

**厚生労働科学研究費補助金研究報告書**  
**化学物質リスク研究事業**

**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に関する研究**

令和元年度

総括・分担研究報告書

**研究代表者 津田 洋幸**

令和2年(2020年)5月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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に関する研究

( 1 9 K D 1 0 0 1 )

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

## 目 次

・ 総括研究報告書	1
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 津田 洋幸	3
・ 研究分担報告書	9
1 . 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 津田 洋幸	11
2 . 吸入暴露物質の有害性評価における経気管肺内噴霧投与法の有用性の解析 内木 綾	16
3 . 吸入暴露の方法、吸入物質の代謝についての研究 大西 誠	20
4 . 化学物質毒性評価のための酸化ストレス由来代謝物の網羅的解析 伴野 勸	22
5 . 被検物質の DNA 障害性の解析 魏 民	25
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	28

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
  11. 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。

## 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

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

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)

. 研究分担報告書



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)  
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 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

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

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  
研究: 迅速化かつ国際化に向けて

分担研究課題名: 吸入曝露物質の有害性評価における経気管肺内噴霧投与法の有用性の解析

分担研究者 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 准教授

### 研究要旨

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多いため、吸入曝露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。本研究の目的は、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として開発した経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)を、毒劇法指定物質の有害性評価に応用することにある。本年度はTIPS法による毒性評価指標の確立のため、経気道的曝露による有害性、特に発がん性が未知であるフラーレンウィスカー(FLW)と陽性対照のカーボンナノチューブ(MWCNT-7、N)をF344ラットに2週間TIPS投与し、1週間(急性毒性)の肺に対する毒性を比較検討した。また既に吸入曝露試験が実施された1,4-dioxane(dxn)をモデル物質として選択し、そのLC50値51.3mg/L/4hを換算値481mg/300gラットとし、実施するモデル試験の用量範囲に入る様に試行実験を繰り返した。その結果、肺重量、マクロファージはFLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に増加し、いずれの物質も肺胞内に残留していた。一方で、肺胞内活性酸素種(ROS)や*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl9*などのサイトカイン発現は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に増加したが、FLWでは明らかな変化を認めず、曝露物質により肺内酸化ストレスの誘発は異なり、有害性の指標になる可能性が示唆された。また、dxnについては、同様の変化について検討している。初日に1時間に1回、4時間で投与終了、その後一週間程度の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であると考えられた。

#### A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多いため、吸入曝露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。しかしながら毒物及び劇物取締法(毒劇法)によって指定された、空気中有害物質の多くは、経口、皮膚塗布や腹腔内投与など別経路の投与による動物試験により代替されている。この背景には、吸入曝露試験を実施するための特殊施設や高額な費用が関係している。

申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子

体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)を用いた試験デザインを開発してきた。本研究では、毒劇法指定物質の有害性評価を高度化および迅速化するべく、TIPS法による評価を応用することにある。

今年度は、TIPS法による毒性評価指標の確立するため、経気道的曝露による有害性、特に発がん性が未知であるフラーレンウィスカー(FLW)と発がん性を含めた有害性を以前に証明している、カーボンナノチューブ(MWCNT-7、N)をF344ラットに2週間TIPS投与し、1週間(急性毒性)の肺に

対する毒性を比較検討した。また既に日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) における吸入曝露試験にて LC50 (LC50 値 51.3mg/L/4h を、ラットの肺一回換気量、呼吸数、体重等を勘案して 481mg/300-350g ラットに換算) の得られている 1,4-dioxane (dxn) を選択し、F344 ラットを用いて TIPS 法による実験を行った。

## B. 研究方法

① FLW および陽性対照の MWCNT-7、MWCNT-N は、PF ポリマー分散液 (0.5% Pluronic F68 含有生理食塩水) に懸濁し、肺内噴霧ゾンドにより TIPS 投与する。12 週齢雄性 F344 ラットに、FLW、MWCNT-7 および MWCNT-N を、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ 62.5  $\mu$ g/0.5ml/ラットの用量で 2 週間に 8 回 (合計投与量 0.5mg/ラット) 気管内投与した。3 週間目 (投与終了後 1 週間) にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺した。肺の病理組織学的変化、増殖活性、炎症性サイトカイン発現レベルや ROS レベルを定量した。(各群 5 匹)

1) dxn を、11-12 週齢雄ラット (330-350g) 11 日間に 6 回 (合計投与量 60、150、300、450、600、750、1050、1200mg/ラット) を TIPS 投与し LD50 値の得られる投与量を探索した (各群 2 匹)。

2) 上記の結果に基づき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 4 回投与 (合計投与量 200、300 または 400mg/ラット) し、投与終了後 1 週間における肺、肝および腎障害を組織学的に解析した。

Group 1 (G1): 1 時間に 1 回、4 時間で投与終了

G2: 3 時間に 1 回、12 時間で投与終了

G3: 12 時間に 1 回、48 時間で投与終了

G4: 1 日 1 回、4 日で投与終了

(倫理面への配慮)

動物実験については、平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教

育センターのコンベンショナルエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており (H28M-45、医動 19-35)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行った。

## C. 研究結果

① 体重および肝、腎、脾、膵、脳の重量に群間差は認めなかった。肺重量は、無処置群 (絶対重量 0.96  $\pm$  0.04g、相対重量 0.32  $\pm$  0.01g) と比較して、対照群 (絶対重量 1.34  $\pm$  0.03g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.47  $\pm$  0.01g、 $P < 0.001$ )、FLW 群 (絶対重量 1.50  $\pm$  0.09g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.54  $\pm$  0.04g、 $P < 0.001$ )、MWCNT-7 群 (絶対重量 1.60  $\pm$  0.07g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.56  $\pm$  0.03g、 $P < 0.001$ )、MWCNT-N 群 (絶対重量 1.64  $\pm$  0.04g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.59  $\pm$  0.01g、 $P < 0.001$ ) で有意な上昇を認めた。また、対照群と比較して、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N 投与により、有意に増加した (いずれも  $P < 0.001$ )。肺胞内 CD68 陽性マクロファージ量は、対照群と比較して各投与群で有意に増加した (FLW:  $P < 0.01$ 、MWCNT-7、MWCNT-N:  $P < 0.001$ )。電子顕微鏡 (SEM、TEM) 観察では、肺胞内に各被検物質が確認された。一方肺における *Ccl2*、*Ccl3* および *Ccl9* mRNA 発現レベル及び ROS 量は、MWCNT-7、MWCNT-N のみ対照と比較して有意に上昇した (いずれも  $P < 0.001$ )。

1) dxn 投与量が 750mg では肺毒性 (肺胞内出血) が軽度～中程度に見られた。さらに高用量 (1050、1200mg) では、高度の急性びまん性肺出血のために実験中で死亡したため、腎、肝の障害はほとんど見られなかった。従って、合計投与量は 750mg 以下と算定され、以下の実験を実施した。

2) G1-G4 いずれも生存率は 100% を示した。G1 において、肺障害が軽微で、腎の近位尿細管上皮のアポトーシス誘導が最も顕著であった。従って、短期投与を終了し、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、1 時間に 1 回、計 4 回で投与終了後、1 週間程度における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確



7. Suzu ki S, Toyoda T, Kato H, **Nai ki-Ito A**, Yama shita Y, A lagi J, Cho Y.M, Ogawa K, Ta kaha shi S. Dimethylar snic acid may promote pro state carcinogene s sin rat s J Toxicol Pathol. 32:73-77, 2019.
8. Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, **Nai ki-Ito A**, Ta ka s H, Abdou KA, Hiro s A, Taquaha shi Y, Kanno J, Abdelhamid M, T suda H, Ta kaha shi S. Pulmonary and pleural toxicity of pota ssum octatitanate fiber s rutile titanium dioxide nanoparticle s and MWCNT-7 in male Fisher 344 rat s Arch Toxicol. 93:909-920, 2019.
9. Etani T, Nai ki T, **Nai ki-Ito A**, Suzu ki T, Iida K, Noza ki S, Kato H, Nagaya shi Y, Suzu ki S, Kawai N, Ya shi T, Ta kaha shi S. NCL1, A Highly Selective Ly sne-Specific Demethyla s 1 Inhibitor, Suppre s sCa sration-Re s s snt Pro state Cancer Growth via Regulation of Apopto s sand Autophagy. J Clin Med. 8, pii: E442, 2019.

## 2. 学会発表

1. 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)
2. 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)

3. Aya Nai ki-Ito, Ta ku Nai ki, Hiroyuki Kato, Yori ko Yama shita, Satoru Ta kaha shi. Chemotherapeutic effect sof luteolin on ca sration-re s s snt pro state cancer through inhibition of androgen receptor s splice variant, 第 78 回日本癌学会学術総会、京都(2019 年 9 月)
4. 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 s 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)
5. 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)

## 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

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  
研究: 迅速化かつ国際化に向けて

分担研究課題名: 吸入曝露の方法、吸入物質の代謝についての研究

分担研究者 大西 誠 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 技術専門役

### 研究要旨

労働環境・生活環境の多様な化学物質は、経気道的に体内に取り込まれる物質は多く、吸入曝露による健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。本研究の目的は、ナノマテリアルの繊維・粒子体の有害性試験法として開発された経気管肺内噴霧投与方法(TIPS 法)を用いて、有害性評価に適応することにある。令和2年度はTIPS法による毒性評価指標の確立を行うため、経気道的曝露による有害性、特に発がん性が未知であるフラレンウィスカー(FLW)をF344ラットに2週間TIPS投与し、1週間の肺に対する沈着状態について検討した。また既に吸入曝露試験が実施された1,4-dioxane(dxn)をモデル物質として選択し、その肺内濃度の測定方法について検討した。その結果、FLWは顕微鏡所見において肺胞腔においてマクロファージに取り込まれ、一様に分布していた。また、電顕においてFLWはバルクと同様な表面が凹凸形状で観察された。

#### A. 研究目的

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方法を開発してOECD等へ提示を目指すことにある。

申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)において研究代表者と共同でカーボンナノマテリアルの沈着と肺毒性について研究してきた。

今年度は、フラレンウィスカー(FLW)と発がん性を含めた有害性をTIPS投与にて短期に検索す

るモデルの開発のために肺内チンチャクと障害作用について、検討を進めてきた。

#### B. 研究方法

実験① FLWは、PFポリマー分散液(0.5% Pluronic F68 含有生理食塩水)に懸濁し、肺内噴霧ゾンデによりTIPS投与した。12週齢雄性F344ラットに、FLWを、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ62.5 µg/0.5ml/ラットの用量で2週間に8回(合計投与量0.5mg/ラット)気管内投与した。3週間目(投与終了後1週間)にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺した。肺はホルマリン固定後、一部を凍結切片を作成し、標本の観察を実施した。また、一部を5%硝酸液によりマイクロウェーブで60分、150℃で溶解しフィルター濾過し、SEMにより観察を行った。

実験 dxnを、11-12週齢雄ラット(330-350g)11日間に6回(合計投与量60、150、300、450、600、750、1050、1200mg/ラット)をTIPS投与し、解剖時に取り出

した肺を酵素(プロテイナーゼK)により37℃、一晚、溶解検討を行った。さらに難分解性である1,4-dioxane (dxn) について肺内沈着の計測について検討始めた。

### C. 研究結果

実験① FLW の凍結切片の標本について顕微鏡で観察した結果、肺胞腔にマクロファージに取り込まれた FLW が確認された。FLW は、肺中で均等に分布していた。さらに、組織標本を作成し、標本の観察を実施した。また、SEM 観察において肺中から、太さは約 350nm、長さは約 3 $\mu$ m の FLW が認められた。表面状態は、バルクと同様に若干の凹凸が認められた。

実験 dxn 投与肺の溶解度に関して検討した結果、肺の茶褐色成分が残留しており、この成分中に dxn 成分が残留していることが考えられた。従って、次回は酵素の種類を変更して溶解する予定である。

### D. 考察

FLW はフラーレン同士が分子間力により結合した結晶である。従って、フラーレン同様、FLW はキシレンに対する溶解度は高い。通常、パラフィン切片では、洗浄工程でキシレンを用いて洗浄するが、この工程では、FLW が溶解して、標本に残らない。従って、今回の FLW における標本は凍結切片を用いることにより、FLW の残留が肺中に認められた。このことから、肺内の FLW 等の特定の有機溶媒に溶解するナノマテリアルを観察するためには、肺処理溶媒について事前検討が必要である。また FLW の SEM 観察結果より、肺内に沈着した FLW の表面はバルクと同様であり、今後、肺内に 2 年間沈着した様子 FLW 構造変化を観察する必要がある。さらに、FLW の肺内の沈着量を定量的に評価する必要があり、今後実施する予定である。また、TIPS 投与した dxn、肺の溶解はさらに完全に溶解する条件検討が必要である。

### E. 結論

ラット短期間気管内投与モデルを用いて、フラーレ

ンウィスカーの肺内の沈着状態について検討した。その結果、肺胞腔にマクロファージに取り込まれた FLW が確認され、肺中で均等に分布していた。SEM 観察において肺中から、表面が凹凸の、太さは約 350nm、長さは約 3 $\mu$ m の FLW が認められた。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  1. 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．2019 年 5 月
  2. 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．2019 年 5 月
  3. 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．2019 年 11 月．

### 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

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: 化学物質毒性評価のための酸化ストレス由来代謝物の網羅的解析

分担研究者 伴野 勸 愛知医科大学 医学部 感染・免疫学講座

## 研究要旨

経気管肺内噴霧投与(TIPS)による試験法を用いた空気中の化学物質の吸入曝露に伴う毒性評価のための *in vitro* 毒性試験について質量分析計を用いた活性カルボニル化合物(RCs)の網羅的解析によって評価した。ヒト肺がん細胞 A549 に試行検体として 1,4-dioxane(dxn)を曝露させた結果、対照群と比較して dxn 曝露による酸化ストレス由来の RCs の生成が確認された。Dxn 曝露によって高値を示した RCs には、強い細胞傷害性が報告されている glyoxal や crotonaldehyde、2-hexadecenal が含まれていた。RCs の生成を測定することで、酸化ストレスを評価することが出来、また、化学物質曝露による毒性評価に利用することが出来ると考えられた。

### A. 研究目的

ラットによる経気管肺内噴霧投与(TIPS)による試験法を用いた空気中の化学物質の吸入曝露に伴う毒性評価に関して、化学物質曝露に伴い産生される活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)に着目した。しかし、ROS や RNS は半減期が非常に短く、それ自体を安定的に測定することは難しい。そこで本研究では、ROS や RNS と脂質やタンパク質、アミノ酸、核酸などの生体構成成分が反応し、生成された代謝物であるアルデヒドやケトン基を有する種々の活性カルボニル化合物(Reactive carbonyl species; RCs)生成を質量分析計を用いて測定することで、化学物質の酸化ストレスによる毒性評価を行った。本年度は培養細胞を用いた *in vitro* における RCs 産生を測定した。

### B. 研究方法

ヒト肺がん由来培養細胞 A549 に 1,4-Dioxane (dxn)

を 0, 100, 500, 1000 ppm になるように曝露し、24 時間後に培養上清および細胞を回収した。そのうち、200  $\mu$ L の培養上清から RCs を含む脂溶性画分を抽出した。脂溶性画分は RCs と特異的に反応する dansyl hydrazine (DH) で誘導体化した。得られた RCs-DH 誘導体を LC/MS 解析試料とした。RCs-DH 誘導体は、DH 誘導体に特徴的なフラグメントイオン  $m/z$  236.1 という特徴的なフラグメントを利用した UHPLC/Triple TOF/MS により網羅的解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、培養細胞を用いており、倫理面で配慮が必要となるヒト検体や動物等は使用していない。

### C. 研究結果

試行検体として dxn の A549 に対する *in vitro* 毒性試験を酸化ストレスに伴う RCs 生成解析によって評価

した結果、培養上清中の RCs は dxn 0 ppm で 406 peaks、100 ppm で 377 peaks、500 ppm で 408 peaks、1000 ppm で 396 peaks 検出された。また、dxn 曝露群と対照群を比較すると、100 ppm では 377 peaks 中 142 peaks、500 ppm では 408 peaks 中 200 peaks、1000 ppm では 396 peaks 中 205 peaks と dxn 曝露濃度依存的に高値を示していた。対照群と比較して dxn 曝露によって高値を示した RCs には、強い細胞傷害性が報告されている glyoxal や crotonaldehyde、2-hexadecenal が含まれていた。また、dxn 1000 ppm 曝露群では benzaldehyde が有意に増加していた。

#### D. 考察

A549 細胞において Dxn 曝露依存的な酸化ストレスによって RCs の生成が確認できた。このことから、化学物質曝露による酸化ストレスを RCs の網羅的解析によって評価することができると考えられる。また、RCs は化学構造にアルデヒド基やケトン基など DNA のアミノ基に容易に付加反応し、突然変異を誘導することで発がんを誘発することが知られている。今後は、化学物質そのものの代謝物や DNA 付加体も含めて、*in vitro*、*in vivo* における毒性を評価する。

#### E. 結論

本研究では、*in vitro* 毒性試験の評価方法として酸化ストレスに伴う脂質やアミノ酸酸化分解物である活性カルボニル化合物 (RCs) の網羅的解析法を用いた。試行検体として dxn を用いた評価では、曝露によって生じた RCs 生成を測定することが出来た。今後、*in vitro*、*in vivo* 検体を用いて RCs 生成や DNA 付加体などその他代謝物を測定することで、毒性発現機序の一部が明らかとなることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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).

2. 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).
3. 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).
4. 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).

##### 2. 学会発表

1. 伴野勸、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. 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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
該当項目なし

2. 実用新案登録  
該当項目なし

3. その他  
該当項目なし

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, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, and Wanibu chi H. Promotion effects of a toa 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. Acetazolamide 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

## . 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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,	Takebayashi T., Landefeld R., Gamo M.	In Vivo Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials	Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd)	Singapore	2019	145-163

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Takahashi 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	16	34	2019
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	2485-2492 ( 8 )	2019
Fukamachi, K., Hagiwara Y., Futakuchi M., Alexander DB., Tsuda H., Suzui M.	Evaluation of a biomarker for the diagnosis of pancreatic cancer using animal model.	J Toxicol. Pathol.	32(3)	135-141	2019

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
Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokle OM., Nasem AM., Tsuda H.	Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats	Arch. Toxicol	93	49-59	2019
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 E 558	2020
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
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		<i>in press</i>	2020
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		<i>in press</i>	2020

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
Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozakura 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
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., Tatenoko H., Akashi-Takamura S.	Receptor-destroying Enzyme (RDE) From <i>Vibrio cholerae</i> Modulates IgE Activity and Reduces the Initiation of Anaphylaxis.	J. Biol. Chem.	294 (17)	6659-6669	2019
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.	<i>Clostridium Butyricum</i> Modulates the Microbiome to Protect Intestinal Barrier Function in Mice With Antibiotic-Induced Dysbiosis.	Science	23(1)	100772	2020
Nakashima A., Tomono S., Yamazaki T., Inui M., Morita N., Ichimonji I., Takagi H., Nagaoaka 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	doi:10.1093/intimm/dxaa005	2020

Kurokawa Y, Fujii G, Tomono S, Miyamoto S, Hamoyama T, Takahashi M, Narita T, Komiya M, Kobayashi M, Higami Y, Mutoh M.	The Radical Scavenger NZ-4119 Suppresses Intestinal Polyp Development in Apc-Mutant Mice.	J. Clin. Med.	9(1)	270	2020
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
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
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
Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Tagano 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
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

令和2年 3月 27日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 津田特任教授研究室・特任教授  
(氏名・フリガナ) 津田 洋幸 (ツダ ヒロユキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	名古屋市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関： )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容： )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2年 3月 27日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学  
所属研究機関長 職名 理事長  
氏名 郡 健二郎



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 名古屋市立大学 医学研究科 准教授  
(氏名・フリガナ) 内木 綾 (ナイキ アヤ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関： )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容： )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年 3月 31日

厚生労働大臣 殿

機関名 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  
 所属研究機関長 職名 所長代理  
 氏名 相 磯 成 敏



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 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  
(氏名・フリガナ) 大西 誠

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	<input checked="" type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関： )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容： )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

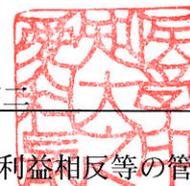
2020年3月27日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 愛知医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 佐藤 啓二 印



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医学部 感染・免疫学講座・助教  
(氏名・フリガナ) 伴野 勸・トモノ ススム

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関： )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容： )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2020年 3月 27日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 大阪

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 西澤 良記



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学研究科 准教授  
(氏名・フリガナ) 魏 民 (ギ ミン)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関： )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由： )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容： )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。