

M., Jishage K., Noda T. and Hino O.					
Wako, K., Kotani, Y., Hirose, A., Doi, T., Hamada, S.	Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity.	The Journal of Toxicological Sciences	35	437-446.	2010
Sakamoto Y, Nakae D, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O and Ogata A	Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT)	The Journal of Toxicological Sciences	35	265-270	2010
Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, Tsuda H	Involvement of macrophage inflammation protein 1 {alpha} (MIP1 {alpha}) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying	Carcinogenes is	31(5)	927-35	2010
Nudejima S, Miyazawa K, Okuda-Shimazaki J and Taniguchi A	Biodegradation of C60 Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells	ADVANCES IN BIOMEDICAL RESEARCH	1	89-94	2010
Tsuda H.	Risk assesment studies of nanomaterials in Japan and other countries.	Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	10, DIMS 30th Anniverrary Supplement	11-12	2010
西村哲治	ナノテクノロジーと環境リスク	公衆衛生	74(4)	305-308	2010
Hiroyuki Tsuda, Jiegou Xu, Yuta Sakai, Mitsuru Futakuchi, Katsumi Fukamachi	Toxicology of Engineered Nanomaterials - A review of Carcinogenic Potential	Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	10	975-980	2009
広瀬明彦, 西村哲治, 菅野純	産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性	国立医薬品食品衛生研究所報告	127	15-25	2009
久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 杉本直樹, 広瀬明彦, 西村哲治	高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法による生物試料中フラーレンの分析法の開発	国立医薬品食品衛生研究所報告	127	65-68	2009
K. Miyazawa and K. Hotta	"The effect of solvent ratio and water on the C60 nanowhiskers"	J. Cryst. Growth	312	2764-2770	2010
K.Miyazawa and K. Hotta	"The effect of water on the stability of C60 fullerene nanowhiskers"	Journal of Nanoparticle Research			2010
R. Kato and K. Miyazawa	"Cross-sectional structural analysis of C60 nanowhiskers by transmission electron microscopy"microscopy"	iamond & Related Materials	20	299-303	2011
K. Miyazawa, T.Tokumitsu, J.Fujii, R.Kato, S.Nudejima, K.Hotta, K.Ide and T.Kizuka	Dispersion of carbon nanotubes and fullerene nanowhiskers by the liquid-jet cavitation method	Annual Conference on Carbon, June 14-19, 2009, Biarits, France / Topic 11		pp.161_1-4	2009

宮澤 薫一	フラーレンナノファイバの合成と成長機構	NEW DIAMOND	25	22-27	2009
S Nudejima, K Miyazawa, J Okuda-Shimazaki and A Taniguchi	Observation of phagocytosis of fullerene nanowhiskers by PMA-treated THP-1 cells	Journal of Physics: Conference Series	159	1-6	2009
Shin-Ichi Nudejima, Kun'Ichi Miyazawa	Biodegradation of C ₆₀ Fullerene Nanowhiskers by Macrophage-like Cells			89-94	2009

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別冊

ナノマテリアルの有害性評価とカーボンナノチューブの生体影響

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

菅野 純
広瀬 明彦

『ナノ材料のリスク評価と安全性対策』

2010 年 6 月 フロンティア出版刊 抜刷

第1章 有害性評価研究とナノ材料

1 ナノマテリアルの有害性評価とカーボンナノチューブの生体影響

菅野 純^{*1}, 広瀬 明彦^{*2}

1.1 はじめに

ナノテクノロジーは、「ナノメートルサイズのスケールで物質の構造・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、このナノテクノロジーの中心的な役割を担う新規物質としてのナノマテリアルは、少なくとも1次元の大きさが100ナノメートル以下である物質として定義され、近年急速にその種類や生産量が増加してきている。これらナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ従来のバルク体のような大きな構造体で得られる性状とは著しく異なることが示されており、この新たな物理化学的性状が産業的に新しい用途への開発として期待されているところである。しかし、この物理化学的性状は、一方で生体とのこれまでに知られていなかった新たな相互作用を引き起こす可能性を内包していると想定され、特にヒト健康影響に対する安全性評価を行う際には、新たな危惧として捉えられる可能性も含んでいる。このようなナノマテリアルの多方面にわたる利用拡大は、我々がこれらの物質に直接、あるいは商品を通して間接的に接する機会が増えてくることを意味する他、長期間の暴露や廃棄後の環境経由暴露の機会も増すことが想定される。従って、ナノマテリアルの使用が本格的に拡大する前に、その有用性だけでなく安全性に関する知見も十分に蓄積し、ナノマテリアルの利用が安心して進められるように対応することが求められている。

