

多層カーボンナノチューブ
C
[CAS No. 308068-56-6]
許容濃度 吸入性粉じん0.010 mg/m³
(無機炭素として)
生殖毒性分類 第3群

カーボンナノチューブは、炭素によって構成されている六員環ネットワークを丸めて円筒状にした同軸管状の物質で、1層(単層)のものを単層カーボンナノチューブ(SWCNT)、多層のものを多層カーボンナノチューブ(MWCNT)がある。ここでは、単層カーボンナノチューブは、生体影響に関するデータが少ないため本対象から除外する。許容濃度と生殖毒性分類の対象となるのは、同軸管の径が1-100 nmの範囲にある多層カーボンナノチューブである。

1. 物理化学的性質・用途

カーボンナノチューブは、常温にて固体であり、粒子として挙動する。高電流密度耐性、高熱伝導特性、高機械強度など様々な優れた特性を有しており、将来的には半導体、燃料電池、光学機器など様々な用途に使用されることが期待されている。

2. 体内動態(吸収, 代謝, 分布, 蓄積, 排泄)

作業環境・作業状況から考えて、労働者は主に経気道的に曝露される。よって、気管内注入試験や吸入曝露試験による肺内滞留性や臓器移行に関する報告を以下に示す。肺内滞留性に関しては、MWCNTは、肺内滞留性が高い^{1,2)}が、短い繊維やカール状の形状をもつ繊維は、滞留性が低い傾向にある^{3,4)}。

雌雄のSDラットにMWCNT(Sun Innovation製1020 long multiwalled carbon nanotube: 名目径10-20 nm 名目長さ10-30 μm, TEMにて計測した平均径15.3 nm(範囲: 6.1-26.7 nm), SEMにて計測した平均長さ2.6 μm(範囲: 0.6-7.4 μm))を0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/m³にて30日間(6時間/日, 5日/週)の全身吸入曝露を行い、肺内滞留性を調べた¹⁾(NTP)。0.1, 0.3 mg/m³にて半減期は、ラットの雄で52日、雌で64日、マウスの雄、雌ではそれぞれ47日と96日であった。1または3 mg/m³にて半減期は、徐々に進行性に遅延し、10 mg/m³にてラットの雄で465日、雌で583日、マウスの雄、雌ではそれぞれ337日と649日となった。筆者らは、3と10 mg/m³にてカーボンナノチューブのoverloadによる遅延と考えた。

雄性WistarラットにMWCNT(Nikkiso製、比表面積69±37 m²/g、幾何平均径48 nm 幾何平均長さ2.5 μm) 0, 0.2 mg, 0.55 mgを気管内注入し1日後から最大364日後まで肺内沈着量を測定し、MWCNTの肺からのクリアラ

ンスを検討した。両用量においても、最初の24時間で、ほぼ30%除去したが、その後364日後まで、肺内の沈着量はほとんど変わらなかった²⁾。

Wistar雄性ラットにMWCNT(一次粒径44 nm, 比表面積69 m²/g, バンドルの長さ0.7 μm, バンドルの径0.2 μm 短い繊維で7割の繊維はほぼ単離状態)を0, 0.37 mg/m³の濃度で4週間(6時間/日, 5日/週)の吸入曝露を行い、観察期間を3日後から最大3か月設けてMWCNTの滞留性を検討した。X線回折では、51日、無機炭素解析では54日であった。これらの繊維は比較的短い繊維が多かった³⁾。

直線上ではなくカールして絡んだようなMWCNT(径5-10 nm, 凝集した繊維の幾何平均長さ37.4 μm, 幾何平均径2.73 μm)を雄性SDラットに28日間(6時間/日, 5日/週, 4週間)吸入曝露試験(0, 0.257, 1.439, 4.253 mg/m³)を行い、観察期間最大28日後までおき、肺内滞留性を検討した。高用量群でのMWCNTの半減期は、35日間であった⁴⁾。

臓器移行に関しては、MWCNTでは様々な臓器で繊維状物質の沈着が認められているが、臓器障害に関する報告はない⁵⁻⁷⁾。

B6C3F1/NマウスにMWCNT(Sun Innovation製: 平均径15 nm, 長さ推測値2.6 μm)を0, 0.06, 0.2, 0.6 mg/m³にて30日間(6時間/日, 5日/週)の全身吸入曝露を行い、曝露終了後10日間の観察期間において肺やその他の臓器における繊維の蓄積を調べた⁵⁾。肺のみならず、脾臓、リンパ節(縦隔, 気道)、嗅球に用量依存性の沈着を認めたが、代謝臓器である肝臓や腎臓には認められなかった。

C57BL/6マウスにMWCNT(保土谷化学工業製造のMWNT-7: 金属不純物1.32%(Fe 1.06%), 空気力学的直径(mass mode): 1.5 μm) 5 mg/m³を12日間(1日5時間)の吸入曝露を行い、曝露終了後1日後、336日後に臓器への沈着を観察した⁶⁾。肺以外の沈着は1日後も336日後にて、気管支リンパ節(縦隔リンパ節)の沈着が一番多く、肝臓、腎臓、心臓、脳、胸郭、横隔膜にも沈着が認められた。肺内に沈着した約54%は、凝集しているが、他臓器の横隔膜、胸郭、肝臓、腎臓、心臓や脳では、ほとんど単離していた。

3. ヒトに対する影響

1) 非発がん性

米国、ロシアの横断的研究で、MWCNTの曝露と血液、鼻腔洗浄、誘発喀痰のサイトカインの産生、肺機能検査との関連が報告されている⁷⁻⁹⁾が、画像や病理などの疾患の診断と曝露に関する報告はない。

