

Original Article

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

Kiyoshi Wako¹, Yuri Kotani¹, Akihiko Hirose², Takuya Doi¹ and Shuichi Hamada¹

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

²Division 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 CrI: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 Medience 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 Medience 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 3.55×10^{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.

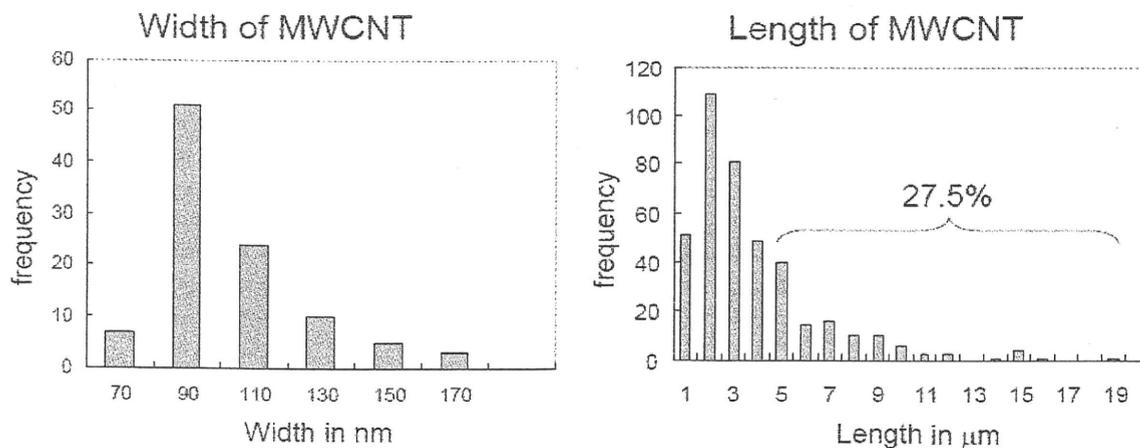


Fig. 1. Width and length distribution of MWCNT: The average width was about 100 nm, and 27.5% of the particles were longer than 5 μm .

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

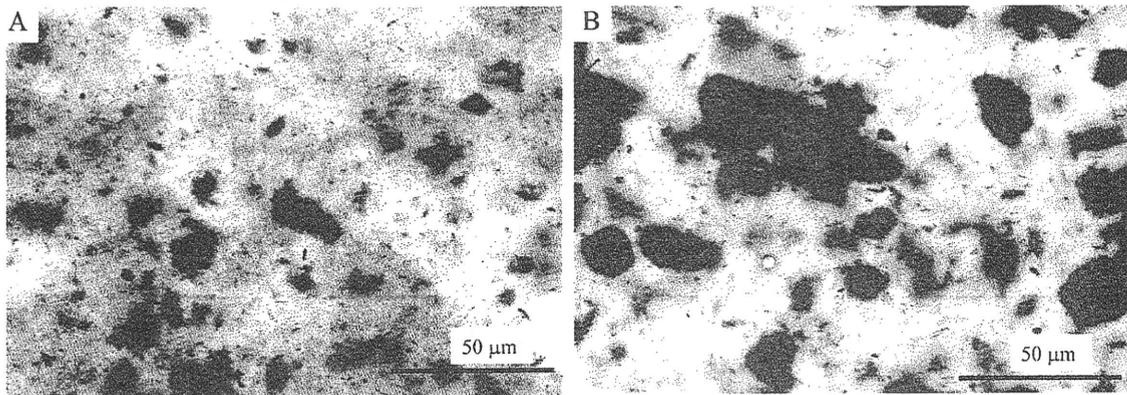


Fig. 2. Light microscopic view of administered MWCNT suspension: A) Ground MWCNT suspension, sizes of agglomerates were smaller than non-ground MWCNT suspension and finely dispersed fibers were seen. B) Non-ground MWCNT suspension, large agglomerates and small number of dispersed fibers were seen. Original magnifications were $\times 400$.

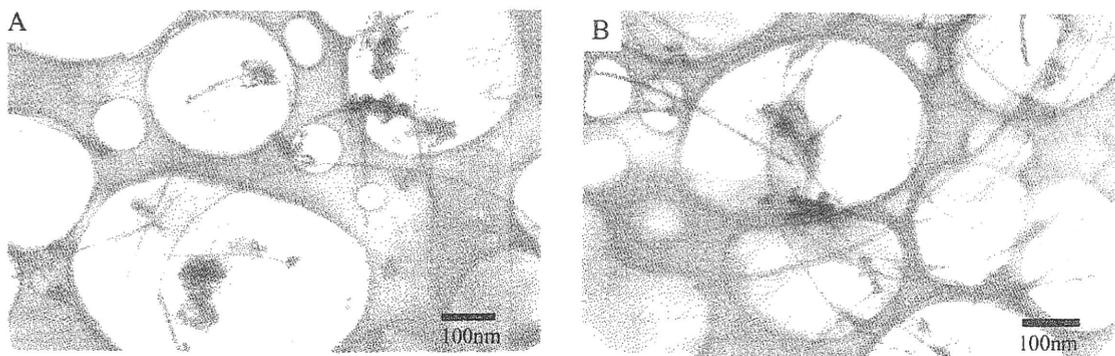


Fig. 3. Transmission electron microscopic view of administered MWCNT suspension: A) Ground MWCNT suspension, short fibers were seen. B) Non-ground MWCNT suspension, long fibers were seen.

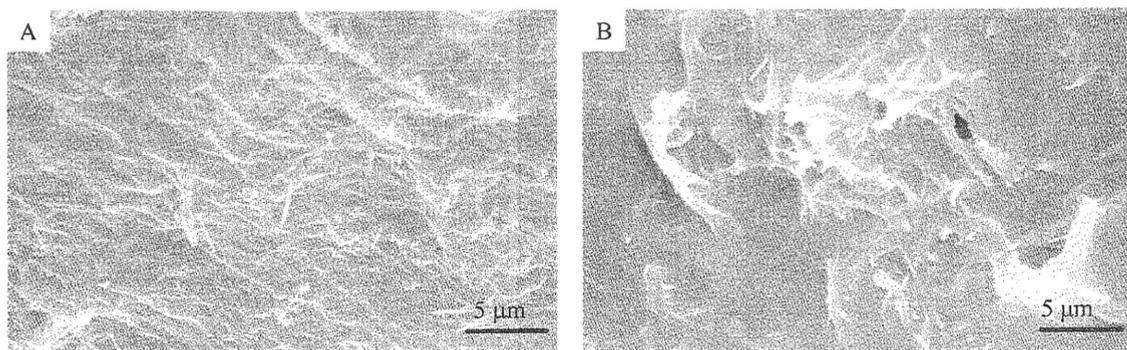


Fig. 4. Scanning electron microscopic view of administered MWCNT suspension: A) Ground MWCNT suspension, uniform suspended condition was seen with small size of fibers. B) Non-ground MWCNT suspension, non-uniform suspended condition and agglomerates were seen.

Effects of MWCNT suspension preparation method to pulmonary toxicity

the non-ground MWCNT and ground MWCNT on Day 8, ground MWCNT and Min-U-Sil on Day 29, as well as Min-U-Sil on Day 91. Higher protein levels in BALF were observed in all treated rats on Day 91 (Fig. 6). There were no remarkable differences in these parameters between rats given the non-ground and ground MWCNT.

Histological examination

Tables 1 and 2 summarized histopathological findings. Black patches in the lung and blackish change of the bronchiolar lymph nodes were macroscopically observed in rats given the non-ground and ground MWCNT. MWCNT, which was "blackish" in color, and was microscopically observed in the alveolar region of rats given the ground MWCNT on Day 2. In rats given the non-ground MWCNT, MWCNT was slightly observed in the bronchial region. On Day 8 or later, focal infiltration of MWCNT-laden macrophages were observed in the interstitium of the lung of rats given the non-ground MWCNT, compared to rats given the ground MWCNT, where macrophages were observed mainly in the alveolus. Ultrastruc-

turally, the macrophages in the alveolus of rats given the ground MWCNT had well-developed lysosomes (Figs. 7 and 9). In the bronchiolar lymph nodes of rats given the non-ground and ground MWCNT, there were black colored macrophage infiltrations, which were thought to be phagocytosed MWCNT. The severity of the black colored macrophage infiltrations in the bronchiolar lymph nodes progressively increased after Day 29 in rats given the ground MWCNT (Fig. 8). Focal inflammatory cell infiltration in the lungs was observed in rats given the non-ground and ground MWCNT on Day 2 only, however, it was observed in rats given Min-U-Sil not only on Day 2 but also on Day 92. In rats given Min-U-Sil, granuloma in the bronchiolar lymph nodes was observed on Day 92.

DISCUSSION

This study led to a conclusion that the ALS is one of the most suitable vehicle media to suspend MWCNT for intratracheal instillation. Buford *et al.* (2007) reported that the vehicle containing some protein, lipid or protein/

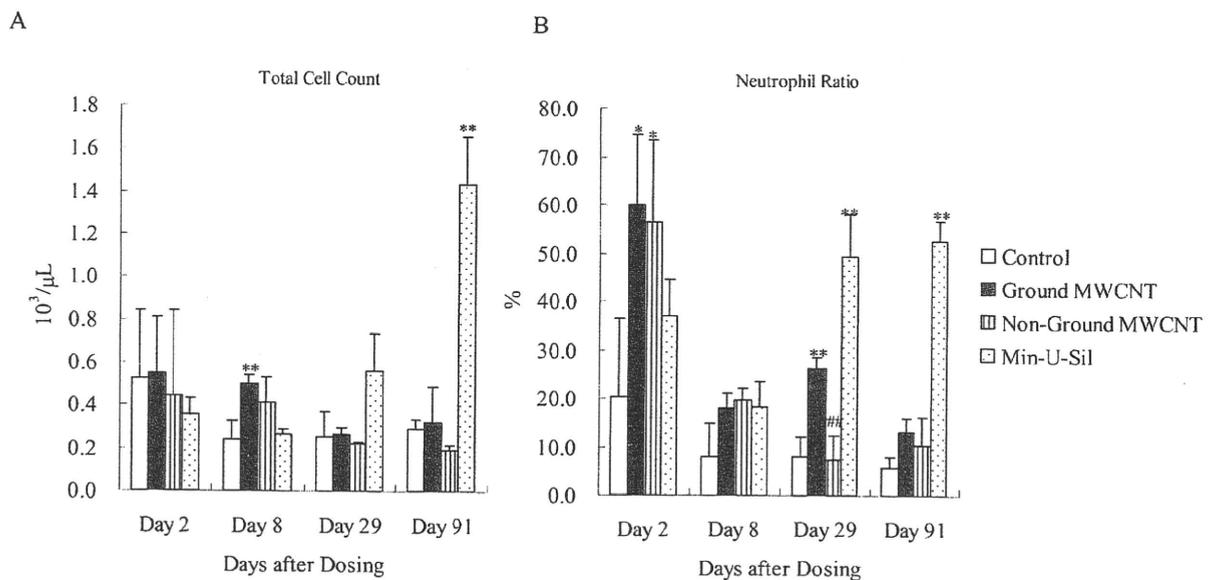


Fig. 5. A) Total cell count in broncho-alveolar lavage fluids (BALF) from rats exposed to non-ground and ground MWCNT, and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91 (day of dosing designated as day 1). Values are mean \pm S.D. Ground MWCNT induced significantly increasing of total cell count in BALF on day 8, ** $p < 0.01$. Min-U-Sil induced significantly increasing of total cell count in BALF on day 91, ** $p < 0.01$.

B) Neutrophil ratio in BALF from rats exposed to ground, non-ground MWCNT and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91. Values are mean \pm S.D. Ground and non-ground MWCNT induced higher neutrophil ratio in BALF on days 2, * $p < 0.05$, and ground MWCNT induced the higher neutrophil ratio on day 29, ** $p < 0.01$. Neutrophil ratio in non-ground MWCNT on day 29 significantly lower than ground MWCNT, ### $p < 0.05$. Min-U-Sil induced higher neutrophil ratio on days 29 and 91, * $p < 0.01$.

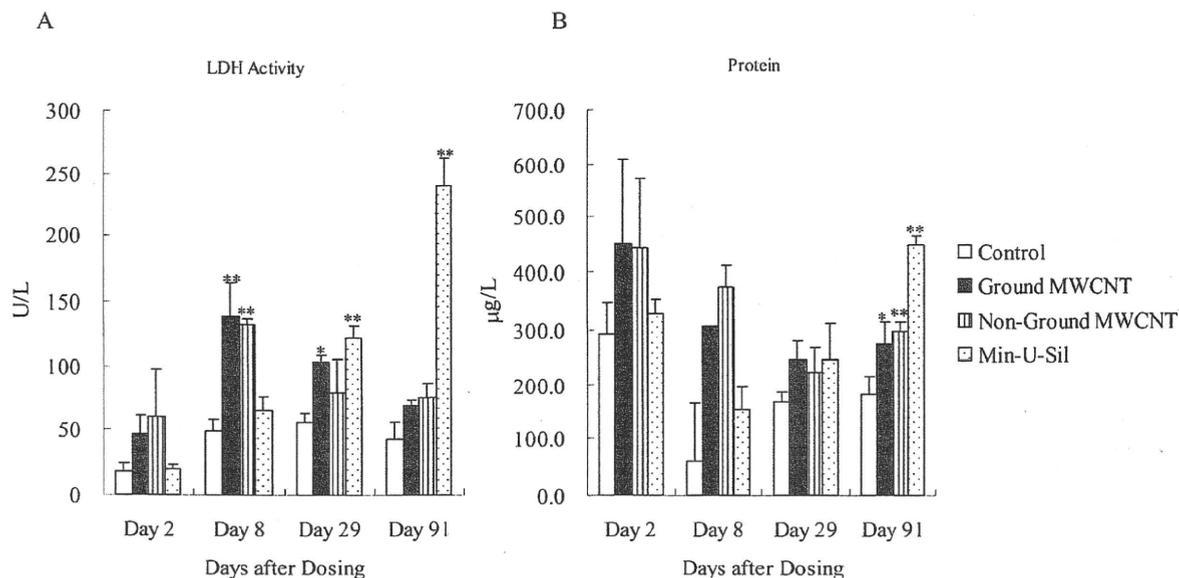


Fig. 6. A) LDH activity in BALF from rats exposed to non-ground and ground MWCNT, and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91 (day of dosing designated as day 1). Values are mean \pm S.D. Ground MWCNT induced significantly increasing of LDH activity on days 8 and 29, non-ground MWCNT induced higher LDH activity on day 8 only, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Min-U-Sil induced higher LDH activity on days 29 and 91, ** $p < 0.01$. B) Total protein concentration in BALF from rats exposed to ground, non-ground MWCNT and corresponding controls on days 2, 8, 29, and 91. Values are mean \pm S.D. Ground and non-ground MWCNT, and Min-U-Sil induced higher protein level in BALF on day 91, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

lipid component could disperse carbon nanotubes appropriately. Since the ALS used in this study is an extraction from bovine lung, which includes phospholipids, free fatty acids, and triglyceride, the results of this study did not contradict their report (Buford *et al.*, 2007). Additionally, although no remarkable adverse effects were noted by dosing of the xenogeneic media, the possible pulmonary toxicity of MWCNT may have to be evaluated by removing the influence of the xenogeneic agent. It is considered that the suspension preparation method recently reported (Buford *et al.*, 2007; Sager *et al.*, 2007) is suitable for this purpose.

The results of this study suggested that the wet-grinding in an agate mortar was useful to prepare uniform dispersed suspension, because it was confirmed that the grinding reduced the number and the size of the agglomerates in the suspensions. Since grinding with a mortar is a simple procedure, it was concluded that this method is appropriate for preparation of any other CNT suspensions for intratracheal instillation. Furthermore, this method reduced generation of MWCNT aerosol when conducted under wet conditions. This suggested that the possibility of inhalation of aerosolized MWCNT to human could be

reduced with this method.

There were remarkable differences between the ground MWCNT and non-ground MWCNT in the BALF chemistry analysis on Day 29. Higher neutrophil ratios and LDH levels in the BALF were observed in rats given the ground MWCNT on Day 29. In contrast, such changes were not noted in rats given the non-ground MWCNT. There were remarkable differences in histological changes of the lungs between rats given the ground and non-ground MWCNT. In rats given the ground MWCNT, remarkable macrophage infiltration in the alveolus was observed, but in the interstitium it was relatively weak. In contrast, there was predominant macrophage infiltration in the interstitium of rats given the non-ground MWCNT.

Muller *et al.* (2005) reported that ground MWCNT led the pulmonary lesion characterized by the interstitial fibrosis in the lungs. MWCNT-laden macrophage infiltration in the alveolus was considered to be attributable to the relatively short fiber, which was generated by grinding. The acceleration of phagocytic activity, which was demonstrated as an increase of developed lysosomes supported our speculation.

There were no inflammatory responses in the bronchi-

Effects of MWCNT suspension preparation method to pulmonary toxicity

Table 1. Numbers of rats indicating the histopathological lesions in the bronchiolar lymph node and trachea of rats given ground or non-ground multiwall carbon nanotube, Min-U-Sil, or artificial lung surfactant

Organ	Findings	Group name																							
		Control						Ground MWCNT						Non-Ground MWCNT						Min-U-Sil					
		Grade	Day:	2	8	29	92	2	8	29	92	2	8	29	92	2	8	29	92						
Lymph node, bronchial																									
	Cell infiltration, macrophage	1	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0		
		2	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
	Granuloma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0		
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3		
Trachea																									
	Accumulation, administered substance	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Cell infiltration, inflammatory, mucosa	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0		
	Regeneration, mucosa, focal	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Ulcer	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Hypertrophy, mucosal epithelium	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	Cell infiltration, macrophage, lamina propria, focal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0		

Note: values indicate number of animals indicating lesion.

Grade: 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate. Day: day of intratracheal instillation designated as Day 1.

Table 2. Numbers of rats indicating the histopathological lesions in the lung of rats given ground or non-ground multiwall carbon nanotube, Min-U-Sil, or artificial lung surfactant

Organ	Findings	Group name											
		Control			Ground MWCNT			Non-Ground MWCNT			Min-U-Sil		
		Grade	Day:	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	2 8 29 92	
Lung (and bronchus)													
	Accumulation, administered substance, alveolus	1		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 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
		2		0 0 0 0	2 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 0	0 0 0 0
		3		0 0 0 0	1 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 0	0 0 0 0
	Accumulation, administered substance, bronchus	1		0 0 0 0	2 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 0	0 0 0 0
		2		0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	2 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
		3		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 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
	Atelectasis, focal	1		0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	2 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
		2		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 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
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1		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	2 0 2 3	0 0 0 0	0 0 0 0
		2		0 0 0 0	3 0 0 0	0 0 0 0	2 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
		3		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 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
	Cell infiltration, macrophage, alveolus, focal	1		0 0 0 0	3 1 1 0	0 3 1 1	0 3 1 1	0 3 1 1	0 3 1 1	0 3 1 1	0 1 1 0	0 1 1 0	0 1 1 0
		2		0 0 0 0	0 2 2 3	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 0 3
	Cell infiltration, macrophage, interstitium, focal	1		0 0 0 0	0 3 3 3	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2
		2		0 0 0 0	0 0 0 0	0 3 1 3	0 3 1 3	0 3 1 3	0 3 1 3	0 3 1 3	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
	Erosion, bronchus	1		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 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
	Hyperplasia, lymphoid tissue	1		0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 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
	Hypertrophy, alveolar epithelium, focal	1		0 0 0 0	3 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 0	0 0 0 0
	Hypertrophy, bronchial epithelium	1		0 0 0 0	3 1 0 0	3 1 0 0	2 1 0 0	2 1 0 0	2 1 0 0	2 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0

Note: values indicate number of animals indicating lesion.

Grade: 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate. Day: day of intratracheal instillation designated as Day 1.

Effects of MWCNT suspension preparation method to pulmonary toxicity

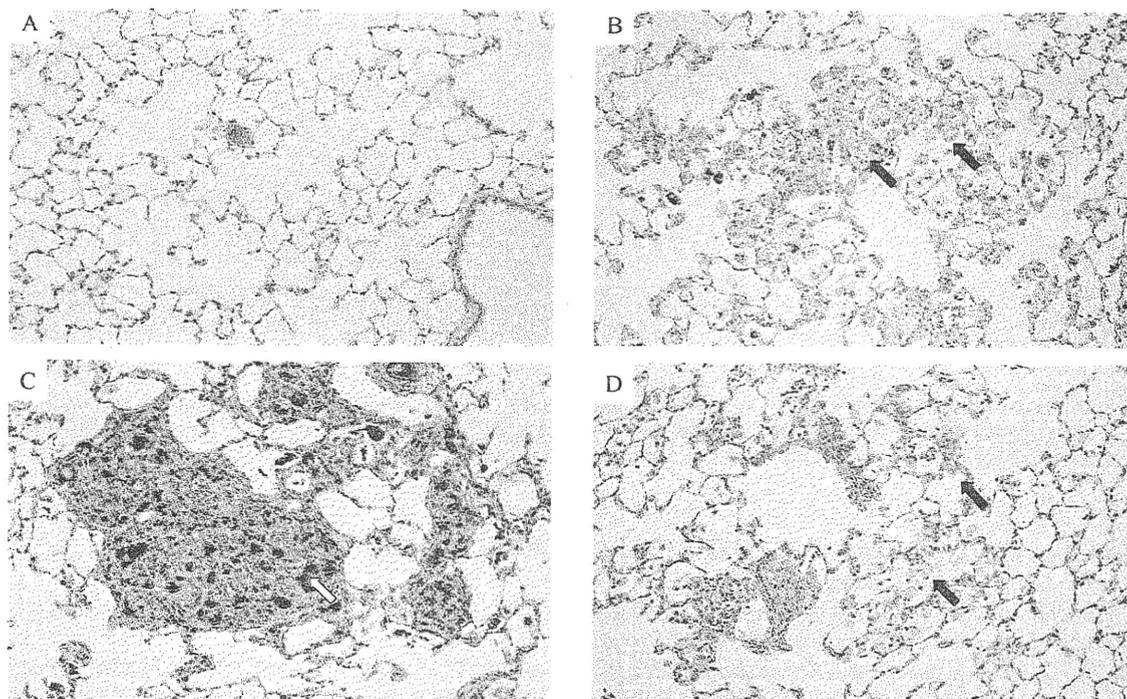


Fig. 7. Light microscopy of the lungs of rats exposed to non-ground and ground MWCNT, and corresponding controls on day 29. A) Control, no remarkable change. B) Ground MWCNT, foamy macrophage infiltration in alveolus. C) non-ground MWCNT, macrophage infiltration in interstitium. D) Min-U-Sil, foamy macrophage infiltration in alveolus.

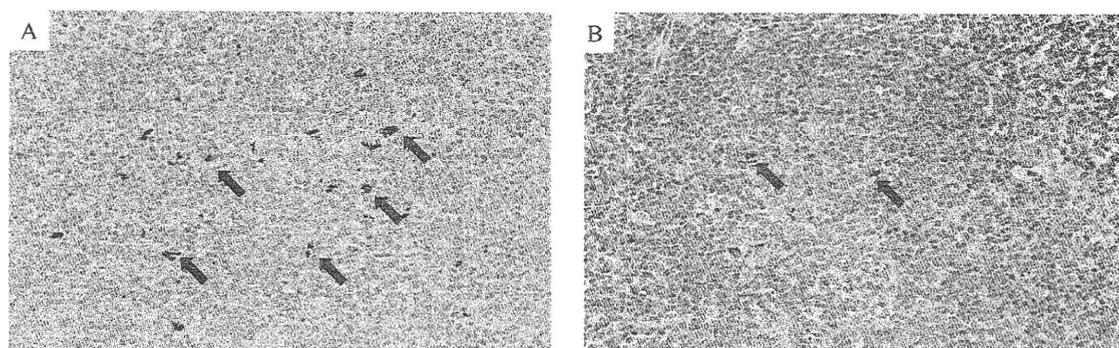


Fig. 8. Light microscopic view of bronchiolar lymph node of rats exposed to non-ground or ground MWCNT on day 29. A) Ground MWCNT: remarkable infiltration of macrophage including MWCNT without any inflammatory reactions than non-ground MWCNT. B) Non-ground MWCNT: infiltration of macrophage including MWCNT without any inflammatory reactions.

olar lymph nodes of rats given MWCNT. Since inflammatory change in the bronchiolar lymph nodes was observed in rats given Min-U-Sil, the biological activity on the discharge process of foreign body from the respiratory tract is considered to be remarkably different between MWC-

NT and Min-U-Sil.

It is estimated that the aerodynamic sizes of MWCNT become smaller than their original size, because MWCNT is widely used after the grinding process (Liu *et al.*, 2004). In fact, it is expected that MWCNT, which has

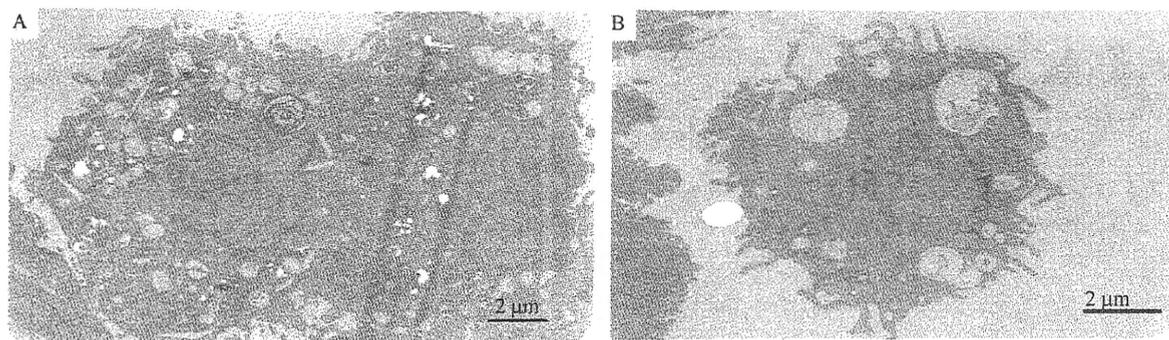


Fig. 9. Transmission electron microscopic view of macrophage in alveolus of rat exposed to non-ground or ground MWCNT. A) Ground MWCNT: macrophage in alveolus had lysosomes which developed remarkably. B) Non-ground MWCNT: macrophage in alveolus on day 29, there were no remarkable lysosomes.

small aerodynamic diameter due to the grinding, reaches deep into the lung in an occupational environment. The pulmonary toxicity of MWCNT obtained in this study was different from the recent report (Muller *et al.*, 2005). Consequently, it is considered that the available information on MWCNT induced pulmonary toxicity is not sufficient to evaluate the effects on human health. Since both of the above-mentioned studies did not have characterization data of the instilled suspensions, the pulmonary toxicity could not be compared between the studies. Therefore, the fibers in the suspensions must be characterized, at least for their length, diameter, and dispersion conditions in order to make a comparison with recent reports. Furthermore, the present study indicated that the different pulmonary toxicity occurred depending on the size of the particles in the suspension. These results suggested that the proper evaluation of the pulmonary toxicity of nanomaterial must include characterization of the instilled suspensions, even if it was only a single material.

There were no inflammatory reactions in the lung or bronchiolar lymph nodes in the rats given MWCNT 3 months after instillation. However, higher protein concentrations in BALF were observed in rats given MWCNT. Moreover, the long term effect of MWCNT on the lungs caused by grinding or non-grinding remained unclear in this study. These findings lead us to conclude that additional studies, such as examination of the fate of MWCNT in the lung and its long term effects on the lung are necessary.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by Health Sciences Research Grants H18-kagaku-ippan-007 from the ministry of

Health, Labor, and Welfare, Japan.

REFERENCES

- Buford, M.C., Hamilton, R.F. and Holian, A. (2007): A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.*, **4**, 6.
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G. and Alexander, A. (2006): Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol. Sci.*, **92**, 5-22.
- Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S. and Hunter, R.L. (2006): A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit. Rev. Toxicol.*, **36**, 189-217.
- Liu, C.H., Huang, H., Wu, Y. and Fan, S.S. (2004): Thermal conductivity improvement of silicone elastomer with carbon nanotube loading. *Appl. Phys. Lett.*, **84**, 4248-4250.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B. and Lison, D. (2005): Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **207**, 221-231.
- Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., Macnee, W. and Donaldson, K. (2008): Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 423-428.
- Sager, T.M., Porter, D.W., Robinson, V.A., Lindsley, W.G., Schwegler-Berry, D.E. and Castranova, V. (2007): Improved method to disperse nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* investigation of toxicity. *Nanotoxicology*, **1**, 118-129.
- Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S. and Kanno, J. (2008): Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 105-116.

【特集】

OECD 化学物質対策の動向 (第 16 報)

— 第 27 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2008 年オタワ)

Progress on OECD Chemicals Programme (16) — SIAM 27 in Ottawa, 2008

高橋美加¹、松本真理子¹、宮地繁樹²、菅野誠一郎³、菅谷芳雄⁴、平田睦子¹、小野敦¹、
鎌田栄一¹、江馬 眞^{1*}、広瀬明彦¹

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター総合評価研究室、
2) (財) 化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所、3) (独) 労働安全衛生総合研究所、
4) (独) 国立環境研究所環境リスク研究センター、
*現：(独) 産業技術総合研究所安全科学研究部門

Mika Takahashi¹, Mariko Matsumoto¹, Shigeki Miyachi², Seiichiro Kanno³,
Yoshio Sugaya⁴, Hirata-Koizumi Mutsuko¹, Ono Atsushi¹, Eiichi Kamata¹,
Makoto Ema^{1*}, and Akihiko Hirose¹

1) Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 2) Chemicals Assessment and Research Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, 3) National Institute of Occupational Safety and Health, and 4) Research Center for Environmental Risk, National Institute for Environmental Studies, and *present: Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

要旨：第 27 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (SIAM 27) が 2008 年 10 月にオタワ (カナダ) で開催され、日本が担当した 3 物質 (*p*-トルエンスルホン酸ナトリウム：CAS 番号 657-84-1、レゾルシノール：CAS 番号 108-46-3、N-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド：CAS 番号 95-33-0) の初期評価プロファイル (SIAP) について合意が得られた。本稿では本会議で合意の得られたこれら 3 物質の初期評価文書について紹介する。

キーワード：OECD、HPV プログラム、SIDS 初期評価会議

Abstract: The 27th Screening Information Data Set (SIDS) Initial Assessment Meeting (SIAM 27) was held in Ottawa, hosted by Canada. The initial assessment documents of three substances, sodium *p*-toluenesulfonate (CAS number: 657-84-1), 1,3-benzenediol (CAS number: 108-46-3), and N-cyclohexyl-2-benzothiazolsulfenamide (CAS number: 95-33-0) were submitted by the Japanese Government with or without the collaboration with International Council of Chemical Associations (ICCA). These SIDS Initial Assessment Profiles (SIAPs) of the substances were agreed at the meetings. In this report, the documents of these substances are introduced.

Keywords: OECD, HPV programme, SIDS Initial Assessment Meeting

1 はじめに

経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) では、1992 年に始まった高生産量化学物質点検プログラム (High Production Volume Chemical (HPV) Programme) により、加盟各国における高生産量化学物質の安全性の評価を行っている (長谷川ら 1999a、江馬 2006)。日本政府は初回より評価文書を提出しており、2001 年からは国際化学工業協会協議会 (International Council of Chemical Associations : ICCA) による評価文書の原案作成に伴い日本化学工業協会加盟企業も評価文書の原案作成に参加している。第 26 回までの初期評価会議 (Screening Information Data Set (SIDS) Initial Assessment Meeting : SIAM) において日本政府が担当し結論および勧告が合意された化学物質の評価文書のヒト健康影響または環境影響・曝露情報部分については既に紹介してきた (長谷川ら 1999b、2000、2001 ; 高橋ら 2004、2005a、2005b、2006a、2006b、2006c、2007a、2007b、2007c、2008、2009)。また、第 1 回 SIAM (SIAM 1) から SIAM 18 までの結果の概要および SIAM 19 から SIAM 27 の各会議内容についても紹介してきた (松本ら 2005a、2005b、2006a、2006b、2007a、2007b、2007c、2008a、2008b、2009)。

本稿では SIAM 27 で合意に至った日本担当物質の評価文書の概要を紹介する。なお、OECD ガイドラインに則した毒性試験についてはガイドライン番号を示したが、遺伝毒性に関しては 1 物質に対して多種の試験が行われることもあり、結果のみ簡潔に示すこととした。

2 SIAM 27 で合意された日本担当物質の初期評価内容

2008 年 10 月にオタワ (カナダ) で開催された SIAM 27 において、我が国は 3 物質の初期評価文書を提出し、それら全ての初期評価結果および勧告が合意された。

SIAM における合意は FW (The chemical is a candidate for further work.) または LP (The chemical is currently of low priority for further work.) として示されている。FW は「今後も追加の調査研究作業が必要である」、LP は「現状の使用状況においては追加作業の必要はない」ことを示す。

(1) *p*-トルエンスルホン酸ナトリウム

英名 Sodium *p*-toluenesulfonate (657-84-1) (日本政府)

トルエン/キシレン/クメンの各スルホン酸塩 (ナトリウム、アンモニウム、カルシウム、カリウム) の異性体 (オルト、メタ、パラ) を含む、ヒドロトロープ類 (Hydrotropes) カテゴリに関する初期評価文書が SIAM 21 (2005 年) で承認されている。本物質は同カテゴリに含まれるが、本物質に関する新たな試験データが得られたので、カテゴリとは別に初期評価文書が作成された。

1) 曝露状況

本物質は粉末の固結防止剤、洗剤の可溶化剤、染料の希釈剤として使用される。本物質は閉鎖系で製造・加工されるため、職業曝露の可能性は低い。また、本物質の製造・加工過程における廃水から環境中への排出量に関しては、現在利用可能な測定データはないが、廃水処理が行われているので少ないと考えられる。本物質は製品に含まれるため、皮膚接触での消費者曝露の可能性があり、また、事故による曝露も考えられるが、容易に洗浄可能なので、その摂取量は軽減されることが考えられた。

2) 環境影響

本物質は水溶液中で完全にイオンに解離するため、水圏からの揮発は生じにくい。媒体別

分配割合の予測の結果、本物質が水圏に放出された場合は主に水圏 (99.8%) に残留する。また、本物質は容易に生分解し、魚類への生物濃縮性は低いと推定される (BCF: 3.16 [計算値])。

水生生物に対する急性毒性について、魚類の半数致死濃度 (LC₅₀) は 100 mg/L 以上 (96 時間、OECD TG 203)、ミジンコの LC₅₀ は 1,000 mg/L 以上 (48 時間、OECD TG 202)、藻類の半数影響濃度 (EC₅₀) は 1,000 mg/L 以上 (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。慢性毒性については、ミジンコの最大無影響濃度 (NOEC) は 100 mg/L (21 日間、繁殖阻害: OECD TG 211)、藻類の NOEC は 10 mg/L (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。

3) 健康影響

ラットには経口投与、イヌには経口および腹腔内投与により同位体³⁵Sを含む本物質を与えたところ、速やかに吸収され、主に尿中に

-トルエンスルホン酸塩-³⁵Sとして排泄された。また、イヌでの血漿中半減期は 75 分であった。

ラットの単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) において最高用量でも死亡例は認められず、LD₅₀は雌雄ともに 2,000 mg/kg bw 以上であった。また、2,000 mg/kg bw で雌雄に下痢がみられた。

ヒドロトローブ類カテゴリーにおいてキシレンスルホン酸カルシウム (28088-63-3) やクメンスルホン酸ナトリウム (28348-53-0、32073-22-6) には皮膚刺激性がないとされたが、本物質はアルカリ性である (pH=9.6) ことから、眼や皮膚に刺激性を示す可能性がある。また、トルエンスルホン酸ナトリウム (オルト/メタ/パラ、12068-03-0) がモルモットで皮膚感作性を示さないことから、本物質には皮膚感作性はないとされた。

ラットに 0、100、300 または 1,000 mg/kg bw/day の本物質を強制経口投与した 28 日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 407) において、最高用量でも毒性影響は認められず、**反復投与毒性の NOAEL は雌雄ともに 1,000 mg/kg bw/day とされた。**

雌雄ラットに交配前 2 週間から交配期間を含め、雄では 46 日間、雌では分娩後哺育 4 日まで、0、100、300 または 1,000 mg/kg bw/day を強制経口投与した経口投与簡易生殖毒性試験 (OECD TG 421) において、親動物では 1,000 mg/kg bw/day で雌雄に下痢や軟便、雄に胃の境界縁における軽度な粘膜固有層の炎症性細胞浸潤および扁平上皮過形成がみられたが、生殖能および児の発生・発育については本物質投与による影響は認められず、**反復投与毒性の NOAEL は雌雄ともに 300 mg/kg bw/day、生殖発生毒性の NOAEL は 1,000 mg/kg bw/day とされた。**

細菌を用いる復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験は S9mix の存在/非存在下で陰性であった。

4) 結論と勧告

本物質は健康および環境に対して有害性が低いので、健康影響および環境影響についてともに LP と勧告された。

(2) レゾルシノール

英名 1,3-Benzenediol (108-46-3) (原案作成: ICCA 日本企業)

本文書では純度 95% 以上のレゾルシノールが評価に用いられた。

1) 曝露状況

本物質は接着剤、染毛剤、化粧品、医薬品の原料として使用されている。本物質は閉鎖系で製造・加工されるため、職業曝露の可能性は低いが、製品の使用により消費者曝露が生じ

る。また、その使用や廃棄によって間接的に環境に放出される可能性がある。

2) 環境影響

媒体別分配割合の予測の結果、本物質が大気・土壌・水圏に放出された場合は主に土壌 (63.8%) と水圏 (36.1%) に分布する。本物質は容易に生分解し、魚類への生物濃縮性も低いと推定される (BCF: 3.16 [計算値])。

水生生物に対する急性毒性について、魚類の LC_{50} は 26.8~100 mg/L (流水、96 時間)、40~60 mg/L (止水、96 時間)、魚類の 7 日間毒性試験 (OECD TG 212 相当) では EC_{50} (体重) は 54.8 mg/L、 LC_{50} は 262 mg/Lであった。ミジンコの EC_{50} は 1.28 mg/L (止水、48 時間)、藻類の EC_{50} は 97 mg/L以上 (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。慢性毒性については、魚類の 60 日間毒性試験 (OECD TG 210 相当) では最小影響濃度 (LOEC) は 32 mg/L (体重)、 EC_{50} (胚致死/形態異常) は 260 mg/Lであり、さらに、 LC_{50} は 320 mg/Lより大きいことが初期評価文書のDossierに記載されている。ミジンコのNOECは試験最高濃度の 172 μ g/L (21 日間、繁殖阻害: OECD TG 211) であり、藻類のNOECは 97 mg/L (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。

3) 健康影響

ラットとウサギに本物質を経口投与したところ、速やかに吸収・代謝され、尿中に排泄された。本物質をラットに反復経口投与した場合には代謝速度の増加がみられた。ヒトでの経皮吸収は緩やかだが、ラットやウサギへの経口投与と同様に代謝・排泄された。

ラットの単回経口投与毒性試験 (OECD TG 401) での LD_{50} は 510 mg/kg bwであり、毒性症状として、眼瞼下垂、呼吸器官への影響、無気力、異常歩行、振戦、けいれん、および流涎が認められた。その他の試験では、雄ラットの経口 LD_{50} は 980 mg/kg bw、雌ラットのエアロゾル吸入 LC_0 は 7,800 mg/m³以上 (1 時間曝露)、2,800 mg/m³以上 (8 時間曝露) であった。雄ウサギの経皮 LD_{50} は 3,360 mg/kg bw、比較的純度の低い物質を用いた場合には 2,830 mg/kg bwであった。これらの急性曝露試験では中枢神経系への影響が認められた。

本物質にウサギの皮膚および眼に対する刺激性は認められなかった (OECD TG 404、TG 405、2.5%水溶液) が、溶解または半固体状態で投与したその他の試験においては、皮膚と眼に刺激性が認められた。本物質は、モルモット Maximization 試験 (OECD TG 406) では中程度の、マウス LLNA 試験 (OECD TG 429) では弱い皮膚感作性を示した。本物質は皮膚炎患者へのパッチテストでアレルギー反応を引き起こした。

雌雄ラットに 0、40、80 または 250 mg/kg bw/day を週 5 日強制経口投与した 90 日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 408) では、250 mg/kg bw/day において雌雄に間代性痙攣や流涎がみられ、雌では体重増加量の減少も認められたことから、**反復投与毒性のNOAELは80 mg/kg bw/day**とされた。

ラットを用いた一連の反復強制経口投与試験 (17 日間、13 週間、または、104 週間) が行われ、17 日間 (用量設定) 試験において 55 mg/kg bw/day 以上の雌ラットに異常な興奮状態がみられたことから、一連の試験で最も低いNOAELは**27.5 mg/kg bw/day**とされた。雄ラットでは 104 週間試験の最低用量 112 mg/kg bw/day 以上で運動失調、腹臥位、流涎、振戦がみられ、この試験で最も低いLOAELは**112 mg/kg bw/day**とされた。104 週間試験の最高用量 225 mg/kg bw/day では体重増加量の減少と死亡の増加も認められた。また、104 週間試験では認められなかったが、13 週間試験において絶対・相対肝重量の増加が雌では 65 mg/kg bw/day、雄では 130 mg/kg bw/day で認められ、さらに、絶対・相対副腎重量の高値が最低用量 32 mg/kg bw/day 以上の雄の生存ラットで認められた。

ラットと同様、マウスを用いた一連の反復強制経口投与試験 (17 日間、13 週間、または、

104 週間) が行われ、17 日間 (用量設定) 試験において 150 mg/kg bw/day の雄マウスに腹臥位および振戦がみられたことから、一連の試験で最も低い **NOAEL** は **75 mg/kg bw/day** とされた。104 週間試験において、最低用量 112 mg/kg bw/day 以上で雌雄マウスに運動失調、横臥位、振戦がみられ、最も低い **LOAEL** は **112 mg/kg bw/day** とされた。13 週間試験において、雄ラットで高値が認められた副腎重量に、雄マウスでは低値がみとめられた。副腎と肝臓の重量変化は 104 週間試験やその他の試験でも認められなかったため、それらの意義は不明とされた。

雌雄ラットに 3,000 mg/L の濃度まで飲水投与した二世世代生殖毒性試験 (OECD TG 416) では、上述した急性中枢神経系影響や副腎と肝臓の重量変化は認められなかった。3,000 mg/L で各世代の雌雄に体重の低値が認められたが、同用量で認められた飲水量の減少による影響とされた。最高用量でも毒性影響は認められず、**反復投与毒性の NOAEL** は雌雄ともに 3,000 mg/L (雄: **233* mg/kg bw/day**、交配前・妊娠期の雌: **304 mg/kg bw/day**、授乳期の雌: **660 mg/kg bw/day**、それぞれ F0 と F1 の平均値) とされた。また、甲状腺に関する詳細な評価が付加的に行われ、3,000 mg/L まで甲状腺への影響は認められなかった。生殖発生に関する項目についても各世代ともに 3,000 mg/L まで影響は認められず、**生殖毒性の NOAEL** は雌雄ともに 3,000 mg/L (雄: **233* mg/kg bw/day**、交配前・妊娠期の雌: **304 mg/kg bw/day**、授乳期の雌: **660 mg/kg bw/day**、それぞれ F0 と F1 の平均値)、また、F1 への投与における **発生毒性の NOAEL** は雌雄ともに 3,000 mg/L (雄: **245 mg/kg bw/day**、雌: **295 mg/kg bw/day**) とされた。(※初期評価文書の Dossier では 223 mg/kg bw/day となっている。)

妊娠 6-19 日の雌ラットに 0、40、80 または 250 mg/kg bw/day を強制経口投与した出生前発生毒性試験 (OECD TG 414) では、250 mg/kg bw/day で母動物の体重増加量の減少が認められ、**母体毒性の NOAEL** は **80 mg/kg bw/day**、**発生毒性の NOAEL** は最高用量の **250 mg/kg bw/day** とされた。催奇形性は認められなかった。

妊娠 6-15 日の雌ラットに 0、125、250 または 500 mg/kg bw/day を強制経口投与した出生前発生毒性試験 (OECD TG 414 準拠) では、胎児や胚吸収に関して投与の影響は認められず、また、催奇形性も認められなかった。**母体毒性と発生毒性の NOAEL** は最高用量の **500 mg/kg bw/day** とされた。

ヒトの創傷皮膚への高濃度曝露による症例報告や主に 1950 年代に行われた動物試験の結果から、本物質の経皮または経口投与が甲状腺に影響を及ぼすことが示唆されたが、職業曝露者の調査を含むその他の多くの試験では甲状腺への影響は認められなかった。上述した二世世代生殖毒性試験 (OECD TG 416) でも、3,000 mg/L (雄: 233* mg/kg bw/day、交配前・妊娠期の雌: 304 mg/kg bw/day、それぞれ F0 と F1 の平均値) まで甲状腺に影響は認められなかった。