健康影響に対する化学物質の安全性評価に関して、これまで通常の毒性評価は、基本的に対象物質の化学組成と重量に基づいて行われている。したがって、構造体そのものの大きさに対しては、アスベストや塵肺症原因物質などを除き、特別の考慮はされてきていないことから、ナノマテリアルのナノサイズ効果に基づく物理化学的特性を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発が急務となっている。行政的な見地に立っても、化審法等これまでの法令に基づく化学物質組成を対象にした安全管理システムでは、生体内へ吸収されないと考えられる高分子ポリマーを除いて、物質の大きさを意識した管理システムになっておらず、化学物質の行政

* 1 Jun KANNO 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 毒性部 部長

* 2 Akihiko HIROSE 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 室長

的申請／認可体制における産業用ナノマテリアルの安全性評価においても、その大きさに依存した特性を評価し、管理するシステムの追加、あるいは全く新たな枠組みに基づく登録システム等の構築が必要とされる。また、化審法に限れば、既存化学物質として評価済みの組成、或いは単一元素からできたナノマテリアル、例えば、炭素のみから成るカーボンナノチューブやフラーレンは、現行の化審法上では審査を必要とされていない。また、酸化チタンなどはすでに化粧品原料として広く使用されており、これらの物質の安全性の評価は急務である。

本稿では、これらの新たな基準のもとに評価される必要のあるナノマテリアルの安全性評価手法を検討するうえで、考慮すべき観点を概説する。特に、ナノマテリアルの多くが持つ難溶性、難分解性で凝集しやすい性質は、安全性試験法の開発において重要な因子であると共に、一旦吸収された後は、生体内での長期の蓄積性(残留性)とそれに基づく慢性影響の有無に大きく関連すると考えられる。ところで、この生体内残留性と関連する慢性影響(催腫瘍性)に関して、我々はすでにアスベストがその代表的な例の一つであることを知っている。そして、ナノマテリアルとして代表的なカーボンナノチューブの中でもその形状がアスベストに類似しているものが腹腔内投与により中皮腫を引き起こすことが最近示された。本稿の後半では、新たな評価手法の確立とは別に、すでに適用可能な知見としてのアスベスト様サイズの繊維状粒子による催腫瘍性研究の解説とナノチューブ安全性研究への適用性と新たな課題について概説する。

1.2 リスクアセスメントにおける課題

1.2.1 体内動態の重要性

一般的に、化学物質の健康影響評価(リスクアセスメント)の基本的なフレームは、有害性評価と暴露評価、および各々の評価内容を比較・統合化する過程であるリスク判定のコンポーネントから成り立っている。さらに有害性評価は、有害性の確認(hazard identification)と用量反応評価(dose-response assessment)に分けられる。この基本フレーム自体は、ナノマテリアルの健康影響評価に適用できるものであると考えられる¹⁻⁵⁾が、ナノマテリアルに特徴的な新たな物理化学的性質に鑑みると、体内動態(吸収 absorption, 分布 distribution, 代謝 metabolism, 排泄 excretion)情報は、一般の化学物質より重要な意味を持つと考えられている。例えば、粒子サイズの微小化はそれまでその大きさのために生体内に侵入することはないと考えられていた粒子状物質が、生体内に侵入が可能なサイズにまで小さくなることを意味しているかも知れない。その結果は、生体組織との間にこれまで起こらなかった新たな反応を引き起こす可能性を示す。また、重量あたり、あるいは1粒子あたりの表面積が増大することにより相対的に増加した表面活性は、それまで反応性が乏しいために無害であると考えられた粒子であっても、生理学的反応を示すようになることなどが推測される。一方、暴露する物質量と生体反応性の

相関性を解析するような用量反応評価や暴露評価の段階においては、従来使われてきている重量よりも表面積や表面活性の強さなどの別のスケールを用いて記述した方が適切な用量依存的な定量評価が可能になることも指摘されている。これらのことは、ナノマテリアルによる生体影響はその化学構成成分に対して一義的に決定されるものではなく、粒子の大きさや形状にも依存した生体反応であることを示している。また、暴露時における暴露環境(分散状態であるか凝集状態であるか)や暴露経路(吸入、経口、経皮など)との組み合わせによって生体侵入時あるいは侵入後の粒子の体内挙動は異なってくることも想定される。有害性影響評価では一般の化学物質に比べて、粉体毒性を含む多くの要因を考慮しなければならないことを意味している。また、ナノマテリアルの凝集しやすい性質は、分布される組織によって蓄積性の動態を示すことが予想される。したがって、ナノマテリアルの場合は体内動態の性質の違いにより毒性(生体影響)の質や強さが大きく変わる可能性を持っており、これらの情報は、一般の化学物質より大きな意味合いを持つようになると考えられる。

このような体内動態情報を取得するためには、まず生体試料中でナノマテリアルを検出、同定・定量できる方法を確立しなくてはならない。ナノマテリアルの存在量を定量する手法としては、測定対象物質を生体試料から分離・単離し、測定することが常套手段となる。たとえば、金属ナノ粒子は生体試料を硝酸加熱分解後、燃焼灰化した試料中の金属元素の量を誘導結合プラズマ質量分析計で分析する方法を採ることができ、フラーレンの場合は、生体試料から抽出後、液体クロマトグラフィー質量分析計で定量可能である。しかし、これらの方法では、ナノマテリアルの存在量を評価することは可能であるが、標的組織における最終的な生体内反応に影響を及ぼすと考えられる実際のナノマテリアルの存在状態(ナノサイズなのか、凝集しているのか等)を把握することはできない。最終的には、組織標本の電子顕微鏡などによる確認が必要である。一方、カーボンナノチューブでは、特定の分析機器による定量測定が困難であり、電子顕微鏡で本数や形態を手動で計測する以外に確実に測定する方法はない。代替手段としては、対象物質に標識をつけて分析する方法の開発も有効であると考えられるが、標識化することによりナノマテリアルの吸収性や生体反応に影響を及ぼす可能性を考慮しなければならない。

1.2.2 影響評価のための試験系確立の必要性

粒子のナノサイズ化による表面活性の増大は、一般的に粒子の凝集性を増強することが知られており、この凝集性は体内動態に対して重要因子であるだけでなく、生体影響を評価するための試験系開発においても重要な制御因子である。*In vitro* 試験系では、水系の培養液を用いた試験法になるため、水難溶性で凝集しやすいナノマテリアルを培養液中に凝集することなく、

均一に分散させることが最も重要な課題となる。分散剤として、界面活性剤など、親水・疎水両領域を持つ媒体となる物質の共存が必要となるが、評価対象の物質以外に共存する物質や溶媒が生体に影響を及ぼす可能性を考慮して、生体影響の少ない物質を使用するか、もしくは影響の出にくい量(濃度)の使用を考えなければならない。例えば、フラーレンはトルエンにある程度まで容易に溶解するが、有機溶媒の毒性や溶媒自身の溶解性のためにトルエン溶液の暴露において量的な制限がかかる。分散剤として有効な界面活性剤も、高濃度では細胞溶解性があるため制限があり、細胞の生理作用や検出する測定系に影響を与えない適切な濃度の選択が必要である。一方、生体成分に近い分散剤としては、血液中脂質やリポタンパク質がある。これらは、細胞毒性等の影響を及ぼす可能性が低く、培養の重要成分として添加されていることから優れた分散剤と言えるが、培養液当たりの添加濃度には制限がある。また、人工脂質二重膜構造のリポソームもナノマテリアルを細胞膜中に導入して、評価する手法としては有用性が高いと考えられるが、リポソーム自身の細胞への影響に注意する必要がある。

最終的な生体影響評価をするためには *in vivo* の実験動物を用いた研究が必要である。しかし、投与時の溶媒や分散状態が吸収性や生体反応にも影響を及ぼすと考えられ、*in vivo* 系でも適切に分散した投与方法の検討が必要である。経口暴露媒体としては、消化管系へ過度な刺激を与えることは望ましくないため、可能な限り、通常使用している溶媒を用いての分散が検討される。溶剤の候補として、オリーブ油などの食品用油脂、膜構成脂質成分、リポソーム、低刺激の有機溶媒等の使用が検討される。水溶液として投与するためには、界面活性剤(Tween20 や Triton X-100 等)、 γ -シクロデキストリン等の包接体を用いて水に分散させる方法もある。フラーレンでは、数百 ppm まではコーン油に溶解して経口投与することが可能である。経皮暴露の場合は、経口暴露の場合と異なり対象が皮膚であるため、溶剤の種類が異なる。溶媒として、揮発性の高いトルエンやキシレン等の有機溶媒と揮発性の低い有機溶媒、もしくは界面活性剤などの分散剤を用いた水溶液が検討されるが、塗布時あるいは塗布後の皮膚表面での凝集性が、ナノマテリアルの残留性や浸透性に影響を与えることを考慮しなくてはならない。