2) 発がん性

・調査した範囲内では、報告は得られていない。

4. 動物に対する影響

1) 慢性影響 (発がん性以外)

吸入曝露試験や気管内注入試験が行われており、肺に炎症や線維化が持続していることが報告されている^{1, 4, 10-23}。ただし、短い繊維に関しては、炎症・線維化が長い繊維よりも弱く、一時的であることも報告されている^{12, 13, 18}。

MWCNTの気管内注入試験に関しては、F344雄性ラットにMWCNT (保土谷化学工業製造のMWNT-7: 構成成分 Fe 4,400 ppm, Cr 48 ppm Ni 17 ppm 平均長さ 5.0 μm (5.0 μm 以上の繊維 38.9%), 平均径 88 nm,) 0, 40, 160 $\mu\text{g}/\text{rat}$ と結晶質シリカ (α -quartz) 160 $\mu\text{g}/\text{rat}$ を気管内注入し、注入1日後から最大91日後の観察期間において肺の炎症や線維化を検討した (一群8匹)¹⁰。肺の炎症において、マクロファージの浸潤では、観察期間中最大でも軽微な浸潤ではあったが、MWCNTは28日後の1例を除いて全例で著しい浸潤であった。microgranulomaは、結晶質シリカでは認められなかったが、MWCNTでは28日、91日後に5/8匹に中等度の所見を認めた。線維化に関しても結晶質シリカは、観察期間をとおして最大でも軽度の線維化であったが、MWCNTでは、91日では全例が中等度の線維化であった。

C57BL/6J 雄性マウスにMWCNT (保土谷化学工業製造のMWNT-7: 比表面積 26 m^2/g 、長さの中央値 3.86 μm 、粒子数中央径 $49 \pm 13.4 \text{ nm}$) 0, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mice}$ を咽頭吸引させ、1日から最大56日まで観察期間において肺の病理所見を検討した¹¹。線維性の肉芽腫性変化、肺胞腔の線維化による肥厚を時間依存性に認めた。

CD 雄性ラットに比較的短繊維の単分離したMWCNT (保土谷化学工業製造のMWNT-7: 径約 60 nm、長さ約 1.5 μm (10 μm 以上の繊維はカール状に曲がった繊維) 0, 0.04, 0.2, 1 mg/kg を気管内注入 (陽性対照 結晶質シリカ 5 mg/kg) して、最大6か月の観察期間をおき、肺の炎症を評価した¹²。MWCNT注入により、肺に炎症細胞浸潤が認められるが、一過性であった。一方、結晶質シリカは、持続性の炎症細胞浸潤を認めた。MWNT-7も短線維化すると炎症の消失傾向であった。

Wistar 系雄性ラットにMWCNT (Nikkiso 製: Bulk 幾何平均径 44 nm (GST 1.3)、比表面積 69 m^2/g 、懸濁液中幾何平均径 48 nm、幾何平均長さ 0.94 μm 、単離した短繊維) にて0, 0.2, 1 mg/rat の気管内注入を行い、最大6か月の観察期間にて肺炎を調べた¹³。気管支肺胞洗浄液中や肺病理の解析結果にて、BALFには好中球浸潤を2相性 (3日と1か月) に認め、好中球ケモカイン CINC-1 や好中球の酵素であるミエロペルオキシダーゼ活性亢進を持続的に認めた。

9 週齢の Wistar 系雄性ラットに短い MWCNT (径 60–100 nm、算術的平均長さ 1.81 μm) を 0, 0.15, 1.5

mg/kg 気管内注入し観察期間最大90日間にて BALF 細胞解析と肺病理学的検討を行った¹⁴。90日間にわたり肺や胸膜に持続的肺炎を誘発したが、胸膜炎が強い傾向にあった。

MWNT-7を含む7種類のMWCNTを雄性C57BL/6マウスに0, 40 μg 咽頭吸引させ84日後の肺病理組織を評価した。7種類のMWCNTの幾何形状は、MW1 (幾何平均径 13 nm、幾何平均長さ 0.67 μm)、MW2 (幾何平均径 14 nm、幾何平均長さ 1.34 μm)、MW3 (幾何平均径 20 nm、幾何平均長さ 1.1 μm)、MW4 (幾何平均径 19 nm、幾何平均長さ 1.41 μm)、MW5 (MWNT-7) (幾何平均径 63 nm、幾何平均長さ 4.39 μm)、MW6 (幾何平均径 28 nm、幾何平均長さ 2.05 μm)、MW7 (幾何平均径 37 nm、幾何平均長さ 2.88 μm) であった。異なる幾何形状ではあったが、いずれのMWCNTにおいても、肉芽腫性炎症、気管支細気管支の線維化、肺胞間質の線維化は、陰性対照と比較して有意に認められた^{15, 16}。

MWCNTの吸入曝露試験においては、B6C3F1/N マウスにMWCNT (Sun Innovation 製: 平均径 15 nm、長さ推測値 2.6 μm) を 0, 0.06, 0.2, 0.6 mg/m^3 にて30日間 (6時間/日、5日/週) の全身吸入曝露を行い、曝露終了後10日間の観察期間において肺の病変を調べた⁵。BALFの炎症性サイトカイン (IL-1B, IL-6, TNF α) 濃度の増加はあるが、炎症所見は認められなかった。

