	2.1 ±0.5	0.0 ±0.0	2.3 ±0.5	81.3 ±5.0	3.02 ±0.61
C60	5	58.1 ±20.9	13.5 ±5.5	2.1 ±1.0	0.0 ±0.0	3.0 ±0.6	81.4 ±5.9	2.71 ±0.64
PVP-C60	5	52.7 ±10.5	12.1 ±2.5	1.5 ±0.3	0.0 ±0.0	2.5 ±0.7	83.9 ±2.7	2.53 ±0.56
SW-CNT	5	63.1 ±14.0	10.1 ±4.2	2.0 ±0.8	0.0 ±0.0	2.6 ±0.4	85.3 ±4.5	3.00 ±0.77
MW-CNT	5	66.5 ±10.1	14.3 ±8.0	2.8 ±0.7	0.0 ±0.0	3.0 ±1.3	79.8 ±8.4	3.08 ±0.53
PVP-K30	5	71.1 ±23.0	14.4 ±4.4	2.0 ±1.4	0.0 ±0.0	3.4 ±0.9	80.2 ±5.3	2.71 ±0.45

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (#P<0.03; control 2, \*P<0.02; control 1)

表9 血液生化学検査(雄)

Table 9. Biochemical findings of male rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)
Corn oil (control 1)	5	5.2 ±0.3	3.7 ±0.2	41 ±7	25 ±6	75 ±9	137 ±12	14 ±3	0.4 ±0.1	0.05 ±0.01	790 ±133
Distilled water (control 2)	5	5.3 ±0.1	3.6 ±0.1	40 ±6	32 ±18	70 ±6	126 ±4	14 ±2	0.4 ±0.0	0.04 ±0.01	612 ±51
C60	5	5.2 ±0.1	3.6 ±0.2	42 ±9	19 ±10	70 ±13	119 ±8	14 ±2	0.4 ±0.0	0.04 ±0.01	820 ±241
PVP-C60	5	5.3 ±0.2	3.7 ±0.1	38 ±9	23 ±14	68 ±10	126 ±7	15 ±2	0.4 ±0.0	0.05 ±0.01	728 ±118
SW-CNT	5	5.1 ±0.2	3.5 ±0.1	40 ±9	35 ±31	70 ±15	120 ±6	13 ±0	0.3 ±0.1	0.05 ±0.01	575 ±131
MW-CNT	5	5.3 ±0.2	3.6 ±0.1	39 ±9	22 ±12	66 ±9	124 ±9	13 ±3	0.4 ±0.1	0.04 ±0.00	526 * ±107
PVP-K30	5	5.4 ±0.2	3.7 ±0.1	41 ±8	24 ±6	73 ±10	126 ±19	15 ±1	0.4 ±0.0	0.05 ±0.01	687 ±84

Group	Number of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	LDH (U/L)	Ca (mg/dL)	Inorganic phosphorus (mg/dL)	A/G	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
Corn oil (control 1)	5	76 ±4	36 ±2	0 ±1	63 ±12	9.3 ±0.3	7.7 ±0.4	2.42 ±0.17	143.5 ±0.8	3.91 ±0.37	105.9 ±1.3
Distilled water (control 2)	5	75 ±10	34 ±5	0 ±1	81 ±48	9.6 ±0.2	7.6 ±0.7	2.12 ±0.26	145.0 ±1.2	3.94 ±0.13	106.6 ±1.3
C60	5	84 ±31	32 ±7	0 ±0	91 ±30	9.7 ±0.2	7.6 ±0.5	2.32 ±0.29	145.0 ±1.0	3.83 ±0.22	107.0 ±0.9
PVP-C60	5	97 ±49	42 ±17	0 ±0	126 ±80	9.7 ±0.2	7.7 ±0.3	2.26 ±0.09	144.0 ±1.0	3.92 ±0.08	106.8 ±0.7
SW-CNT	5	66 * ±5	28 * ±3	0 ±0	54 ±8	9.6 ±0.3	7.9 ±0.4	2.22 ±0.26	144.2 ±1.3	3.79 ±0.21	106.0 ±1.6
MW-CNT	5	65 * ±4	26 * ±5	0 ±1	60 ±36	9.6 ±0.2	7.9 ±0.5	2.15 ±0.12	144.4 ±0.7	3.77 ±0.16	106.5 ±1.1
PVP-K30	5	74 ±9	32 ±3	0 ±0	113 ±78	9.6 ±0.3	7.5 ±0.5	2.21 ±0.16	144.6 ±0.8	3.60 ±0.22	107.4 ±1.5

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (\*P<0.02; control 1)

表10 血液生化学検査(雌)

Table 10. Biochemical findings of female rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)
Corn oil (control 1)	5	5.5 ±0.2	3.8 ±0.2	46 ±10	10 ±5	85 ±13	120 ±14	16 ±1	0.5 ±0.1	0.06 ±0.01	440 ±102
Distilled water (control 2)	5	5.4 ±0.2	3.7 ±0.3	46 ±11	10 ±4	86 ±17	113 ±12	16 ±1	0.4 ±0.0	0.05 ±0.01	373 ±87
C60	5	5.3 ±0.3	3.7 ±0.2	41 ±9	10 ±3	79 ±13	117 ±10	16 ±3	0.4 ±0.0	0.06 ±0.01	422 ±73
PVP-C60	5	5.3 ±0.5	3.8 ±0.4	46 ±11	9 ±4	84 ±20	116 ±11	16 ±1	0.4 ±0.0	0.06 ±0.01	328 ±80
SW-CNT	5	5.2 ±0.4	3.6 ±0.3	52 ±14	11 ±4	91 ±20	125 ±6	14 ±2	0.4 ±0.0	0.06 ±0.01	441 ±60
MW-CNT	5	5.5 ±0.1	3.8 ±0.1	44 ±8	10 ±1	79 ±10	118 ±11	18 ±7	0.5 ±0.1	0.05 ±0.01	461 ±46
PVP-K30	5	5.5 ±0.3	3.8 ±0.1	55 ±14	13 ±5	97 ±23	115 ±5	15 ±1	0.4 ±0.0	0.06 ±0.01	482 ±64

Group	Number of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	LDH (U/L)	Ca (mg/dL)	Inorganic phosphorus (mg/dL)	A/G	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
Corn oil (control 1)	5	74 ±8	26 ±2	1 ±0	80 ±23	9.3 ±0.4	6.6 ±0.7	2.29 ±0.12	143.9 ±1.2	3.65 ±0.20	107.1 ±2.2
Distilled water (control 2)	5	71 ±7	27 ±4	1 ±0	80 ±20	9.2 ±0.2	7.1 ±0.4	2.13 ±0.27	144.4 ±1.0	3.70 ±0.24	107.8 ±0.6
C60	5	76 ±11	24 ±3	1 ±0	69 ±33	9.2 ±0.3	6.8 ±0.3	2.31 ±0.16	143.0 ±0.6	3.71 ±0.13	107.8 ±1.6
PVP-C60	5	87 ±37	42 ±35	1 ±0	87 ±30	9.3 ±0.4	7.5 ±0.5	2.53 * ±0.11	144.5 ±0.6	3.72 ±0.21	108.1 ±1.6
SW-CNT	5	74 ±4	26 ±2	1 ±0	85 ±39	9.4 ±0.2	7.5 ±0.6	2.37 ±0.38	143.3 ±1.1	3.62 ±0.14	107.6 ±1.5
MW-CNT	5	79 ±13	25 ±5	1 ±0	84 ±30	9.6 ±0.1	7.4 ±0.4	2.40 ±0.29	143.6 ±1.5	3.71 ±0.23	106.8 ±1.1
PVP-K30	5	81 ±8	33 ±15	1 ±0	59 ±11	9.6 ±0.3	7.5 ±0.8	2.28 ±0.23	143.5 ±0.8	3.65 ±0.29	107.0 ±0.3

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (#P<0.03; control 2)

表11 尿検査(雄)

Table 11. Urine findings of male rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	pH					protein				glucose			ketone body			Bilirubin		occult blood			urobilinogen	
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	-	±	1+	2+	-	1+	-	±	1+	-	-	1+	2+	±	1+		
Corn oil (control 1)	5	0	3	2	0	0	0	0	5	0	5	0	0	3	2	5	5	0	0	2	3		
Distilled water (control 2)	5	0	0	5	0	0	0	0	5	0	5	0	0	5	0	5	4	1	0	3	2		
C60	5	0	1	4	0	0	0	0	5	0	5	0	2	3	0	5	5	0	0	2	3		
PVP-C60	5	0	2	2	0	1	0	0	4	1	5	0	3	0	2	5	5	0	0	3	2		
SW-CNT	5	0	3	1	1	0	0	1	2	2	5	0	1	1	3	5	5	0	0	1	4		
MW-CNT	5	0	2	3	0	0	0	0	5	0	5	0	1	2	2	5	4	1	0	3	2		
PVP-K30	5	0	1	3	1	0	0	0	5	0	5	0	1	4	0	5	5	0	0	3	2		

Each value shows mean±S.D.

表12 尿検査(雌)

Table 12. Urine findings of female rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	pH					protein				glucose			ketone body			Bilirubin		occult blood			urobilinogen	
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	-	±	1+	2+	-	1+	-	±	1+	-	-	1+	2+	±	1+		
Corn oil (control 1)	5	0	3	2	0	0	0	4	1	0	5	0	4	1	0	5	5	0	0	5	0		
Distilled water (control 2)	5	1	3	0	0	1	0	2	3	0	5	0	2	3	0	5	5	0	0	4	1		
C60	5	0	5	0	0	0	0	2	3	0	5	0	2	3	0	5	5	0	0	2	3		
PVP-C60	5	0	3	2	0	0	0	3	2	0	5	0	2	2	1	5	4	0	1	4	1		
SW-CNT	5	1	4	0	0	0	0	2	3	0	5	0	3	2	0	5	5	0	0	3	2		
MW-CNT	5	0	3	1	1	0	1	1	3	0	5	0	2	3	0	5	5	0	0	2	3		
PVP-K30	5	1	1	1	2	0	2	1	2	0	5	0	3	1	1	5	5	0	0	3	2		

Each value shows mean±S.D.