現在のところ、生体内吸収の観点から最も健康影響に対する懸念の高い暴露経路は吸入暴露であると考えられている。これまで、産業用ナノマテリアルに限らず微粒子の吸入暴露研究は、金属、鉱物粒子、排ガス粒子などを中心に数多く行われているところであり、生体影響についても、これらの過去の知見が有用であることは明らかである。しかし、実験的検証を行う際には、先に述べたナノマテリアルに特有の凝集しやすい性質をどのように扱うかについての検討が必要となる。特に凝集体が大きいままであると、肺組織中の細気管支等を詰まらせることによる物理的な二次影響を見ることになり、少なくとも肺胞まで到達可能な分散技術は必要であると思われる。実験的暴露方法には、一個体ずつ暴露する吸引法や気管内投与法と、吸入設

備を用いる吸入暴露法がある。どちらを採用するにしても、ナノマテリアルの吸入暴露試験系として、特に凝集しやすい特有の性状のため新たな分散法の開発が必要である。吸引・気管内投与の場合には、投与溶媒の選択、エアロゾル化するための技術と分散媒体の選択が必要である。分散媒体としては Tween 等の界面活性剤や肺サーファクタントなどの使用が検討されている。吸入設備の開発においても、粉体をより微細にする方法やエアロゾル化による粒子発生装置の開発が必要である。

一方、繊維状粒子については、これまでアスベストやアスベスト代替物である人工繊維による研究で蓄積された情報が有益である。これらアスベスト様繊維については、肺がんや中皮腫、肺線維症の誘発は重要な影響であり、特に中皮腫誘発性に関しては、腹腔内投与による試験系が古くから感受性の高い試験であるとされており、次項ではその適用性と最新の知見について解説する。

1.3 カーボンナノチューブの安全性

1.3.1 アスベスト様繊維状粒子による過去の知見

カーボンナノチューブは単層または多層の形状を持ち、それぞれ単層カーボンナノチューブ (SWCNT) および多層カーボンナノチューブ (MWCNT) として分類されるが、その製法により層の数や構造、繊維の長さ、使用する触媒金属などの異なる様々な種類が存在する。一方、ある種の MWCNT の形状や大きさはアスベストに類似していることに、潜在的な懸念としての関心が持たれていた。アスベスト様繊維による催腫瘍性の強さを規定している最も重要な因子は、特徴的な繊維径と繊維長に加えて、数年から数十年にわたる生体内における残留性であると考えられている。そのため、現時点でも *in vitro* 実験や短期の動物試験により催腫瘍性を実証することが困難であり、長期の動物試験による確認が必要とされている。Davis(1989)ら⁶⁾のラットを使った吸入実験では、20 μm 以上の繊維数の多い chrysotile でアスベスト線維症と発がん性が強くなる傾向が示唆されている。このように、アスベスト様繊維による催腫瘍性は吸入暴露された際の肺への長期間の沈着により確認されるものであるが、吸入暴露による長期の動物試験は、特殊な実験設備を長期間維持する必要があり、膨大な手間と経費がかかることが知られている。

一方、アスベストによる実験動物の中皮腫の誘発は、Wanger らにより、ラットの胸腔内へのアスベスト埋入実験によっても再現されることが示されている。さらに、Stanton(1981)ら⁷⁾による様々な径と長さの分布を持つアスベストを含む鉱物系繊維を胸膜に埋入した実験により、径が 1.5 μm 以下で、長さが 4 μm 以上の繊維の割合が多いものが、発がん性の強いことが示唆されている。これらの様々な知見をもとに Pott(1978)⁸⁾は、繊維径と繊維長を関数とし

て発がんポテンシャルの強さを示す仮説を提唱した(図1)。WHO(1986)⁹⁾では、繊維長、径および化学組成は体内での沈着性に重要な因子であり、胸腔内あるいは腹腔内へ直接投与して中皮腫を誘発させる一連の研究結果からは、繊維長と径が主要な因子であるとした。その結果、WHOでは、PCOM サンプラーでカウント可能な、繊維長

5 μm 以上で、繊維径が3 μm 以下で且つ、繊維長:繊維径のアスペクト比3:1以上の粒子(WHO fiber)を、職域環境でのモニター粒子として推奨してきた。

このような、形状に依存した繊維性粒子の催腫瘍性の強さは、肺胞内への到達性と肺の中での長期残留性に関連していると考えられている。これは、繊毛のある気道を通り抜けて、肺胞まで到達できる(respirable)繊維状粒子は、空気力学的な解析によって繊維径が5~10 μm 以下の繊維とされているが、その際の繊維長は空気力学的に肺胞への到達性に影響を与えないことを示している^{10, 11)}。一方、5 μm 以上の大きさの繊維は、肺胞内で異物を除去するために機能するマクロファージで除去するには大きすぎるために、長期間肺胞内に残留する、あるいは、胸膜までの到達を許すことになると考えられている。しかもこの残留した除去不可能な繊維に対して、生体はマクロファージによる除去活動を長期に亘って継続することになり、その結果、長期間の自浄作用による酸化ストレスが結果的に、肺の上皮細胞や胸膜の中皮細胞に対する発がん性の原因になっていると推定されている。つまり、特徴的な繊維状粒子の形状が、肺胞・胸膜域への到達性と生理学的な難除去性と結びつき、慢性的な生体影響の結果としての催腫瘍性の強さと