Wistar 系雄性ラットにMWCNT (Nikkiso 製: Bulk 幾何平均径 44 nm (GST 1.3)、比表面積 69 m^2/g 、懸濁液中幾何平均径 48 nm、幾何平均長さ 0.94 μm 、気相中幾何平均径 63 nm、幾何平均長さ 1.1 μm 70%以上は単離した繊維) にて0, 0.37 mg/m^3 にて4週間の吸入曝露を行い、最大3か月の観察期間を設けて肺炎を調べた¹³。気管支肺胞洗浄液中や肺病理の解析結果にて、BALFには好中球ケモカインの増加は認めるも有意な好中球などの炎症細胞浸潤を認めなかった。

直線上ではなくカールして絡んだようなMWCNT (径 5–10 nm、凝集した繊維の幾何平均長さ 37.4 μm 、幾何平均径 2.73 μm) を雄性SDラットに28日間 (6時間/日、5日間/週、4週間) 吸入曝露試験 (0, 0.257, 1.439, 4.253 mg/m^3) を行い、観察期間最大28日後までおき、肺内炎症を検討した⁴ (Kim JK 2019)。BALFの好中球数の増加を中濃度以上で増加、高濃度でBALFのLDH活性の増加を認めた。低濃度である0.257 mg/m^3 がNOAELであることを提案している。

雌雄のSDラットにMWCNT (Sun Innovation 製 1020 long multiwalled carbon nanotube: 名目径 10–20 nm 名目長さ 1,030 μm 、TEMにて計測した平均径 15.3 nm (6.1–26.7 nm)、SEMにて計測した平均長さ 2.6 μm (0.6–7.4 μm)) を 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/m^3 にて30日間 (6時間/日、5日/週) の全身吸入曝露を行い、病理学

表 1. 104週間の MWNT-7吸入ばく露試験による肺の非腫瘍病理所見 (匹数)

肺の病理所見	雄: 50匹中の匹数 曝露濃度 (mg/m ³)				雌: 50匹中の匹数 曝露濃度 (mg/m ³)			
	0	0.02	0.2	2	0	0.02	0.2	2
細気管支・肺胞上皮過形成	2	6	13*	22**	3	3	8	12*
異型過形成	0	0	0	10**	0	0	0	14**
肺胞上皮過形成	0	2	13**	41**	1	1	6	41**
細気管支上皮過形成	0	0	4	8**	0	0	4	26**
肺胞マクロファージの集簇	2	7	5	48**	2	6	9	48**
限局性線維化: 肺胞壁	0	2	43**	48**	0	3	44**	49**
肉芽腫性変化	0	5	42**	50**	0	3	45**	50**

*: $p < .05$ vs 非曝露群, **: $p < .01$ vs 非曝露群

的検討を行った¹⁾(NTP). 肺の慢性炎症に関して, ラット, マウスの雌雄とも1, 3, 10 mg/m³にて有意に増加, 肺胞上皮細胞の過形成では, ラットにおいて半減期は, 1 mg/m³では, 雄3匹, 雌2匹, 3および10 mg/m³にて雌雄ともすべての個体に認めた. 細気管支上皮細胞の過形成では, マウスの3および10 mg/m³のみ認められ, 陰性対照群と比較して, 有意な増加を示した. 筆者らは, 0.3 mg/m³を NOAEL として提案した.

雄性 Wistar ラットに MWCNT (Baytube 社製: コバルトの含有率0.53%, 平均径 10–16 nm 平均長さが 200–300 nm) と金属を除去した MWCNT (Baytube 社製: コバルトの含有率0.12%) の吸入曝露を行い, 肺炎症の差異を検討した^{17,18)}. Baytubes を0, 11, 241 mg/m³, 金属を除去した Baytube を 11 mg/m³, 陽性対照として結晶質シリカ 241 mg/m³を6時間鼻部吸入曝露し, 観察期間を3か月間おいた. 気管支肺胞洗浄液の細胞やサイトカインの解析の結果, Baytubes は用量依存性に肺炎症が増加したが, 時間とともに減少した. 炎症の時間的变化は, 金属を除去した Baytube は, Baytube と差異は認めなかったが, 陽性対照の結晶質シリカは時間とともに炎症は増強した. 著者らは, カーボンナノチューブの肺炎症には, 金属不純物ではなく, チューブの構造が関与していることを示唆した.

雌雄の F344ラットに MWCNT (保土谷化学工業製造の MWNT-7: 空気動学的平均径 (GSD): 1.4–1.6 μm (2.3–3.0), 平均径 94.1–98 nm 平均長さ 5.53–6.19 μm) を0, 0.2, 1, 5 mg/m³にて13週間 (6時間/日, 5日/週) の全身吸入曝露を行い, 肺の炎症と線維化を調べた¹⁹⁾. 気管支肺胞洗浄液から雌雄とも 0.2 mg/m³から炎症反応を用量依存性に認め, 肺組織における肉芽腫性変化が雌では 1 mg/m³以上で, 雄は, 0.2 mg/m³で認めた. 肺の線維化に関しては, 肺胞壁の局所的な線維化が雌雄とも 1 mg/m³以上で認められた.

Wistar ラットに MWCNT (Baytube 社製: 径 10 nm レベルの範囲, 中位長さが 200–300 nm の範囲) を0, 0.1, 0.4, 1.5, 6.0 mg/m³にて13週間 (6時間/日, 5日/週) の鼻部吸入曝露を行い, 曝露終了後26週間の観察期間を設け, 肺の炎症と線維化を調べた²⁰⁾. 気管支肺胞洗浄液による好中球浸潤は, 0.4 mg/m³から有意な増加を認めた. 病理所見において肺胞や間質の肥厚が 0.4 mg/m³以上にて曝露終了後から認められ, 観察期間をとおして重症度が増加した. 胸膜の肥厚は 6.0 mg/m³にて, 末梢気道のコラーゲンの沈着も 1.5 mg/m³にて観察期間をとおして改善する傾向は認められなかった. 肉芽腫性炎症は, 時間依存性に増加し, 6.0 mg/m³にて認められた.

