

令和元年度厚生労働科学研究費補助金
(化学物質リスク研究事業)

・総括研究報告書

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

研究課題名：気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する研究
：迅速化かつ国際化に向けて

研究代表者 津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

研究要旨

毒物及び劇物取締法（毒劇法）によって指定された化合物に対する吸入曝露の評価は、多くの事業場において、安全性試験は動物を用いた経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。その理由は、吸入曝露試験専用施設とその稼働に高額な費用が必要であることによる。本研究の目的は、吸入曝露試験の絶対的な不足を補う目的で、それに代わり得る気管内投与法を開発してOECD等へ提示を目指すことにある。津田らはラットによる経気管肺内噴霧投与（TIPS）による試験法を開発し、世界に先駆けて4種の異なった形状の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）および1種のチタン酸カリウムの毒性と肺と胸膜中皮における発がん性を明らかにし、吸入曝露試験に替わる気管内投与の有用性を国内外に示してきた（吸入曝露試験の実施されたMWCNTは世界でMWCNT-7の1種のみ）。この手法を毒物劇物の有害性評価に適用できるように改良して普遍的な評価試験法として発展させようとするものである。今年度は、日本バイオアッセイ研究センターにて試験された1,4-dioxane（dxn）（化学工業溶剤・抽出に汎用・生物難分解性）をモデル物質として選び、そのLC50値51.3mg/L/4hを350gのラットへの換算値481mg/300g（ \div 1600mg/kg）と計算して、この値が「実施するモデル試験」の用量範囲に入る様に用量の試行実験を実施した。これらの実験において、分担研究者での再現確認、dxnの毒性、in vitro毒性試験、DNA障害性、次年度を考慮してfullerene whisker等についても検討した。

その結果、1時間に1回、3時間に4回（0、1、2、3時）投与した総投与量において1040mg/kgでは致死率は14.3%、1300mg/kgでは57.1%、1560mg/kgでは57.1%、2000mg/kgでは71.4%であり、生存個体は7日間観察に後致死させた。これによるLD50値は1300mg～1560mg/kgであり、JBRCの1600mg/kgに近似する値であったことから、TIPS法のモデルとして有用である可能性が示された。

研究分担者

内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学分野 准教授
大西 誠 独立行政法人労働者健康安全機構日本バイオアッセイ研究センター・試験管理部・分析室技術専門役
伴野 勸 愛知医科大学医学部・感染・免疫学講座 助教
魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科・環境リスク評価学・准教授

研究協力者

David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

沼野 琢旬 名古屋市立大学津田特任教授研究室 研究員

飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

Dina Mohammed Saleh 名古屋市立大学大学院医学研究科博士課程

A. 研究目的

空気中の化学物質は不可避免的に体内に取り込まれるため、事業場における気中物質の安全性の評価と管理は重要である。わが国でも毒物及び劇物取締法（毒劇法）により指定された多数の化合物の毒性評価は、

経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。また、GHSに記載されている物質には実際必要な吸入曝露試験が実施されているものは非常に少ない。発がん性についてはWHO/IARCでは今までに1000種以上の環境物質・要因について危険度を分類をしているが、そのうちヒトに吸入曝露リスクのある物質・要因の約25%は吸入曝露試験以外の投与方法によって代替されている。その理由は、吸入曝露試験には大規模な専用施設とその稼働に高額な費用が要求されるためである。

本研究の目的は、吸入曝露試験の絶対的不足を補う目的で、実施容易な気管内投与法を開発して国内外において標準的試験法としての採用を提案することにある。申請者はラットにおける気管内投与法によって、ナノサイズの炭素・金属繊維や粒子の障害性について「経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)」を開発し、世界に先駆けて5種の異なった形状のカーボンナノチューブと一種のチタン酸カリウムの肺または胸膜中皮における発がん性を見出し、吸入曝露試験に替わる気管内投与の有用性を国内外に示してきた。これは、OECD TEST GUIDELINE: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON INHALATION TOXICITY TESTING #39 (p59) に引用され、また Archives of Toxicology, Particle and Fibre Toxicology (5-Year IFは夫々6.04および8.40)等に掲載されるようになり、気管内投与の有用性が認められつつある。実施あたって技術的な考慮から液状物質、固形体等をまず試行検体として選び、日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)にて吸入曝露試験においてLC50の得られている1,4-dioxane (dxn) について、そのTIPS投与による毒性評価方法について検討した。

