ナノ物質の腹腔内投与によるマウス雄性生殖器への影響

田山 邦昭^a,坂本 義光^a,安藤 弘^a,海鉾 藤文^a,久保 喜一^a,高橋 博^a 長澤 明道^a,湯澤 勝廣^a,小縣 昭夫^b,中江 大^{b,c},猪又 明子^a,栗田 雅行^d

6種類のナノ物質:カーボンブラック(CB),フラーレン(FL),アナターゼ型酸化チタン(TA),ルチル型酸化チ タン(TR),カーボンナノファイバー(CN),多層カーボンナノチューブ(MW)について雄性生殖器系に及ぼす影 響を検討した.各ナノ物質を2%カルボキシメチルセルロースナトリウム水に懸濁し,CNとMWについては0.2,1,5 mg/kg体重/回,他は1,5 mg/kg体重/回,さらに対照(CONT)として懸濁剤のみを10週齢のCD-1(ICR)系雄性マウス (1群5匹)に週1回計10回腹腔内投与し,最終投与の1週間後に屠殺剖検した.ナノ物質投与により,CN,MW群では 途中死亡があり,またTA,CN,MW群では体重,精巣・精巣上体重量,精子パラメータ(数・運動性・粒度分布・形 態),精巣・精巣上体組織などに軽度な影響がみられたが,CB,TR,FL群ではほとんど影響は認められなかった.

キーワード:ナノ物質,カーボンブラック,フラーレン,酸化チタン,カーボンナノファイバー,多層カーボンナノ チューブ,マウス,腹腔内投与,生殖毒性,精子数,精子運動性,粒度分布,精子形態,精巣組織

はじめに

最近のナノテクノロジーの進歩により各種のナノ物質が 生産可能となり,新機能材料への応用期待の中,実用化へ の展開が進められている.それに伴い新物質であるナノ物 質のヒトへの影響や安全性の確認が求められている.当研 究科ではナノ物質の安全性評価に対し, *in vivo* (生体内), *in vivo*(試験管内)の両方面から検討を進めており, *in vivo*では多層カーボンナノチューブがラットにおいて中皮 腫¹⁾,マウスにおいて催奇形を誘発すること²⁾,マウス免 疫系へ影響を及ぼすこと³⁾,また*in vitro*ではラット遊離肝 細胞で,フラーレンの誘導体がその水酸基の数が増えるほ ど細胞毒性やミトコンドリア機能障害性を強めること⁴⁾な どを認めた.当センターではこれらを研究報告としてまと めている⁵⁾.

ナノ物質の雄性生殖器系への毒性に関しては、カーボン ブラック^{6,7)}や酸化チタン⁸⁻¹¹⁾などで報告がある.酸化チタ ンは、結晶構造の違いから、アナターゼ型、ルチル型など に分類されるが、結晶構造の記載がない報告を除いて、そ の報告のほとんどはアナターゼ型⁸⁻¹¹⁾である.今回我々は、 これら2種類の酸化チタンを含めた6種類のナノ物質につい て、マウス雄性生殖器系への影響を比較するため、感受性 の高いとされている腹腔内投与法¹²⁾により、比較的低用量 の同一濃度群で検討した.特に解剖時に並行して測定を行 った精子パラメータ検査(数・運動性・粒度分布)に関し ては、機器¹³⁾を用いて数値化を図ることにより客観的に評 価した.

実験方法

1. 被験物質と実験動物

試験した6種類のナノ物質(CB, FL, TA, TR, CN, MW) をTable 1に示した.カルボキシメチルセルロースナトリウ ム(関東化学㈱, Lot No. 853X1516,以後, CMCNa)を注 射用蒸留水(扶桑薬品工業㈱)で2%の濃度に溶解し,そ の溶液に各被験物質を加え懸濁液の濃度を調整した.調整 は超音波ソニケーター(㈱藤原製作所, UA50D)で5分間 処理し,さらに6連スターラー(Jeio Tech Co., Ltd., Korea, MS-51M)で3時間撹拌した.調整した被験懸濁液は冷蔵 保存し,投与時に高圧蒸気滅菌器(池本理化工業㈱, KY-23)で滅菌(120℃,20分)して用いた.対照群(CONT) には,2% CMCNa水を同様に操作して用いた.

雄性Crlj:CD1(ICR)マウスを日本チャールス・リバー(㈱ より7週齢で購入し、ファイティング(闘争)による精子 検査への影響を避けるため、全て個別飼育した.室温23-25℃、相対湿度50-60%、照明12時間/日の飼育室で、餌 (日本クレア(㈱、CE-2)と水道水を自由に摂取させた. 投与開始1週間前に体重は層別無作為抽出法で群分けを行 い、10週齢より投与を開始した.

実験は当センターの研究調整委員会および動物実験委員 会の承認を受け、実験動物の適切な扱いに関する法規、規 則およびガイドライン等に準拠して行った.

- ^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 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部(当時)
- 。現所属:東京農業大学156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1
- ^d 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

Nanomaterials	Abbreviations	Product name / Code number	M anufacturer	Lot no.	Size of nanomaterials ^a
Carbon black	СВ	Printex® 90	Orion Engineered Carbons	1135101	Primary particle size: 14 nm
Fullerene	FL	C60, #600-9969	SES Research, Inc.	HT-5023	Particle size: 55nm [Gregory et al. ¹¹⁾]
Titanium(IV) oxide, anatase	ТА	637254	Sigma-Aldrich Corp.	#MKBK2771V	Particle size <25 nm, spec. surface area 45-55 m^2/g
Titanium(IV) oxide, rutile	TR	637262	Sigma-Aldrich Corp.	#BCBJ9101V	D x L: ~ 10nmx40 nm, Particle size<100nm Spec. surface area 50 m ² /g
Carbon nanofibers	CN	719781	Sigma-Aldrich Corp.	#MKBC8965V	$D\ x\ L$: 100nm x 20-200µm, Average diameter: 130 nm,
Multi-walled carbon nanotube	MW	MWNT-7	Mitsui & Co, Ltd.	060125-01k	D x L: 70-100nm(82%) x 1-4 μ m(73%) [Sakamoto et al. ¹⁾]

Table 1. Test substances

a: Company product information, D: Diameter, L: Length.

2. 投与および実験方法

各種ナノ物質の懸濁液は、投与直前に振盪機(東京理化 器械㈱、CM-1000型) で10~30分処理し、1mLディスポー ザブルシリンジ (テルモ㈱) で腹腔内投与した. CNと MWは0.2, 1, 5 mg/kg体重/回,他は1, 5 mg/kg体重/回の用量 で週1回計10回腹腔内投与し、最終投与の1週間後(11週 目)に屠殺剖検した.動物はイソフルラン麻酔下で大腿動 ・静脈切断により致死させ、生殖器系臓器を中心に摘出・ 秤量した.精巣や精巣上体(左側の尾部は精子検査のため 除く)は改良ダビットソン液、その他の臓器は10%中性緩 衝ホルマリン液で固定後,常法によりパラフィン包埋し, 薄切後, ヘマトキシリン・エオジン染色し, 組織学的検索 を光学顕微鏡下で行った.精巣については切片当たり変性 がみられた精細管数(-~++)で分類し、精巣上体につい ては障害の強度によりランクを、-:変化なし、±:管腔 内精子の減少,+:細胞残渣貯留,++:上皮の変性により 分類した(Table 4). 精子パラメータの検査は既報¹³⁾に従 い、左精巣上体尾部を外科用メスで切断、秤量後、粒子計 測装置(シスメックス㈱, CDA-500)で精子数・粒度分布 (体積相当径)計測を,精子特性分析機Sperm Quality

Analyzer (Medical Electronic Systems Ltd, Israel, SQA II-C) で運動性(精子運動性指数:SMI)計測を行った.精子数 は精巣上体尾部当たり,および精巣上体尾部グラム重量当 たりで算出し,SMIは精子数により影響を受ける値である ため,1mL当たりの精子数でSMIを除した値で比較した. 計測終了後,当日中に未固定の精子形態の位相差像を,共 焦点レーザー顕微鏡(カールツァイス(㈱,LSM700)で観 察した.

なお、記載を簡略化するため、各物質の濃度群はハイフンの後に数字のみで表した。例としてCNの0.2 mg/kg 体重/回の投与群はCN-0.2とした。

3. 統計

統計解析は各検査項目に対応した対照群と各ナノ物質の 投与群間で、2群の場合は等分散の検定により、等分散で はt検定を、異分散ではWelchのt検定を行った.多群の場 合は各群の分散をBartlett法で検定し、等分散の場合は一 元分散分析法、有意な場合はさらにDunnett法で検定した. 不等分散の場合はKruskal-Wallis法、有意な場合はさらに Non-parametric Dunnett法で検定した.危険率は5%とし た.統計処理にはASPEL(㈱エーダックス)を用いた.

結 果

実験期間中の死亡は, Fig. 1に示すように投与6週以降に 繊維状物質を投与したCN-1, CN-5, MW-5でみられ, 解剖 時(11週目)には死亡数は各々5, 4, 4匹となり, CNの方が MWより致死率が高くなった.一方, 粒子状物質(CB, FL, TA, TR)では死亡はみられなかった.



Fig. 1. Survival curves in dead groups of male mice administered with six types of nanomaterials once per week for 10 weeks.



Fig. 2. Body weight changes of male mice administered with six types of nanomaterials once per week for 10 weeks.

*: P < 0.05, significantly different from the control value.

体重の推移をFig. 2に示した. MW-1の11週目で有意な体 重の減少がみられた.

剖検所見では、CN, MW群において、投与した検体と思われる黒色の繊維状物質の沈着が、腹腔内各臓器の表面や 間膜に散在してみられ、肝臓は辺縁が丸く変形していた. 粒子状の物質(CB, FL, TA, TR)では、各々の物質の色に 相当した乳白色や褐色の顆粒状物の集合体が、主に胃や膵 臓周囲の間膜にみられた.またCB群では特に肝臓の色調 が黒かった.

生殖器系の絶対・相対の臓器重量をTable 2に示した.臓器重量の増加は、精巣ではMW-0.2(相対のみ)、精巣上体では、MW-0.2(絶対、相対の両方)、CN-0.2およびMW-1

(相対のみ)でみられた.また,臓器重量の減少傾向(絶対,相対の両方)を示したのは,精嚢(凝固腺を含む)ではMW-0.2, MW-1で,前立腺(腹部)ではCN-0.2, MW-0.2であった.

尾部重量,精子数(尾部当たりおよび尾部グラム重量当 たり),運動性(1mL精子数当たり)および形態所見を Table 3に示した.さらにFig. 3のA-Fに,対照群(CONT) 並びに変化がみられた投与例における精子形態像および粒 度分布曲線の例を示した.TA,CN,MW群で精子数と運動 性に減少傾向がみられ,さらに形態所見にも変化がみられ た.精子形態はCONTの場合,フック状の頭部と長い尾部 を持つ精子が一様にみられ(Fig. 3-A),粒度分布曲線はピ ークが5µm付近にあり,正規分布様の曲線であるが(Fig. 3-D),ナノ物質投与群のTA,MW,CN群の一部では,形態 異常(頭部異常,頭尾離断,細胞崩壊物の出現など)がみ られ(Fig. 3-B,C),粒度分布曲線は不正形な曲線となった (Fig. 3-E,F).CB,FL,TR群では,精子数,運動性,粒度 分布曲線,形態異常ともに異常はほとんどみられなかった.

精巣,精巣上体の組織学的所見をTable 4に,組織像を Fig.3-G-Lに示した.精巣では精上皮の変性・脱落が,TA, CN,MW群の一部でみられ,さらにTA群ではセルトリ細胞 の空胞化が顕著にみられたものがあった(Fig. 3-H, I).精 巣上体では管腔内精子数減少がTA,CN,MW群の一部でみ られ(Fig. 3-K,L),さらにTA群の一部で細胞残渣貯留が (Fig. 3-K),また各群1匹生残したCN-5,MW-5で上皮の変 性が観察された.CN,MW群では,精巣,精巣上体,精嚢 などの繊維の沈着と白膜の肥厚,炎症性細胞の浸潤がみら れた(Fig. 3-I,L).前立腺ではCN,MW群の一部で上皮の 萎縮が観察された.

この他,組織学的には、全ての群で肝臓では泡沫状に腫 大したクッパー細胞が小葉全体に散見され、黒色物質であ るCB, CN, MW群では、胞体内で貪食された投与物質が容 易に観察された.また投与物質は縦隔リンパ節のマクロフ ァージ内にも認められた(図には示していない).

Treatment	Number	Final	Te	stes	Epidid	ymes	Seminal vesicles -	+ Coagulating gl. ^d	Prostate gl.(Ventral lobe)
body wt	of males	body wt ^a .	Absolute ^b	Relative ^c	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative
CONT	5	44.8 ± 3.2^{e}	224 ± 42	483 ± 92	90.4 ± 9.5	202 ± 13	243 ± 51	538 ± 79	20.0 ± 3.4	44.6 ± 7.9
CB-1	5	43.8 ± 5.3	250 ± 34	580 ± 107	$101\ \pm 9.4$	232 ± 27	252 ± 41	580 ± 100	20.2 ± 3.0	46.5 ± 7.9
CB-5	5	45.3 ± 3.0	237 ± 15	526 ± 63	93.4 ± 8.9	208 ± 31	237 ± 52	525 ± 111	19.3 ± 5.0	42.3 ± 8.3
FL-1	5	43.4 ± 2.5	231 ± 55	533 ± 128	90.8 ± 7.9	210 ± 25	241 ± 53	560 ± 149	19.6 ± 3.5	45.3 ± 9.6
FL-5	5	44.4 ± 1.9	225 ± 22	508 ± 62	93.2 ± 2.6	211 ± 13	240 ± 40	$540\pm~85$	22.6 ± 7.1	50.5 ± 14
TA-1	5	42.1 ± 3.6	249 ± 12	$595\pm\ 67$	94.1 ± 4.1	229 ± 13	213 ± 40	531 ± 139	19.3 ± 5.1	47.3 ± 11
TA-5	5	44.7 ± 3.0	201 ± 74	470 ± 194	92.5 ± 11	214 ± 36	247 ± 59	569 ± 141	20.9 ± 12	40.4 ± 17
TR-1	5	44.8 ± 2.2	234 ± 19	$523\pm\ 49$	93.1 ± 6.8	208 ± 15	248 ± 78	553 ± 163	20.4 ± 5.0	46.0 ± 13
TR-5	5	43.4 ± 2.0	228 ± 28	527 ± 78	93.9 ± 13	217 ± 35	212 ± 43	490 ± 111	22.4 ± 4.2	51.9 ± 12
CN-0.2	5	42.1 ± 3.7	219 ± 36	522 ± 95	95.9 ± 6.4	$231\pm19*$	219 ± 82	515 ± 176	15.7 ± 2.9	37.2 ± 4.5
CN-1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CN-5	1	37.5	131	351	85.6	228	300	802	15.4	41.1
MW-0.2	5	42.3 ± 1.9	277 ± 45	$652 \pm 91*$	$108 \pm 9.1*$	$256\pm17*$	191 ± 44	448 ± 88	16.5 ± 1.9	38.9 ± 3.7
MW-1	5	39.7 ± 1.3*	237 ± 25	597 ± 70	98.7 ± 8.7	$249\pm25*$	192 ± 49	482 ± 120	20.5± 3.2	51.5 ± 7.2
MW-5	1	32.1	173	539	63.8	199	64	200	4.0	12.5

Table 2. Organ Weights

a: g, b: mg, c: mg/100g body wt, d: These organs were trimmed and weighed after formalin fixation.

e: Values are mean \pm SD. *: Significantly different from control (p <0.05).

Treatment Num	Number	Cauda enididymidis	Epididyma	l sperm count	Sperm motility (SM I/sperm count/mI.)	M orphology ^b			
body wt	of males wt^a Per cauda (x10 ⁷) Per g		Per gram cauda (x10 ⁹)	(x10 ⁻⁵)	-	±	+	++	
CONT	5	13.8 ± 1.9^{c}	1.64 ± 0.38	1.18 ± 0.21	4.24 ± 0.94	5	0	0	0
CB-1	5	14.4 ± 2.4	1.66 ± 0.21	1.17 ± 0.21	3.90 ± 0.80	5	0	0	0
CB-5	5	13.9 ± 1.8	1.58 ± 0.25	1.13 ± 0.05	3.82 ± 0.41	5	0	0	0
FL-1	5	13.5 ± 2.2	1.62 ± 0.45	1.21 ± 0.31	3.99 ± 0.42	5	0	0	0
FL-5	5	15.6 ± 1.2	1.71 ± 0.31	1.10 ± 0.21	3.94 ± 0.43	5	0	0	0
TA-1	5	14.2 ± 2.4	1.58 ± 0.39	1.11 ± 0.16	3.55 ± 0.89	3	2	0	0
TA-5	5	15.1 ± 2.7	1.37 ± 0.36	0.92 ± 0.24	3.05 ± 1.79	2	2	0	1
TR-1	5	12.7 ± 2.2	1.49 ± 0.26	1.19 ± 0.15	4.27 ± 0.64	4	1	0	0
TR-5	5	14.1 ± 3.4	1.73 ± 0.50	1.22 ± 0.17	3.36 ± 0.93	5	0	0	0
CN-0.2	5	16.2 ± 2.2	1.55 ± 0.26	0.97 ± 0.21	3.89 ± 0.66	4	1	0	0
CN-1	0	_	-	_	_	_	_	-	-
CN-5	1	14.4	0.95	0.66	3.14	0	1	0	0
MW-0.2	5	17.0 ± 2.6	1.74 ± 0.33	1.03 ± 0.14	3.34 ± 0.86	4	1	0	0
M W-1	5	15.1 ± 2.3	1.36 ± 0.26	0.90 ± 0.13	3.04 ± 1.14	3	1	1	0
M W-5	1	9.0	0.75	0.84	1.03	0	0	1	0

Table 3. Sperm parameter and morphology

The spermatozoa from left epididy mis were collected by same methods described in our previous report $^{13)}$.

a: mg, b: -: No change, ±: Very slight, +: Slight, ++: Modarate.

c: Values are mean \pm SD.

Treatment - mg/kg body wt	Number	Testes ^a				Ep ididy mes ^b			
	of males	-	±	+	++	_	±	+	++
CONT	5	5°	0	0	0	5	0	0	0
CB-1	5	5	0	0	0	5	0	0	0
CB-5	5	5	0	0	0	5	0	0	0
FL-1	5	5	0	0	0	4	1	0	0
FL-5	5	5	0	0	0	4	1	0	0
TR-1	5	5	0	0	0	5	0	0	0
TR-5	5	5	0	0	0	5	0	0	0
TA-1	5	4	1	0	0	4	1	0	0
TA-5	5	2	1	0	2	2	1	2	0
CN-0.2	5	3	1	1	0	3	2	0	0
CN-1	0	_	_	_	_	_	_	_	_
CN-5	1	0	0	1	0	0	0	0	1
MW-0.2	5	3	2	0	0	4	1	0	0
MW-1	5	2	2	1	0	3	2	0	0
M W-5	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Table 4. Histological changes

a: The number of seminiferous tubules degenerated per section was scored.

-: 0-2, ±: 3-5, +: 6-10, ++: 11 ≤

b: –: No change, \pm : Decreased number of spermatozoa,

+: Increase in cellular debris, ++: Degenelation of epididy mal epithelia.

c: Number of cases.



CON (A, D, G, J)

TA-5 (B, E, H, K)

MW-1 (C, F, I, L)

Fig. 3. Effects of nanomaterials (titanium dioxide anatase and multi-wall carbon nanotubes) on sperm morphology by phase difference microscopic observation (A-C), particle size distribution (volume-equivalent-diameter distribution) by the particle counter (D-F) and histology of testis (G-I) and corpus epididymis (J-L) stained with H&E stain.

察

考

6種類のナノ物質の腹腔内投与において、繊維状物質の CN, MW群で死亡例が多くみられ、粒子状物質のCB, FL, TA, TR群では死亡はみられず, その組織学的観察から, 繊維状物質による強い炎症性反応が致死に関連していると 思われた. さらにTA, CN, MW群に軽度な雄性生殖器系へ の毒性がみられたが、CB, FL, TR群にはほとんどその作用 はみられなかった.これらTA, CN, MW群での雄性生殖器 系への障害作用は、変異原性・遺伝毒性物質のブスルファ ン¹⁵⁾,シクロホスファミド¹⁶⁾などに比べ非常に軽度であり, 個体間でバラツキを示した. CN, MW群の雄性生殖器系 への毒性作用は、白膜における繊維の沈着・肥厚・炎症反 応がみられることから (Fig. 3-I, L), これによる臓器重量 増加や精巣・精巣上体組織への2次的な作用とも考えられ た. TA群では,精巣,精巣上体においては白膜の肥厚・ 炎症性反応は認められず(Fig. 3-H), 肝クッパー細胞や縦 隔リンパ節のマクロファージで粒子の貪食像が示されたこ とから、投与した粒子が精巣に血行性・リンパ行性に移行 し、精細管の精上皮の変性、特にセルトリ細胞の空胞変性 を起こしたと考えられる.実際,TAの経口投与により精 巣への移行が確認されている⁸⁾. TAは酸化ストレスによる 細胞障害を起こすこと17が知られ、精巣障害についても酸 化ストレスが関係していると言われている11).精巣障害の 報告されているナノ酸化チタンでは、そのほとんどはアナ ターゼ型(TA)であり、その作用機序についてはなお不 明な点も多く、今回の実験では個体差も認められた.一般 に精巣・精子毒性を示す変異原性・遺伝毒性物質は、細胞 分裂の盛んな精原細胞や精母細胞を標的としていることが 報告されている^{15,16)}.精巣障害が報告されているTAはその ほとんどの粒子径が25 nm前後である。細胞分裂の際に形 成される分裂装置の微小管も直径約25 nmの管状構造であ るため、何らかの物理的作用も関係し、精巣障害がもたら された可能性があるのではないかと考えられる.

ナノカーボンブラックPrintex 90 (CB) については,腹 腔内投与で今回雄性生殖器系への毒性作用はみられなかっ たが,Yoshidaら^{6,7)}は我々と同一系統のマウスを用いたCB の実験で,6週齡への気管内投与や胎児期の気管内暴露に より陽性の成績を報告している.6週齡への投与実験⁶⁾で は我々の実験と投与量・投与期間はほぼ一致しているが, 投与時期や投与経路は異なっており,これらが結果の違い の一因となったのではないかと考える.

ナノ酸化チタンは白色顔料や紫外線吸収剤,光触媒など として、ナノカーボンブラックは印刷インキ、黒色塗料、 プラスチックコンパウンド、複写機およびレーザープリン ター用トナーなどとして使用され、使用範囲も拡大して、 今回使用した物質だけでなく種々の粒子径や加工品が作り 出されて来ていることから、今後それらの毒性やその作用 機序に対しても詳細な検討が必要と考える.

献

 Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N., *et al.*: *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 65-76, 2009.

文

- Fujitani, T., Ohyama, K., Hirose, A., et al.: J. Toxicol. Sci., 37, 81-89, 2012.
- Yamaguchi, A., Fujitani, T., Ohyama, K., et al.: J. Toxicol. Sci., 37, 177-189, 2012.
- Nakagawa, Y., Suzuki, T., Nakajima, K., *et al.*: Arch. Toxicol. 88, 115-26, 2014.
- 5) 小縣 昭夫, 木村 圭介, 藤原 卓士, 他:東京健安研 セ年報, **63**, 55-66, 2012.
- Yoshida, S., Hiyoshi, K., Ichinose, T., et al.: Int. J. Androl. 32, 337-342, 2009.
- Yoshida, S., Hiyoshi, K., Oshio, S., et al.: T. Fertil. Steril., 93:1695-1699, 2010.
- Gao, G., Ze, Y., Zhao, X., et al.: J. Hazard. Mater., 15, 258-259, 2013.
- Jia, F., Sun, Z., Yan, X., et al.: Arch. Toxicol., 88, 781-788, 2014.
- 10) Ahmed, F. El-K., Mohamed A. N., Ahmed A. A. B., *et al.*: *Am. J. Pharmacol. Toxicol*, **9**, 29-38, 2014.
- Meena, R., Kajal, K. and Paulraj, R.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **175**, 825-840, 2015.
- Wyrobek, A.J., Gordon, L.A., Burkhart, J.G., et al.: Mutat. Res., 115, 1-72, 1983.
- 13) Tayama, K., Fujita, H., Takahashi, H., *et al.*: *Reprod. Toxicol.*, **22**, 92-101, 2006.
- 14) Gregory, L. B., Gupta, A., Clark, M. L., *et al.*: *Toxicol. Sci.* 101, 122–131, 2008.
- 15) Creasy, D.M.: Toxicol. Pathol., 29, 64-76, 2001.
- 16) Drumond, A. L., Wenga C. C., Wanga G., et al.: Reprod. Toxicol. 32, 395–406, 2011.
- Bhattacharya, K., Davoren M., Boertz, J., *et al.*: *Particle and Fibre Toxicol.*, 6, 1–11, 2009.

Effects of Intraperitoneal Administration of Nanomaterials on the Male Reproductive Organs in Mice

Kuniaki TAYAMA^a, Yoshimitsu SAKAMOTO^a, Hiroshi ANDO^a, Fujifumi KAIHOKO^a, Yoshikazu KUBO^a, Hiroshi TAKAHASHI^a, Akemichi NAGASAWA^a, Katsuhiro YUZAWA^a, Akio OGATA^b, Dai NAKAE^{b,c}, Akiko INOMATA^a, and Masayuki KURITA^a

Six types of nanomaterials, i.e., carbon black Printex-90 (CB), fullerene C60 (FL), titanium dioxide anatase (TA), titanium dioxide rutile (TR), carbon nanofiber (CN), and multi-wall carbon nanotubes MWNT-7 (MW) suspended in sodium carboxymethyl cellulose solution, were administered intraperitoneally to 10-week-old male CD-1 mice once each week for 10 weeks. The dose levels were 1 or 5 mg/kg body weight for CB, FL, TA, and TR, and 0.2, 1, or 5 mg/kg body weight for CN and MW. The treated mice were sacrificed one week after the last dose and their reproductive organs were examined. Death was observed in the CN and MW groups. Slight changes in body weight, testicle and epididymis weights, sperm parameters (count, motility, particle size distribution curve, and morphology), and histology of the reproductive organs were observed in the TA, CN, and MW groups. However, no clear effects were observed in the CB, TR, and FL groups.

Keywords: nanomaterials, carbon black, fullerene, titanium dioxide, carbon nanofiber, multi-walled carbon nanotubes, mouse, intraperitoneal injection, reproductive toxicity, sperm parameters, count, motility, morphology, particle size distribution, testis, histology

^c Present Address: Tokyo University of Agriculture,
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,

^{3-24-1,} Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out.