多層カーボンナノチューブの腹腔内投与によるマウス胎仔および母体への影響

藤谷 知子 a, 安藤 弘 a, 久保 喜一 a, 矢野 範男 a, 高橋 博 a, 湯澤 勝廣 a, 長澤 明道 a, 広瀬 明彦 b, 西村 哲治 c, 猪又 明子 a, 小縣 昭夫 a, 中江 大 d

多層カーボンナノチューブの安全性試験の一環として、マウスを用いた催奇形性試験を行った。多層カーボンナノチューブを2%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁して、0.0(対照群)、0.2、1.0、5.0 mg/kg体重(実験1)あるいは、0.0(対照群)、2.0、3.0、4.0 mg/kg体重(実験2)を、妊娠9日のCD1(ICR)マウス母体に腹腔内投与し、妊娠18日に、妊娠に関する指標と、胎仔および母体への影響を検査した。実験1の5.0 mg/kg群で、妊娠18日の母体あたり生存胎仔数が減少し、母体あたりの早期死胚数が上昇し、生存していた胎仔26例中2例に、四肢の減形成が見られた。また、5.0 mg/kg群の母体の脾臓重量が増加し、白血球数、特に好中球数および好酸球数が有意に上昇した。実験2の4.0 mg/kg群で、生存胎仔数が減少し、早期死胚数が増加した。実験2の全ての投与群の雌雄の生存胎仔平均重量が低下した。3.0 mg/kg群と4.0 mg/kg群で外表奇形(四肢減形成、無尾・短尾)の発現が増加し、全ての投与群で骨格奇形(脊椎癒合・不整、肋骨癒合・不整、指骨の欠損、指骨の過多)の発現が増加した。また、実験2の全ての投与群で、母体の脾臓重量が増加し、白血球数、特に好中球数および好酸球数が増加していた。多層カーボンナノチューブは、2.0 mg/kg体重以上の腹腔内投与で母体の脾臓重量の増加や白血球数の増加をもたらすとともに、胎仔においては著しい催奇形性を示した。多層カーボンナノチューブの母体免疫系への影響による胎仔毒性発現、あるいは、多層カーボンナノチューブの胎盤通過性や胎児/仔への移行などの作用機序についての検討が必要であると考えられる。

キーワード: 多層カーボンナノチューブ,マウス,腹腔内投与,胎仔,早期死胚,四肢減形成,脊椎癒合,白血球数,好中球数,好酸球数,脾臓

はじめに

ナノテクノロジーはナノサイズの微小な分子や原子の配列に関する技術であり、高性能の半導体や工業材料、あるいは、革新的な医療技術への応用が期待されている。しかし、この様な機能を意図して作られたナノ物質が生体に及ぼす影響については、多くの点で未知である。ナノテクノロジーがもたらすであろう社会的影響が大きいだけに、その生体系(健康、安全、環境)への影響を明らかにし、ナノテクノロジーがもたらす利点を安心して進められるように対応しなければならない。

近年,高木らによりP53遺伝子欠損マウスにおいて多層カーボンナノチューブ(以下,MWCNTと略す)の腹腔内投与が中皮腫を誘発すること¹⁾が,続いて,坂本らにより,正常ラットへの陰嚢腔内投与が,同じく中皮腫を誘発すること²⁾が報告された.陰嚢腔は腹腔とつながっており,腹腔内投与と同様の影響を及ぼすことは明らかである.そこで我々は,腹腔内投与による正常マウスにおける催奇形性試験を試みたので報告する.

実験方法

1. 被検物質と実験動物

多層カーボンナノチューブは、高木ら1)と坂本ら2)と

同じ製品を、2%カルボキシメチルセルロースナトリウム (東京化成工業㈱) 水溶液に超音波ソニケーターで懸濁し、 高圧滅菌したものを用いた. 対照群には、2%カルボキシメ チルセルロースナトリウム水溶液を高圧滅菌したものを 用いた.