B. 研究方法

1) *in vitro* 毒性試験及び、2) ラットを用い経気管肺内噴霧投与(TIPS)法による投与実験を行った。

① *in vitro* 毒性試験：

ヒト肺がん由来のA549細胞を用いてdxnを100、200mg/mLを培地に加えて、neutral redの取り込みを指標として60分までの取り込み率を算定した。

② ラットを用いた *in vivo* 試験：

ラットの肺1回換気量、呼吸数、体重等を勘案して、JBRCにおける吸入曝露試験の実施されたdxnを選び、そのLC50に相当する値の得られる条件をTIPS法における投与用量、投与回数、投与時間(回数)について検討した。

1) 11-12週齢のF344雄性ラット(330-350g)を用いた。検体は蒸留水中にて超音波ブレンダーによる分散処理をした直後に投与した。日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)におけるラット6400ppm/6h/day/L/4hの13週の吸入曝露試験においてLC50値は51.3mg/L/4hであったことから、吸入量を350gラットに換算して481mg/300gラット(≒1600mg/kg)を得た。これを目安にしてTIPS法に於ける用量設定と投与手順について、最適条件を探索した。

2) 実験デザインは、dxnを、11-12週齢雄ラット(330-350g)11日間に6回(0、3、5、7、9、11日目)投与した。用量は10、25、50、75、100、152、175、200mg/ラット×6回となる様に投与してLD50値の得られる投与量を検定した(各群2匹)。

3) 上記の結果に基づき、新たに急性肺障害による斃死が少なく、腎、肝に対する毒性の観察され得る用量と投与期間、回数を検討するためにラット1匹あたりの総投与量:200、300または400mg/ラット(=50、75、100mg/ラット×4回投与)と設定して投与終了後最長11日まで観察した。以下の投与を行ってLD50値を求めた。

1時間に1回(計3時間で投与終了)

3時間に1回(計12時間で投与終了)

12時間に1回(計48時間で投与終了)

1日1回(計4日で投与終了)

以上から、生存率、肺・腎障害の程度を評価した。

この結果、 の全モデルにおいて生存率は100%であり、そのうち、 のモデル3時間に4回(0、1、2、3時)で投与した方法において肺障害が軽微で、アポトーシスカウントでみる腎尿細管上皮障害はもっとも顕著であった。

4) 以上から得られた致死用量に基づき、以下の投与におけるLD50値を ~ の方法における結果から投与終了までの致死率(LD)より求めた。

溶媒 LD=0

240mg/kg×4回(960mg/kg) LD=0

320mg/kg×4回(3回計960mgで1匹死亡、4回総投与量1040mg/kg) LD=1/7

400mg/kg×4回(400mg1回で1匹死亡 残り3匹は300mg/kg×3回 4回総投与量1300mg/kg) LD=4/7

480mg/kg×4回(480mg1回で1匹死亡 残り3匹は360mg/kg×3回、4回総投与量1560mg) LD=4/7

560mg/kg×4回(560mg1回で1匹死亡 残り3匹は420mg/kg×3回 4回総投与量1560mg) LD=5/7

以上の ～ のグループのうち、JBRCの吸入曝露実験のLC50に近似のLD50（投与終了時）を得るグループ抽出した。

（倫理面の配慮）

本研究における倫理面への配慮については、各班員は「動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日、法律第105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)を遵守するとともに、当該法令の規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる研究は行わない。

C. 研究結果

① *in vitro* 毒性試験：

neutral redの取り込み率は、200mg/mLではすべての時間で10%以下、100mg/mLでは1分～30分までは70～80%、60分で50%であった。これを体重300gのラットの肺容積10mLに単純換算すると1000mg/肺となり、投与後60分の50%致死量(LD50)はおよそ1000mg/300g以下とされた。

② ラットを用いた *in vivo* 試験：

最終的な実験モデルの決定に至った上記方法4)の結果、総投与量において1040mg/kgでは致死率は14.3%、1300mg/kg、1560mg/kgでは57.1%、2000mg/kgでは71.4%であった。すなわち、LD50値は1300mg～1560mg/kgであることが分かった。現在、1時間に1回(0, 1, 2, 3時)計3時間に4回で投与終了後、生存ラットについては7日後に屠殺剖検して、血清生化学的検査と臓器の病理学的変化について検討している。