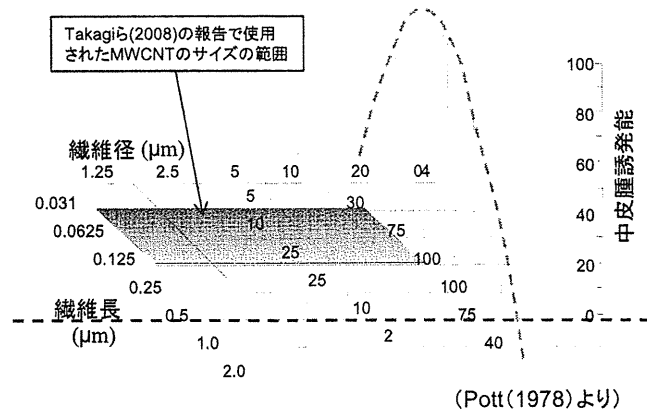


図1 繊維粒子サイズと中皮腫誘発能の関係

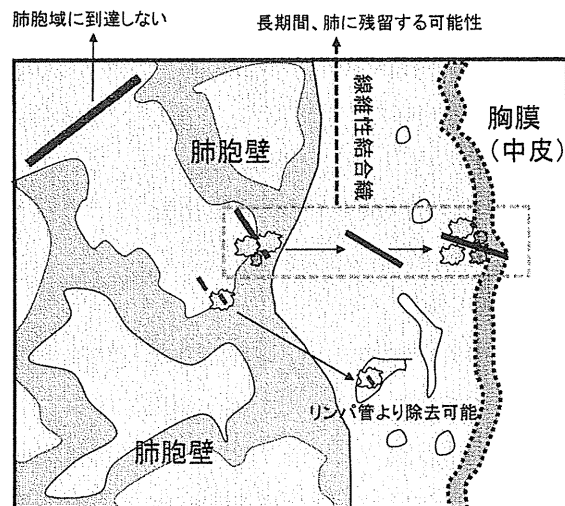


図2 繊維状粒子の肺胞域への到達性と生理学的難除去性

関連していると考えられている(図2)。

また、アスベストや鉍物系の繊維以外の人工的なガラス質繊維を用いた試験でも、繊維長に依存した発がんポテンシャルを示す結果が得られている。しかし、同じ形状を持つ繊維でもその化学組成の違いで、発がん・慢性影響に違いがあることが示されている¹²⁾。構成する化学組成の内、鉄原子が活性酸素発生に強く関わっており、発がん機序の一つと考えられているが、鉄原子の混在量や酸化状態と発がん性の強さとの関係は依然明らかになっておらず¹³⁾、鉄含量は中皮腫誘発の増強要因であるが、絶対要因であるとは考えられていない。また、赤血球由来の鉄成分が、繊維に吸着する機序も想定されている。一方、化学組成に基づく繊維の体内での耐久性(durability)は、体内残量性に関係しており、繊維状粒子の形状(繊維長と径)以外に発がん性の強さに関わる重要な因子であると認識されている¹⁴⁾。形状的には、体内残留性が高いと思われる形状の物質でも、長期間体内に残留している間に、粒子表面の修飾や侵食などにより、繊維が分解されたり短くなったりするような成分で構成されている繊維は、時間をかけて肺胞内から除去されていく可能性が示唆されている。実際、肺内からの繊維の排出半減期(特に繊維長の長い(20 μm 以上)繊維の)の長さが、肺への障害性と相関していることが、人工ガラス質繊維を用いた研究で示されている¹⁵⁾。1997年のECのガラス性繊維の有害性物質の分類、包装、表示に関する指定(EC Commission directive 97/69/EC)¹⁶⁾の中では、既述のような知見を受けて、腹腔内投与あるいは吸入試験での発がん性試験に加えて、20 μm 以上の繊維の肺からの消失半減期(吸入の場合10日、気管内投与の場合、40日より短い場合は発がん物質としての表示から除外している)を表示の基準として採用している。

以上のようにこれまで繊維状粒子と中皮腫誘発能に関しては、繊維の径と長さ、構成成分、生体内半減期等様々な因子を用いた数多くの研究がなされてきており、合成有機繊維やカーボンナノチューブ等の新しい素材の繊維性粒子に関しても、これらの知見が当てはまるかどうかについて確認の必要性が提言されていた¹⁷⁾。そこで、筆者らの研究班では、炭素原子が主成分であるが、アスベストと同様の形状を持つカーボンナノチューブについて、その形状(繊維長や径)から予想される中皮腫誘発能を検証する研究に取りかかった。

1.3.2 繊維長の長いタイプのMWCNTの腹腔内投与試験の結果

我々の研究で使用したMWCNTについて、その繊維径と長さを測定したところその大きさは、アスベストを用いて提唱された催腫瘍性を示す大きさのレンジと重なることが示された(図1)。最も懸念される暴露経路を考慮すると吸入暴露による実験が適切であると考えられるが、カーボンナノチューブは凝集しやすい性質を持っており、研究を開始した直後においては適切に分散して投与／吸入暴露を行う手法が確立していなかった。そこで、アスベストにおいて良

く検討されている実験系として、腹腔内投与による実験を先行して行うこととした。しかし、最も催腫瘍性の強いアスベストであるクロシドライトを用いた腹腔内投与研究でも、中皮腫の誘発には1年以上の期間が必要であることが知られていたため、より短期間での中皮腫の発生を検出できる動物種として、P53(+/-)ヘテロノックアウトマウスを使用することとした^{18,19)}。

P53(+/-)マウスを用いたオリジナルの手法^{18,19)}では、200 μg (5.8×10^8 fibers)を週に1回35週間腹腔内投与しているが、複数回投与による繊維長非依存的な毒性を回避するために筆者らの研究では3mg (1×10^9 fibers)/miceを単回投与で行うこととした。1回の投与量としては多いものであるが、1997年にEuropean Chemical Bureau 合同研究センターで作成されたMan Made Mineral Fibres(MMMF)試験法のドラフト案²⁰⁾では、 1×10^9 WHO fibers/ratの単回投与を標準としている他、Rollerら(1997)²¹⁾の様々な繊維粒子を腹腔内投与した際の用量(繊維数)依存性からは、 10^9 fiber/animal程度を投与すれば、様々な繊維での中皮腫の発生を捉えることが示されていることから、最初の実験としては妥当なものであると考えている。その結果、p53のヘテロノックアウトマウスに3mg/miceを腹腔内単回投与し、投与後半年までの間にほとんどのマウスに中皮腫の発生が認められた²²⁾(なお、現在解析中の投与量を1000分の一まで下げた追加試験でも、3 μg /miceの腹腔内投与で中皮腫の発生することを確認している)。筆者らとほぼ同時期に発表された別の研究では、長さの違う4種類のMWCNTを50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で腹腔内単回投与して、7日後の中皮細胞の増殖性を検証したところ、長いタイプの2種類について腹腔側に肉芽の形成を認めている²³⁾。さらに、我々が用いた長いタイプのMWCNTは、野生型のラットを用いた腹腔(陰嚢腔)内投与研究によっても、中皮腫を誘発する能力を持つことが明らかにされた²⁴⁾。一方、最近繊維長の平均が1 μm 以下の短いMWCNTを2または20mg/animalでラットに単回腹腔内投与した研究では、2年後に有意な中皮腫の発生を認めていない²⁵⁾。これらの結果は、MWCNTについてもアスベストと同様に繊維の長さに依存して中皮腫を誘発する能力に違いがあるという筆者らの仮説を支持するものである²⁶⁾。

ところで、この腹腔内等による中皮腫誘発試験に関しては、実際の暴露経路で行われたものでなく、リスク評価として検証するためには吸入暴露試験が必要であるとの意見もあるが、実験動物を用いた吸入暴露試験をリスク評価に使用する妥当性についても論議のあるところである。アスベストを用いた吸入暴露試験によるげっ歯類の発がん感受性がヒトの感受性に対して著しく低いことが知られている。これには、呼吸器や肺の病理学的形状や大きさがヒトとげっ歯類とで異なるために、ヒトの方がより長い繊維状粒子が肺胞域まで到達しやすいことによるという説もあるが、正確な原因はまだ明らかでない。つまり、げっ歯類を用いた吸入試験による結果は、ヒトに対する発がんポテンシャルを過小評価する可能性のあることが指摘されてい

る。最近になって、カーボンナノチューブを3ヶ月間まで吸入暴露した試験がいくつか報告されてきている²⁷⁻³⁰⁾が、まだ発がん性が検証できるまでの長期の吸入暴露試験結果は報告されていない。一方、吸入暴露に替わる手法としては、分散剤を用いた分散溶液を気管内投与する手法や咽頭吸引させる手法が知られているが、単回投与による一過性の急性影響等を解析したものがほとんどである。