Wistar ラットに MWCNT (Nanocyl 社製 NC 7000: 成分90%が炭素, 10%金属酸化物, 径5–15 nm, 長さ0.1–10 μm) を0, 0.1, 0.5, 2.5 mg/m³にて13週間 (6時間/日, 5日/週) の鼻部吸入曝露を行い, 肺の炎症と線維化を調べた²¹⁾. 肺の病理所見において多発性の好中球主体の肉芽腫性炎症や肺胞蛋白症様の病変を0.5 mg/m³以上にて認められた. 著者らは, 0.1 mg/m³でもごくわずかではあるが, 肉芽腫様炎症を認めたことから, NOAEL は提案出来ないとした.

雌雄 Wistar ラットに MWCNT (Graphistrength 社製 C100 MWCNT: 平均径 11–12 nm, 平均長さ およそ 1 μm) を0, 0.05, 0.25, 5 mg/m³にて90日間 (6時間/日, 5日/週) の鼻部吸入曝露を行い, 最大90日間の観察期間において, 肺の炎症を調べた²²⁾. 曝露直後 (24時間後) では, 0.25, 5 mg/m³にて BALF の好中球数が増加し, マクロファージが減少し, 90日後では 5 mg/m³でも認め, 炎症細胞が継続して浸潤した. 間質におけるコラーゲンの沈着は 5 mg/m³で認められた.

雌雄の F344ラットに MWCNT (保土谷化学工業製造の MWNT-7: 長さ 1–19 μm, 径 70–170 nm) を0, 0.02, 0.2, 2 mg/m³にて104週間 (6時間/日, 5日/週) の全身吸

表 2. 104週間の MWNT-7吸入ばく露試験による肺病理所見（腫瘍発生の匹数）

肺の病理所見	雄：50匹中の匹数 曝露濃度 (mg/m ³)				雌：50匹中の匹数 曝露濃度 (mg/m ³)			
	0	0.02	0.2	2	0	0.02	0.2	2
細気管支・肺胞上皮がん	1	1	8*	10**	0	1	0	5**
腺扁平上皮がん	0	0	0	1	0	0	0	1
低分化腺がん	0	0	0	0	0	0	0	1
扁平上皮がん	0	0	0	0	0	0	0	1
すべての肺がん	1	1	8*	11**	0	1	0	8**
細気管支・肺胞腺腫	1	1	7*	5	3	1	4	3
すべての肺がんと腺腫	2	2	13**	16**	3	2	4	11*

* : $p < .05$ vs 非曝露群, ** : $p < .01$ vs 非曝露群

入曝露を行い、病理学的検討（線維化）を行った²³⁾。一群は雌雄とも50匹ずつであった。肺胞壁の局所的な線維化の雄の発生率は、0 mg/m³ 0% (0/50), 0.02 mg/m³ 4% (2/50), 0.2 mg/m³ 86% (43/50), 2 mg/m³ 96% (48/50) であり、0.2 mg/m³ より有意な発生率の増加を認めた。雌に関しては、0 mg/m³ 0% (0/50), 0.02 mg/m³ 6% (3/50), 0.2 mg/m³ 88% (44/50), 2 mg/m³ 96% (49/50) であった。肺の肉芽腫性変化の雄の発生率は、0 mg/m³ 0% (0/50), 0.02 mg/m³ 10% (5/50), 0.2 mg/m³ 84% (42/50), 2 mg/m³ 100% (50/50) であり、雌に関しては、0 mg/m³ 0% (0/50), 0.02 mg/m³ 6% (3/50), 0.2 mg/m³ 90% (45/50), 2 mg/m³ 100% (50/50) であった。いずれの線維化でも0.2 mg/m³ より有意な発生率の増加を認め、肺の線維化のNOAELは、0.02 mg/m³ と考える。

2) 発がん性

MWCNTでは、2年間の吸入曝露試験で、肺腫瘍の発生を認め²³⁾、2段階発がんモデル試験（MWCNTの吸入曝露試験）において肺腫瘍の増強作用を認め²⁴⁾。気管内注入試験³³⁾や腹腔内注入試験³¹⁾では、中皮腫の発生を認めている。

雌雄のF344ラットにMWCNT（保土谷化学工業製造のMWNT-7：長さ1–19 μm, 径70–170 nm）を0, 0.02, 0.2, 2 mg/m³にて104週間（6時間/日, 5日/週）の全身吸入曝露を行い、病理学的検討を行った²³⁾。一群は雌雄とも50匹ずつであった。雄では、肺腫瘍（腺腫と肺がん）発生率は、0 mg/m³ 4% (2/50), 0.02 mg/m³ 4% (2/50), 0.2 mg/m³ 26% (13/50), 2 mg/m³ 32% (16/50) であり、0.2 mg/m³ より有意な発生率の増加を認めた。雌に関しては、0 mg/m³ 6% (3/50), 0.02 mg/m³ 4% (2/50), 0.2 mg/m³ 8% (4/50), 2 mg/m³ 22% (11/50) であり、2 mg/m³ より有意な発生率の増加を認めた。雌雄とも有意な中皮腫の発生は認めなかった。以上より肺腫瘍発生のNOAELは0.02 mg/m³ と考える。

2段階発がんモデルの試験である。B6C3F1マウスに発がんイニシエーターである3-メチルコラントレンを腹腔内注入後、MWCNT（保土谷化学工業製造のMWNT-7：長さ1–19 μm, 径70–170 nm）0.5 mg/m³で15日間（5時間/日, 5日/週）吸入曝露を行い、17か月の観察期間後に、肺腫瘍の検討を行った²⁴⁾。気管支肺胞腺腫や腺がんを含めた肺腫瘍の総発生率は、陰性対照群23.2%, 3-メチルコラントレン曝露群51.9%, MWCNT曝露群26.5%, 3-メチルコラントレンとMWCNT曝露群90.5%であった。イニシエーターである3-メチルコラントレンを曝露した群よりもMWCNTと3-メチルコラントレンを複合曝露した群で有意に発生率が増加した。

Wistar系雄性ラットに4種類のMWCNT（繊維A：ベンゼンを炭素源とした昇華法にて生成、中位径85 nm, 中位長さ8.57 μm 比較的太い繊維、繊維B：サイクロヘキサンを炭素源としたエアロゾル法にて生成、中位径62 nm, 中位長さ9.3 μm 比較的太い繊維、繊維C：サイクロヘキサンを炭素源としたエアロゾル法にて生成、中位径40 nm, 中位長さ10.24 μm, 細くて長い繊維、繊維D：アセトニトリルを炭素源としたエアロゾル法にて生成、中位径37 nm, 中位長さ7.91 μm 細くて中くらいの長さの繊維）を0, 10⁹, 5×10⁹ WHO fiber, 陽性対照としてアモサイト（石綿）10⁸ WHO fiberを腹腔内注入し、2年後に免疫染色を含む病理組織検査を行い、腹腔内腫瘍の発生率を検討した²⁵⁾。4種類すべてのMWCNTに、多少の差はあれ、高率に中皮腫を発生（繊維A：低用量（98% (49/50)）高用量（90% (40/50)）、繊維B：低用量（92% (46/50)）高用量（90% (40/50)）、繊維C：低用量（84% (42/50)）高用量（94% (47/50)）、繊維D：低用量（40% (20/50)）高用量（70% (35/50)））した。またアモサイトによる中皮腫の発生率は66% (33/50) であった。

F344系雄性ラットにMWNT-7をスプレー式チューブに

よる気管内注入 (0, 0.125, 0.5 mg/kg) を4週間連続で注入して最大104週間の観察期間にて呼吸器腫瘍の検討を行った²⁶⁾。26週間や52週間では胸膜中皮腫は認められなかったが、104週間では、すべての低用量、高用量のラットに肺の線維化を来しており、胸膜中皮腫の発生率が低用量では35% (9/26)、高用量でも71% (17/24) に有意に増加した。

3) 生殖毒性

生殖毒性に関して、ヒトに関する報告はないが、複数の動物試験において生殖毒性が認められることが報告されている²⁷⁻³¹⁾。但し、カーボンナノチューブは難溶性であること、曝露用量などの研究デザインが十分でないこと (非生理的な投与方法) からこれらの所見は、限定的な所見と考える。

ICR 雌性マウスの妊娠9日にMWCNT (MWNT-7) 0, 2, 3, 4, 5 mg/kg を腹腔内投与し、催奇形性を検討した。2, 3, 4 mg/kg では胎児の体重減少がみられ、4, 5 mg/kg では早期吸収胚が増加し、生存胎児数が減少した²⁷⁾。また、いずれの用量においても、種々の外表奇形や骨格奇形を認めた。それぞれの奇形の発生数は少なかったが、奇形胎児を有する母動物の割合、奇形の発生率および奇形胎児の割合は投与用量に対応して増加した。同マウスにMWCNT3,4,5 mg/kg を気管内注入し同様に催奇形性を検討した。3 mg/kg では異常を認めなかったが、4, 5 mg/kg では、種々の外表奇形や骨格奇形を認め、奇形胎児を有する母動物の割合、奇形の発生率および奇形胎児の割合が増加した²⁷⁾。

NMRI 雌性マウスの交配時、妊娠3日にMWCNT (比表面積 270 m²/g, 長さ 10 μm, 径 30 nm, 熱伝導率 1,500 w/mv, テヘランの研究所で製造) 0, 1, 10 mg/kg を腹腔内投与し、評価を行った。MWCNT 曝露により、児動物で高架式十字迷路でのオープンアーム滞在時間の減少 (クローズドアーム滞在の増加) と強制水泳試験での水泳時間の減少 (浮遊時間の増加) が示された。また、胸腺などの絶対臓器重量も減少し、1 mg 曝露群では、肝臓や脾臓の絶対臓器重量も減少した²⁸⁾。

Kunming 雌性マウス (Lanzhou 大学にて生産) の妊娠17日に、テクネシウムでラベルした酸化MWCNT (Shenzhen Nanotech Port 社製造: 長さが 1-2 mm, 径は 10-30 nm, 純度96%以上を硝酸処理) 0, 20 mg/kg.b.w. を静脈内投与して母動物から胎児への移行を調べた²⁹⁾。投与1時間後に胎盤での濃度が高くなったが、羊水と胎児では低かった。6時間後に胎盤と胎児で濃度がピークになり、その後羊水での蓄積が増加した。以上より、酸化MWCNTが、母動物から児動物に移行したことを認めた。また、酸化MWCNT 20 mg/kg.b.w. の妊娠7日の静脈内投与では、胚吸収率が増加した。さらに、MWCNT 20 mg/kg.b.w. の妊娠4, 11, 15日、あるいはMWCNT4, 20,

30 mg/kg.b.w. の妊娠11日の静脈内投与では、投与の用量と時期に対応して母動物の血清中のプロゲステロン濃度の減少、エストラジオール濃度が増加した。C57BL/6J 雌性マウスはMWCNT (NM-400; Nanocyl-Belgium 比表面積 298 m²/g, サブミクロンの長くカールした繊維を含んでおり、平均径 10 nm 平均長さ 295 nm) 67 μg の気管内投与前後の14日間、性周期を評価するために膣垢像を調べた³⁰⁾。MWCNT の投与前と比較して、投与時中の性周期は有意に延長し、投与終了後は短縮した。また、同MWCNT 0, 2, 18, 67 μg を気管内投与し、児動物の影響を観察した。同腹児の分娩までの時間、同腹児数、性比、着床数、着床の損失など児動物に対する影響は認められなかった。

BALB/c 雄性マウスにMWCNT (US Research Nanomaterial 社製 純度95%以上, 外径 20-30 nm) を0, 10, 50 mg/kg/日を5週間経口投与し、生殖能と酸化ストレスを検討した³¹⁾。生殖能に関しては、精巣上体における相対重量、精子の生存率、前進運動能、精子の生存性 (精子膨化試験)、精子数、ミトコンドリアの脱水素酵素活性、ATP 産生量の低下、精子ミトコンドリアの脱分極、異常精子の割合の増加、精巣の病理組織形態学的異常を認めた。酸化ストレスでは、両CNTにより精巣および精巣上体における総酸化能、GSH/GSSH 比の低下、精巣及び精子のTBARS 含有量、タンパク質のカルボニル化、ROS、酸化型グルタチオンレベルの亢進を認めた。CNTによる酸化ストレスの亢進が、生殖臓器の障害や精巣毒性につながったことを示唆した。

5. 遺伝毒性

In vitro 試験にてDNA鎖切断などの遺伝子損傷、小核、染色体異常などが報告³²⁻⁴¹⁾されており、複数の陽性結果が報告されている (表3)。*In vivo* 試験においても、MWCNTの結果でDNA鎖切断や小核試験が陽性であった^{38, 40, 43)} (表3)。以上の結果からCNTとしては、遺伝毒性を有することが考えられる。但し、この遺伝毒性は、酸化ストレスを介して生じることも報告されており⁴⁴⁾、二次的な遺伝毒性であることも考えられる。

MWCNT (径 5-20 nm, 長さ 300-2,000 nm) に関しても、0, 10, 50 μg/mL をヒトの肺胞上皮細胞株 (A549細胞) を加え24時間後に小核形成を認めている。抗酸化剤であるdimethylthiourea (DMTU) またはN-acetylcystein (NAC) を加えると小核形成が低下する⁴⁴⁾。

6. 許容濃度の提案

ヒトの横断的研究におけるカーボンナノチューブ取り扱い作業員において呼吸器疾患の発生とCNTの曝露量との関連を示した報告はなかった。

動物試験において、製造が中止されているMWNT-7以

表 3. MWCNT の遺伝毒性試験結果

試験方法	使用細胞種/動物種・S9の有無・濃度/用量*	結果	
In vitro	復帰突然変異試験	MWCNT (Buytubes): TA98, TA100, TA102, TA 1535, TA 1537: S9mix (-) (+) 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	- 32
		MWCNT (Sigma Aldrich): TA98, TA100, S9mix (-) (+) 9 $\mu\text{g}/\text{plate}$	- 33
		MWNT-7: TA98, TA100, TA 1535, TA 1537, WP2uvrA: S9mix (-) (+)	- 34
	染色体異常試験	MWCNT (Buytubes): Chinese hamster lung fibroblast: S9mix (-) (+) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	- 32
		MWCNT: Chinese hamster lung fibroblast 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+ 35
	小核試験	MWCNT; A549 cell, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	
		NM-401 長さ 4 μm ROS (+)	+ 36
		NM-402 長さ 1 μm ROS (+)	- 36
		MWCNT; BEAS-2B cell, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	+ 37
		NM-401 長さ 4 μm	
		MWCNT : A549 cells	+ 38
	姉妹染色分体交換試験	MWCNT : CHO cells	+ 38
		DNA 鎖切断試験	ヒト気道上皮細胞 (BEAS-2B) : MWCNT 5, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
	A549細胞 : 長い繊維 MWCNT	+ 41	
In vivo	DNA 鎖切断試験 コメットアッセイ	MWCNT : 気管内注入 ICR マウス (0.05, 0.2 mg/mice) 肺組織	+ 38
		直線的な MWCNT : C57BL/6マウス (1-200 $\mu\text{g}/\text{mice}$) Aspiration 24時間後肺組織	+ 40
		NM401*, MWNT-7: Muta マウス (<i>lacZ</i>) 気管内注入90日後の肺組織	- 42
	小核試験	MWNT-7: ICR mice erythrocyte	- 34
		NM-401* : Female Wistar Rat 気管内注入試験 (0.5, 2 mg) 3日後 II型肺胞上皮細胞	+ 43
		直線的な MWCNT C57BL/6mice	+ 40
	吸入曝露 (8.2-10.8 mg/m ³) 4日間 (4時間/日) erythrocyte		

- : 陰性 + : 陽性 NM401* : IO-LE-TEC Nanomaterials 製の MWCNT
平均径 64, 67 nm, 平均長さ 4, 4.05 μm

表 4. MWCNT の吸入曝露試験の NOEL, LOEL の比較

CNT	MWCNT(Baytube)	MWCNT(Nanocyl社 NC7000)	MWCNT(Graphistren社 C100)	MWNT-7	MWNT-7
物理化学的特性	径10nm レベルの範囲 中位長さ 200-300 nm の範囲	径5-15 nm 長さ 0.1-10 μm	平均径 11-12 nm 平均長さ およそ1 μm	MMAD 1.4-1.6 μm 平均径 94.1-98nm 平均長さ 5.53-6.19 μm	同左
曝露期間	13週間	13週間	90日間	13週間	104週間
濃度(mg/m ³)	0, 0.1, 0.4, 1.5, 6	0, 0.1, 0.5, 2.5	0, 0.05, 0.25, 5	0, 0.2, 1, 5	0, 0.02, 0.2, 2
NOEL	0.1 mg/m ³		0.05 mg/m ³		0.02 mg/m ³
LOEL LOEL相当		0.1 mg/m ³ わずかに肉芽腫性炎症		0.2 mg/m ³	
Ref	Pauluhn 2010	Ma-Hock et al. 2009	Pothmann et al. 2015	Kasai et al. 2015	Kasai et al. 2016

外のMWCNTの吸入曝露試験にて、亜慢性の影響を評価した90日²²⁾または13週間^{20, 21)}のMWCNTの吸入曝露試験では、0.1 mg/m³では肺炎は認められない(表4)。または認められてもごく軽度であることが報告されているが、0.05 mg/m³では肺炎等は認められなかった。従って、これらの試験を総合的に勘案すると、亜慢性吸入曝露試験によるNOAELは、0.05 mg/m³と考える。

Workshop report (ILSI2000)⁴⁵⁾に基づいて種差の不確実係数を3とし、さらに亜慢性から慢性への不確実係数2であることから、この不確実係数でNOAEL 0.05 mg/m³を除することにより、0.0083 mg/m³となる。以上のことから許容濃度を0.01 mg/m³と提案する。

一方、現在、製造されていないMWNT-7では、発がん性試験まで実施されており、雌雄のラットにて発がん性試験(104週間吸入曝露)では、雌雄とも有意な肺腫瘍の発生率の増加のなく、線維化の増加もない濃度が0.02 mg/m³であった²³⁾。仮にこれをNOAELとしても、上述の亜慢性試験からのNOAEL 0.05 mg/m³に、期間(亜慢性から慢性)の不確実係数2で除した濃度は0.025 mg/m³であることから、どちらの数値から許容濃度を算出しても、差異はないと考える。従って、製造されているMWCNTから算出した0.01 mg/m³を許容濃度として提案する。

生殖毒性に関して、ヒトに関する報告はないが、複数の動物試験において生殖毒性が認められることが報告されている²⁷⁻³¹⁾。但し、カーボンナノチューブは難溶性であること、曝露用量などの研究デザインが十分でないことから、限定的な所見と考え、第3群とした。

7. 他機関の提案値

曝露限界値関連

ENRHES (欧州): 0.2 or 0.034 mg/m³: 14日間の多層カーボンナノチューブのマウス吸入曝露試験によるエンドポイントを肺影響として設定した。(2010)

NIOSH: 0.001 mg/m³ (REL): 90日間の多層カーボンナノチューブ(Nanocyl社, Bayern社)のラット吸入曝露試験によるエンドポイントを肺へ影響として設定した。(2013)。

ECHA (欧州化学品庁): 0.0335 mg/m³ (DNEL 導出無影響量) (2010)

8. 勧告の履歴

なし

文 献

- 1) National Toxicology Program. Toxicity studies of 1020 long multiwalled carbon nanotubes (L-MWNT-1020) administered by inhalation to Sprague Dawley (Hsd: Sprague Dawley SD)

- rats and B6C3F1/N mice. Toxic Rep Ser. 2019; doi: 10.22427/NTP-TOX-94
- 2) Shinohara N, Nakazato T, Ohkawa K, et al. Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation. J Appl Toxicol. 2016;36:501-9.
- 3) Oyabu T, Myojo T, Morimoto Y, et al. Biopersistence of inhaled MWCNT in rat lungs in a 4-week well-characterized exposure. Inhal Toxicol. 2011;23(13):784-91.
- 4) Kim JK, Jo MS, Kim Y, et al. Nanotoxicol. 2019;14(2):250-62.
- 5) Migliaccio CT, Hamilton RF, Shaw PK, et al. Respiratory and systematic impacts following MWCNT inhalation in B6C3F1/N mice. Part Fibre Toxicol. 2021;18(1):16.
- 6) Mercer RR, Scabilloni JF, Hubbs AF, et al. Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure. Part Fibre Toxicol. 2013;10:38.
- 7) Fatkhutdinova LM, Khaliullin TO, Vasil'yeva OL, et al. Fibrosis biomarkers in workers exposed to MWCNTs. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;299:125-31.
- 8) Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, Khailullin TO, Birch E, Fatkhutdinova LM. Integrated analysis of dysregulated ncRNA and mRNA expression profiles in humans exposed to carbon nanotubes. PLOS ONE 2016; doi: 10.1371/journal.pone.0150628
- 9) Schubauer-Berigan MK, Dahm MM, Erdely A, et al. Association of pulmonary, cardiovascular, and hematologic metrics with carbon nanotube and nanofiber exposure among U.S. workers: a cross-sectional study. Part Fibre Toxicol. 2018;15:22.
- 10) Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, et al. Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. Ind Health 2010;48:783-95.
- 11) Mercer RR, Hubbs AF, Scabilloni JF, et al. Pulmonary fibrotic responses to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. Part Fibre Toxicol. 2011;8:21.
- 12) Kobayashi N, Naya M, Ema M, et al. Biological response and morphological individually dispersed multi-walled carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. Toxicol. 2010;143-53.
- 13) Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, et al. Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation. Nanotoxicol. 2012;6(6):587-99.
- 14) Fujita K, Fukuda M, Endoh S, et al. Pulmonary and pleural inflammation after intratracheal instillation of short single-walled and multi-walled carbon nanotubes. Toxicol Letters 2016;257:23-37.
- 15) Fraser K, Kadali V, Yanamala N, et al. Physicochemical characterization and genotoxicity of the broad class of carbon nanotubes and nanofibers used or produced in U.S. facilities. Part Fibre Toxicol. 2020;17:62.
- 16) Fraser K, Hubbs A, Yanamala N, et al. Histopathology of the broad class of carbon nanotubes and nanofibers used or produced in U.S. facilities in a murine model. Part Fibre Toxicol. 2021;18:47.

- 17) Ellinger-Ziegelbauer H, Pauluhn J. Pulmonary toxicity of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes®) relative to α -quartz following a single 6 h inhalation exposure of rats and a 3 months post-exposure period. *Toxicology* 2009;266(1–3):16–29.
- 18) Pauluhn J. Comparative pulmonary response to inhaled nanostructures: Considerations on test design and endpoints. *Inhal Toxicol.* 2009;21(supl):40–54.
- 19) Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, et al. Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats. *Nanotoxicol.* 2015;9(4):413–22.
- 20) Pauluhn J. Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol Sci.* 2010;113(1):226–42.
- 21) Ma-Hock L, Treumann S, Strauss V, et al. Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed to 3 months. *Toxicol Aci.* 2009;112(2):468–81.
- 22) Pothmann D, Simar S, Schuler D, et al. Lung inflammation and lack of genotoxicity in the comet and micronucleus assays of industrial multiwalled carbon nanotubes Graphistrength® C100 after a 90-day nose-only inhalation exposure of rats. *Part Fibre Toxicol.* 2015;12(1):21.
- 23) Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, et al. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13:53.
- 24) Sargent LM, Porter DW, Staska LM, et al. Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:3.
- 25) Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, et al. The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:59.
- 26) Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, et al. Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotubes by intratracheal instillation induces lung and pleural mesotheliomas in F344 rats. *Part Fibre Toxicol.* 2022;19:38.
- 27) 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.* 2012;37(1):81–9.
- 28) Ivani S, Karimi I, Tabatabaei SRF. Biosafety of multiwalled carbon nanotube in mice: a behavioral toxicological approach. *J Toxicol Sci.* 2012;37(6):1191–205.
- 29) Qi W, Bi J, Zhang X, et al. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep.* 2014;4:4352.
- 30) Johansson HKL, Hansen JS, Elfving B, et al. Airway exposure to multi-walled carbon nanotubes disrupts the female reproductive cycle without affecting pregnancy outcomes in mice. *Part Fibre Toxicol.* 2017;14:17.
- 31) Farshad O, Heidari R, Zamiri MJ, et al. Spermatotoxic effects of single-walled and multi-walled carbon nanotubes on male mice. *Front Vet Sci.* 2022;59:1558.
- 32) Wirtzner U, Herbold B, Voetz M, Ragot J. Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicol Lett.* 2009;186:160–5.
- 33) Di Sotto A, Chiaretti M, Carru GA, Bellucci S, Mazzanti G. Multi-walled carbon nanotubes: lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. *Toxicol Lett.* 2009;184:192–7.
- 34) Ema M, Imamura T, Suzuki H, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J. Evaluation of genotoxicity of multiwalled carbon nanotubes in a battery of in vitro and in vivo assays. *Regulatory Toxicol Pharmacol.* 2012;63(2):188–95.
- 35) Asakura M, Sasaki T, Sugiyama T, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *J Occup Health* 2010;52:155–66.
- 36) Pinto F, Lourenco AF, Pedrosa JFS, et al. Analysis of the in vitro toxicity of nanocelluloses in human lung cells as compared to multi-walled carbon nanotubes. *Nanomaterials* 2022;12:1432.
- 37) Garcia-Rodriguez A, Kazantseva L, Vila L, et al. Micronuclei detection by flow cytometry as a high-throughput approach for the genotoxicity testing of nanomaterials. *Nanomaterials* 2019;9:1677.
- 38) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, et al. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo systems. *Nanotoxicol.* 2013;7:452–61.
- 39) Srivastava RK, Rahman Q, Kashyap MP, Lohani M, Pant AB. Ameliorative effects of dimethylthiourea and N-acetylcysteine on nanoparticles induced cyto-genotoxicity in human lung cancer cells-A549. *Plos One* 2011;6(9):e25767.
- 40) Catalan J, Siivola KM, Nymark P, et al. In vitro and in vivo genotoxic effects of straight versus tangled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicol.* 2016;10(6):794–806.
- 41) Lanni ED, Erdem JS, Moller P, et al. In vitro-in vivo correlations of pulmonary inflammogenicity and genotoxicity of MWCNT. *Part Fibre Toxicol.* 2021;18:25.
- 42) Rahman L, Jacobsen NR, Aziz SA, et al. Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-fibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2017;823:28–44.
- 43) Muller J, Decordier I, Hoet PH, et al. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* 2008;29(2):427–33.
- 44) Srivastava RK, Rahman Q, Kashyap MP, Lohani M, Pant AB. Ameliorative effects of dimethylthiourea and N-acetylcysteine on nanoparticles induced cyto-genotoxicity in human lung cancer cells-A549. *Plos One* 2011;6(9):e25767.
- 45) ILSI risk science institute workshop participants. The relevance of the rat lung response to particle overload of human risk assessment: A workshop consensus report. *Inhal. Toxicol.* 2000;12, 1–17.