Crlj:CD1(ICR) マウスは日本チャールスリバー(㈱から購入し、1 匹/ケージに収容し、室温23-25 $^{\circ}$ 、相対湿度50-60%、照明12時間/日の飼育室で、餌と水を自由に摂取させ、当所の実験動物倫理規定に従って扱った.

2. 実験

マウスは、膣栓の認められた日を妊娠0日として、妊娠9日に、MWCNT0.0 (対照群)、0.2、1.0、5.0 mg/kg体重の4群 (実験1)、あるいは、MWCNT0.0 (対照群)、2.0、3.0、4.0 mg/kg体重の4群 (実験2) に分けて、容量10 mL/kg体重で腹腔内投与した。体重および摂餌量の測定と一般症状観察を毎日行った。

妊娠18日の午前中に、母体をジエチルエーテルで麻酔し、 下腿動脈よりEDTA2Kを塗布した試験管に採血し、帝王切 開にて子宮内を観察し、生存胎仔数および死胚数の計測と、 母体の肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、卵巣、胸腺、胸部縦 隔洞リンパ節を秤量した。死胚のうち、胎仔および胎盤の

- a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1
- b 国立医薬品食品衛生研究所 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
- ° 帝京平成大学薬学部 164-8530 東京都中野区中野 4-21-2
- d 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

吸収が進んでいるものを早期死胚とし、胎仔の形状が残存 しているものを後期死胚とした. 卵巣の黄体数を実体顕微 鏡下で計数した.

生存胎仔は、外表観察で雌雄の確認後、肉眼で内臓の異常を観察すると共に、子宮・卵巣あるいは精巣の有無で雌雄を再確認し、95%エタノール溶液で1週間以上固定した後、表皮を剥離し、5%水酸化カリウムで24時間、5%水酸化カリウム0.002%アリザリンレッドで24時間、5%水酸化カリウム20%グリセリンで24時間、50%グリセリンで24時間以上処理して、実体顕微鏡下で骨格の観察をした。

新鮮血の白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値をSYSMEX KX21NVで計数し、平均血球容積、平均血球ヘモグロビン量および平均血球ヘモグロビン濃度を算出した。血液塗抹標本を、Diff-Quik (SYSMEX)で染色し、光学顕微鏡下で白血球サブタイプを計数した。

3. 統計

対照群と投与群間の差は、Scheffeの多重比較検定と χ^2 検定を用いて分析した.

結 果

実験1の5.0 mg/kg群で投与後1~3日におびただしい膣出血が認められ、妊娠の経過に伴う体重の伸びが有意に抑制された(図1). 妊娠10日(投与翌日)の実摂餌量および相対摂餌量が投与群全体で用量に相関して有意に低下し、妊娠11日、12日、13日、17日および18日の5.0 mg/kg群の実摂餌量および妊娠11日の5.0 mg/kg群の相対摂餌量が対照群より有意に低かった(データは示していない).

実験1の妊娠・出産に関する指標および胎仔への影響を表1に示した. 母体あたりの着床数は対照群と投与群間で有意な差はなかった. 母体あたりの早期死胚数,着床数中の早期死胚%が,5.0 mg/kg群で有意に増加していた. 母体あたりの後期死胚数,着床数中の後期死胚%は,対照群と投与群間で有意な差はなかった. 母体あたりの生存胎仔数,着床数中の生存胎仔%が,5.0 mg/kg群で有意に低下していた. 母体あたりの生存胎仔総重量が,5.0 mg/kg群で有意に低下していた. 雌雄の生存胎仔の平均重量は対照群と投与群間で有意な差はなかった.5.0 mg/kg群の生存胎仔26例中2例(1母体)に,四肢の減形成奇形が見られた(図2). また,5.0 mg/kg群の生存胎仔26例中3例(2母体)に腰椎の癒合・変形が,同3例(1母体)に指骨の欠損が見られた(図3).

実験1の母体への影響を表2に示した. 母体の肝臓, 腎臓, 心臓, 肺, 胸腺および卵巣の重量は, 対照群と投与群間で有意な差はなかったが, 5.0 mg/kg群の脾臓重量が増加していた. 胸部縦隔洞リンパ節の重量が全投与群で有意に増加していた. 5.0 mg/kg群の白血球数が対照群に比べて有意に増加し、白血球サブタイプでは, 好中球数と好酸球数が有意に増加していた. 赤血球数, ヘモグロビン値, ヘマトクリット値, 平均血球容積, 平均血球へモグロビン量, 平均

血球へモグロビン濃度および血小板数は、対照群と投与群間で有意な差はなかった (データは示していない).

影響の見られなかった1.0 mg/kg体重と、早期死胚の著しかった5.0 mg/kg体重との間の投与量による影響を調べるために、2.0から4.0 mg/kg体重の投与量で実験2を行った. 実験2の母体体重を図4に示した. 投与の翌日に、すべての投与群で、対照群に比べて有意に体重が低下し、妊娠16日までは3.0および4.0 mg/kg群で、それ以降は4.0 mg/kg群で、体重の増加が有意に抑制された. 妊娠10日(投与翌日)の全投与群の実摂餌量および相対摂餌量、妊娠11日の3.0および4.0 mg/kg群の実摂餌量および相対摂餌量が、対照群に比べて有意に低下していた.

実験2の妊娠・出産に関する指標および胎仔への影響を 表3に示した. 母体あたりの着床数は対照群と投与群間で 有意な差はなかった. 母体あたりの早期死胚数, 着床数中 の早期死胚%が、4.0 mg/kg群で有意に増加していた. 母体 あたりの後期死胚数,着床数中の後期死胚%は,対照群と 投与群間で有意な差はなかった. 母体あたりの生存胎仔数, 着床数中の生存胎仔%が、4.0 mg/kg群で有意に低下してい た. 母体あたりの生存胎仔総重量が, 3.0 mg/kg群および4.0 mg/kg群で有意に低下していた.全ての投与群の,雌雄の 生存胎仔の平均重量が有意に低下していた. 全ての投与群 の胎仔に、四肢減形成(図5)や無尾・短尾が散見され、 これらの外表奇形の,総胎仔数中の頻度が3.0 mg/kg群およ び4.0 mg/kg群で有意に増加していた. また, 全ての投与群 の胎仔に, 脊椎癒合・不整, 肋骨癒合・不整 (図6), 指骨 の欠損, 指骨の過多が散見され, これらの骨格奇形の, 総 胎仔数中の頻度が全ての投与群で有意に増加していた.

実験2の母体への影響を表4に示した. 母体の肝臓, 腎臓, 心臓, 肺, 胸腺および卵巣の重量は, 対照群と投与群間で有意な差はなかったが,全ての投与群で脾臓重量が有意に増加し,白血球数が増加し,白血球サブタイプでは,好中球数と好酸球数が増加していた. 赤血球数,へモグロビン値,へマトクリット値,平均血球容積,平均血球へモグロビン量,平均血球へモグロビン濃度および血小板数は,対照群と投与群間で有意な差はなかった(データは示していない).

実験1および2に共通して、投与群の母体の腹腔内の各種 臓器の表面、腹腔内膜や横隔膜に、黒色のMWCNTの塊が 付着しているのが、肉眼で観察され、子宮表面への付着も 散見された。しかし、子宮表面への付着と、死胚や奇形発 現との関連は、明らかではなかった。

考察

MWCNTは、マウスに単回腹腔内投与すると、2.0 mg/kg 体重以上の用量で、四肢減形成や脊椎の癒合・不整などの奇形を誘発することが明らかになった。母体の胸部縦隔洞リンパ節の黒色化や腫張は、MWCNTが腹腔内からこれらのリンパ節へ移動したことを強く示唆している。すなわち、腹腔内投与されたMWCNTは、母体マウスの循環

系(血流・リンパ流)に乗ったものと考えられ、胎仔における奇形の発現や重量低下などの変化は、経胎盤で胎仔がMWCNTに曝露されたことに基づくものである可能性がある.しかしながら、MWCNTの胎盤通過性や、それに基づく胎児/仔への移行については、現在のところ明確になっておらず、リスク評価の観点から今後の喫緊の課題である.

MWCNTの腹腔内投与により母体の脾臓重量と白血球(好中球・好酸球)が増加したことは、このナノマテリアルが母体免疫系に影響を及ぼしたことを示唆している.山口らは、2 mg/kg体重のMWCNTを腹腔内投与した雌マウスにおいて、投与の1から2週間後に総白血球数および顆粒球(好中球および好酸球にあたる)数が増加し、各種サイトカインが誘導されること報告している³⁾.しか

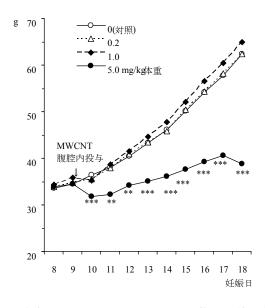


図1. 妊娠9日に0.2-5.0 mg MWCNT /kg体重を単回腹腔内投与された母体の体重変化

, *: 対照群と比べてそれぞれp<0.01, 0.001



図2. 実験1の5.0 mg/kg 投与群(左)と対照群(右)の胎仔. 5.0mg/kg 投与群の胎仔の左前肢が、対照群と比べて短く、指数が少ない.

しながら、MWCNTの母体免疫系への影響が、このナノマテリアルによる胎仔毒性発現に関与するのか、またその作用機序については、現在のところ判断に足るデータがなく、今後の検討を予定している.

本研究は、別報⁴⁾のヒトの曝露形態により近い条件である経気道暴露による結果と併せ、MWCNTに催奇形性があることを明らかにしたものである.

まとめ

MWCNTは、 妊娠9日のマウス母体への2.0 mg/kg体重以上の単回腹腔内投与で、母体の脾臓重量の増加や白血球数の増加をもたらし、胎仔においては、著しい四肢減形成や脊椎の癒合・不整などの奇形を誘発した.

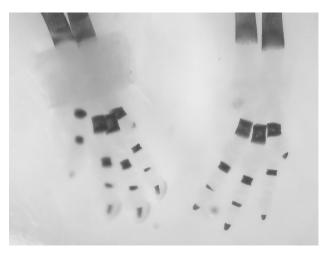


図3. 実験1の対照群(左) と5.0 mg/kg投与群(右)の前肢 先端の骨格.

5.0 mg/kg投与群の指骨が1本欠如している.

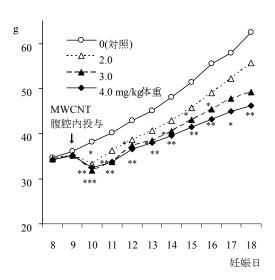


図4. 妊娠9日に2.0-4.0 mg MWCNT /kg体重を単回腹腔内投与された母体の体重変化

*, **, ***: 対照群と比べてそれぞれp<0.05, 0.01, 0.001

表1. 妊娠9日に0.2-5.0 mg MWCNT /kg体重を単回腹腔内投与したマウスの妊娠に関する指標および胎仔への影響

投与量 (m	g/kg体重)	0.0(対照)	0.2	1.0	5.0
交配を確認した雌マウス数		10	10	10	10
妊娠していたマウス数		9	10	9	9
生存胎仔を有していた母	上体数	9	10	9	3*
黄体数/母体		16.6±1.6	15.6±1.2	16.6±2.6	14.4±2.2
着床数/母体		13.2±3.4	14.3±1.8	15.2±2.9	12.7±3.8
早期死胚数/母体		0.89 ± 0.93	1.30 ± 2.21	1.22±1.09	10.00±4.47***
(着床数中の%)		6.03 ± 6.46	8.52±14.57	8.14±7.24	81.72±28.23***
後期死胚数/母体		0.22 ± 0.44	0.60 ± 0.70	0.44 ± 0.73	0.11±0.33
(着床数中の%)		1.70 ± 3.46	3.86 ± 4.35	2.90 ± 4.71	0.85±2.55
生存胎仔数/母体		12.11±2.98	12.40 ± 2.22	13.56±3.13	1.44±3.28***
(着床数中の%)		92.3±7.1	87.6±16.8	89.0±9.9	9.5±20.7***
生存胎仔総重量/母体(g)		17.16±4.77	17.42 ± 2.78	18.68±4.26	5.86±6.44*
平均胎仔重量(g)	雄	1.421±0.138	1.446 ± 0.078	1.403 ± 0.072	1.415±0.124
	雌	1.397±0.105	1.380 ± 0.097	1.354 ± 0.066	1.331±0.021
外表奇形数/母体		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.67±1.15
(生存胎仔中の%)		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.67±11.55
奇形胎仔を有した母体数		0	0	0	1
奇形胎仔数/総胎仔数		0/99	0/124	0/122	2/26**

数値は、観察された頻度あるいは平均値±標準偏差.

表2. 妊娠9日に0.2-5.0 mg MWCNT /kg体重を単回腹腔内投与したマウス母体への影響

投与量(mg/kg体重)		0.0 (対照)	0.2	1.0	5.0
母体数		9	10	9	9
体重 (g)	妊娠9日	34.44 ± 2.08	34.83±2.40	35.81±3.06	34.54±2.31
	妊娠18日	62.46±7.44	62.46±5.28	64.93±8.12	38.82±9.38***
臓器重量					
	肝臓 (g)	2.855 ± 0.296	2.958 ± 0.342	2.973 ± 0.388	2.460 ± 0.613
	腎臓 (mg)	430±47	444±38	462±50	455±52
	心臟 (mg)	162±17	170±17	173±17	157±21
	肺 (mg)	186±17	182±11	196±8	202±18
	脾臓 (mg)	157±65	166±40	203±44	356±101***
	胸腺 (mg)	24.7±7.2	24.9±8.2	20.6±4.4	35.7±15.6
	胸部縦隔洞リンパ節 (mg)	5.5±1.4	11.5±3.7*	12.4±5.7*	13.9±5.3*
	卵巣 (mg)	19.0 ± 2.6	21.0±3.2	19.9±3.1	18.7±2.4
総白血球数	$(10^2/\mu L)$	45.2±1.5	49.0±16.3	57.3±28.5	80.4±36.5*
	リンパ球数 (10²/μL)	28.8 ± 8.8	27.8±6.8	25.6±9.5	24.6±11.0
	好中球数 (10²/μL)	14.6 ± 6.0	18.3±11.0	32.4±22.5	44.8±23.2**
	好酸球数 (10²/μL)	0.5 ± 0.6	1.4±1.1	2.6±1.7	6.2±5.0*
	単球数 (10²/μL)	1.8 ± 0.7	1.6±0.8	1.6±1.2	5.3±3.8

数値は平均値±標準偏差.

^{*, **, ***:} 対照群と比べてそれぞれp<0.05, 0.01, 0.001

^{*, **, ***:} 対照群と比べてそれぞれp<0.05, 0.01, 0.001

主つ	4T.4E0 [] 1720 1 10 mg	MUCNIT/La/k 重大当同脂肪内机片:	したマウスの妊娠に関する指標および胎仔への	記り組収
₹ .	火工火ビタ ロ (こと.U-4.U M2)	MWUN1/K214 単 & 単同 B だい 校 サリ	したマリクの妊娠に関する有傷わまい胎性への	沙窖

投与量(mg/kg体重)		0.0(対照)	2.0	3.0	4.0
交配を確認した雌マウス数		10	10	10	14
妊娠していたマウス数		10	8	9	13
生存胎仔を有していた母体数		10	7	8	7*
黄体数/母体		15.80±1.87	16.00 ± 1.77	16.00 ± 4.06	15.62±1.94
着床数/母体		14.50±2.55	14.38±1.51	12.33±2.69	14.00 ± 2.08
早期死胚数/母体		1.70±2.16	4.75±4.27	5.00±3.94	8.92±4.92**
(着床数	(中の%)	10.98±13.51	35.30 ± 34.86	41.70±34.78	67.09±38.79**
後期死胚数/母体		0.20 ± 0.42	0.38 ± 0.52	0.00 ± 0.00	0.23±0.44
(着床数	(中の%)	1.67±3.75	2.45±3.38	0.00 ± 0.00	1.63±3.14
生存胎仔数/母体		12.60±2.63	9.50±5.10	7.33±4.09	4.85±5.84**
(着床数	(中の%)	87.35±13.02	63.92±34.02	58.30±34.78	31.27±37.69**
生存胎仔総重量/母	母体(g)	19.126±3.294	12.178 ± 6.808	9.063±4.973*	6.004±7.210***
平均胎仔重量(g)	雄	1.475±0.105	1.293±0.085**	1.282±0.105**	1.305±0.080*
	雌	1.431±0.131	1.227±0.087*	1.241±0.124*	1.210±0.108*
外表奇形数/母体		0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.98	0.25 ± 0.46	0.43 ± 0.53
(生存胎仔中の%)		0.00 ± 0.00	9.18±18.77	3.65 ± 6.84	4.59±6.46
奇形胎仔を有し	た母体数	0	2	2	3*
奇形胎仔数/総別	台仔数	0/126	3/76	2/66*	3/63*
奇形胎仔数	口唇裂	0	0	0	1
	四肢減形成	0	2	2	1
	無尾・短尾	0	2	0	1
骨格奇形数/母体		0.00 ± 0.00	1.14±1.21	0.88 ± 1.73	1.00±1.41
(生存胎	(子中の%)	0.00 ± 0.00	14.39±18.09	11.15±21.68	11.90±19.16
奇形胎仔を有した母体数		0	4**	3*	3*
奇形胎仔数/総胎仔数		0/126	9/76***	7/66***	7/63***
奇形胎仔数	肋骨癒合・不整	0	3	1	2
	脊椎癒合・不整	0	6	7	0
	四肢減形成	0	2	2	3
	多指	0	0	0	2

数値は、観察された頻度あるいは平均値±標準偏差.

*, **, ***: 対照群と比べてそれぞれp<0.05, 0.01, 0.001



図5. 実験2の対照群(左) と2.0 mg/kg投与群(右)の胎2.0 mg/kg投与群の胎仔の左前肢が欠如している.

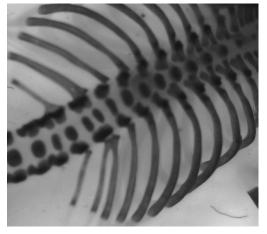


図6. 実験2の4.0 mg/kg投与群の胎仔の胸-腹部骨格. 胸椎, 肋骨および腰椎の癒合が見られる.

表4. 妊娠9日に2.0-4.0 mg MWCNT /kg体重を単回腹腔内投与したマウスの母体への影響

投与量(mg/kg体重)		0.0(対照)	2.0	3.0	4.0
母体数		9	10	9	9
体重(g)	妊娠9日	34.69 ± 1.42	34.41±1.83	34.20 ± 2.65	34.18 ± 2.64
	妊娠18日	62.41±2.77	55.65±11.86	49.16±7.91	46.27±11.89**
臓器重量					
	肝臓(g)	3.110 ± 0.400	3.173±0.531	2.986 ± 0.493	2.798 ± 0.520
	腎臓(mg)	478±133	503±52	447±48	472±55
	心臓(mg)	179±17	180±23	167±18	165±16
	肺(mg)	189±8	181±3	176±20	188±15
	脾臓(mg)	145±40	237±88**	323±86**	333±99**
	胸腺(mg)	26.6±12.9	22.6 ± 5.4	17.2 ± 9.2	25.3 ± 7.4
	胸部縦隔洞リンパ節(mg)	7.4 ± 8.3	7.3±3.5	8.8±4.5	6.2 ± 4.5
	卵巣(mg)	25.1±7.8	21.2±4.6	21.6±3.6	17.6 ± 2.9
総白血球数(10 ² /µL)		46.7±18.7	114.9±34.3*	124.0±48.2*	109.1±68.1*
	リンパ球数 (10²/μL)	28.9±11.7	38.8±12.0	33.6±15.1	33.0±35.7
	好中球数(10²/μL)	15.0 ± 7.0	54.6±19.2*	66.1±23.0**	53.6±37.0*
	好酸球数(10²/μL)	0.9 ± 0.5	17.5±14.1**	16.1±8.9**	15.5±8.1**
	単球数(10²/μL)	1.9±1.7	4.1±3.0	8.2 ± 7.8	7.0 ± 4.2

数値は平均値±標準偏差.

文 献

- 1) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., et al.: J. Toxicol. Sci., 33, 105-116, 2008.
- 2) Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N., et al.: J. Toxicol. Sci., **34**, 65-76, 2009.
- 3) Yamaguchi, A., Fujitani, T., Ohyama, K., et al.: J. Toxicol. Sci., 37, 177-189, 2012.
- 4) 藤谷知子,安藤 弘,久保喜一,ほか:東京都健安研 セ年報, 64, 211-215, 2013.

^{*, **:}対照群と比べてそれぞれp<0.05, 0.01

Effects of Intraperitoneally Administrated Multi-Wall Carbon Nanotubes (MWCNT) on Mouse Fetus and Dam

Tomoko FUJITANI^a, Hiroshi ANDO ^a, Yoshikazu KUBO ^a, Norio YANO ^a, Hiroshi TAKAHASHI ^a, Katsuhiro YUZAWA ^a Akemichi NAGASAWA ^a, Akihiko HIROSE^b, Tetsuji NISHIMURA ^c, Akiko INOMATA ^a, Akio OGATA ^a and Dai NAKAE ^a

One of the safety evaluations of multi-wall carbon nanotubes, a possible teratogenicity of multi-wall carbon nanotubes was studied in mice. Multi-wall carbon nanotubes suspended in 2% sodium carboxy methyl cellulose, 0.0 (control), 0.2 1.0, 5.0 mg/kg b.w. (Experiment 1), or 0.0(control), 2.0, 3.0, 4.0 mg/kgb.w. (Experiment 2) were intraperitoneally administered on day 9 of gestation in CD1 (ICR) mice. At day 18 of gestation, the parameters of pregnancy, effects on fetuses and effects on dams were examined. In Experiment 1, the number of live fetuses was significantly decreased, and early fetal death was significantly increased in the 5.0 mg/kg group to compare with those in the control group. In 2 of 26 live fetuses in the 5.0 mg/kg group, a reduction deformity of the limbs was observed. The spleen weight and white blood cell count, especially of neutrocyte and eosinocyte counts, of the dam in the 5.0 mg/kg group was higher than those of the control group. In Experiment 2, the number of live fetuses was significantly decreased, and early fetal death was significantly increased in the 4.0 mg/kg group. Mean male and female live fetus weights of all dosed groups were significantly lower than those of the control group. External malformations (reduction deformity of the limbs, short or absent tail) in the 3.0 or 4.0 mg/kg groups and skeletal malformations (fusion of vertebrae, fusion of rib, hypophalangia, hyperphalangia) in all dosed groups were increased. The spleen weight and white blood cell count, especially neutrocyte and eosinocyte counts, of dam in all dosed groups were significantly higher than those of the control. Intraperitoneally administered multi-wall carbon nanotubes at a dose of 2.0 or more mg/kg b.w. increased the spleen weights and white blood cell counts in the dam and had significant teratogenic effects in the fetus. Examination of a possible fetal toxicity by immunological changes in the dam or a possible trans-placental transfer of multi-wall carbon nanotubes to the fetus would be necessary to clarify the mechanism of the teratogenicity of multi-wall carbon nanotubes.

Keywords: multi-walled carbon nanotubes, mouse, intraperitoneal, fetus, early fetal death, reduction deformity of limb, fusion of vertebrae, white blood cell count, neutrocyte count, eosinocyte count, spleen

a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

National Institute of Health Science
1-18-1, Kamiyohga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

c University of Teikyou Heisei4-21-2, Nakano, Nakano-ku, Tokyo 164-8530, Japan