

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 被検物質の DNA 障害性の解析

分担研究者 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

研究要旨

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、気中物質有害物質のリスク評価と管理は重要である。本研究は吸入曝露試験の絶対的不足を補う目的で、ラットによる経気管肺内噴霧投与 (TIPS) による試験法を毒劇法指定物質の気管内投与による毒性試験法に適用できるように改良し、普遍的な毒物・劇物の評価試験法として発展させることである。今年度は、TIPS 法による 1,4-dioxane (dxn) の気管内投与実験について、病理組織学的解析を行い、dxn の最適な投与回数及び観察期間などについて検討した。その結果、「初日に 1 時間に 1 回、4 時間で投与終了、その後 7 日間観察」が肺障害は軽微で、全身臓器における毒性評価にモデルとして最適と考えられた。

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、気中物質の安全性の評価と管理は重要である。WHO/IARC では今までに 1000 種以上の環境要因の発がん性について分類している。そのうちヒトが吸入曝露されている物質/要因の 25%は、動物試験においては吸入曝露試験で評価されていない。わが国でも毒物及び劇物取締法 (毒劇法) によって指定された化合物の多数について、各事業場における吸入毒性の判定は経口・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に吸入曝露試験が実施されているものは非常に少ない。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必要とされているからである。

これまでに申請者はラットを用いて毒物及び劇物取締法によって指定された化合物について、ナノサイズの繊維・金属粒子の「経気管肺内噴霧投与方法 (TIPS 法)」を開発し、世界に先駆けて 4 種の異なっ

た壁層のカーボンナノマテリアルチューブとチタン酸カリウムに発癌性を見出し、OECD TEST GUIDELINE: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON INHALATION TOXICITY TESTING #39 (p59)に引用されて、気管内投与の有用性が認められつつある。本研究の目的は、吸入曝露試験の絶対的不足を補う目的で、実施容易な気管内投与方法を開発して国際的標準化を目指すこと、さらに TIPS 法を毒劇法指定物質の毒性試験法として発展させるものである。

本年度では、吸入曝露試験において毒性情報と LC50 値が得られている 1,4-dioxane (dxn) をモデル物質とし、ラットを用いた TIPS 法による気管内投与実験について、病理学的解析を行い、最適な用量、投与回数及び観察期間などについて検討した。

B. 研究方法

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、dxn の LC50 値は 51.3mg/L/4h であっ

た。これをラットの肺一回換気量、呼吸数および体重等の情報から、350gラットに換算して481mg/300gラットを得た。これを目安にしてTIPS法における用量設定と投与手順について、以下の実験を実施した(津田、内木、魏、大西)。

[実験1] 11-12週齢雄ラット(330-350g)にdxnを、11日間に6回(投与日:0, 3, 5, 7, 9, 11日)投与し、肺、肝臓及び腎臓について病理組織学的解析を行った(各群2匹)。用量は10, 25, 50, 75, 100, 150, 175, 200mg/回/ラット×6回とした。

[実験2] 実験1の結果に基づき新たに急性肺障害による斃死が少なく、肝及び腎臓に対する毒性の観察され得る用量、投与期間及び回数を検討した。実施条件は下記の①～④とした。ラット1匹あたりの総投与量:200, 300または400mg/ラット(各50, 75, 100mg/回/ラット×4回投与)、観察期間は投与終了後最長11日までとした。

- 1時間に1回(計4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)

(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、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

[実験1] dxn投与量が125mg/回/ラット×6回(計750mg)では肺毒性(肺胞内出血)が軽度～中程度に見られた。しかしながら、それより高用量域(150, 175及び200mg/回/ラット×6回)では、高度の急性びまん性肺出血のために途中で死亡し、肝及び腎障害はほとんど見られなかった。よって、[実験2]を実施するにあたり、適切な総投与量は750mg以下と算定された。

[実験2] ~ の全モデルにおける生存率は100%であり、そのうち、のモデル(1時間/回/ラット、4時間で投与終了)においては、肺障害が軽微で、アポトーシス数による腎尿細管上皮障害はもっとも顕著であった。以上より、短期投与を終了し、かつ1週間程度の観察後に屠殺するのモデルが最適と考えられた。

D. 考察

以上の結果より、dxnの投与は1時間に1回(計4時間に4回で投与終了)とし、1週程度の観察期間で全身臓器の毒性を評価する条件が急性毒性の評価に最適であることが判った。この結果に基づいて、次年度では、dxnの有害作用について、以下のようなプロトコールで検討する予定である: dxnのLC50に相当する481mg/300gラットをカバーできる総用量にて1時間ごとに4回投与後8日まで観察し屠殺する。用量は、0～100%の致死率をカバーできると想定される、1回あたりの投与量が100, 110, 120, 130及び140mgとして、漸次実施する。また、今後はa rolein, 1,2-di chloropropane, di chloromethane, gly col, xyrol等についての検討を実施予定である。

E. 結論

今回、比較的毒性の強い毒劇法指定物質の評価におけるLC50値に近い用量で実施した気管内投与の実験では、想定していたよりも肺に対する直接毒性が顕著にみられ、それによって短期の斃死率が高くなり、肺を除く全身臓器における毒性評価は困難となることがわかった。この点においては、工夫とデータを蓄積しつつ手法を構築する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yu kimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujio ka M, Suzuki S, Ka lehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Na katani T, and Wanibu phi H. Promotion effects of a otoa o-to-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in

- rats. *Arch Toxicol*. 93: 3617-3631, 2019.
2. Gi M, Fujio ka M, Totsu ka Y, Matsumoto M, Masumura K, Ka lehashi A, Yamagu thi T, Fu kushima S, and Wanibu thi H. Quantitative analysis of mutageni cty and car onogeni cty of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgeni crats. *Mutagenesis*. 34: 279-287. 2019.
 3. Yoshida K, Gi M, Fujio ka M, Teramoto I, and Wanibu thi H. Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. *J Toxicol Sci*. 44: 681-691. 2019.
 4. Yamagu thi T, Gi M, Fujio ka M, Tago Y, Ka lehashi A, and Wanibu thi H. A chronic toxic study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks. *J Toxicol Pathol*. 32: 127-134. 2019.
 5. Okuno T, Gi M, Fujio ka M, Yukimatu N, Ka lehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, and Wanibu thi H. Acetoacetate-o-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats. *Toxicol Sci*. 169: 456-464. 2019.
2. 学会発表
1. 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.
 2. 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.
 3. 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酸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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし