

図9 $A_g(2)$ ピークのラマンシフトとレーザー光エネルギードーズ量の関係

D. 考察

図8で、エネルギードーズ量をさらに高くすると斜めの矢印で示したように $A_g(2)$ ピーク位置が高波数側に逆戻りする現象が発生した。これは、強いレーザー光照射によって試料温度が上昇して光ポリマーの解離が発生したためと考察される [8]。

また、図9の直線で、 $y=1460\text{ cm}^{-1}$ となる x の値は 1520 J/mm^2 となる。この結果は、 532 nm の波長の光を用いて大気中でFNWを完全に重合させるためには、 1520 J/mm^2 以上の線量を照射することが必要であることを意味する。

E. 結論

C_{60} 分子から構成されるフラーレンナノウィスカー(FNW)を液-液界面析出法によって合成した。それを、真空加熱乾燥後、波長 532 nm のラマンレーザー光源によって照射し、大気中で完全に重合体となる線量をラマンスペクトルの $A_g(2)$ ピーク位置の

シフト量から求めた結果、 1520 J/mm^2 以上の線量を照射することが必要であることが判明した。

参考文献

- [1] K. Miyazawa, Y. Kuwasaki, A. Obayashi and M. Kuwabara, *J. Mater. Res.*, 17 (2002)83-88.
- [2] “Fullerene Nanowhiskers”, Ed. by K. Miyazawa, Pan Stanford Publishing, Singapore (2011).
- [3] S. Hoen, N. G. Chopra, X. D. Xiang, R. Mostovoy, J. Hou, W. A. Vareka and A. Zettl, *Phys. Rev. B*, 46(1992)12737.
- [4] K. Asaka, R. Kato, K. Miyazawa and T. Kizuka, *Appl. Phys. Lett.*, 89 (2006)071912.
- [5] K. Saito, K. Miyazawa and T. Kizuka, *Jpn. J. Appl. Phys.* 48(2009)010217.
- [6] M. M. J. Treacy, T. W. Ebbesen, J. M. Gibson, *Nature* 381 (1996)678.
- [7] A. M. Rao, P. Zhou, K.-A. Wang, G. T. Hager, J. M. Holden, Y. Wang, W.-T. Lee, X.-X. Bi, P. C. Eklund, D. S. Cornett, M. A. Duncan, and I. J. Amster, *Science*, 259 (1993) 955-957.
- [8] Y. Wang, J. M. Holden, X. X. Bi and P. C. Eklund, 217(1994)413.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(論文発表)

1. Ryoei Kato and Kun'ichi Miyazawa, “Raman laser polymerization of C_{60} nanowhiskers”, *Journal of Nanotechnology*, 2012(2012)101243.

(学会発表)

1. Kun'ichi Miyazawa and Ryoei Kato, "Laser polymerization of fullerene nanofibers", Proceedings of the JSME/ASME 2011 International Conference on Materials and Processing (ICM&P2011), P. ICMP2011-51020, Oregon State University, USA, June 13-17, 2011.
2. Ryoei Kato, Yinghui Wang and Kun'ichi Miyazawa, "Raman spectroscopy investigation on the structural change of heat-treated photopolymerized fullerene nanowhiskers", Abstract of The International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology(ICAMN), Kathmandu, Nepal, October 21-23, 2011, pp.68-68.
3. K. Miyazawa and C. Hirata, "Synthesis of C₆₀ nanowhiskers with controlled lengths and diameters", Abstracts of Twelfth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-12), Nagoya University, Japan, January 24-27, 2012, P.O13.
4. Ryoei Kato, Yinghui Wang and Kun'ichi Miyazawa, "Raman spectra analyses of the heat-treated photopolymerized fullerene nanowhiskers", 第 41 回フラーレン・ナノ

チューブ・グラフェン総合シンポジウム講演要旨集, 2011 年 9 月 5 日 (月) ~7 日 (水), 首都大学東京, フラーレン・ナノチューブ・グラフェン学会, P.114.

5. 宮澤 薫一, 加藤 良栄, 王 英輝, "フラーレンナノウiskアーの光重合", 日本機械学会 2011 年度年次大会講演論文集, pp.J044051_1~J044051_2, 一般社団法人日本機械学会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2011 年 9 月 11 日 (日) ~14 日 (水).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 加藤良栄, 宮澤薫一, "フラーレン細線及びフラーレン結晶の光重合体の製造方法", 特願 2011- 249493, 2011 年 11 月 15 日.
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

研究分担者：	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
	西村 哲治	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部長	
研究協力者：	小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部研究員	
	小縣 昭夫	東京都健康安全研究センター	環境保健部長	
	坂本 義光	東京都健康安全研究センター	環境保健部主任	
	前野 智和	東京都健康安全研究センター	環境保健部主任	
	藤谷 知子	東京都健康安全研究センター	環境保健部主任	
	中江 大	東京都健康安全研究センター	医薬品部長	
	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
	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
	松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	研究員
	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研究の一環として、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（SP）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ことを目的としている。今年度は、これまでにその情報が著しく不足している生殖発生毒性に焦点をあて、妊娠マウスへの MWCNT 投与による胎児への影響を検討した。その結果、妊娠 9 日のマウスへの腹腔内投与（2 - 5 mg/kg）のみならず気管内投与（4 - 5 mg/kg 投与）によって催奇形を示すことを明らかにした。一方、妊娠 7 日から 10 日のマウス及びラットへの単回静脈内投与（ラット：0.5mg/kg、マウス：0.3mg/kg）においては外表査察の結果、奇形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（CNT）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。平成 23 年度は、中皮腫を誘発することが明らかとされている MWCNT の発がん性以外の有害情報を収集することを目的として、生殖発生毒性に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. マウスを用いた MWCNT の催奇形性試験

Crlj:CD-1(ICR)雌マウスの妊娠 9 日に、2%CMC に懸濁した MWCNT (MWCNT-7) 懸濁液 (0.2–0.5 mg/ml) を、腹腔内には 0、2、3、4、5mg/kg の用量で、また、気管内には 0、3、4、5mg/kg の用量で、1 群 10~15 匹に投与し、体重測定、一般症状の観察を行い、妊娠 18 日に帝王切開により胎児を摘出、雌雄の判別、体重測定後、外表異常の有無を調べた。その後、胎児は常法により骨格標本作製し、骨格異常の観察を行った。

2. 静脈内投与による催奇性の検討

体内負荷量と催奇形性との用量依存性を検討するために、MWCNT 懸濁液を妊娠動物に静脈内投与して胎児への影響を検討した。MWCNT 懸濁液は、雌ラットあるいはマウスから採取した血清に添加し (ラット用 : 0.5mg/ml、マウス用 : 0.05mg/ml) , 超音波バスを用いて 30 分間超音波処理を行った (図 1) 。これらの懸濁液を妊娠 7、8、9、および 10 日のラットあるいはマウス (各投与日毎に 5~7 匹) に、予備試験で投与可能な最大量と判断された 0.5 (マウスでは 0.3) mg/kg bw の用量で投与した。妊娠 20 日のラットおよび妊娠 17 日のマウスを帝王切開して病理組織学的に MWCNT の組織への沈着を確認すると

共に、胎児への影響について検討した。

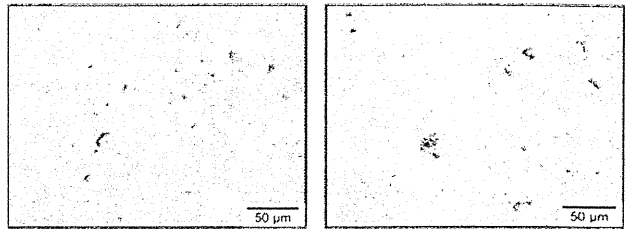


図 1、MWCNT の血清懸濁液 (0.5mg/ml)

C. 研究結果

1. マウスを用いた MWCNT の催奇形性試験

MWCNT を腹腔内投与した全ての群において、四肢減形成、口蓋裂の外表奇形及び、脊椎・肋骨の癒合などの骨格奇形が用量相関的に発現した (表 1、表 2)。

ヒトでの暴露経路を模して、MWCNT を気管内投与した場合には 4-5mg/kg の投与群で、腹腔内投与と同様の四肢減形成、脊椎・肋骨の癒合などの奇形が見られた。しかし、3mg/kg 投与群では奇形児の発現はなく、この量を気管内投与における最大無作用量とした (表 3、表 4)。

2. 静脈内投与による催奇性の検討

母動物の病理組織学的検査では、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、および脳において MWCNT の沈着が確認され (図 2) , その沈着量は心臓>肺>>肝臓>腎臓>脾臓の順であった。肺においては炎症関連所見 (好中球浸潤および肉芽腫) がみられた。

胎仔の検査では、外表観察の結果、いずれの胎仔においても奇形はみられなかった。また、着床痕数、黄体数、胚・胎児死亡数 (早期および後期吸収胚) , 生存胎児数、性別、生存胎児体重、および生存胎児胎盤重量のいずれにおいても、MWCNT 投与群と対照群で著明な差は認められなかった。

D. 考察

アスベスト様の繊維状粒子については、その形状と体内残留性に基づく中皮腫の誘発性が研究されてきており、同様の形状をもつ MWCNT についても、腹腔内投与により中皮細胞に直接接触させる手法を用いて、アスベスト

同様の中皮腫を起こす可能性を示してきた。しかし、今年度の腹腔内投与及び気管内投与による催奇形性が、中皮腫と同様のアスベスト様の物性や形状に依存しているかどうかについては不明である。そもそも、アスベストばく露による催奇形性を調べた研究報告もなく、アスベストそのものに催奇形性があるのかどうかについても情報が無い。

SWCNT、MWCNT の 28 日間反復投与毒性の結果では、経口投与可能な最高投与量においても特段の毒性影響は観察されておらず、経口投与による一般毒性は比較的低いと考えられている。しかし、近年 SWCNT および酸化/水酸化した MWCNT を妊娠マウスへ静脈内や経口投与することにより、胚致死や催奇形性を示唆する報告が公表されているが、MWCNT のラットへの経口投与では胎児への発生毒性は認められなかったとする報告もある。

他方、ナノ粒子の腹腔内や静脈投与だけでなく吸入ばく露や皮下投与によっても胎盤を通過して胎児に移行することが近年報告されている。アスベスト様繊維状粒子の中皮腫誘発性が、ばく露局所での長期残留性に基づいていることからすると、今回観察された催奇形性が MWCNT の胎児移行によるものであるとすれば、中皮腫を起こした形状のものよりは小さく、体内吸収されやすい、より微少の粒子によるものであることが想定される。一方、ばく露局所での生体反応により誘発されたタンパクや低分子などの生体反応産物による 2 次的な影響である可能性も否定できない。

そこで、今回の気管内投与による催奇形性実験では MWCNT の胎児移行は確認していないが、静脈投与による催奇形性実験を行えば、MWCNT の直接影響であるかどうかについて確認できると考え、ラットおよびマウスを用いて検討した。しかし、胎児の外表観察の結果では、いずれの胎児においても奇形は認められず、暴露した後に血流に乗った MWCNT が生殖・発生毒性を引き起こす可能性は低いと考えられ

た。

今回の研究結果は、重量としては低用量であるが、母毒性の認められる高用量域 (4 mg/kg 以上) での影響であり、そのすぐ下の用量 (3mg/kg) では催奇性がほとんど認められていないことから、誤って原体等を直接に吸引するような大量ばく露のケースを除けば差し迫ったリスクは少ないと想定される。しかし、上述したようにその発現メカニズムが全く不明であることから、サイズの異なる CNT によるリスクの大きさに関して想定することは困難であり、本格的なメカニズム解明のための研究が今後必要になると考えられる。

E. 結論

OECD スポンサーシッププログラム (SP) への日本政府の対応としてのデータ提供の一環として、その情報が著しく不足している生殖発生毒性に焦点をあて、妊娠マウスへの MWCNT 投与による胎児への影響を検討した。その結果、妊娠 9 日のマウスへの腹腔内投与 (2 - 5 mg/kg) のみならず気管内投与 (4 - 5 mg/kg 投与) によって催奇形を示すことを明らかにした。一方、妊娠 7 日から 10 日のマウス及びラットへの単回静脈内投与 (ラット : 0.5mg/kg、マウス : 0.3mg/kg) においては、外表上の奇形は誘発されなかった。

F. 健康危機情報

多層型カーボンナノチューブの腹腔内投与により実験動物に中皮腫を引き起こすことを示した (平成 20 年 2 月に報告) ものと同じ多層型カーボンナノチューブが、妊娠マウスへの腹腔内投与のみならず気管内投与 (3、4、5mg/kg 投与) によって催奇形 (4 mg/kg 以上) を示すことが確認されたため、厚生労働省健康危機管理調整官宛に健康危険情報通報 (グレード B : 情報提供、経過注視) を行った。(平成 23 年 12 月 19 日)

G. 研究発表

(論文発表)

Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D*, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice, J. Toxicol. Sci. 37, 81-89 (2012).

Yamaguchi A, Fujitani T, Ohyama K, Nakae D, Hirose A, Nishimura T, Ogata A. , Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotubes on immune and inflammatory responses in mice. J. Toxicol. Sci. 37, 177-189 (2012).

Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura, T.: Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry., Toxicol. Lett., 206, 172-177(2011).

Horibata, K., Ukai, A., Koyama, N., Takagi, A., Kanno, J., Kimoto, T., Miura, D., Hirose, A., and Honma, M. : Fullerene (C60) is negative in the in vitro pig-A gene mutation assay. Genes and Environment 33, 27-31 (2011).

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 (2), 195-201 (2011) .

(学会発表)

平田睦子, 芹澤英樹, 鎌田栄一, 小野敦, 広瀬明彦: 単層型カーボンナノチューブの28日間反復経口投与毒性試験、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7) (横浜)

小野 敦, 平田 睦子, 須永 昌男, 古川 正敏, 鎌田 栄一, 広瀬 明彦: 多層型カーボンナノチューブの28日間反復経口投与毒性試験、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7) (横浜)

Hirose, A., Ono, A., Hirata-Koizumi, M., Serizawa, H., Sunaga, M., Furukawa, M., Kamata, E., Nishimura, T: "Repeated dose 28-day oral toxicity studies of single- and multi-walled carbon nanotubes in rats, The 47th EUROTOX2011 (2011.8) (France,Paris)

広瀬明彦: 国研の取組：健康影響評価指針の国際動向について、日本薬学会第132年会、2012年

3月 (札幌)

渡辺渡、吉田裕樹、広瀬明彦、紺野克彦、山中沙代子、黒木奈緒、黒川昌彦：酸化チタンナノ粒子のマクロファージおよびマウスモデルにおけるRSウイルス感染免疫応答への影響、日本薬学会第132年会、2012年3月 (札幌)

清水広介、内山安里奈、西村哲治、広瀬明彦、奥直人：カーボンナノチューブ暴露による生体膜障害性の検討、日本薬学会第132年会、2012年3月 (札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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. 多層カーボンナノチューブ MWCNT 2-5 mg/kg の妊娠9日目腹腔内投与の影響

生殖の指標	MWCNT 投与量(mg/kg)				
	0(control)	2	3	4	5
交尾雌数	11	12	12	15	10
死亡雌数	0	0	0	0	0
妊娠雌数	10	8	9	13	9
生仔有母体数	10	7	8	7*	3**
着床数	14.5±2.5	14.4±1.5	12.3±2.7	14.0±2.1	12.7±3.8
吸収胚(%)					
早期	11.0±13.5	35.3±34.9	41.7±34.8	67.1±38.8**	81.7±28.2***
後期	1.7±3.7	2.4±3.4	0.0±0.0	1.6±3.1	0.9±2.6
生存胎仔数	12.6±2.6	9.5±5.1	7.3±4.1	4.9±5.8**	1.4±3.3***
生存胎仔平均重量 (g)					
雄	1.48±0.10	1.29±0.08*	1.28±0.10**	1.31±0.08*	1.42±0.12
雌	1.43±0.13	1.23±0.09*	1.24±0.12*	1.21±0.11*	1.33±0.02

表2. 多層カーボンナノチューブ MWCNT 2-5 mg/kg の妊娠9日目腹腔内投与による奇形

	MWCNT 投与量 (mg/kg)				
	0	2	3	4	5
外表奇形					
外表奇形のあった母体数/総母体数	0/10	2/7	2/8	3/7*	1/3
-(%)	(0)	(28.6)	(25)	(42.9)	(33.3)
外表奇形発生率 (%)\$	0.00±0.00	9.18±18.77	3.65±6.82	4.59±6.46	6.67±11.55
外表奇形のあった胎仔数/総胎仔数	0/126	3/76*	2/66*	3/63*	2/13***
短尾・無尾	0	2	1	1	0
口蓋列	0	0	0	1	0
四肢減形成	0	2	2	1	2
骨格奇形					
骨格奇形のあった母体数/総母体数	0/10	4/7**	3/8*	3/7*	2/3**
-(%)	(0)	(57.1)	(37.5)	(42.9)	(66.7)
骨格奇形発生率 (%)\$	0.00±0.00	14.39±18.09	11.15±21.68	11.90±19.16	40.00±52.92
骨格奇形のあった胎仔数/総胎仔数	0/126	9/76***	7/66***	7/63***	5/13***
肋骨癒合	0	3	1	2	0
脊椎癒合	0	6	7	0	3
少指	0	2	2	3	2
多指	0	0	0	2	0

表 3. 多層カーボンナノチューブ MWCNT 3-5 mg/kg の妊娠 9 日目気管内投与の影響

生殖の指標	MWCNT 投与量(mg/kg)			
	0(control)	3	4	5
交尾雌数	11	12	16	6
死亡雌数	0	0	0	0
妊娠雌数	10	10	15	5
生仔有母体数	10	10	15	5
着床数	12.8±1.6	14.8±2.2	13.8±2.7	11.8±2.9
吸収胚(%)				
早期	9.8±13.4	8.8±8.4	21.0±29.8	20.0±17.7
後期	2.0±4.6	0.6±1.8	0.8±2.2	6.3±10.1
生存胎仔数	11.30±2.11	13.30±1.49	10.53±4.36	8.80±2.95
生存胎仔平均重量(g)				
雄	1.41±0.14	1.36±0.12	1.23±0.19	1.07±0.20*
雌	1.35±0.13	1.31±0.11	1.19±0.19	1.06±0.18*

表 4. 多層カーボンナノチューブ MWCNT 3-5 mg/kg の妊娠 9 日目気管内投与による奇形

	MWCNT 投与量 (mg/kg)			
	0	3	4	5
外表奇形				
外表奇形のあった母体数/総母体数	0/10	0/10	5/14*	2/5*
-(%)	(0)	(0)	(35.7)	(40)
外表奇形発生率 (%)	0.0±0.0	0.0±0.0	15.6±27.9	5.6±8.2
外表奇形のあった胎仔数/総胎仔数	0/113	0/135	15/158***	3/44**
短尾・無尾	0	0	12**	3**
四肢減形成	0	0	7*	0
骨格奇形				
骨格奇形のあった母体数/総母体数	0/10	1/10	6/14*	4/5**
-(%)	(0)	(10)	(43)	(80)
骨格奇形発生率(%)	0.0±0.0	0.7±2.3	39.9±48.4*	61.9±38.2*
骨格奇形のあった胎仔数/総胎仔数	0/113	1/133	56/158***	31/44***
肋骨癒合	0	0	8*	10***
脊椎癒合	0	0	54***	25***
少指	0	0	10*	1
多指	0	1	0	1

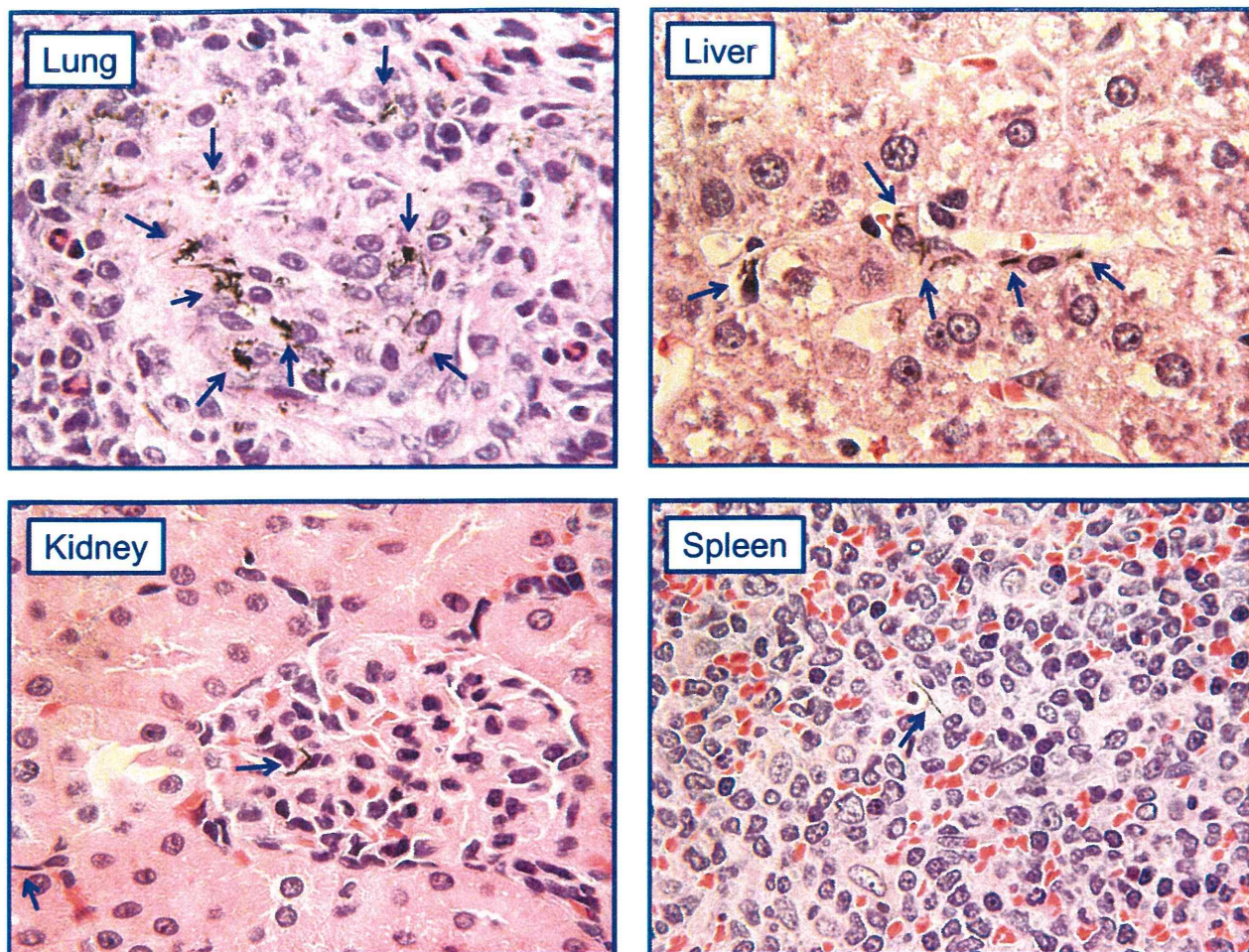


図 2. MWCNT を投与したラット組織中の MWCNT の光学顕微鏡写真 (×1000)
(矢印は CNT の沈着部位を示している。)

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
Fujitani, T., Ohyama, K., Hirose, A., Nishimura, T., Nakae, D., Ogata, A	Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube(MWCN) in ICR mice	J. Toxicol. Sci.	Vol.3 7, No.1	81-89	2012
Yamaguchi, A., Fujitani, T., Ohyama, K., Nakae, D., Hirose, A., Nishimura, T., Ogata, A.	Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotubes on immune and inflammatory responses in mice	J. Toxicol. Sci.	Vol.3 7, No.1	177-189	2012
Ryoei Kato and Kun'ichi Miyazawa2011.10	"Raman laser polymerization of C60 nanowhiskers"	Journal of Nanotechnology	(2012)10 1243		2012
Sagawa, Y., Futakuchi, M., Xu, J., Fukamachi, K., Sakai, Y., Ikarashi, Y., Nishimura, T., Suzui, M., Tsuda, H., Morita, A.	Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice.	J Toxicol Sci	37	317-327	2012
Zhang, X., Horibata, K, Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, SI., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M, Nohmi, T., Yasui, A. and Tanaka	Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair.	Nature Genetics, in press (*these authors contributed equally to this work.)			Published online 1 April 2012
Kaoru Sato、Jun-ichi Kuriwaki、Kanakano Takahashi、Yoshihiko Saito、Jun-ichiro Oka、Yuko Otani、Yu Sha、Ken Nakagawa、Yuko	Discovery of a Tamoxifen-Related Compound that Suppresses Glial L-Glutamate Transport Activity without Interaction with Estrogen Receptors	ACD Chemical Neuroscience	3	105-113	2012

Sekino, and Tomohiko Ohawada					
Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura, T.	Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry	Toxicology Letters	206	172-177	2011
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 (2)	195-201	2011
Horibata, K., Ukai, A., Koyama, N., Takagi, A., Kanno, J., Kimoto, T., Miura, D., Hirose, A., and Honma, M.	Fullerene (C60) is negative in the in vitro pig-A gene mutation assay.	Genes and Environment	33	27-31	2011
Xu, J., Sagawa, Y., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Furukawa, F., Ikarashi, Y., Uchino, T., Nishimura, T., Morita, A., Suzui, M., Tsuda, H.	Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats.	Food Chem Toxicol	49	1298-1302	2011
Kimoto, T., Chikura, S., Suzuki, K., Kobayashi, X., Itano, Y., Horibata, K., Honma, M., Dobrovolsky, V.N., Heflich, R.H., Miura, D. and Kasahara, Y.	Further Development of the Rat Pig-a Mutation Assay: Measuring Rat Pig-a Mutant Bone Marrow Erythroids and a High Throughput Assay for Mutant Peripheral Blood Reticulocytes.	Environment and Molecular Mutagenesis	52	774-783	2011
佐藤 薫	Glial L-glutamate transporters グリア型グルタミン酸トランスポーター	日薬理誌	138	127	2011
佐藤 薫	Ephrin/Eph 受容体シグナルを介した neuron-glia communication	日薬理誌	137	53	2011
Zhang D., Kobayashi T., Kojima T., Kanenishi K., Hagiwara Y., Abe M., Okura H., Hamano Y., Sun G., Maeda M.,	Deficiency of the Erc/mesothelin gene ameliorates renal carcinogenesis in Tsc2 knockout mice.	Cancer Science	102	720-727	2011

Jishage K., Noda T. and Hino O.					
Imashimizu K., Shiomi K., Maeda M., Aoki N., Igarashi K., Suzuki F., Koizumi M., Suzuki K. and Hino O	Feasibility of large-scale screening using N-ERC/mesothelin levels in the blood for the early diagnosis of malignant mesothelioma.	Experimental and Therapeutic Medicine	2	409-411	2011
Shiomi K., Shiomi S., Ishinaga Y., Sakuraba M., Hagiwara Y., Miyashita K., Maeda M., Suzuki K., Takahashi K. and Hino O.	Impact of renal failure on the tumor markers of mesothelioma, N-ERC/mesothelin and Osteopontin.	Anticancer Research	31	1427-1430	2011
Kanamori-Katayama M., Kaiho A., Ishizu Y., Okamura-Oho Y., Hino O., Abe M., Kishimoto T., Sekihara H., Nakamura Y., Suzuki H., Forrest A.R.R., Hayashizaki Y.	LRR4 and UPK3B are markers of primary mesothelial cells.	PLoS One	6	e25391-25399	2011

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Original Article

Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice

Tomoko Fujitani¹, Ken-ichi Ohyama¹, Akihiko Hirose³, Tetsuji Nishimura⁴, Dai Nakae²
and Akio Ogata¹

¹Departments of Environmental Health and Toxicology and ²Departments of Pharmaceutical Sciences,
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku, Tokyo 169-0073, Japan
³Divisions of Risk Assessment, Biological Safety Research Center and ⁴Divisions of Environmental Chemistry,
National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyohga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

(Received July 21, 2011; Accepted November 8, 2011)

ABSTRACT — A possible teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) was assessed using ICR mice. MWCNTs were suspended in 2% carboxymethyl cellulose and given intraperitoneally or intratracheally to pregnant ICR mice on day 9 of the gestation. All fetuses were removed from the uterus on day 18 of the gestation, and were examined for external and skeletal anomalies. In the intraperitoneal study, various types of malformation were observed in all MWCNT-treated groups (2, 3, 4 and 5 mg/kg body weight, intraperitoneal). In contrast, such malformations were observed in groups given 4 or 5 mg/kg body weight, but not in that treated with 3 mg/kg in the intratracheal study. In either study, the number of litters having fetuses with external malformation and that of litters having fetuses with skeletal malformations were both increased in proportion to the doses of MWCNT. The present results are the first to report that MWCNT possesses the teratogenicity at least under the present experimental conditions. Mechanism(s) to result such malformations is yet unclear and further experiment is necessary.

Key words: Multi-wall carbon nanotube, Nanomaterial, Teratogenicity, Hazard identification, Mice

INTRODUCTION

Carbon nanotube is a new form of the technological crystalline carbon and one of the most anticipated nanomaterials, because of its unique properties suitable for a variety of industrial products such as high strength materials, electronics and biomedical apparatuses (Martin and Kohli, 2003; Scott, 2005). On the other hand, potential hazards and/or risk for humans of carbon nanotube has been concerned, and large efforts have been internationally being made to investigate and evaluate them (Lam *et al.*, 2006; Pacurari *et al.*, 2010; Hubbs *et al.*, 2011). Among those, a possible carcinogenicity has been concerned most, assuming the structural similarity between carbon nanotubes and asbestos. Takagi *et al.* (2008) have first reported that multi-wall carbon nanotube (MWCNT) induces mesotheliomas, when intraperitoneally administered to male p53 gene deficient mice. Shortly afterwards, Sakamoto *et al.* (2009) have demonstrated that the carcinogenicity of MWCNT is a universal event and not specific to mice or genetically modified animals, by showing

the mesothelioma development in male intact (not genetically modified) rats, intrascrotally administered the same MWCNT. Since then, carcinogenicity of MWCNT has enthusiastically been being studied but the mechanism(s) of such carcinogenicity is yet not clearly understood. Because the damage to DNA, directly or indirectly, by MWCNT is to be evaluated by prenatal stage, a possible teratogenicity must be another big issue for the risk assessment of MWCNT. To the best of our knowledge there have been no reports dealing with this issue in the literature. In this content, the present study was conducted to assess a possible teratogenicity of MWCNT.

MATERIALS AND METHODS

Ethical consideration of the experiments

An experimental protocol was approved by the Experiments Regulation Committee and the Animal Experiment Committee of the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health prior to its execution and monitored at every step during the experimentation for its scientific and

Correspondence: Tomoko Fujitani (E-mail: Tomoko_Fujitani@member.metro.tokyo.jp)

ethical appropriateness, including concern for animal welfare, with strict obedience to the National Institutes of Health Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals, Japanese Government Animal Protection and Management Law, Japanese Government Notification on Feeding and Safekeeping of Animals and other similar laws, guidelines, rules and *et cetera* provided domestically and internationally.

Animals

Specific pathogen free Crlj:CD1(ICR) mice, 5 weeks old, were purchased from Charles River Japan Inc., Kanagawa, Japan and were sufficiently acclimatized before use. Mice were housed individually in plastic cage (180 x 305 x 110mm³) with cedar chip bedding and free access to the standard diet CE2 (Nihon Clea, Inc., Tokyo, Japan) and water. The animal room was maintained at 23-25°C with a relative humidity of 50-60%, with 10 ventilation per hour (drawing fresh air through an HEPA-filter, 0.3 µm, 99.9% efficiency) and on a 12 hr light/dark cycle. At 8 to 13 weeks old, a nulliparous female was housed overnight with a male and the next morning the female was checked for the presence of a vaginal plug. The day when vaginal-plug formation was observed was regarded as day 0 of the gestation.

Test chemicals

The presently utilized test chemicals, MWCNT (MITSUI MWCNT-7; lot number, 060125-01k) was exactly identical to those used in the carcinogenicity studies in *p53* gene deficient mice (Takagi *et al.*, 2008) and in intact rats (Sakamoto *et al.*, 2009). MWCNT was suspended in 2% carboxymethyl cellulose sodium (CMCNa; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) solution at concentrations of 0.2, 0.3, 0.4 or 0.5 mg/ml for the intraperitoneal study to achieve a uniform administration volume of 10 ml/kg body weight. In the case of the intratracheal study, 3, 4 and 5 mg/ml suspensions were prepared to achieve a uniform administration volume of 1 ml/kg. The control (0 mg/kg body weight) animals were received 2% CMCNa solution, intraperitoneally or intratracheally, respectively. These suspensions as well as a vehicle 2% CMCNa solution were sterilized by an autoclave at 120°C for 20 min and vigorously mixed by hand shaking immediately prior to the administration.

Animal treatment and assessments

Two independent experiments were performed. In experiment 1, pregnant female mice were given a single intraperitoneal administration of MWCNT at dosages of 2, 3, 4 or 5 mg/kg body weight on day 9 of the gestation.

On the other hand, in experiment 2, mice were given a single intratracheal spray administration of 3, 4 or 5 mg/kg body weight using intratracheal aerosolizer (MicroSprayer Model IA-1B; Penn-Century, Inc., Philadelphia, PA, USA) on day 9 of the gestation.

In either experiment, body weights of mated females were measured daily, and clinical observations were recorded. All mice were killed on day 18 of the gestation under light ether anesthesia. The liver, lung, spleen, heart, kidney, thymus and tracheobronchial lymph node of each dam were removed and weighed. Peripheral blood was examined for the leukocyte counting by Sysmex KX-21NV. Blood films were made, stained by May/Grünwald;Giemsa and counted for the subtypes of leukocytes under the light microscopy.

The uterus was opened to examine for early and late fetal deaths, and to record the position of dead and live fetuses. The numbers of implantation sites and corpora lutea in the ovaries were also counted. Each live fetus was weighed and examined for external anomalies. Fetuses were fixed in 95% ethanol and stained with Alizarin Red S (Dawson, 1926) to examine skeletal anomalies.

Statistical analysis

Scheffe's multiple comparison was applied for the organ weights of dams, maternal body weights, number of implantations and live fetuses, and fetal body weights. The incidence of pregnant females and of litters with malformed fetuses, and the number of malformed fetuses were analyzed using the Chi square test. The rank sum test was used for data on the resorption and the percent incidence of malformations (Nishimura, 1976). The trend test (cumulative X2 test) was performed to evaluate the significance of the development of malformations by the administered doses of MWCNT.

RESULTS

Experiment 1, the intraperitoneal study

The pregnant status is summarized in Table 1. No animals died after the MWCNT administration. While most of the mated mice were gestated regardless to treatments, 1, 1, 6 and 6 pregnant mice, which were dosed 2, 3, 4 and 5 mg/kg body weight of MWCNT respectively, did not have any living fetuses on 18 day of the gestation. The statistical significances of this change were obtained in the 4- and 5-mg/kg groups. Similarly, the rates of early resorption of fetuses were significantly increased, with the number of live fetuses per litter being decreased, in these groups. In addition, the body weights of live fetuses were significantly lower in the 2-, 3- and 4-mg/kg groups,

Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube

Table 1. Experiment 1; pregnant status

Reproductive parameters	MWCNT dose (mg/kg body weight)				
	0 (control)	2	3	4	5
Female mated ¹⁾	11	12	12	15	10
Female died ²⁾	0	0	0	0	0
Female gestated ³⁾	10	8	9	13	9
Female with >1 live fetus	10	7	8	7*	3**
Corpora lutea/litter [#]	15.8 ± 1.9	15.6 ± 1.6	16.0 ± 4.1	15.4 ± 1.8	14.4 ± 2.2
Implantations/litter [#]	14.5 ± 2.5	14.4 ± 1.5	12.3 ± 2.7	14.0 ± 2.1	12.7 ± 3.8
Resorption of fetuses(%) ⁴⁾ #					
Early	11.0 ± 13.5	35.3 ± 34.9	41.7 ± 34.8	67.1 ± 38.8**	81.7 ± 28.2***
Late	1.7 ± 3.7	2.4 ± 3.4	0	1.6 ± 3.1	0.9 ± 2.6
Live fetus /litter [#]	12.6 ± 2.6	9.5 ± 5.1	7.3 ± 4.1	4.8 ± 5.8**	1.4 ± 3.3***
Body wt of live fetus (g) [#]					
Male	1.48 ± 0.10	1.29 ± 0.08*	1.28 ± 0.10**	1.31 ± 0.08*	1.42 ± 0.12
Female	1.43 ± 0.13	1.23 ± 0.09*	1.24 ± 0.12*	1.21 ± 0.11*	1.33 ± 0.02

¹⁾ Number of animals with vaginal plug. ²⁾ Number of animals died before the scheduled sacrifice on day 18 of the gestation. ³⁾ Number of animals with implantation sites. ⁴⁾ 'Early' was defined as a case showing the implanted sites and amorphous mass, while 'Late' was defined as a case showing the head and limbs. # Values are the means ± S.D. The percent resorption and foetal body weight were obtained by averaging the value for each litter. Asterisks represent that the values are significantly different from the control value (*, ** or *** indicating $p < 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively).

but not in the 5-mg/kg group, than in the control group.

Figure 1 illustrates changes of the maternal body weight, of which increment was retarded by MWCNT with a dose-dependent tendency. The body and organ weights and leucocyte typing and counting data of dams are summarized in Table 2. The final body weights were significantly decreased in the 4- and 5-mg/kg groups. The liver weight tended decreased in the dose groups but changes were not statistically significant. The weight of the spleen was significantly increased in the dose groups but no other adverse effect was evident. The numbers of total white blood cells, neutrophils, eosinophils and monocytes, lymphocytes as well but lesser degree, all tended increased in all MWCNT-treated groups. The statistical significances of these changes were obtained in the 3-mg/kg group for the total white blood cells and in 2- 3- and 4-mg/kg groups for the neutro- and eosinophils.

The incidences of malformations were summarized in Table 3. Various types of external and skeletal malformations, such as reduction deformity of limb, short or absent tail, cleft palate, fusion of vertebrae, hypophalangia and hyperphalangia, were observed not in the control group but in all MWCNT-treated groups. Whereas respective incidences of such malformations were a few, the ratio of litters with malformed fetuses, the percent incidence of malformations and the ratio of malformed fetuses were all increased in all MWCNT-treated groups, most of them

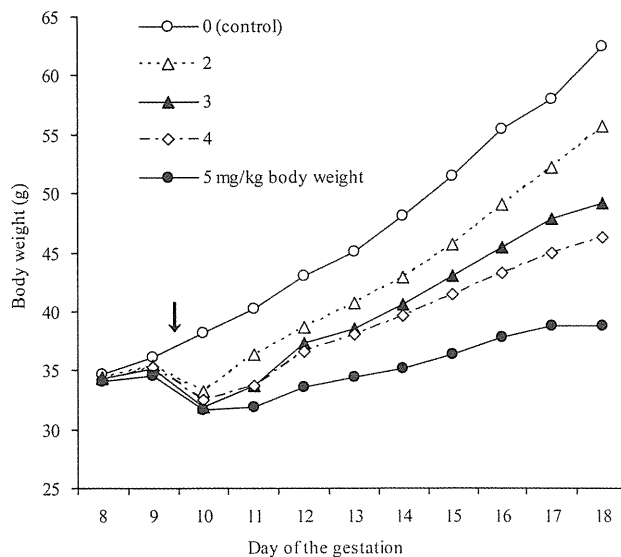


Fig. 1. Experiment 1; changes of the maternal body weights. The arrow represents the timing of the intraperitoneal administration of MWCNT.

being with the statistical significance. The trend test evaluated that the development of skeletal malformations by the administered doses of MWCNT was significant ($p < 0.05$).

Table 2. Experiment 1; body and organ weights, and leucocyte typing and counting of dams

Items	MWCNT dose (mg/kg body weight)				
	0 (control)	2	3	4	5
Number of dam	10	8	9	13	9
Body weight on day 9 of the gestation	36.1 ± 1.3	35.3 ± 1.9	35.2 ± 2.9	35.2 ± 2.6	34.6 ± 2.4
on day 18 of the gestation	62.4 ± 2.8	55.7 ± 12.0	49.2 ± 7.9	46.3 ± 11.9*	38.8 ± 9.4***
Organ weight					
Liver (g)	3.11 ± 0.40	3.17 ± 0.53	2.99 ± 0.49	2.80 ± 0.52	2.42 ± 0.64
Kidney (mg)	478 ± 133	503 ± 52	447 ± 48	472 ± 55	452 ± 55
Heart (mg)	179 ± 17	180 ± 23	167 ± 18	165 ± 16	157 ± 22
Lung (mg)	189 ± 8	181 ± 3	176 ± 20	188 ± 15	202 ± 20
Spleen (mg)	145 ± 40	297 ± 88*	323 ± 86**	333 ± 99**	372 ± 91***
Thymus (mg)	26.6 ± 12.9	22.6 ± 5.4	17.2 ± 9.2	25.3 ± 7.4	37.8 ± 15.0
Tracheobronchial lymph node (mg)	7.4 ± 8.3	7.3 ± 3.5	8.8 ± 4.5	6.2 ± 4.5	14.6 ± 5.1
Leucocyte count (10²/μl)					
Total	47 ± 19	115 ± 34	124 ± 48*	109 ± 68	82 ± 38
Lymphocyte	28.9 ± 11.7	38.8 ± 12.0	33.6 ± 15.1	33.0 ± 35.7	23.9 ± 11.4
Neutrophil	15.0 ± 7.0	54.6 ± 19.2*	66.1 ± 23.0**	53.6 ± 37.0*	46.5 ± 23.9
Eosinophil	0.9 ± 0.5	17.5 ± 14.1**	16.1 ± 8.9**	15.5 ± 8.1**	6.7 ± 5.0
Monocyte	1.9 ± 1.7	4.1 ± 3.0	8.2 ± 7.8	7.0 ± 4.2	5.5 ± 4.0

Values are the mean ± S.D. Asterisks represent that the values are significantly different from the control value (*, ** or *** indicating $p < 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively).

Table 3. Experiment 1; incidences of malformations

Items	MWCNT dose (mg/kg body weight)				
	0 (control)	2	3	4	5
External malformation					
Numbers of litters with malformed fetuses/examined (percentages in the parentheses)	0/10(0)	2/7(28.6)	2/8(25.0)	3/7(42.9)*	1/3(33.3)
Percent incidence of malformations [#]	0	9.2 ± 18.8	3.6 ± 6.8	4.6 ± 6.5	6.7 ± 11.5
Numbers of malformed fetuses/examined	0/126	3/76*	3/66*	3/63*	2/13***
Numbers of fetuses with					
short or absent tail	0	2	1	1	0
cleft palate	0	0	0	1	0
reduction deformity of limb	0	2	3	1	2
Skeletal malformation					
Numbers of litters with malformed fetuses/examined (percentages in the parentheses)	0/10(0)	4/7(57.1)**	3/8(37.5)*	3/7(42.9)*	2/3(66.7)**
Percent incidence of malformations [#]	0.0 ± 0.0	14.4 ± 18.1	11.1 ± 21.7	11.9 ± 19.2	40.0 ± 52.9
Numbers of malformed fetuses/examined	0/126	9/76***	7/66***	7/63***	5/13***
Numbers of fetuses with					
fusion of ribs	0	3	1	2	0
fusion of vertebral bodies and arches	0	6	7	0	3
hypophalangia	0	2	2	3	2
hyperphalangia	0	0	0	2	0

[#]Calculated by averaging the percentage in each litter (*i.e.* numbers of malformations/fetuses) and shown as the means ± S.D. Asterisks represent that the values are significantly different from the control value (*, ** or *** indicating $p < 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively).

Experiment 2, the intratracheal study

The pregnant status is summarized in Table 4. No animals died after the MWCNT administration. Most of the treated mated mice were gestated, and all of them had living fetuses. The rates of early as well as late resorption of fetuses were increased in the 4- and 5-mg/kg groups, respectively, but these changes were not statistically significant because of a large dispersion. The numbers of live fetuses per litter in MWCNT-treated groups were well maintained, although slight decreases were seen in the 4- and 5-mg/kg groups. In contrast, the body weight of live fetuses was significantly lower in the 5-mg/kg group.

Figure 2 illustrates changes of the maternal body weights, of which increment was retarded in the 5-mg/kg group. The body and organ weights, and leucocyte typing and counting data of dam are summarized in Table 5. The final body weight was significantly decreased in the 5-mg/kg group. The weight of the lung and tracheobronchial lymph nodes tended increased in a dose-dependent tendency, and the statistical significance was achieved for the lung in the 5-mg/kg group. Lungs of dosed groups looked blackened. The numbers of total white blood cells tended increased in a dose-dependent tendency, and the statistical significance was achieved in the 4- and 5-mg/kg group, but the magnitude of this change was not so high. The numbers of all types of white blood cell looked increased in some MWCNT-treated group, but the changes were modest and lacked statistical significances.

The incidences of malformations were summarized in Table 6. Various types of external and skeletal malformations, as seen in experiment 1, were observed not in the control group and scarcely in the 3-mg/kg group. In the 4- and 5-mg/kg groups, however, such malformations occurred frequently and significantly. Typical features of the reduction deformity of limb and the fusion of vertebrae and ribs are demonstrated in Figs. 3 and 4, respectively. The ratio of litter with malformed fetuses, the percent incidence of malformations and the ratio of malformed fetuses were all increased in 4- and 5-mg/kg group, most of them being with the statistical significance.

DISCUSSION

The present results clearly elicit that MWCNT is teratogenic in mice, at least under the present experimental conditions. This is the first report demonstrate the teratogenicity of this nanomaterials. Also, there is no report on teratogenicity of other exogenous fibers such as single wall nanotubes, asbestos and glass fibers. It is sometimes difficult to judge teratogenicities of chemicals, especially when the maternal toxicity is present. Because the maternal toxicity was in fact observed in some MWCNT-treated groups of the present study, one might consider the malformation of the fetuses only reflected and thus did not necessarily indicate the "true" teratogenicity of MWC-

Table 4. Experiment 2; pregnant status

Reproductive parameter	MWCNT dose (mg/kg body weight)			
	0 (control)	3	4	5
Female mated ¹⁾	11	12	16	6
Female died ²⁾	0	0	0	0
Female gestated ³⁾	10	10	15	5
Female with >1 live fetus	10	10	15	5
Corpora lutea/litter	14.6 ± 1.5	16.0 ± 1.8	15.1 ± 1.8	15.8 ± 2.3
Implantations/litter	12.8 ± 1.6	14.8 ± 2.2	13.8 ± 2.7	11.8 ± 2.9
Resorption of fetuses(%) ^{4) #}				
Early	9.8 ± 13.4	8.8 ± 8.4	21.0 ± 29.8	20.0 ± 17.7
Late	2.0 ± 4.6	0.6 ± 1.8	0.8 ± 2.2	6.3 ± 10.1
Live fetus/litter [#]	11.3 ± 2.1	13.3 ± 1.5	10.5 ± 4.4	8.8 ± 2.9
Body weight of live fetus (g) [#]				
Male	1.41 ± 0.14	1.36 ± 0.12	1.23 ± 0.19	1.07 ± 0.20*
Female	1.35 ± 0.13	1.31 ± 0.11	1.19 ± 0.19	1.06 ± 0.18*

¹⁾ Number of animals with vaginal plug. ²⁾ Number of animals died before the scheduled sacrifice on day 18 of the gestation. ³⁾ Number of animals with implantation sites. ⁴⁾ 'Early' was defined as a case showing the implanted sites and amorphous mass, while 'Late' was defined as a case showing the head and limbs. # Values are the means ± S.D. The percent resorption and fetal body weight were obtained by averaging the value for each litter. Asterisks represent that the values are significantly different from the control value (* indicating $p < 0.05$).

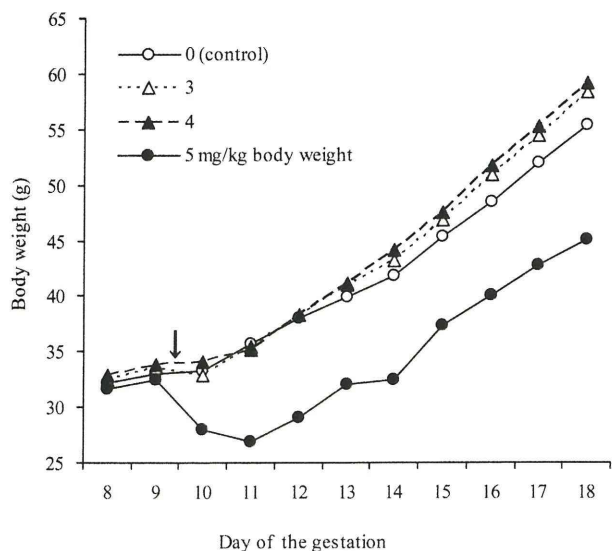


Fig. 2. Experiment 2; changes of the maternal body weights. The arrow represents the timing of the intratracheal administration of MWCNT.



Fig. 4. Experiment 2; an 18-day-old fetus, showing the fusion of vertebrae and ribs, from a dam intratracheally administered MWCNT at a dose of 4 mg/kg body weight on day 9 of the gestation.



Fig. 3. Experiment 2; an 18-day-old fetus, showing the reduction deformity of the limb, from a dam intratracheally administered MWCNT at a dose of 4 mg/kg body weight on day 9 of the gestation.

NT. Malformations were, however, induced even in the 4-mg/kg group of the intratracheal study, in which MWCNT did not apparently cause the maternal toxicity. In addition, the malformations induced by the MWCNT administration belonged to a reduction type, such as the reduction

deformity of limbs and the short or absent tail. The malformations in this type have not been found among about 7,000 fetuses of ICR mice historically examined so far in our laboratory (Ogata *et al.*, 1984, 1987, 1989 and 1999). Also in other laboratories, the spontaneous incidence of the reduction deformity of limb of ICR mice is usually very low. For instance, the incidence of amelia and oligodactylia has both been reported to be 0.02% among 5,000 fetuses in another laboratory and no deformities have observed among 4,335 fetuses in another laboratory (Kameyama *et al.*, 1980). The malformations observed in this study are uncommon in merely by the maternal toxicity. It is thus safe to say that the teratogenicity of MWCNT demonstrated in the present study is true with a biological significance.

The reasons why we at first conducted the intraperitoneal study and used very high doses were to avoid missing a teratogenicity of MWCNT, if it is present, under the experimental condition as sensitive as possible from the point of the hazard identification. This is the same strategy that was adopted in the studies identifying the carcinogenic hazard of MWCNT (Sakamoto *et al.*, 2009; Takagi *et al.*, 2008). The relatively severe maternal toxicity in the high doses is thus rather expected. Nevertheless, the present intraperitoneal study can demonstrate the teratogenicity of MWCNT as stated above, which then led us to confirm this hazard using a more human-relevant exposure route. In the intratracheal study, MWCNT was administered into the trachea of mice in a spray or mist shape, which well mimics the most plausible human