それらの中で注目すべき研究として、最近、分散剤で分散させたMWCNT(最高80 μg まで)をマウスに吸引させた研究やMWCNT:30mg/m³を6時間マウスに単回吸入暴露した研究において、暴露後7~8週間目にMWCNTが胸膜に到達していることを確認したものが挙げられる^{31, 32)}。これらの研究結果は、高用量の暴露による短期間の結果ではあるが、呼吸器を経由した暴露においてもMWCNTは胸膜(中皮)まで到達することを示唆しており、腹腔内投与による中皮腫誘発性の証拠と合わせると、リスク評価の上でも重要な知見であると考えられる。今後の定量的なリスク評価のためには、低用量まで暴露量を設定した長期間の観察を行う研究が遂行されることが望まれる。

1.3.3 慢性影響研究の重要性

腹腔内投与による中皮腫誘発能は、繊維状粒子による催腫瘍性のみを検出する系であり、短いタイプやその他様々な形状のMWCNTにおける慢性毒性は別途検証する必要がある。実際、筆者らの行った腹腔内投与試験では、小さいサイズのナノチューブ繊維を含んだ細胞が腹膜の病変部のみならず肝類洞内又は肝葉間や腸間膜リンパ節の中にも認められ、体内に再分布することが示唆された。

繊維径としてはMWCNTより小さいSWCNTを咽頭吸引によりマウスに暴露させた実験では、一過性のマクロファージとの反応による急性症状の後に、炎症性細胞浸潤を伴わない間質の繊維化が認められている³³⁾。さらに、ApoE-/-トランスジェニックマウスを用いた実験では、大動脈ミトコンドリアのグルタチオン量、蛋白カルボニル化活性の変化を伴うミトコンドリアDNA障害が示され、アテローム性動脈硬化症の進行を増強することが示され、体循環に入り込んだSWCNTが全身影響を示す可能性が示唆されている³⁴⁾。また、マウスにMWCNT(200~400 μg)を気管内滴下した実験では、一過性の肺の炎症反応に加えて、投与量に依存した血小板の活性化と凝固作用の活性化を促進している可能性が示唆されている³⁵⁾。最近の報告では、MWCNTやSWCNTを気管内投与や経鼻投与することにより、アレルギー反応を増強することが報告されている³⁶⁻³⁸⁾。これらの結果は、カーボンナノチューブが直接体内循環に侵入することを示すものではないが、少なくとも免疫細胞との接触を通して生体内の免疫系に影響を及ぼしていることを示している。

ナノサイズとはいっても、低分子の化学物質から見ればはるかに大きな粒子であり、凝集しやすい点も考慮すれば、体内(細胞)への吸収性は化学物質ほど高いものではないと想定できる。そうかといって全く吸収されないとも言い難い粒子の大きさであることを考慮すると、細胞の食作用などの機能により、長期間にわたって少しずつ体内に吸収される一方、排泄が進まないことから、生体内安定性の高いものは場合によっては恒久的な蓄積が引き起こされると考えられる。そう考えると、蓄積作用によってもたらされる慢性的な影響が現時点で最も懸念される健康影響として想定できる。多くの点で未確定の部分が多いナノマテリアルの健康影響評価において、様々なアプローチが必要であることに異論の余地はないところである。しかし、闇雲にあらゆるエンドポイントやスクリーニング手法の検証を進めることより、回り道のようにみえるかもしれないが、想定される重要な *in vivo* 影響、特に慢性影響を同定し、その影響の発現メカニズムや検出マーカーを検索しながら評価手法を整備していくことの方が、より早く評価手法の確立に繋がるのではないかと考えている。

文 献

- 1) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Adopted during the 10th plenary 26 March 2006 after public consultation. SCENIHR 002/05 (2006).
- 2) SCENIHR, Opinion On The Appropriateness Of The Risk Assessment Methodology In Accordance With The Technical Guidance Documents For New And Existing Substances For Assessing The Risks Of Nanomaterials. Adopted during the 19th plenary 21-22 June 2007 after public consultation (2007).
- 3) FSA (Food Safety Authority of Ireland), The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in Food and Feed (2008).
- 4) COT, UK Committees on toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and the environment (COT, COM, COC). Joint statement on nanomaterial toxicology (2005).
- 5) COT, UK Committee on toxicity, of chemicals in food, consumer products and the environment. COT Addendum to joint statement of the Committees on toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of nanomaterial toxicology. COT Statement 2007/01. March 2007 (2007).
- 6) J.M. Davis, *IARC Sci Publ*, 33-45 (1989).
- 7) M.F. Stanton *et al.*, *J Natl Cancer Inst*. **67**, 965-75 (1981).