D. 考察

比較的毒性の強いdxnの評価において、投与間隔をおいた気管内投与の実験では肺に対する蓄積毒性が顕著にみられ、それによる投与終了中または終了後の斃死率が高いことが分かった。これに基づいて、dxnについて予備試験で得られたLDより低い用量で検討した結果、LD50域は1300mg/kg(400×1+300×3)～1560mg/kg(480×1+360×3mg)であることが分かった。この値はdxnの吸入曝露におけるLC50値(≒1600mg/kg)に近似するもので、本方法の1時間に1回(0, 1, 2, 3時間経過時)計4回投与し、さらに生存ラットについては週間経過観察する方法

が最適である事がわかった。

E. 結論

これにより、比較的毒性の強い物質の吸入毒性LC50値に近い用量にて実施した気管内投与の実験では、意外であるが短期間投与の方が生存率が高く、この方法においてJBRCの吸入曝露試験によるLC50に近似するLD50値が得られることが分かってきた。

この結果に基づき、吸入毒性の報告されている以下の各種の検体：fullerene whisker、acrolein、1,2-dichloropropane、dichloromethane、N,N-dimethylformamide、tetrachloroethylene、glycidol、xyrol、(nanowhisker)、acrylic acid polymer (neutralized, cross-linked)等について検証を実施してデータの集積を重ねつつ短期の全身臓器の変化も観察し得る手法を構築する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitrate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration, *Particle and Fibre Toxicology* <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0316-2> 16:34, 2019.
2. Tsuda, H., Alexander D. Development of intratracheal intrapulmonary of spraing (TIPS) administration as a feasible assay method for testing the toxicity and carcinogenic potential of multiwall carbon nanotubes, *In Vivo Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials*, Toru Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, *In Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine*, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp145-163, 2019, DOI:10.1007/978-981-13-8433-2
3. Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A, Naiki-Ito A.,

- Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats, *Cancer Sci.*, 110 (8): 2485-2492, 2019
4. Fukamachi, K., Hagiwara Y., Futakuchi M., Alexander DB., Tsuda H., Suzui M. Evaluation of a biomarker for the diagnosis of pancreas cancer using animal model. *J Toxicol. Pathol.*, 32(3):135-141, 2019
 5. Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, *Arch. Toxicol.*, 93(4): 909-920, 2019
 6. Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, *Arch. Toxicol.*, 93: 49-59, 2019
 7. Yeewa R, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients*. 12: pii: E558, 2020.
 8. Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagayasu Y, Nagai T, Etani T, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. *Cancer Sci*. 111:1165-1179, 2020.
 9. Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*. *in press*
 10. Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology*. *in press*
 11. Suzuki S, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Akagi J, Cho Y.M, Ogawa K, Takahashi S. Dimethylarsinic acid may promote prostate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*. 32:73-77, 2019.
 12. Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy. *J Clin Med*. 8, pii: E442, 2019.
 13. Yamazaki T., Inui Masanori., Hiemori K., Tomono S., Itoh M., Ichimonji I., Nakashima A., Takagi H., Biswas M., Izawa K., Kitaura J., Imai T., Sugiura N., Tateno H., Akashi-Takamura S. Receptor-destroying Enzyme (RDE) From *Vibrio cholerae* Modulates IgE Activity and Reduces the Initiation of Anaphylaxis. *J. Biol. Chem.*, 294 (17), 6659-6669 (2019).
 14. Hagihara M., Kuroki Y., Ariyoshi T., Higashi S., Fukuda K., Yamashita R., Matsumoto A., Mori T., Mimura K., Yamaguchi N., Okada S., Nonogaki T., Ogawa T., Iwasaki K., Tomono S., Asai N., Koizumi Y., Oka K., Yamagishi Y., Takahashi M., Mikamo H. *Clostridium Butyricum* Modulates the Microbiome to Protect Intestinal Barrier Function in Mice With Antibiotic-Induced Dysbiosis. *iScience*, 23(1):100772 (2020).
 15. Nakashima A., Tomono S., Yamazaki T., Inui M., Morita N., Ichimonji I., Takagi H., Nagaoka F., Matsumoto M., Ito Y, Yanagishita T., Miyake K., Watanabe D., Akashi-Takamura S. Phospholipase A2 From Bee Venom Increases Poly(I:C)-induced Activation in Human Keratinocytes. *Int Immunol*, dxaa005 (2020).
 16. Kurokawa Y, Fujii G, Tomono S, Miyamoto S, Hamoya T, Takahashi M, Narita T, Komiya M, Kobayashi M, Higami Y, Mutoh M. The Radical Scavenger NZ-419 Suppresses Intestinal Polyp Development in Apc-Mutant Mice. *J. Clin. Med.*, 9(1):270 (2020).

17. Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, and Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Arch Toxicol.* 93: 3617-3631, 2019.
18. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, and Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. *Mutagenesis.* 34: 279-287. 2019.
19. Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, and Wanibuchi H. Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. *J Toxicol Sci.* 44: 681-691. 2019.
20. Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Tago Y, Kakehashi A, and Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks. *J Toxicol Pathol.* 32: 127-134. 2019.
21. Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatsu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, and Wanibuchi H. Acetoaceto-o-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats. *Toxicol Sci.* 169: 456-464. 2019.
- inhibition of androgen receptor splice variant, 第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
5. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智。去勢抵抗性前立腺癌における androgen receptor splice variant の役割と microRNA による制御機構、第 36 回日本毒性病理学会、世田谷(2020 年 2 月)
6. 内木綾。非アルコール性脂肪肝炎・肝線維症に対する細胞間コミュニケーションの役割と予防剤の探索、第 93 回日本薬理学会年会、横浜(2020 年 3 月)
7. 大西誠、後藤裕子、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、武田知起、東久保一郎、菅野純。フィルター捕集したカーボンブラックの HPLC を用いた微量定量法の開発。第 92 回日本産業衛生学会、名古屋。令和元年 5 月
8. 加納浩和、笠井辰也、齋藤新、平井繁行、鈴木正明、梅田ゆみ、妹尾英樹、大西誠、竹内哲也、三角恭兵、福島昭治、菅野純。メタクリル酸ブチルのラット及びマウスへの吸入ばく露による発がん性及び慢性毒性。第 92 回日本産業衛生学会、名古屋。令和元年 5 月
9. 大西誠、東久保一郎、後藤裕子、川本俊弘、菅野純。HPLC を用いたカーボンブラック粉塵の微量定量法の開発。第 59 回日本労働衛生工学会、福島。令和元年 11 月。
10. 伴野勤、長岡史晃、一文字功、山崎達也、乾匡範、高木秀和、伊藤誠、高村祥子。「Ceramide phosphoethanolamine による Arginase-1 発現誘導」第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019 年 9 月 19 日

2. 学会発表

1. Tsuda H., Demonstration of the carcinogenicity of a flexible tangled multi-walled carbon nanotube in the rat lung, AACR サテライトミーティング-Environmental Carcinogenesis: Potential Pathway to Cancer Prevention, Charlotte (USA) 2019 年 6 月
2. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、山下依子、高橋智。Luteolin は RNA サイレンシングによる AR-V7 制御により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第 108 回日本病理学会、千代田(2019 年 4 月)
3. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智。Luteolin は RNA サイレンシングによる AR-V7 制御により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第 26 回日本がん予防学会総会、札幌(2019 年 6 月)
4. Aya Naiki-Ito, Taku Naiki, Hiroyuki Kato, Yoriko Yamashita, Satoru Takahashi. Chemotherapeutic effects of luteolin on castration-resistant prostate cancer through
- Tomono S., Yamazaki T., Inui M., Akashi-Takamura S. 「Ceramide phosphoethanolamine, a sphingomyelin analog prevents NO production in bone marrow-derived macrophages」第 48 回日本免疫学会学術集会、浜松、2019 年 12 月 11 日
12. 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機。BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討。第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、平成 31 年 2 月。
13. 鰐淵英機、魏民。In vivo 発がん物質短・中期検出法の開発 第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島。令和元年 6 月。
14. 魏民、藤岡正喜、大石裕司、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機。ジフェニルアルシンの胎仔期ばく露におけるマウス肝発がん性の検討。第 78 回日本癌学会学術総会、京都。令和元年 9 月。

15. 鰐淵英機，魏民．芳香族アミンによる職業性膀胱がんに関する最新知見．第 78 回日本癌学会学術総会，京都．令和元年 9 月．
16. 魏民．機能性食品の安全性評価 第 35 回食品化学シンポジウム，東京．令和元年 11 月．
17. Gi M. Novel *in vivo* Bioassays for Prediction of Chemical Carcinogenicity, The 3th Chinese Pharmaceutical Association-Society of Toxicologic pathology (CPA-STP) Meeting, Shu Zhou, China. 2019, 11.

H．知的所有権の取得状況

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし