

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)
分担研究報告書

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

分担研究課題名: 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-動物実験および
データ管理・統括

研究分担者: 津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

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

研究要旨

労働環境における有害物質、例えば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、有害性の評価のための吸入曝露試験には専用施設と高額な稼働費用が要求されることから、実際には経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されているために正確なリスク評価は困難である。本研究の目的は、吸入曝露試験データの不足を補う目的で、実施容易な気管内投与法を開発してOECD等への提示を目指すことにある。申請者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カーボンナノチューブと1種のチタン酸化合物の肺・胸膜中皮における発癌性を明らかにし、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。本研究では、この手法を毒物劇物の気管内投与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、労働者健康安全機構・日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)において試験された1,4-dioxane(dxn)をモデル物質として選び、そのLC50値51.3mg/L/4hを350gラットに換算値481mg/300gとし、この値がTIPS法の用量範囲に入る様に用量、投与間隔、投与回数の設定試験を実施した。その結果、1時間に1回、計4回を3時間で投与終了する方法が、JBRCの吸入試験のLC50(1600mg/kg)に近似のLD50(1443-1560mg/kg)の得られるモデルとして有用である可能性が示された。

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。わが国で毒物及び劇物取締法(毒劇法)によって指定された多数の有害性事象のある物質についての毒性評価は経口・皮膚塗布・腹腔内投与試験等で代替されている。また、GHSに記載されている物質についても同様で

ある。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・要因について発がん性とその可能性について評価分類しているが、そのうちヒトに吸入曝露リスクのある物質・要因の25%は、動物における吸入曝露試験の実施されたものではなく、経口、皮膚塗布試験等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

模な専用施設と高額な稼働費用が要求であるためである。

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、国内外において標準試験法と実地使用を提案することにある。申請者は今までのラットにおける気管内投与法（TIPS法）を用いた実験によって、ナノサイズの炭素・金属繊維や粒子の障害性について、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癌性を見出し、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TEST GUIDELINE: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON INHALATION TOXICITY TESTING #39 (p59)に引用されて、気管内投与の有用性が認められつつある。また、TIPSを用いた我々の論文は、Archives of Toxicology, Particle and Fibre Toxicology 誌(5-Year IFはそれぞれ6.04および8.40)等に採択されるようになってきた。実施あたって技術的な考慮から液状物質、固形体にまず試行検体としてJBRCにて13週吸入曝露試験においてLC50の得られている1,4-dioxane (dxn)を選び、その毒性の評価と機序について検討した。

B. 研究方法

1) *in vitro* 毒性試験：ヒト肺がん由来のA549細胞およびマウス肺胞M 由来のRAW264.7細胞によるneutral redの取り込みを指標として細胞毒性の強度を評価した(OECD GD129を参考)。これを参考として、2)ラットを用い経気管肺内噴霧投与(TIPS)法によると投与実験を行った。ラットの肺一回換気量、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、TIPS法のLD50値との比較によってTIPS法のへの投与用量、投与回数、投与時間(回数)について検討し、BRCにて行った吸入曝露試験におけるLC50相当のLD50を得られる条件を探索した。この結果に基づき、他の物質についても同様の方法で実験を進めて、システムの信頼性を確立する。

実際には、*in vitro*毒性試験とラットを用いた*in vivo*試験(急性/慢性毒性・発がん性試験)より構成される。

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：

(1) まずは吸入曝露試験において毒性とLC50値の得られている物質を基準物質を選定してシステムの構築を立ち上げた。

11-12週齢のF344雄性ラット(330-350g)を用いた。JBRCにおける全身吸入曝露試験において毒性とLC50値の得られている物質を用いて条件の設定を構築する。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。またIARC Group 2A(動物に発がん性の十分な証拠あり)である。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、以下の実験を進めた。

(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(第0、3、5、7、9、11日)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探索した(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)

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(1時間に1回、3時間で投与終了)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。投与終了後1週間程度の観察後に屠殺するモデルが最適と考えられた。すなわち、dxnの投与は、1時間に1回(0, 1, 2, 3時間経過時)計4回投与し終了し、全身臓器の毒性をみるのが急性毒性の評価に最適であることが判った。

2) 以上の結果から得られた致死用量に基づき、以下の投与におけるD50値を求めた。LD50値の決定において、以下の ~ の方法における結果から投与終了までの致死率(LD)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
すなわち、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、LD50値は1300mg~1560mg/kgであることが分かった。死亡ラットおよび生存ラットについては7日後に屠殺剖検して、臓器変化と血清生化学的検査との関連性について検討している。

(4) 毒性発現の機序

上記の実験において致死しなかった個体について7日後に屠殺して血清と臓器について病理学的、臓器および血清の生化学的変化について検討している。

(5) R2年度の被検体について、fullerene whisker、acrolein、1,2-dichloropropane、dichloromethane、N,N-dimethylformamide、tetrachloroethylene、glycidol、xyrol、acrylic

acid polymer (neutralized, cross-linked)を選び、班員と分担して予備試験を行っている。

倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、「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、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施した。

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1000mg/300g以下と推定された。

② ラットを用いた *in vivo* 試験:

先ず投与用量・投回数・投与期間についてTIPS法にて試行を重ねた結果、予測に反して同じ用量でも短期間の投与の方に急性毒性発現が軽度である(致死率が低い)ことが判明した。これに基づいて「1時間に1回計4回、すなわち0、1、2、3時目の最初に投与する方法が最適であることを見出した。

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+360×3)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、本方法の妥当性が見えてきた。

D. 考察

これにより、比較的毒性の強い化合物の評価においてのLC50値に近い用量にて実施してきた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によって、肺を除く全身臓器における毒性評価は困難となることも観察さ

れた。一方、短期の気管内投与によって吸入曝露試験から得られたLC50に、TIPS法によるLD50値が近似である条件が分かってきた。この面での工夫と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。

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、意外に短期間投与の方が短期生存率が高く、この方法においてJBRCの吸入曝露試験によるLC50の近似値とするLD50値を得る条件が分かってきた。すなわち、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1週間経過観察する方法が最適である事がわかった。

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、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 . 研究発表

1 . 論文発表

- 1 . Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigo 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 octatitanate (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 spraying (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

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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況