- 8) F. Pott, *Staub, Reinhaltung der Luft*, **38**, 486-490(1978).
- 9) WHO, ASBESTOS AND OTHER NATURAL MINERAL FIBRES(ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 53) (1986).
- 10) V. Timbrell, *J. Occup. Health Soc. Aust.*, **3**, 3-12(1983).
- 11) HSE, An inventory of fibres to classify their potential hazard and risk(2006).
- 12) D.M. Bernstein *et al.*, *Inhal Toxicol.*, **15**, 1247-74(2003).
- 13) WHO, Consensus report of 'IARC Scientific publication No.140' (1999).
- 14) J. Bignon *et al.*, *Environ Health Perspect.*, **102** Suppl **5**, 3-5(1994).
- 15) T.W. Hesterberg *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol.*, **151**, 262-75(1998).
- 16) EC, *Official Journal of the European Communities*, (1997).
- 17) K. Donaldson and C.L. Tran, *Mutat Res.*, **553**, 5-9(2004).
- 18) J.M. Marsella *et al.*, *Environ Health Perspect.*, **105** Suppl **5**, 1069-72(1997).
- 19) C.A. Vaslet *et al.*, *Toxicol Sci.*, **68**, 331-8(2002).
- 20) ECB, METHODS FOR THE DETERMINATION OF THE HAZARDOUS PROPERTIES FOR HUMAN HEALTH OF MAN MADE MINERAL FIBRES(MMMF) (1999).
- 21) M. Roller *et al.*, *Environ Health Perspect.*, **105** Suppl **5**, 1253-6(1997).
- 22) A. Takagi *et al.*, *J Toxicol Sci.*, **33**, 105-16(2008).
- 23) C.A. Poland *et al.*, *Nat Nanotechnol.*, **3**, 423-8(2008).
- 24) Y. Sakamoto *et al.*, *J Toxicol Sci.*, **34**, 65-76(2009).
- 25) J. Muller *et al.*, *Toxicol Sci.*, **110**, 442-8(2009).
- 26) A.B. Kane and R.H. Hurt, *Nat Nanotechnol.*, **3**, 378-9(2008).
- 27) L. Ma-Hock *et al.*, *Toxicol Sci.*, **112**, 468-81(2009).
- 28) J. Pauluhn, *Toxicol Sci.*, **113**, 226-42
- 29) H. Ellinger-Ziegelbauer and J. Pauluhn, *Toxicology.*, **266**, 16-29(2009).
- 30) J.G. Li *et al.*, *J Nanosci Nanotechnol.*, **9**, 1384-7(2009).
- 31) D.W. Porter *et al.*, *Toxicology*, (2009).
- 32) J.P. Ryman-Rasmussen *et al.*, *Nat Nanotechnol.*, **4**, 747-51(2009).
- 33) A.A. Shvedova *et al.*, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.*, **289**, L698-708(2005).
- 34) Z. Li *et al.*, *Environmental health perspectives.*, **115**, 377-382(2007).
- 35) A. Nemmar *et al.*, *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.*, **5**, 1217-1226(2007).
- 36) E.J. Park *et al.*, *Toxicology.*, **259**, 113-21(2009).
- 37) U.C. Nygaard *et al.*, *Toxicol Sci.*, **109**, 113-23(2009).
- 38) K. Inoue *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol.*, **237**, 306-16(2009).

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 leucocytes 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,

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

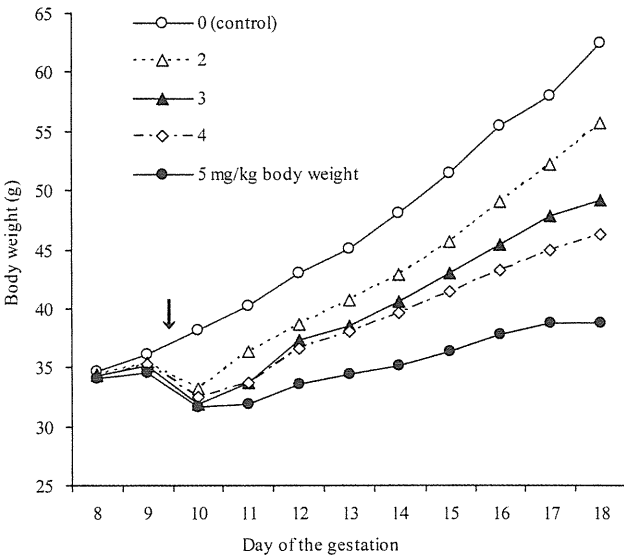


Fig. 1. Experiment 1; changes of the maternal body weights. The arrow represents the timing of the intraperitoneal administration of MWCNT.

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 (10 ² /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).