細菌を用いる復帰突然変異試験が複数行われ、ほぼ全ての結果が陰性であった。一方、本物質は哺乳動物の培養細胞に染色体異常 (破損や小核) を引き起こした。姉妹染色分体交換 (SCE) は、*in vitro* では 7 試験中 5 試験で認められず、また、*in vivo* では 3 試験の全てにおいて認められなかった。ラットの肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験は陰性であった。マウスリンフォーマ試験の結果は S9mix 非存在下で陽性であったが、観察されたコロニーが小さいため、遺伝子の変異ではなく染色体異常に関係があると考えられた。*In vitro* 小核試験では S9mix 存在/非存在下で陽性であった。シリアン・ハムスター胚細胞を用いた形質転換試験は陰性であった。*In vivo* 小核試験の結果は、数種の試験で陰性、1 試験で陽性であった。その他の信頼性の低い試験の結果を考え合わせると、本物質は *in vitro* では染色体異常を引き起こす可能性があるが、*in vivo* での遺伝毒性はない。

2 年間、ラットとマウスに本物質を強制経口投与 (週 5 日) した試験において、発ガン性は認められなかった。

4) 結論と勧告

本物質は健康に対して有害性(感作性)を示すが、現況においては十分なリスク管理がなされているので、健康影響について LP と勧告された。環境に対しても有害性(魚類・ミジンコ・藻類への急性毒性: 1~100 mg/L)を示すが、ミジンコへの慢性毒性は 21 日間試験において最高濃度でも認められず、また、本物質は容易に生分解し、魚類における生物濃縮性の計算値は低いため、水生生物における生物濃縮性も低いと推定される。これより本物質は、現況においては環境影響について LP と勧告された。

(3) N-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド

英名 N-Cyclohexyl-2-benzothiazolsulfenamide (95-33-0) (日本政府、ドイツ政府、原案: EU の評価文書)

本物質(CBS)の主な加水分解物はメルカプトベンゾチアゾール(MBT) (149-30-4)、および、シクロヘキシルアミン(CHA) (108-91-8)である。これらの加水分解物による試験結果も本物質の評価に利用された。

1) 曝露状況

本物質は加硫促進剤としてゴム製品の製造に使用される。本物質には吸入や皮膚接触による職業曝露の可能性がある。消費者製品において本物質の使用実績が認められないので、消費者曝露の可能性は低いと考えられた。

2) 環境影響

媒体別分配割合の予測の結果、本物質が大気・土壌・水圏に放出された場合は主に土壌(71.1%)と底質(18.9%)に分布し、その他、水圏(9.7%)にも分布する。本物質は容易に生分解されず、また、魚類への生物濃縮性も高いと推定される(BCF: 1,248 または 3,094 [ともに計算値])。

水生生物に対する急性毒性について、魚類のLC₅₀は 2.1 mg/L (96 時間、流水、OECD TG 203)、ミジンコのEC₅₀は 0.79 mg/L (48 時間、半止水、遊泳阻害、OECD TG 202)、藻類のEC₅₀は 0.15 mg/L 以上 (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。慢性毒性については、ミジンコのNOECは 0.058 mg/L (21 日間、繁殖阻害: OECD TG 202)、藻類のNOECは 0.0084 mg/L (72 時間、生長速度法: OECD TG 201) であった。本物質の試験濃度は水への溶解度(0.32 mg/L)より一般的に高いので、止水条件で認められた影響の一部は分解生成物によって引き起こされた可能性がある。

3) 健康影響

ラットに本物質を経口投与したところ、速やかに吸収・代謝された。MBT と CHA への加水分解が *in vitro* でみられたことから、吸収前に胃腸管内でも同様の加水分解が起こる可能性があると考えられた。経口または吸入による吸収率は 100% と考えられた。物理化学的・動態力学的情報から経皮吸収率は 10% とされた。

ラットとマウスの単回経口投与でのLD₅₀は 5,000 mg/kg bw 以上であった。ウサギの経皮でのLD₅₀は 7,940 mg/kg bw 以上であった。

本物質は腐食性物質ではない。本物質を含む市販製品についてヒトにおけるパッチテストを行ったところ皮膚刺激性を示すケースは少ないが、ウサギの皮膚および眼に対しては軽微な刺激性が認められた(OECD TG 404、TG 405)。雌雄ラットに 0、4.3、14.4、または 48 mg/m³ を 6 時間・週 5 日吸入曝露させた 28 日間反復吸入毒性試験では、曝露直後に中程度の炎症が

鼻で散発的に認められたが、それらは 24 時間以内に回復した。本物質はモルモット (Buehler 法) では皮膚感作性を示さないが、ヒトへのパッチテストで明らかな感作性が認められ、疫学データからも皮膚感作性の可能性が示された。

上述の 28 日間反復吸入毒性試験において、最高濃度でも全身性の毒性影響は認められず、無毒性濃度 (NOAEC) は 48 mg/m³とされた。

ラットに 0、25、80、250 または 800 mg/kg bw/day の本物質を強制経口投与した 28 日間反復経口投与毒性試験 (OECD TG 407) において、250 mg/kg bw/day 以上で雌雄に血液凝固障害、雄に腎臓の近位尿細管上皮における硝子滴の増加が認められ、反復投与毒性の NOAEL は雌雄ともに 80 mg/kg bw/dayとされた。

雌雄ウサギに 0、125、500 または 2,000 mg/kg bw/day の本物質を 1 日 6 時間経皮投与した 21 日間反復経皮投与毒性試験 (OECD TG 410) において、最高用量でも本物質による毒性影響は認められず、反復投与毒性の NOAEL は雌雄ともに 2,000 mg/kg bw/dayとされた。

細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ試験の結果は陰性であった。染色体異常試験では弱い陽性が認められたが、本物質の加水分解物である MBT と CHA の遺伝毒性試験は全て陰性であることから、本物質には遺伝毒性はないとされた。

マウスに約 18 ヶ月間、95.3 mg/kg bw/day (TWA) の本物質を経口投与した試験において発ガン性は認められなかった。さらに、ラットやマウスに MBT または CHA を経口投与した種々の長期試験でも発ガン性は認められず、MBT については雌雄マウス・雄ラットで 750 mg/kg bw/day、雌ラットでは 350 mg/kg bw/day、CHA については雌雄ラットで 440 mg/kg bw/day まで、雌雄マウスでは 500 mg/kg bw/day まで、発ガン性は認められなかった。

ラットに MBT を混餌投与した二世世代試験において、8,750 ppm (700 mg/kg bw/day) 以上で肝臓と腎臓の組織への毒性影響が認められたが、最高用量 (15,000 ppm (1,200 mg/kg bw/day)) でも生殖への有害影響は認められなかった。その他、8,750 ppm 以上で食物摂取の開始に伴い児体重が減少したが、嗜好性の低下により摂餌量が低下したためとされた。

ラットに CHA を反復経口投与した複数の毒性試験 (投与期間: 3 ヶ月~2 年) では、概ね 200 mg/kg bw/day 以上で精細管萎縮や精子形成の低下が認められた。3 ヶ月間毒性試験の NOAEL は 100 mg/kg bw/day (CBS換算では 276 mg/kg bw/day相当)、2 年間毒性試験の NOAEL は 82 mg/kg bw/day (CBS換算では 218 mg/kg bw/day相当) であった。

妊娠 0-20 日の雌ラットに 0、0.001、0.01、0.1、または 0.5% (0、0.7、7.1、69.6、288.8 mg/kg bw/day 相当) の本物質を混餌投与した発生毒性試験では、69.6 mg/kg bw/day 以上で母体重増加量の低下、288.8 mg/kg bw/day で摂餌量の減少が認められ、母毒性の NOAEL は 7.1 mg/kg bw/dayとされた。また、288.8 mg/kg bw/day で雌雄胎児体重および胎盤重量の低値が認められ、発生毒性の NOAEL は 69.6 mg/kg bw/dayとされた。妊娠 6-15 日の雌ラットに 0、100、300、500 または 900 mg/kg bw/day の本物質を強制経口投与した出生前発生毒性試験 (OECD TG 414 準拠) では (900 mg/kg bw/day 投与は著しい毒性から試験を中断)、300 mg/kg bw/day 以上で母体重増加量の低値、500 mg/kg bw/day で胎児重量の低値が認められた。妊娠 6-15 日の雌ラットに 0、50、150、450 mg/kg bw/day の本物質を強制経口投与した発生毒性試験では、450 mg/kg bw/day で母体重増加量および胎児重量の低値等が認められた。これらの試験で認められた胎児重量の低値は母体重増加量が 15-30% 減少した場合に観察され、本物質投与による特異的な胎児毒性や催奇形性は認められなかった。

4) 結論と勧告

本物質は健康に対して有害性 (感作性、反復投与毒性) を示すが、現況においては十分なリスク管理がなされているので、健康影響について LP と勧告された。環境に対しては有害性 (ミジンコ・藻類への急性毒性: 1 mg/L 以下) を示すことから、環境影響については FW

と勧告され、曝露量に関する調査が要請され、底質への曝露が著しい場合には底生生物に対する毒性評価を行うことが推奨された。

参考文献：

1. 江馬 眞 (2006) : OECD の高生産量化学物質安全性点検プログラムとその実施手順. 化学生物総合管理, 2, 83-103.
2. 高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2004) : OECD 化学物質対策の動向 (第 5 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 122, 37-42.
3. 高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2005a) : OECD 化学物質対策の動向 (第 6 報). 化学生物総合管理, 1, 46-55.
4. 高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2005b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 7 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 123, 46-52.
5. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006a) : OECD 化学物質対策の動向 (第 8 報). 化学生物総合管理, 2, 147-162.
6. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 9 報). 化学生物総合管理, 2, 163-175.
7. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006c) : OECD 化学物質対策の動向 (第 11 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 124, 62-68.
8. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007a) : OECD 化学物質対策の動向 (第 10 報). 化学生物総合管理, 2, 286-301.
9. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 12 報). 化学生物総合管理, 3, 43-55.
10. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007c) : OECD 化学物質対策の動向 (第 13 報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 101-106.
11. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2008) : OECD 化学物質対策の動向 (第 14 報). 化学生物総合管理, 4, 225-236.
12. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2009) : OECD 化学物質対策の動向 (第 15 報). 化学生物総合管理, 5, 193-200.
13. 長谷川隆一, 中館正弘, 黒川雄二 (1999a) : OECD 化学物質対策の動向. J. Toxicol. Sci., 24, app. 11-19.
14. 長谷川隆一, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 菅野誠一郎, 福間康之臣, 高月峰夫, 中館正弘, 黒川雄二 (1999b) : OECD 化学物質対策の動向 (第 2 報). J. Toxicol. Sci., 24, app. 85-92.
15. 長谷川隆一, 小泉睦子, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 菅野誠一郎, 高月峰夫, 黒川雄二 (2000) : OECD 化学物質対策の動向 (第 3 報). J. Toxicol. Sci., 25, app. 83-96.
16. 長谷川隆一, 小泉睦子, 広瀬明彦, 菅原尚司, 黒川雄二 (2001) : OECD 化学物質対策の動向 (第 4 報). J. Toxicol. Sci., 26, app. 35-41.
17. 松本真理子, 田中里依, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2005a) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム : 第 19 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 1, 280-288.
18. 松本真理子, 鈴木理子, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2005b) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム : 第 20 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 1, 445-453.
19. 松本真理子, 高橋美加, 平田睦子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2006a) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム : 第 18 回初期評価会議までの概要. 化学生物総合

- 管理, 2, 104-134.
20. 松本真理子, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2006b): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 21 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 2, 135-146.
 21. 松本真理子, 日下部哲也, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2007a): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 22 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 2 302-312.
 22. 松本真理子, 大井恒宏, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2007b): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 23 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 3, 56-65.
 23. 松本真理子, 山本展裕, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2007c): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 24 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 3, 180-189.
 24. 松本真理子, 山本展裕, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2008a): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 25 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 4, 136-143.
 25. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞, 広瀬明彦 (2008b): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 26 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 4, 237-245.
 26. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦 (2009): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 27 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 5, 105-115.
 27. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦 (2009): OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 27 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 5, 201-209.

ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性

広瀬明彦,^{*,a} 高木篤也,^a 西村哲治,^a 津田洋幸,^b 坂本義光,^c
小縣昭夫,^c 中江 大,^c 樋野興夫,^d 菅野 純^a

Importance of Researches on Chronic Effects by Manufactured Nanomaterials

Akihiko HIROSE,^{*,a} Atsuya TAKAGI,^a Tetsuji NISHIMURA,^a
Hiroyuki TSUDA,^b Yoshimitsu SAKAMOTO,^c Akio OGATA,^c
Dai NAKAE,^c Okio HINO,^d and Jun KANNO^a

^aDivision of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, ^bNagoya City of University, 1 Kawasumi Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan, ^cTokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan, and ^dJuntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

(Received September 3, 2010)

Manufactured nanomaterials are the most important substances for the nanotechnology. The nanomaterials possess different physico-chemical properties from bulk materials. The new properties may lead to biologically beneficial effects and/or adverse effects. However, there are no standardized evaluation methods at present. Some domestic research projects and international OECD programs are ongoing, in order to share the health impact information of nanomaterials or to standardize the evaluation methods. From 2005, our institutes have been conducting the research on the establishment of health risk assessment methodology of manufactured nanomaterials. In the course of the research project, we revealed that the nanomaterials were competent to cause chronic effects, by analyzing the intraperitoneal administration studies and carcinogenic promotion studies. These studies suggested that even aggregated nanomaterials were crumbled into nano-sized particles inside the body during the long-term, and the particles were transferred to other organs. Also investigations of the toxicokinetic properties of nanomaterials after exposure are important to predict the chronically targeted tissues. The long lasting particles/fibers in the particular tissues may cause chronic adverse effects. Therefore, focusing on the toxicological characterization of chronic effects was considered to be most appropriate approach for establishing the risk assessment methods of nanomaterials.

Key words—chronic toxicity; multi-wall carbon nanotube (MWCNT); fullerene

1. はじめに

近年、ナノテクノロジーの中心的な役割を担う物質としての産業用ナノマテリアルは、急速にその種類や生産量が増加しつつあるところであるが、新たに期待されているナノマテリアルの物理化学特性については、有効的な生理活性等に使用され得る特性

を持つ反面、ヒト健康影響に対する懸念についても検証されるべきであると考えられている。つまり、ナノマテリアルを用いた技術や製品を社会的に受容するためには、安全性の検証を行うことが不可欠であると思われる。しかし、従来の一般的な化学物質とは異なる物理化学的特性は、その毒性評価においても従来とは異なる考え方を取り入れることも必要とされている。それゆえ、ナノマテリアルの特性を考慮した有害性評価手法の開発が急務となっている。また、国際的な枠組みにおいても、ナノマテリアルの安全性確認は、重要な問題として認識されており、OECD や ISO 等を中心として評価手法の国際的標準化に向けた取り組みが進行しているところでもある。本稿では、ナノマテリアルの安全性評価

^a国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1), ^b名古屋市立大学 (〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1), ^c東京都健康安全研究センター (〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1), ^d順天堂大学医学部 (〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1)

*e-mail: hirose@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S18 で発表したものを中心に記述したものである。