

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2年度 総括研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

令和3年（2021年）5月

目 次

I. 総括研究報告書

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
津田 洋幸	

II. 研究分担報告書

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 -動物実験およびデータ管理・統括に関する研究	
津田 洋幸	9
2. 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に関する研究	
内木 綾	15
3. 経気管肺内噴霧投与試験物質(7種)のキャラクタリゼーションに関する研究	
大西 誠	19
4. 多層カーボンナノチューブ曝露による活性カルボニル化合物産生とDNA付加体形成に関する研究	
伴野 勸	27
5. 被検物質のDNA障害性の解析に関する研究	
魏 民	30

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	32
---------------------	----

令和2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

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

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毒性評価は、高額な費用が要求されるために実際には別ルートの経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。本研究の目的は、毒性特にLD値において吸入曝露試験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、4種の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）および1種チタン酸カリウム線維の毒性と、肺と胸膜中皮における発がん性を世界に先駆けて明らかにし、TIPS法の有用性を世界に示してきた（MWCNT類の吸入曝露試験は後日に発表された世界で唯一日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）にて実施されたMWCNT-7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。手法の開発においてはJBRCにて試験された1）1,4-dioxane（化学工業溶剤・生物難分解性）をモデル物質として選び、3時間に4回（開始時、1、2、3時間後）投与して2週間までのLD50値は総投与量において1300mg～1560mg/kgの範囲にあり、JBRCにおける吸入曝露試験のLC50値1600mg/kgに近似する値であった。この結果に基づき、用量設定において① *in vitro* におけるneutral red 取り込み試験で A549細胞を半数死滅させる用量に基づきTIPS投与用量を算定し、その用量域とOECD、Handbook of Toxicologyおよび企業の「安全データシート」等の4時間吸入曝露 LC50(4h) 値を参考にして② TIPS投与によるLD50値を求めた。その結果、OECD等のLC50(4h)と得られたTIPS LD50の上限値の比率は、1,4-ジオキサン：1（R1年度報告）、2）グリシドール：1.7～2.4、3）N,N-ジメチルホルムアミド：3.0～3.9、4）アクリル酸ポリマー：1（吸入曝露の範囲内）、5）アセチルアセトン：2.0～3.6、6）エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート：1（吸入曝露の範囲内）、7）N,N-ジメチルアセトアミド：1.9～3.8であった。アセチルアセトン、N,N-ジメチルアセトアミド、N,N-ジメチルホルムアミドは最大4倍であった。これはより細かな用量設定によって解決できると考える。以上から本法の実用性が明らかとなってきた。次年度ではさらに多くの検体（10検体を予定）について検証を重ねて実用化への提案を行う。

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

物及び劇物取締法」（毒劇法）によって指定された大多数の化合物の毒性評価は、経口投与・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。また、国際的にもGHS（Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals）に記載されている物質にも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要求されるためである。

A. 研究目的

空気中の化学物質は不可避免的に肺から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。しかしながらわが国でも「毒

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、直径がナノサイズの炭素線維・金属線維や粒

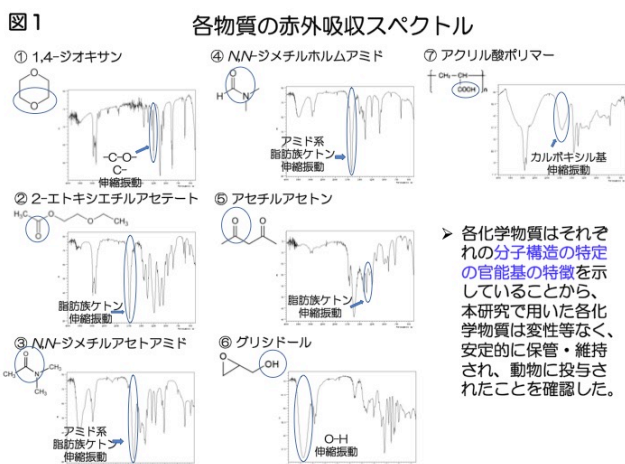
子の障害性について「経気管肺内噴霧投与方法（TIPS法）」を開発し、世界に先駆けて4種の異なった形状のカーボンナノチューブと一種のチタン酸カリウムの肺または胸膜中皮における発がん性を見出し、吸入曝露試験に替わる気管内投与の有用性を国内外に示してきた。これは、OECD TEST GUIDELINE: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON INHALATION TOXICITY TESTING #39 (p59)に引用され、また Archives of Toxicology, Particle and Fibre Toxicology (2019-20 IF は夫々 5.6 および 6.9) 等に掲載されるようになり、TIPS 投与の有用性と実用性が世界に認められつつある。実施にあたって技術的な考慮からまず液状物質、固形体等を検体として選び、主に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の得られている物質について、その TIPS 投与による評価方法の妥当性について検討した。

B. 研究方法

投与物質の検定

本研究に用いた各化学物質の持つ特有の物理化学的及び化学構造の特性を明確にするために、各物質の赤外分光分析を行い、動物に投与した化学物質のキャラクタリゼーションを実施した。各物質をミニ油圧プレス（株式会社 ST ジャパン 181-1410）により KBr カッティングシートにより測定用錠剤を作成し、赤外分光分析（梶島津製作所 IR Affinity-1）により $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ ($0.00025\text{cm}\sim 0.0025\text{cm}$) の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、各化学物質特有の官能基の吸収バンドから各化学物質の特定を行った。

図1：投与物質の検定



① *in vitro* Neutral red 毒性試験：

Neutral red 試験は急性経口毒性試験における動物使用数を削減するように改良された代替法として、

OECD から固定用量法 (TG420)、急性毒性等級法 (TG423) 等が経口投与代替法 (候補) として推奨している。OECD ガイドライン等における検体の4時間吸入曝露量の LC50 (LC50 4hr) の ppm 値を mg/ml に換算し、得られた値を培養液中の検体投与量 (mg/ml) に変換して (変換式 図2)、Neutral red の取り込によって検体の A549 細胞に対する LD50 を求めた。

図2

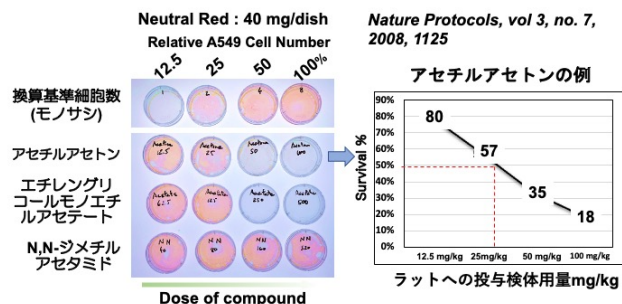
培養液中の検体の投与量 (mg/ml) =

$$\left[\text{吸入検体の濃度 (ppm)} \times \frac{\text{検体の分子量}}{24.45 \text{ (1 Molあたりの気体の体積)}} \times \frac{\text{m}^3}{10^6 \text{ mL}} \times \text{毎分換気量} \times \text{曝露時間 (分)} \right] \div 1.1 \text{ ml (1呼吸当たりの空気量)}$$

(図3)

図3 Neutral red 肺細胞取り込み試験

A549がん細胞培養液に検体を加え1時間後に検体の無い培養液に交換して肺がん細胞のNeutral red の取り込み率 (=生存率) を計測する



* Repetto, G. et al., Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols, 7, 1125, 2000

② *in vivo* 試験：

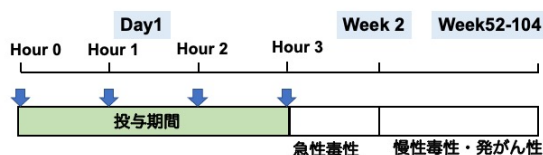
R1 年度において投与方法についての1) 1,4-ジオキサソ (DOX) を用いた結果より、3時間に4回 (0、1、2、3時) で投与する方法を開発してきた。Neutral red 試験における A549 細胞の LD50 を示す培地中の検体の値 (mg/L) から、各用量2匹の10用量程度による TIPS 予備試験の LD50 値を求め、これより TIPS 本試験にて4~5用量を設定し、この1/4量を3時間に4回に分けて投与した。

予備試験では*in vitro* 暫定LD50を挟む約10段階の用量 (mg/g) にて1投与群2匹にてLD値 (LD50ではない) を求めた。次にこの値を挟む4～7用量にて各用量群7～10匹にてLD50値を求めた。用量は公比2～3を基準として設定した (図4)。

図4

投与方法

Neutral red 試験におけるA549細胞のLD%50を示す培地中の検体の値 (mg/L) から、各用量2匹の10用量程度によるTIPS予備試験のLD50値を求め、これからTIPS本試験にて4～5用量を設定し、この1/4量を3時間に4回に分けて投与した。



③ さらに投与終了後2週にて2～3匹を屠殺して、気管枝肺胞洗浄液 (BALF) の炎症細胞数と血清の生化学検査も行っている。また生存したラットの最高濃度投与群の2ラットは2週後に屠殺した。残りのラットは慢性毒性・発がん性の観察のためにそのまま無処置にて飼育している。

以下に検体の用途・毒性・発がん性等を示す

- 1) 1,4-ジオキサン (報告済み) : 洗剤用品原料、溶剤、脳・肝・腎障害、IARC Group 2B
- 2) グリシドール (Gly) : 天然油脂、ビニル樹脂安定剤、肝障害、IARC Group 2A
- 3) *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) : アクリル樹脂の合成、肝障害、IARC Group 2A
- 4) アクリル酸ポリマー (PAP) : 肺障害・洗剤、顔料・水処理、IARC G3
- 5) アセチルアセトン (ACA) : 接着剤原料、溶剤、吸引毒性、発がん性データ無し
- 6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (酢酸2-メトキシエチル) (EGMA) : 塗料、インキ、血液・精巢毒性、発がん性データ無し。
- 7) *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA) : 反応溶媒、肝腫瘍発生 (日本バイオアッセイセンター)、IARC G2B

なお、5) のアセチルアセトン (ACA)、6) のエチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (EGMA)、7) の *N,N*-ジメチルアセトアミドについ

ては、肺・気管病変と内炎症細胞解析・肝・腎・副腎・脾・睾丸の病理学的変化に加え、新たに血清生化学的検査・気管肺胞洗浄液急性炎症変化についても検討した。

さらに、追加化合物として以下の物質について Neutral red 試験を終了し用量を算定している。

- 1) アクロレイン
- 2) アクリル酸
- 3) アクリル酸メチル
- 4) 1,2-ジクロロプロパン : 印刷作業、IARC G1
- 5) ジクロロメタン : 印刷作業、IARC G2A
- 6) メタクリル酸 : 塗料・接着剤
- 7) メタクリル酸 2,3-エポキシプロピル : 塗料
- 8) 酢酸イソプロピル : インク溶剤
- 9) メチルアミン : 殺虫剤・医薬品
- 10) テトラクロロエチレン : 金属洗浄

(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した。ヒト組織から得た材料は扱っていない。

C. 研究結果

使用した検体は赤外分光分析を行い、動物に投与した化学物質物質のスペクトルは、国立研究開発法人産業技術総合研 (https://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi) のスペクトルデータベースと一致した。

① *in vitro* 毒性試験

Neutral redの取り込みを指標とした用量設定試験ではこの*in vitro* 暫定LD50を挟む約10段階の用量 (mg/g) にて1投与群2匹にてLD値 (LD50ではない) を求めた

② *in vivo* 試験 : LD50値

R1年度において投与方法についての1) 1,4-ジオキサン (DOX) を用いた結果より、3時間に4回 (0、1、2、3時) で投与する方法において肺障害が軽微で、毒性標的臓器の腎における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。ことからこのモデルを用いた他の物質を被検体とした試験を行なった。以下のその概要を示す。

なお投与群は1用量8匹とした。投与量はmg/kg、(死

亡数/母数) は生存率を示す。

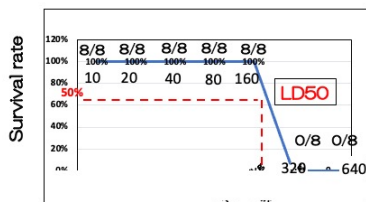
2) グリシドール (図5)

10 (8/8) 、 20 (8/8) 、 40 (8/8) 、 80 (8/8) 、 160 (8/8) 、 320 (0/8) 、 640mg (0/8)

→ LD50は160 (8/8) と320 (0/8) の間にあることが示された。

図5 グリシドール Glycidol

MTD: 160mg/kg
死亡ラット: 160mg/kg=0/8; 320mg/kg 8/8



→ LD50 TIPSは160 mg/kg と 320 mg/kgの間

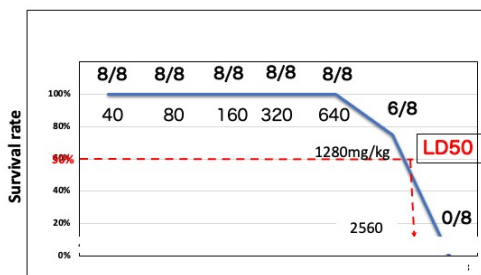
3) N,N-ジメチルホルムアミド (図6)

40 (8/8) 、 80 (8/8) 、 160 (8/8) 、 320 (8/8) 、 640 (8/8) 、 1280 (6/8) 、 2560mg (0/8)

→ LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) の間にあることが示された。

図6 N,N-ジメチルホルムアミド

MTD: 640mg/kg
死亡ラット: 640mg/kg=8/8; 2560mg/kg=0/8



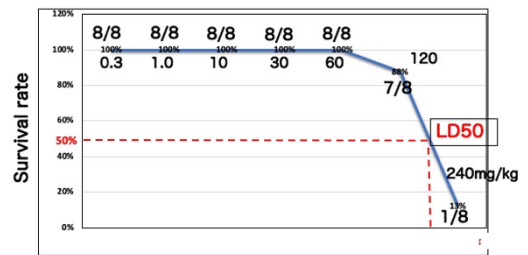
→ TIPSの LC50は1280mg/kg と 2560mg/kgの間にある

4) アクリル酸ポリマー (図7)

0.3 (8/8) 、 1.0 (8/8) 、 3.0 (8/8) 、 10 (8/8) 、 30 (8/8) 、 60 (6/8) 、 120 (7/8) 、 240mg (1/8)

→ LD50は120 (7/8) と240 (1/8) の間にあることが示された。

図7 アクリル酸ポリマー Acryl Polymer
MTD: 60mg/kg
死亡ラット: 120mg/kg=8/8; 240=1/8



→ TIPSのは120mg/kg と 240mg/kgの間にある

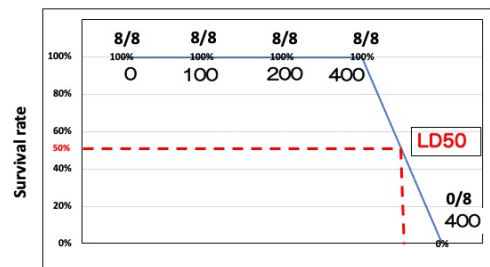
5) アセチルアセトン (図8)

100 (8/8) 、 200 (8/8) 、 400 (8/8) 、 800mg (0/8)

→ LD50は400 (8/8) と800 (0/8) の間にあることが示された。

図8 アセチルアセトン Sacetylaceton

死亡ラット: 400mg/kg=7/8; 800=0/8



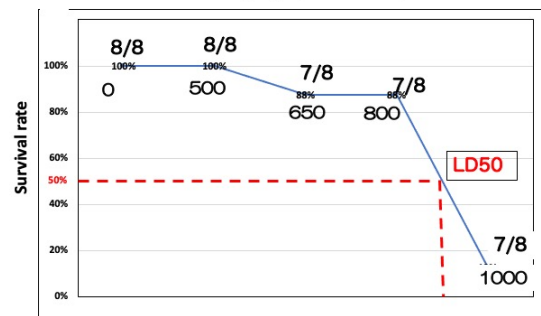
→ TIPSの LC50は400mg/kg と 800mg/kgの間にある

6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (酢酸 2-メトキシエチル) (図9)

500 (8/8) 、 650 (7/8) 、 800 (7/8) 、 1000mg (1/8)

→ LD50は800 (7/8) と1000 (1/8) の間にあることが示された。

図9 エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート
死亡ラット: 800mg/kg=7/8; 1000=1/8

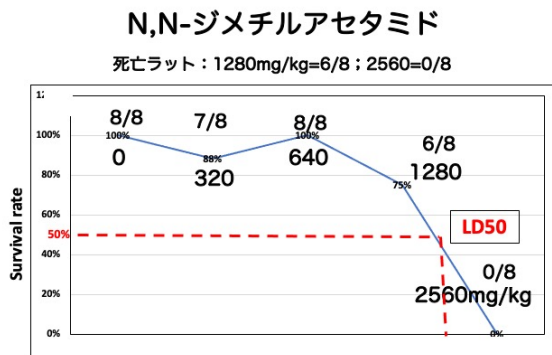


→ TIPSの LC50は800mg/kg と 1000mg/kgの間にある

7) N,N-ジメチルアセトアミド (図10)

320 (8/8)、640 (7/8)、1280 (6/8)、2560mg (1/8)
 → LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) の間にあることが示された。

図10

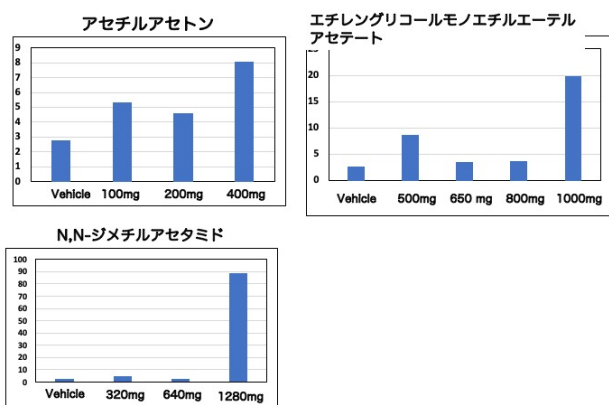


→ TIPSのLC50は1280mg/kgと2560mg/kgの間にある

③ 肺胞気管支洗浄液 (BALF) の炎症細胞成分

5) アセチルアセトン、6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートおよび7) N,N-ジメチルアセトアミドの3物質について残存ラットの2週生存ラットの肺胞気管支洗浄液 (BALF) の炎症細胞成分と血清について解析した。WBC 数/ μ lは、最高用量において高値 (有意) であることが分かった。これもLD 50値の判定の重要なマーカーと考える。この面でも次年度には追求を進める。今年度 (R3年度) では全ての投与群においてこの解析を実施する (図11: 肺胞気管支洗浄液のWBC数)

図11 気管支洗浄液中のWBC数 ($10^2/\mu$ l)

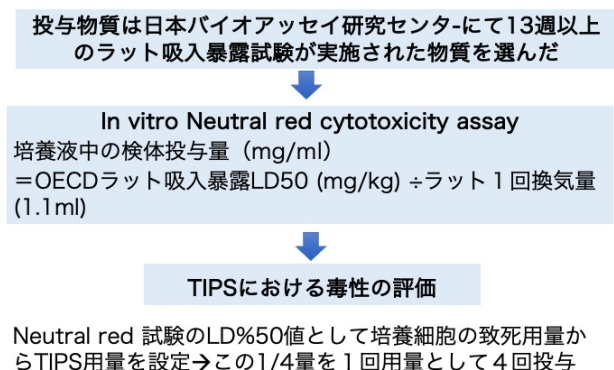


④ マウスマクロファージ様細胞におけるMWCNT曝露と活性カルボニル化合物の解析およびDNA付加体マイクロアレイ解析については、いくつかの非検体にて条件設定を行ってR3年度にはデータが得られる予定である。

D. 考察

本方法の Neutral red を用いた肺細胞培養液の検体濃度から細胞の LD50 値を求め、それを検体の気管内投与による致死量からその培地の濃度を TIPS 投与液の濃度に変換してラットの LD50 値を判定する方法の目処が立った。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2週間の経過観察をする LD50 判定は目論見通りの結果が得られつつあると考える。(図12)

図12 構築された評価システム



LD50 値の検索にあたって投与した用量の上限と下限の差異は2倍以内であり、たとえば現行の4時間吸入曝露試験による LC50 値の上限と下限の差異の4倍より十分に小さく、信頼度の高いデータであると考えられる (表1)。

以上から、同時に高額な装置と稼働費用要する吸入曝露を必要としない、安価で実用可能な「吸入曝露」の代替でき得る方法候補として期待できることが分かった。

表1

吸入曝露のLC50 (4時間曝露値)と得られたTIPS LC50の比較

検体	吸入曝露のLC50 (4時間曝露値) mg/kg*	TIPS LD50 mg/kg	吸入曝露LC50 : TIPS LD50 (上限値の比較)
1-4 ジオキサン	1492~2216	1600~1920	1 : 1 (吸入曝露値内)
アクリル酸ポリマー	93.7~2466	120~240	1 : 1 (吸入曝露値内)
エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート	522~1041	800~1000	1 : 1 (吸入曝露値内)
グリシドール	92.4~130.7	160~320	1 : 1.7 ~ 2.4
アセチルアセトン	220	400~800	1 : 2.0 ~ 3.6
N,N-ジメチルアセトアミド	96.12~671	1280~2560	1 : 1.9 ~ 3.8
N,N-ジメチルホルムアミド	328~651 または > 254	1280~ 2560	1 : 3.0 ~ 3.9

* OECD資料のLC50値より換算

E. 結論

これによって、比較的毒性の強い物質の吸入毒性

LC50値に近い用量にて様々な投与時期にて実施してTIPS実験では、意外であるが短期間（1日に必要用量投与）投与の方に生存率が高く、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。

この結果に基づいてJBRC等にて吸入毒性試験の報告がある以下の物質について検証を重ねてTIPS短期投与試験の急性吸入代替試験モデルとしての実用化への基礎を構築する。

- 1) アクロレイン
- 2) アクリル酸
- 3) アクリル酸メチル
- 4) 1,2-ジニクロプロパン：印刷作業、IARC G1
- 5) ジクロロメタン：印刷作業、IARC G2A
- 6) メタクリル酸：塗料・接着剤
- 7) メタクリル酸 2,3-エポキシプロピル：塗料
- 8) 酢酸イソプロピル：インク溶剤
- 9) メチルアミン：殺虫剤・医薬品
- 10) テトラクロロエチレン：金属洗浄

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang Q., Zhao Z., Alexander DB, Zhao D., Jiegou Xu, Tsuda H. Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes, *J. Toxic. Pathol.*, 33(3):145-151, 2020
- 2) Saleh D., Alexander TW., Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Jiegou Xu., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled by carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Particle and Fibre Toxicology*, 17:48, 2020, <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00382-y>
- 3) Sudo H., Tsuji AB., Sugyo A., Kurosawa G., Kurosawa Y., Alexander DB., Tsuda H., Saga T., Higashi T. Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213 has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 21(7); 2304 2020, <https://doi.org/10.3390/ijms21072304>
- 4) Kato H, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. in press
- 5) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 336:32-38, 2021.
- 6) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 33(4):279-285, 2020.
- 7) Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A, Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K. The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease. *Physiol Rep.* 8(17):e14556, 2020.
- 8) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 94:4085-4097, 2020.
- 9) Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, Naiki-Ito A, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohta Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation. *NeuroUrol Urodyn.* 39:1922-1929, 2020.
- 10) Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 8:1895-1906, 2020.
- 11) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H,

- Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules*. 25:2737, 2020.
- 12) 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*. 41:1145-1157, 2020.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) T. Yamazaki, M. Biswas, K. Kosugi, M. Nagashima, M. Inui, S. Tomono, H. Takagi, I. Ichimonji, F. Nagaoka, A. Aina, H. Hasegawa, J. Chiba, S. Akashi-Takamura. A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza. *Frontiers in Immunology*. 2020. eCollection 2020.
- 16) Kakehashi A, Chariyakornkul, A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 13(6), 2021.
- 17) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 96: 180-187, 2020.
- 18) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani. T Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett*, 479: 89-99, 2020.
- 19) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 21, 2020.
- 20) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*, 94: 927-937, 2020.

2. 学会発表

1. Saleh D., Alexander TW., T Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H. Thin-Tangled Multi Walled Carbon Nano Tubes are carcinogenic to the rat lung after administration by intra-tracheal instillation. Virtual 2021 SOT Annual Meeting & ToxExpo, March, 2021
2. 内木綾、加藤寛之、稲熊真悟、山下依子、高橋智. MiR-8080 は androgen receptor スプライスバリアントの発現低下により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第 109 回日本病理学会、Web 開催(2020 年 7 月)
3. Aya Naiki-Ito, Hiroyuki Kato, Taku Naiki, Satoru Takahashi. Cancer chemoprevention by antioxidant luteolin, symposium, 第 79 回日本癌学会学術総会、広島(2020 年 10 月)
4. 内木綾. 酸化ストレスから見た発癌機序の分子病理学的解析と臨床応用への試み(A 演説)、第 66 回日本病理学会秋期特別総会、浜松(2020 年 11 月)

5. 内木綾、加藤寛之、小村理行、高橋智。Luteolin は mTOR シグナルと p21 発現の制御により膀胱発がんを抑制する、第 37 回日本毒性病理学会、Web 開催(2021 年 1 月)
6. 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機。芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明、第 93 回産業衛生学会、WEB 開催(2020 年 4 月)
7. 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機。ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用、第 47 回日本毒性学会学術年会、WEB 開催(2020 年 6 月)
8. 鰐淵英機、魏民。職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開、第 27 回がん予防学会総会、WEB 開催(2020 年 9 月)
9. Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice、第 79 回日本癌学会学術総会、WEB 開催(2020 年 10 月)
10. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機。化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出、第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、WEB 開催(2021 年 1 月)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
大学の特許として届出済み（審査中）。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

令和2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に関する研究

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・統括に関する研究

研究分担者: 津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

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毒性評価は、高額な費用が要求されるために実際には別ルートの経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。本研究の目的は、毒性特にLD値において吸入曝露試験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、4種の高層カーボンナノチューブ(MWCNT)および1種チタン酸カリウム線維の毒性と、肺と胸膜中皮における発がん性を世界に先駆けて明らかにし、TIPS法の有用性を世界に示してきた(MWCNT類の吸入曝露試験は後日に発表された日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)にて実施されたMWCNT-7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。手法の開発においてはJBRCにて試験された1)1,4-dioxane(化学工業溶剤・生物難分解性)をモデル物質として選び、3時間に4回(開始時、1、2、3時間後)投与して2週間までのLD50値は総投与量において1300mg~1560mg/kgの範囲にあり、JBRCにおける吸入曝露試験のLC50値1600mg/kgに近似する値であった。この結果に基づき、用量設定において① *in vitro* におけるneutral red 取り込み試験でA549細胞を半数死滅させる用量に基づきTIPS投与用量を算定し、その用量域とOECD、Handbook of Toxicologyおよび企業の「安全データシート」等の4時間吸入曝露LC50(4h)値を参考にして② TIPS投与によるLD50値を求めた。その結果、OECD等のLC50(4h)と得られたTIPS LD50の上限値の比率は、1)1,4-ジオキサン:1(R1年度報告)、2)グリシドール:1.7~2.4、3)N,N-ジメチルホルムアミド:3.0~3.9、4)アクリル酸ポリマー:1(吸入曝露の範囲内)、5)アセチルアセトン:2.0~3.6、6)エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート:1(吸入曝露の範囲内)、7)N,N-ジメチルアセトアミド:1.9~3.8であった。アセチルアセトン、N,N-ジメチルアセトアミド、N,N-ジメチルホルムアミドは最大4倍であった。これはより細かな用量設定によって解決できると考える。以上から本法の実用性が明らかとなってきた。次年度ではさらに多くの検体(10検体を予定)について検証を重ねて実用化への提案を行う。

A. 研究目的

空気中の化学物質は不可避的に肺から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。しかしながらわが国でも「毒物及び劇物取締法」(毒劇法)によって指定された大多数の化合物の毒性評価は、経口投与・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。また、国際的にもGHS(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)に記載されている物質にも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、直径がナノサイズの炭素線維・金属線維や粒子の障害性について「経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)」を開発し、世界に先駆けて4種の異なる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、

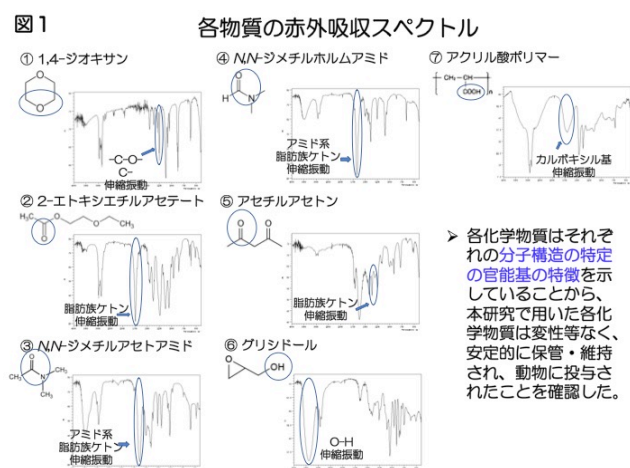
吸入曝露試験に替わる気管内投与の有用性を国内外に示してきた。これは、OECD TEST GUIDELINE: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON INHALATION TOXICITY TESTING #39 (p59)に引用され、また Archives of Toxicology, Particle and Fibre Toxicology (2019-20 IF は夫々 5.6 および 6.9) 等に掲載されるようになり、TIPS 投与の有用性と実用性が世界に認められつつある。実施あたって技術的な考慮からまず液状物質、固形体等を検体として選び、主に日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) にて吸入曝露試験において LC50 の得られている物質について、その TIPS 投与による評価方法の妥当性について検討した。

B. 研究方法

投与物質の検定

本研究に用いた各化学物質の持つ特有の物理化学的及び化学構造の特性を明確にするために、各物質の赤外分光分析を行い、動物に投与した化学物質のキャラクタリゼーションを実施した。各物質をミニ油圧プレス (株式会社 ST ジャパン 181-1410) により KBr カッティングシートにより測定用錠剤を作成し、赤外分光分析 (株島津製作所 IR Affinity-1) により $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ ($0.00025\text{cm}\sim 0.0025\text{cm}$) の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、各化学物質特有の官能基の吸収バンドから各化学物質の特定を行った。

図 1 : 投与物質の検定



① *in vitro* Neutral red 毒性試験 :

Neutral red 試験は急性経口毒性試験における動物使用数を削減するように改良された代替法として、OECD から固定用量法 (TG420)、急性毒性等級法 (TG423) 等が経口投与代替法 (候補) として推奨している。OECD ガイドライン等における検体の 4 時間吸

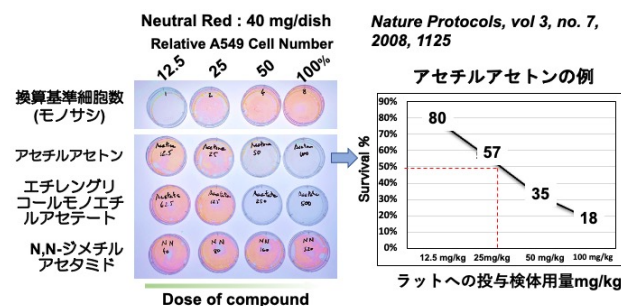
入曝露量の LC50 (LC50 4hr) の ppm 値を mg/ml に換算し、得られた値を培養液中の検体投与量 (mg/ml) に変換して (変換式 図 2)、Neutral red の取り込みによって検体の A549 細胞に対する LD50 を求めた。(図 3)

図 2

$$\text{培養液中の検体の投与量 (mg/ml)} = \left[\frac{\text{吸入検体の濃度 (ppm)} \times \frac{\text{検体の分子量}}{24.45 \text{ (1 Molあたりの気体の体積)}} \times \frac{\text{m}^3}{10^6 \text{ mL}} \times \text{毎分換気量} \times \text{曝露時間 (分)} \right] \div 1.1 \text{ ml (1呼吸当たりの空気量)}$$

図 3 Neutral red 肺細胞取り込み試験

A549がん細胞培養液に検体を加え1時間後に検体の無い培養液に交換して肺がん細胞のをNeutral red の取り込み率 (=生存率) を計測する



* Repetto, G. et al., Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols, 7, 1125, 2000

② *in vivo* 試験 :

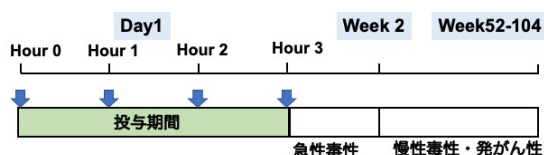
R1 年度において投与方法についての 1) 1,4-ジオキサン (DOX) を用いた結果より、3 時間に 4 回 (0、1、2、3 時) で投与する方法を開発してきた。Neutral red 試験における A549 細胞の LD50 を示す培地中の検体の値 (mg/L) から、各用量 2 匹の 10 用量程度による TIPS 予備試験の LD50 値を求め、これより TIPS 本試験にて 4~5 用量を設定し、この 1/4 量を 3 時間に 4 回に分けて投与した。

予備試験では *in vitro* 暫定 LD50 を挟む約 10 段階の用量 (mg/g) にて 1 投与群 2 匹にて LD 値 (LD50 ではない) を求めた。次にこの値を挟む 4~7 用量にて各用量群 7~10 匹にて LD50 値を求めた。用量は公比 2~3 を基準として設定した (図 4)。

図4

投与方法

Neutral red 試験におけるA549細胞のLD₅₀を示す培地中の検体の値 (mg/L) から、各用量 2 匹の10用量程度によるTIPS予備試験のLD₅₀値を求め、これからTIPS本試験にて4~5用量を設定し、この1/4量を3時間に4回に分けて投与した。



③ さらに投与終了後2週にて2~3匹を屠殺して、気管枝肺胞洗浄液 (BALF) の炎症細胞数と血清の生化学検査も行っている。また生存したラットの最高濃度投与群の2ラットは2週後に屠殺した。残りのラットは慢性毒性・発がん性の観察のためにそのまま無処置にて飼育している。

以下に検体の用途・毒性・発がん性等を示す

- 1) 1,4-ジオキサン (報告済み) : 洗剤用品原料、溶剤、脳・肝・腎障害、IARC Group 2B
- 2) グリシドール (Gly) : 天然油脂、ビニル樹脂安定剤、肝障害、IARC Group 2A
- 3) *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) : アクリル樹脂の合成、肝障害、IARC Group 2A
- 4) アクリル酸ポリマー (PAP) : 肺障害・洗剤、顔料・水処理、IARC G3
- 5) アセチルアセトン (ACA) : 接着剤原料、溶剤、吸引毒性、発がん性データ無し
- 6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (酢酸2-メトキシエチル) (EGMA) : 塗料、インキ、血液・精巣毒性、発がん性データ無し。
- 7) *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA) : 反応溶媒、肝腫瘍発生 (日本バイオアッセイセンター)、IARC G2B

なお、5) のアセチルアセトン (ACA)、6) のエチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (EGMA)、7) の *N,N*-ジメチルアセトアミドについては、肺・気管病変と内炎症細胞解析・肝・腎・副腎・脾・睾丸の病理学的変化に加え、新たに血清生化学的検査・気管肺胞洗浄液急性炎症変化についても検討している。

さらに、追加化合物として以下の物質について

Neutral red 試験を終了し用量を算定した。

- 1) アクロレイン
- 2) アクリル酸
- 3) アクリル酸メチル
- 4) 1,2-ジクロロプロパン : 印刷作業、IARC G1
- 5) ジクロロメタン : 印刷作業、IARC G2A
- 6) メタクリル酸 : 塗料・接着剤
- 7) メタクリル酸 2,3-エポキシプロピル : 塗料
- 8) 酢酸イソプロピル : インク溶剤
- 9) メチルアミン : 殺虫剤・医薬品
- 10) テトラクロロエチレン : 金属洗浄

(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した。ヒト組織から得た材料は扱っていない。

C. 研究結果

使用した検体はすべて計測した特性検査を満たすものであることが証明された。

① *in vitro* 毒性試験

Neutral redの取り込みを指標とした用量設定試験ではこの *in vitro* 暫定LD₅₀を挟む約10段階の用量 (mg/g) にて1投与群2匹にてLD値 (LD₅₀ではない) を求めた

② *in vivo* 試験 : LD₅₀値

R1年度において投与方法についての1) 1,4-ジオキサン (DOX) を用いた結果より、3時間に4回 (0、1、2、3時) で投与する方法において肺障害が軽微で、毒性標的臓器の腎における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。ことからこのモデルを用いた他の物質を被検体とした試験を行なった。以下のその概要を示す。

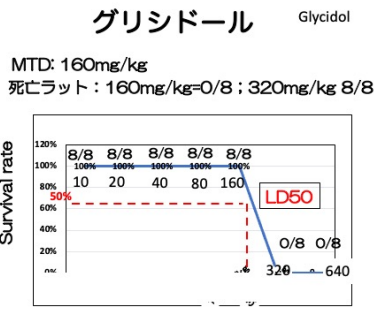
なお投与群は1用量8匹とした。投与量はmg/kg, (死亡数/母数) は生存率を示す。

2) グリシドール (図5)

10 (8/8)、20 (8/8)、40 (8/8)、80 (8/8)、160 (8/8)、320 (0/8)、640mg (0/8)

→ LD₅₀は160 (8/8) と320 (0/8) の間にあることが示された。

図5



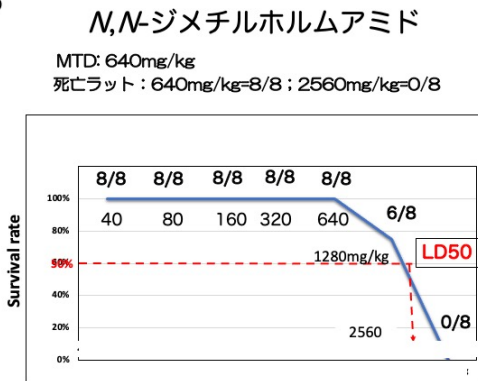
→ LD50 TIPSは160 mg/kg と 320 mg/kgの間

3) *N,N*-ジメチルホルムアミド (図6)

40 (8/8) 、 80 (8/8) 、 160 (8/8) 、 320 (8/8) ,
640 (8/8) 、 1280 (6/8) 、 2560mg (0/8)

→ LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) の間にあることが示された。

図6



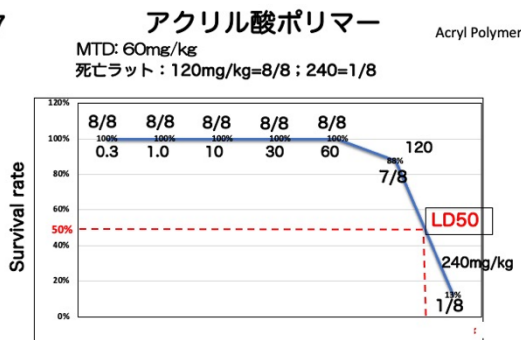
→ TIPSの LC50は1280mg/kg と 2560mg/kgの間にある

4) アクリル酸ポリマー (図7)

0.3 (8/8) 、 1.0 (8/8) 、 3.0 (8/8) 、 10 (8/8) ,
30 (8/8) 、 60 (6/8) 、 120 (7/8) 、 240mg (1/8)

→ LD50は120 (7/8) と240 (1/8) の間にあることが示された。

図7

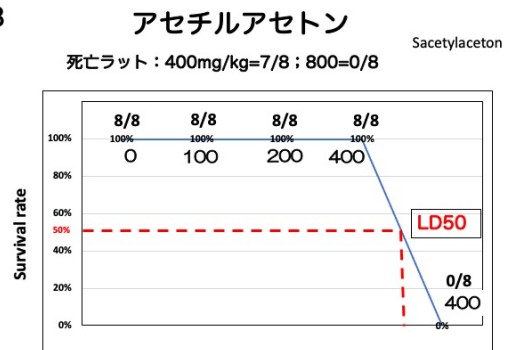


→ TIPSの は120mg/kg と 240mg/kgの間にある

5) アセチルアセトン (図8)

100 (8/8) 、 200 (8/8) 、 400 (8/8) 、 800mg (0/8)
→ LD50は400 (8/8) と800 (0/8) の間にあることが示された。

図8

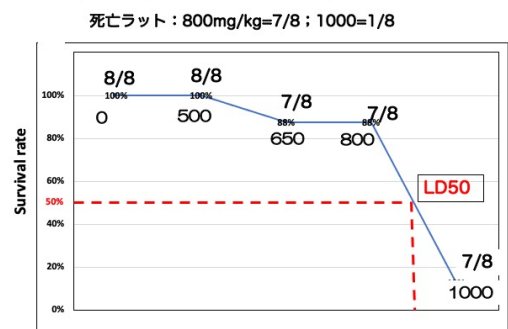


→ TIPSの LC50は400mg/kg と 800mg/kgの間にある

6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (酢酸 2-メトキシエチル) (図9)

500 (8/8) 、 650 (7/8) 、 800 (7/8) 、 1000mg (1/8)
→ LD50は800 (8/8) と1000 (1/8) の間にあることが示された。

図9 エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート

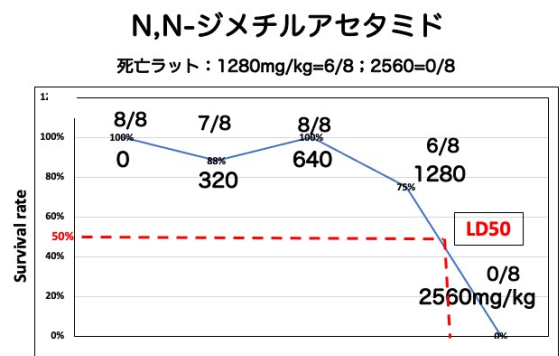


→ TIPSの LC50は800mg/kg と 1000mg/kgの間にある

7) *N,N*-ジメチルアセトアミド (図10)

320 (8/8) 、 640 (7/8) 、 1280 (6/8) 、 2560mg (1/8)
→ LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) の間にあることが示された。

図10

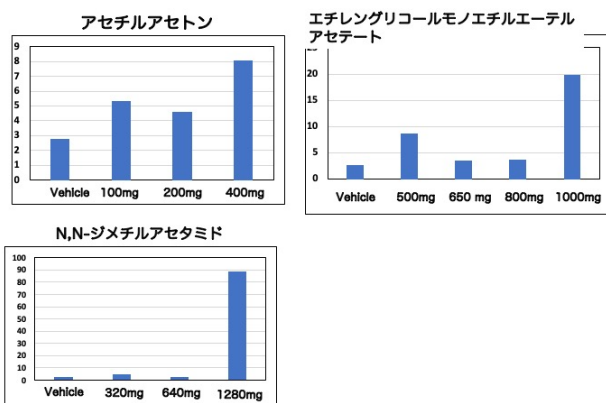


→ TIPSの LC50は1280mg/kg と2560mg/kgの間にある

③ 肺胞気管支洗浄液 (BALF) の炎症細胞成分

5) アセチルアセトン、6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテートおよび7) N,N-ジメチルアセトアミドの3物質について残存ラットの2週生存ラットの肺胞気管支洗浄液 (BALF) の炎症細胞成分と血清について解析した。WBC 数/ μ lは、最高用量において高値 (有意) であることが分かった。これもLD 50値の判定の重要なマーカーと考える。この面でも次年度には追求を進める。今年度 (R3年度) では全ての投与群においてこの解析を実施する (図11: 肺胞気管支洗浄液のWBC数)

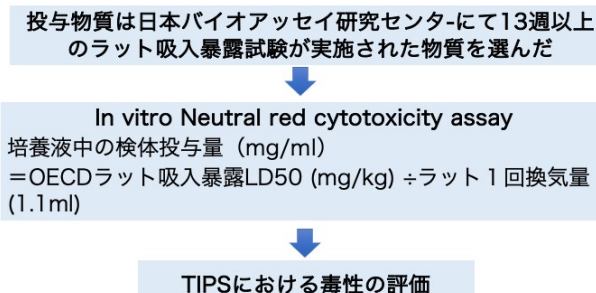
図11 気管支洗浄液中のWBC数 ($10^2/\mu$ l)



D. 考察

本方法の Neutral red を用いた肺細胞培養液の検体濃度から細胞の LD50 値を求め、それを検体の気管内投与による致死量からその培地の濃度を TIPS 投与液の濃度に変換してラットの LD50 値を判定する方法の目処がついた。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2週間の経過観察をする LD50 判定は目論見通りの結果が得られつつあると考える。(図12)

図12 構築された評価システム



Neutral red 試験のLD%50値として培養細胞の致死用量からTIPS用量を設定→この1/4量を1回用量として4回投与

LD50 値の検索にあたって投与した用量の上限と下限の差異は2倍以内であり、たとえば現行の4時間吸入暴露試験による LC50 値の上限と下限の差異の4倍より十分に小さく、信頼度の高いデータであると考える (表1)。

以上から、同時に高額な装置と稼働費用要する吸入暴露を必要としない、安価で実用可能な「吸入暴露」の代替でき得る方法候補として期待できることが分かった。

表1

吸入暴露のLC50 (4時間暴露値)と得られたTIPS LC50の比較

検体	吸入暴露のLC50 (4時間暴露値) mg/kg*	TIPS LD50 mg/kg	吸入暴露LC50 : TIPS LD50 (上限値の比較)
1-4 ジオキサソ	1492-2216	1600-1920	1 : 1 (吸入暴露値内)
アクリル酸ポリマー	93.7-2466	120-240	1 : 1 (吸入暴露値内)
エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート	522-1041	800-1000	1 : 1 (吸入暴露値内)
グリシドール	92.4-130.7	160-320	1 : 1.7 - 2.4
アセチルアセトン	220	400-800	1 : 2.0 - 3.6
N,N-ジメチルアセトアミド	96.12-671	1280-2560	1 : 1.9 - 3.8
N,N-ジメチルホルムアミド	328-651 または > 254	1280- 2560	1 : 3.0 - 3.9

* OECD資料のLC50値より換算

E. 結論

これによって、比較的毒性の強い物質の吸入毒性 LC50値に近い用量にて様々な投与時期にて実施して TIPS実験では、意外であるが短期間 (1日に必要用量投与) 投与の方に生存率が高く、この方法においてJBRCの吸入暴露試験によるLC50に近似するLD50値が得られることが分かってきた。

この結果に基づいてJBRC等にて吸入毒性試験の報告がある以下の物質について検証を重ねてTIPS短期投与試験の急性吸入代替試験モデルとしての実用化への基礎を構築する。

- 1) アクロレイン
- 2) アクリル酸
- 3) アクリル酸メチル
- 4) 1,2-ジクロロプロパン : 印刷作業、IARC G1
- 5) ジクロロメタン : 印刷作業、IARC G2A
- 6) メタクリル酸 : 塗料・接着剤
- 7) メタクリル酸 2,3-エポキシプロピル : 塗料
- 8) 酢酸イソプロピル : インク溶剤
- 9) メチルアミン : 殺虫剤・医薬品
- 10) テトラクロロエチレン : 金属洗浄

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang Q. , Zhao Z., Alexander DB, Zhao D., Jiegou Xu, Tsuda H. Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes, *J. Toxic. Pathol.*, 33(3):145-151, 2020
 2. Saleh D., Alexander TW., Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Jiegou Xu., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled by carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Particle and Fibre Toxicology*, 17:48, 2020, <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00382-y>
 3. Sudo H., Tsuji AB., Sugyo A., Kurosawa G., Kurosawa Y., Alexander DB., Tsuda H. , Saga T., HigashiT. Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 21(7); 2304 2020, <https://doi.org/10.3390/ijms21072304>
2. 学会発表
 1. Saleh D., Alexander TW., T Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB. , Abdelgied M., El-gazzar AM., Takase H., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kanno J., Tsuda H. Thin- Tangled Multi Walled Carbon Nano Tubes are carcinogenic to the rat lung after administration by intra-tracheal instillation. Virtual 2021 SOT Annual Meeting & ToxExpo, March, 2021
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
大学の特許として届出済み（審査中）。
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

令和2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に関する研究

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
に関する研究

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、気中物質有害物質のリスク評価と管理は重要である。しかしながら、吸入曝露試験には専用施設と莫大な費用を要するため、わが国では吸入曝露しうる毒物および劇物取締法(毒劇法)によって指定された化合物の安全性試験は、経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。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。

まず、既に日本バイオアッセイ研究センターで吸入曝露試験が実施された1,4-ジオキサン(LC50値1,600mg/kg)を標準物質としてTIPS法を実施したところ、3時間に4回(開始時、1, 2, 3時間後)投与することにより、TIPS LD50値は1,350-1,560mg/kgとなり、4時間吸入曝露LC50(4h)と近似する値が導き出されることがわかった。この方法により、さらに被験物質数を増やしてTIPS LD50値を求めたところ、吸入曝露試験のLC50(4h)とTIPS法によるLD50上限値の比率は、1,4-ジオキサンを含め、アクリル酸ポリマー、とエチレングリコールモノエチルエーテルアセテートでは1:1であり、吸入曝露試験におけるLC50(4h)の範囲内であった。その他の被験物質における比率は、グリシドール 1:1.7-2.4、アセチルアセトン 1:2.0-3.6、*N,N*-ジメチルホルムアミド 1:1.9-3.8、*N,N*-ジメチルアセトアミド 1:3.0-3.9であり、最大でも4倍未満であった。以上より、現時点で少なくとも3つの被験物質において、TIPS法で得られるLD50値について、吸入曝露用量の範囲のデータが得られている。その他の被験物質に対しても、細かい用量設定を行うことにより、応用可能であると考えられる。

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。しかしながら毒物および劇物取締法(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。これまでにTIPS法をもちいて世界に先駆けて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示している。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、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 値が得られている物質について、まず *in vitro* における LD50 値を算出し、TIPS 法における投与濃度を決定した。F344 ラットに対して TIPS 投与を行い、得られる LD50 値の妥当性について、吸入曝露試験の LC50 (4h) と比較検討した。

B. 研究方法

令和元年度には、1,4-ジオキサン (DOX) を用いて、3 時間に 4 回 (開始時、1, 2, 3 時間後) 投与する方法を開発してきた。今年度は、以下に示す被験物質について TIPS 投与による LD50 値を算出することとした。まず、被験物質投与に対する肺癌細胞株 A549 の細胞生存率を Neutral red assay により計測し、LD50 値を算出した。またこの値をもとに TIPS 投与用量を求め、この値を挟む 4~7 用量を設定した。1 用量につき 8 匹ずつとし、候補用量域の 1/4 量を 3 時間で 4 回投与した。この研究では研究代表者の津田と、投与・動物の観察・剖検・病理解析において共同作業で実施した。

被験物質

- (1) 1,4-ジオキサン (DOX): 洗剤用品原料、溶剤
脳、肝、腎障害、IARC Group 2B
- (2) グリシドール (Gly): 天然油脂、ビニル樹脂安定剤、
肝障害、IARC Group 2A
- (3) *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF): アクリル樹脂の
合成、肝障害、IARC Group 2A
- (4) アクリル酸ポリマー (PAP): 洗剤、顔料
肺障害、IARC Group 3
- (5) アセチルアセトン (ACA): 接着剤原料、溶剤
吸引毒性、発がん性データなし
- (6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテ
ート (EGMA): 塗料、インキ、
血液・精巣毒性、発がん性データなし
- (7) *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA): 反応溶媒、肝腫
瘍発生、IARC Group 2B

(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 (医動 20-28)、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

1,4-ジオキサン (DOX) を用いた解析では、3 時間に 4 回 (開始時、1, 2, 3 時間後) 投与する方法が、肺障害が軽微で、毒性標的臓器である腎の近位尿細管上皮のアポトーシス誘導率が高値であり、標的臓器における有害性を評価するのに有効であると考えられた。今年度は、この研究プロトコルを他の被験物質 (2)~(7) にも応用して、*in vivo* における LD50 値を検討した。以下に、投与量 (mg/kg)、生存率 (生存数/母数) の概要を示す。

- (2) グリシドール (Gly):
10 (8/8), 20 (8/8), 40 (8/8), 80 (8/8), 160 (8/8), 320 (0/8), 640 (0/8)
LD50: 160~320 mg/kg
- (3) *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF):
40 (8/8), 80 (8/8), 160 (8/8), 320 (8/8), 640 (8/8), 1280 (6/8), 2560 (0/8)
LD50: 1280~2560 mg/kg
- (4) アクリル酸ポリマー (PAP):
0.3 (8/8), 1.0 (8/8), 3 (8/8), 10 (8/8), 30 (8/8), 60 (8/8), 120 (7/8), 240 (1/8)
LD50: 120~240 mg/kg
- (5) アセチルアセトン (ACA):
100 (8/8), 200 (8/8), 400 (8/8), 800 (0/8)
LD50: 400~800 mg/kg

(6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (EGMA):

500 (8/8), 650 (7/8), 800 (7/8), 1000 (1/8)

LD50: 800~1000 mg/kg

(7) *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA)

320 (8/8), 640 (8/8), 1280 (6/8), 2560 (1/8)

LD50: 1280~2560 mg/kg

D. 考察

経気道的に曝露する劇物および毒物の有害性評価において、TIPS法は吸入曝露試験に代替する最も有用な方法の一つであると考えられる。さらに、吸入曝露試験の投与量は、投与気中濃度から計算しているが、気管内投与では投与物質量が正確であることから、TIPS法から得られるデータは、より正確な有害性評価につながる可能性がある。しかし被験物質の溶液を気管内噴霧する場合、吸入曝露における気化状態を考慮する必要がある。本研究では、*in vitro*におけるLD50値から、TIPS投与濃度を算出するために、分子量、換気量、曝露時間、呼吸容量や気化体積等を考慮した換算式を用いた。その結果、得られたTIPS法におけるLD50値の上限と下限の差異は2倍以内であり、吸入曝露試験におけるLC50値のそれよりも十分に小さく、信頼度の高いデータと考えられた。また、吸入曝露試験のLC50(4h)とTIPS法によるLD50の上限値の比率は、1,4-ジオキサン 1:1(吸入曝露閾値内)、アクリル酸ポリマー1:1(吸入曝露閾値内)、エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート 1:1(吸入曝露閾値内)、グリンドール 1:1.7-2.4、アセチルアセトン 1:2.0-3.6、*N,N*-ジメチルホルムアミド 1:1.9-3.8、*N,N*-ジメチルアセトアミド 1:3.0-3.9と最大で4倍未満であった。少なくとも3つの被験物質は吸入曝露用量の範囲のデータが得られており、その他の被験物質に対しても細かい用量設定を行うことにより、解決できるものと考えられる。

E. 結論

比較的毒性の強い毒劇物について、吸入曝露試験のLC50値に近い用量にてTIPS投与を実施した。様々なスケジュールで投与したところ、意外にも短時間(3時間)

の投与のほうが個体の生存率が高く、標的臓器の有害性が検出されることが明らかになった。また、複数の被験物質の検証から、TIPS法により、吸入曝露試験のLC50に近似するLD50値が得られることがわかってきた。今後は、吸入毒性が報告されている1,2-ジクロロプロパン、ジクロロメタン等の物質や、LC50値が不明なものについても検証し、データを蓄積していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. ○Kato H, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. in press
2. Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 336:32-38, 2021.
3. Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 33(4):279-285, 2020.
4. ○Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 17:48, 2020.
5. Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A, Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K. The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic

- kidney disease. *Physiol Rep.* 8(17):e14556, 2020.
6. ○Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 94:4085-4097, 2020.
 7. Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, Naiki-Ito A, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohta Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation. *Neurourol Urodyn.* 39:1922-1929, 2020.
 8. Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 8:1895-1906, 2020.
 9. Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkiengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 25:2737, 2020.
 10. ○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.* 41:1145-1157, 2020.
 11. 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.
 12. ○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.
2. 学会発表
 1. 内木綾、加藤寛之、稲熊真悟、山下依子、高橋智。MiR-8080 は androgen receptor スプライスバリエーションの発現低下により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第 109 回日本病理学会、Web 開催 (2020 年 7 月)
 2. Aya Naiki-Ito, Hiroyuki Kato, Taku Naiki, Satoru Takahashi. Cancer chemoprevention by antioxidant luteolin, symposium, 第 79 回日本癌学会学術総会、広島 (2020 年 10 月)
 3. 内木綾. 酸化ストレスから見た発癌機序の分子病理学的解析と臨床応用への試み (A 演説)、第 66 回日本病理学会秋期特別総会、浜松 (2020 年 11 月)
 4. 内木綾、加藤寛之、小村理行、高橋智。Luteolin は mTOR シグナルと p21 発現の制御により膀胱癌を抑制する、第 37 回日本毒性病理学会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
1. 特許取得
大学の特許として届出済み (審査中)
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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に関する研究

分担研究課題名:経気管肺内噴霧投与試験物質(7種)のキャラクタリゼーションに関する研究

分担研究者 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

研究要旨

本研究では、長期吸入暴露試験が実施されたものを含む物質について、吸入試験の代替法として開発された「経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)」を用いてラットに投与し、主要臓器の病変を観察し、評価する事を目的としている。令和2年の研究として、それら投与に用いた7種類の物質について各化学物質の持つ特有の物理化学的及び化学構造の特性を明確にするために、各物質の赤外分光分析を行い、動物に投与した化学物質のキャラクタリゼーションを実施した。赤外分光分析では赤外吸収スペクトルを測定し、各化学物質特有の官能基の吸収ピークから各化学物質の特定を行った。その結果、1,4-ジオキサンでは炭素と酸素からなる環状エーテル構造の伸縮運動のピーク、2-エトキシエチルアセテートでは脂肪族エステル及び脂肪族エーテルの伸縮運動のピーク、*N,N*-ジメチルアセトアミド及び*N,N*-ジメチルホルムアミドではアミド系脂肪族ケトンの伸縮運動のピーク、アセチルアセトンでは脂肪族ケトンの伸縮運動のピーク、グリシドールでは水酸基の伸縮運動を示す吸収ピーク、架橋型アクリル酸ポリマーではカルボキシル基の伸縮運動のピークが認められ、各化学物質はそれぞれの分子構造の特定の官能基の特徴を個々に示していることから、本研究で用いた各化学物質は変性等なく、動物に投与されたことを確認した。

以上のことから、本研究に用いられた7種類の物質(1,4-ジオキサン、2-エトキシエチルアセテート、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N,N*-ジメチルホルムアミド、アセチルアセトン、グリシドール、架橋型アクリル酸ポリマー)のキャラクタリゼーションを行った結果、赤外分光分析により個々の物質特性を示し、吸入試験の代替法として新たに開発された「経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)」を用いて7種類の個々の物質特性は赤外分光分析よりそれらの構造特性と一致した。

A. 研究目的

本研究の目的は、長期吸入暴露試験が実施されたものを含む7種類の物質(1,4-ジオキサン、2-エトキシエチルアセテート、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N,N*-ジメチルホルムアミド、アセチルアセトン、グリシドール、架橋型アクリル酸ポリマー)について、吸

入試験の代替法として開発された「経気管肺内噴霧投与方法(TIPS法)」を用いてラットに投与し、主要臓器の病変を観察することである。

この分担研究では、その投与に用いた7種類の物質について各化学物質の持つ特有の物理化学的及び化学構造の特性を明確にするために、各物質の

赤外分光分析を行い、動物に投与した化学物質のキャラクタリゼーションを実施した。赤外分光分析では赤外吸収スペクトルを測定し、各化学物質特有の官能基の吸収ピークから各化学物質の特定を行った。

B. 研究方法

本研究に用いた各化学物質の持つ特有の物理化学的及び化学構造の特性を明確にするために、各物質の赤外分光分析を行い、動物に投与した化学物質のキャラクタリゼーションを実施した。

測定は下記 7 物質について実施した。

- ・ 1,4-ジオキサン(液体)
- ・ 2-エトキシエチルアセテート(液体)
- ・ *N,N*-ジメチルアセトアミド(液体)
- ・ *N,N*-ジメチルホルムアミド(液体)
- ・ アセチルアセトン(液体)
- ・ グリシドール(液体)
- ・ 架橋型アクリル酸ポリマー(固体)

液体物質に関しては、KBr 液体セル法により、固体物質についてはヌジョール法により試料を作成し、赤外分光分析（梶島津製作所 IR Affinity-1）（図 1）により 4000～400 cm^{-1} (0.00025～0.0025 cm) の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、各化学物質特有の官能基の吸収バンドから各化学物質の特定を行った。

C. 研究結果

図 2 に 1,4-ジオキサンの化学構造式と赤外吸収スペクトルを示した。その結果、波数 1120 cm^{-1} 近辺に、炭素と酸素からなる環状エーテル構造の C—O 伸縮運動のシャープな吸収ピークが認められ、1,4-ジオキサンの構造が確認された。

図 3 に 2-エトキシエチルアセテートの化学構造式と赤外吸収スペクトルを示した。その結果、波数 1750 cm^{-1} 近辺にエステルの C=O 伸縮運動及び 1250 cm^{-1} 、1050 cm^{-1} 近辺にエステルの C—O 吸収ピークが、1130 cm^{-1} 近辺にエーテルの C—O 伸縮運動の強い吸収ピークが認められ、2-エトキシエチルアセテートの構造が確認された。

図 4 に *N,N*-ジメチルアセトアミドの化学構造

式と赤外吸収スペクトルを示した。その結果、1630 cm^{-1} 近辺に、アミドの C=O の伸縮運動を示す吸収ピークが認められ、*N,N*-ジメチルアセトアミドの構造が確認された。

図 5 に *N,N*-ジメチルホルムアミドの化学構造式と赤外吸収スペクトルを示した。その結果、1670 cm^{-1} 近辺に、アミドの C=O の伸縮運動を示す吸収ピークが認められ、*N,N*-ジメチルホルムアミドの構造が確認された。なお、類似構造物質である図 4 で示した *N,N*-ジメチルアセトアミドの 1630 cm^{-1} 近辺のアミド系脂肪族ケトンの伸縮運動のピークは、1 つのメチル基を持たないことから 1670 cm^{-1} 近辺にシフトしたことが考えられた。

図 6 にアセチルアセトンの化学構造式と赤外吸収スペクトルを示した。その結果、1620 cm^{-1} に C=O の伸縮運動の吸収ピークが認められ、アセチルアセトンの構造が確認された。

図 7 にグリシドールの化学構造式と赤外吸収スペクトルを示した。その結果、1040 cm^{-1} に C—O の伸縮運動及び 3100～3700 cm^{-1} 近辺に O—H の伸縮運動を示す吸収ピークが認められ、グリシドールの構造が確認された。

図 8 に架橋型アクリル酸ポリマーの化学構造式と赤外吸収スペクトルを示した。その結果、1740 cm^{-1} 近辺にカルボキシ基の C=O 伸縮運動のブロードな吸収ピーク及び 3000 cm^{-1} 近辺にカルボキシ基の O—H の伸縮運動のブロードなピークが認められ、架橋型アクリル酸ポリマーの構造が確認された。なお、当物質はヌジョール法(流動パラフィン添加)により測定したため、1350 cm^{-1} 、1450 cm^{-1} 及び 2900 cm^{-1} に、流動パラフィンの吸収ピークが認められた。

また、図 2～図 7 の各スペクトルは、国立研究開発法人産業技術総合研 (https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi) のスペクトルデータベースと一致した。

D. 考察

今回、キャラクタリゼーションを実施した 7 種類の物質において、それらの構造における赤外吸収と官能基の関係として、1,4-ジオキサンでは環状エーテ

ルの C-O 伸縮運動、2-エトキシエチルアセテートではエステル C=O 及び C-O 伸縮運動、エーテルの C-O 伸縮運動、*N,N*-ジメチルアセトアミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミドではアミドの C=O の伸縮運動、アセチルアセトンでは C=O の伸縮運動、グリシドールでは C-O、O-H の伸縮運動、架橋型アクリル酸ポリマーではカルボキシ基の C=O 及び、O-H の伸縮運動が認められた。以上のことから、各化学物質はそれぞれの分子構造の特定の官能基の特徴を個々に示していることから、本研究で用いた各化学物質は変性等なく、動物に投与されたことを確認した。

E. 結論

本研究に用いられた7種類の物質(1,4-ジオキサン、2-エトキシエチルアセテート、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N,N*-ジメチルホルムアミド、アセチルアセトン、グリシドール、架橋型アクリル酸ポリマー)のキャラクタリゼーションを行った結果、赤外分光分析により個々の物質特性を示した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed

OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. : Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. Particle and Fibre Toxicology Vol. 17, 48 (2020)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特許出願 ;

独立行政法人労働者健康安全機構、大西誠、笠井辰也、鈴木正明: 粒子状物質の浮遊特性測定方法及び浮遊特性測定装置 特許第 6362669 号 特許登録日 : 平成 30 年 7 月 6 日

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし



図 1. 測定に用いた赤外分光光度計（榊島津製作所 IR Affinity-1）

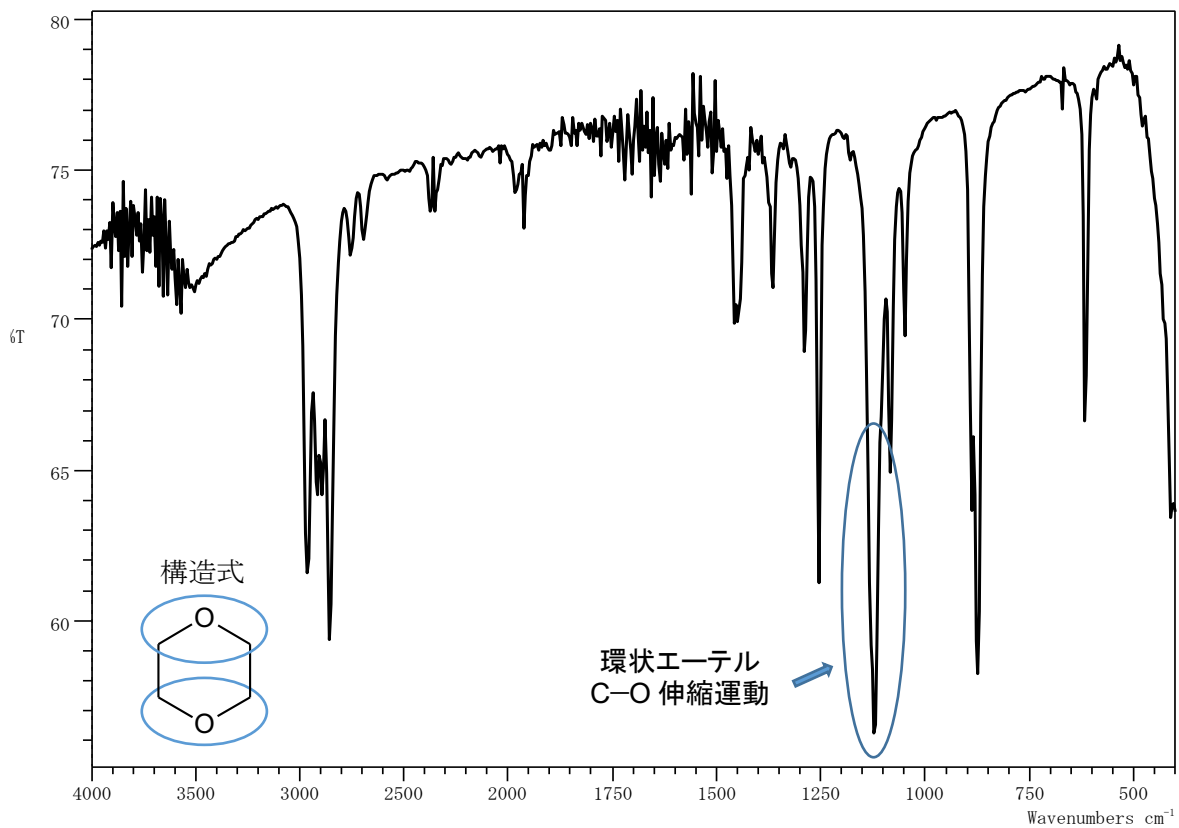


図 2. 1,4-ジオキサンの赤外吸収スペクトル及び構造式・赤外吸収特性運動

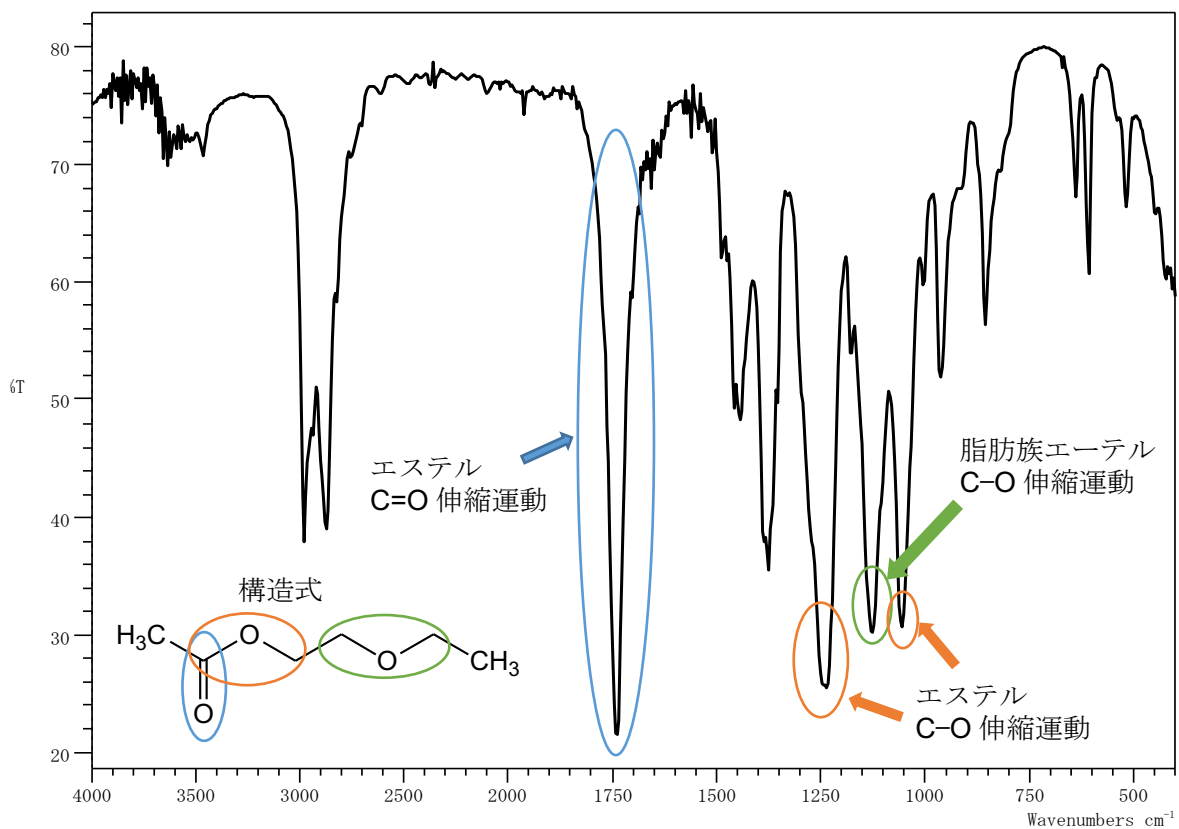


図 3. 2-エトキシエチルアセテートの赤外吸収スペクトル及び構造式・赤外吸収特性運動

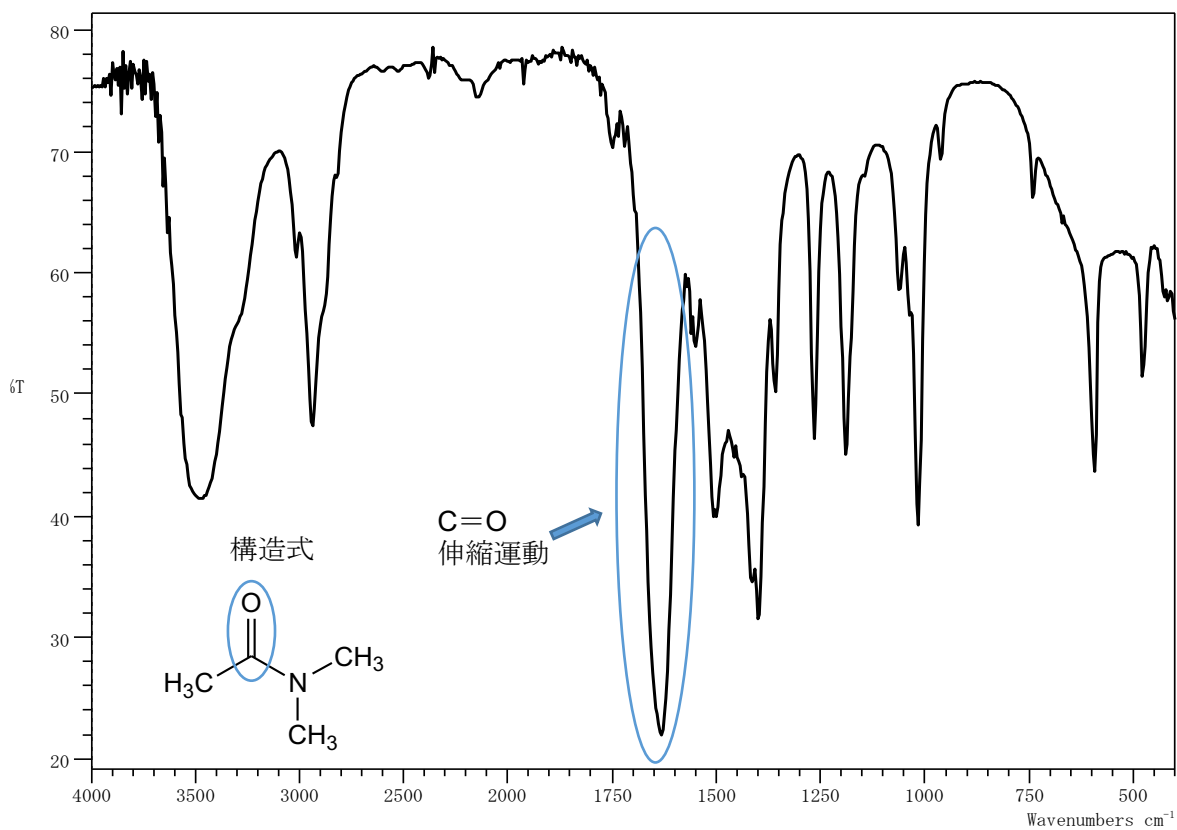


図 4. *N,N*-ジメチルアセトアミドの赤外吸収スペクトル及び構造式・赤外吸収特性運動

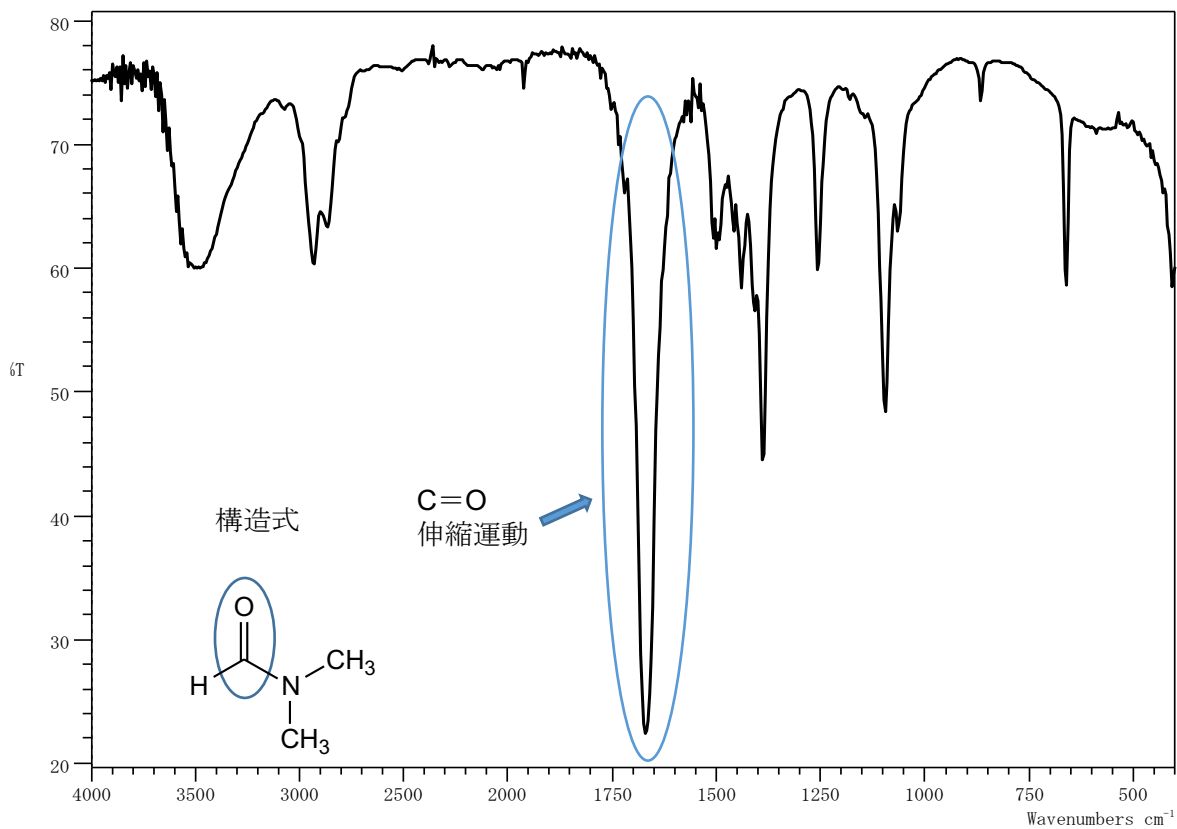


図 5. *N,N*-ジメチルホルムアミドの赤外吸収スペクトル及び構造式・赤外吸収特性運動

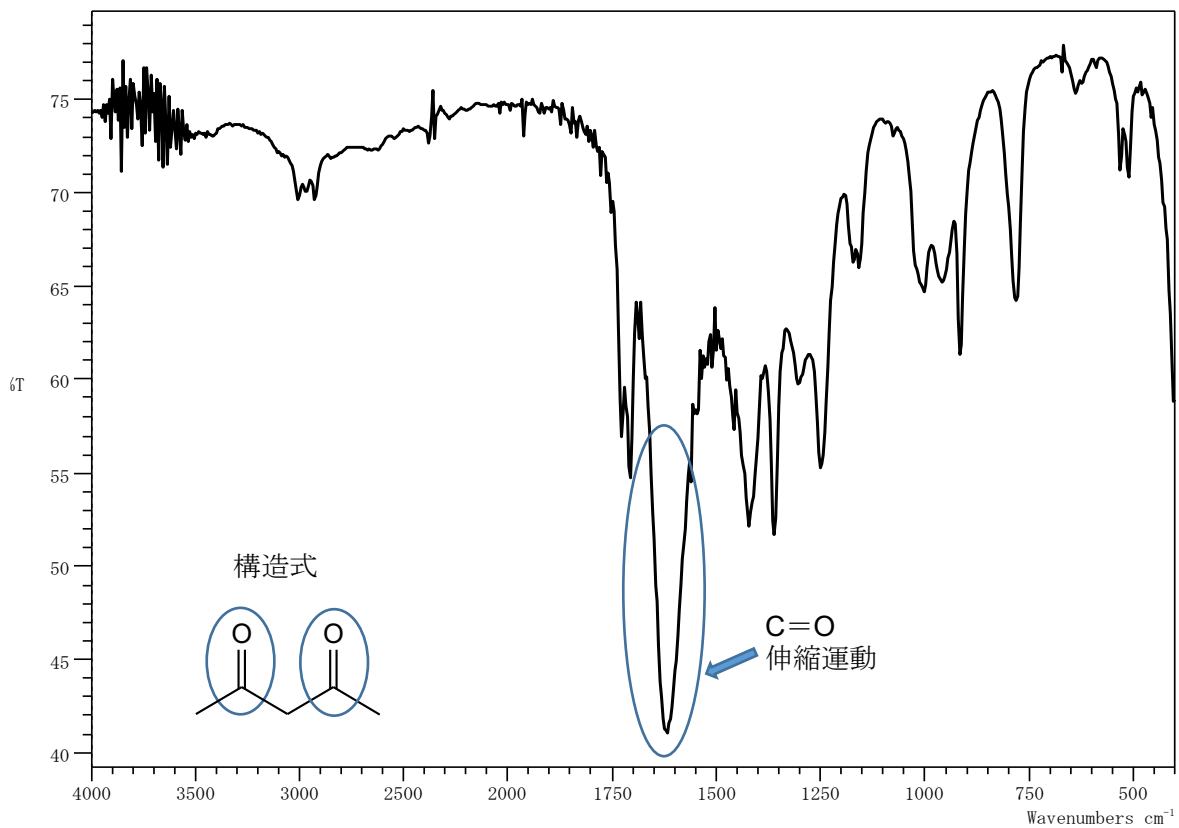


図 6. アセチルアセトンの赤外吸収スペクトル及び構造式・赤外吸収特性運動

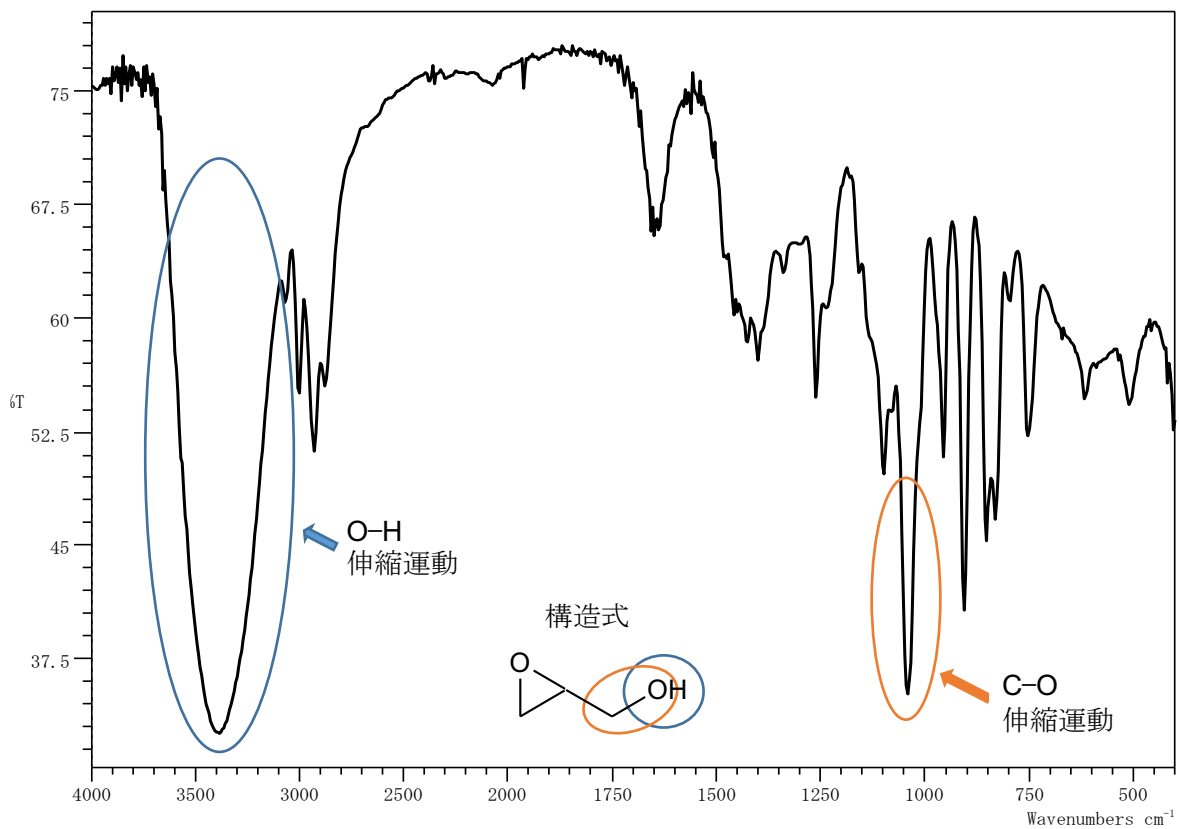


図 7. グリシドールの赤外吸収スペクトル及び構造式・赤外吸収特性運動

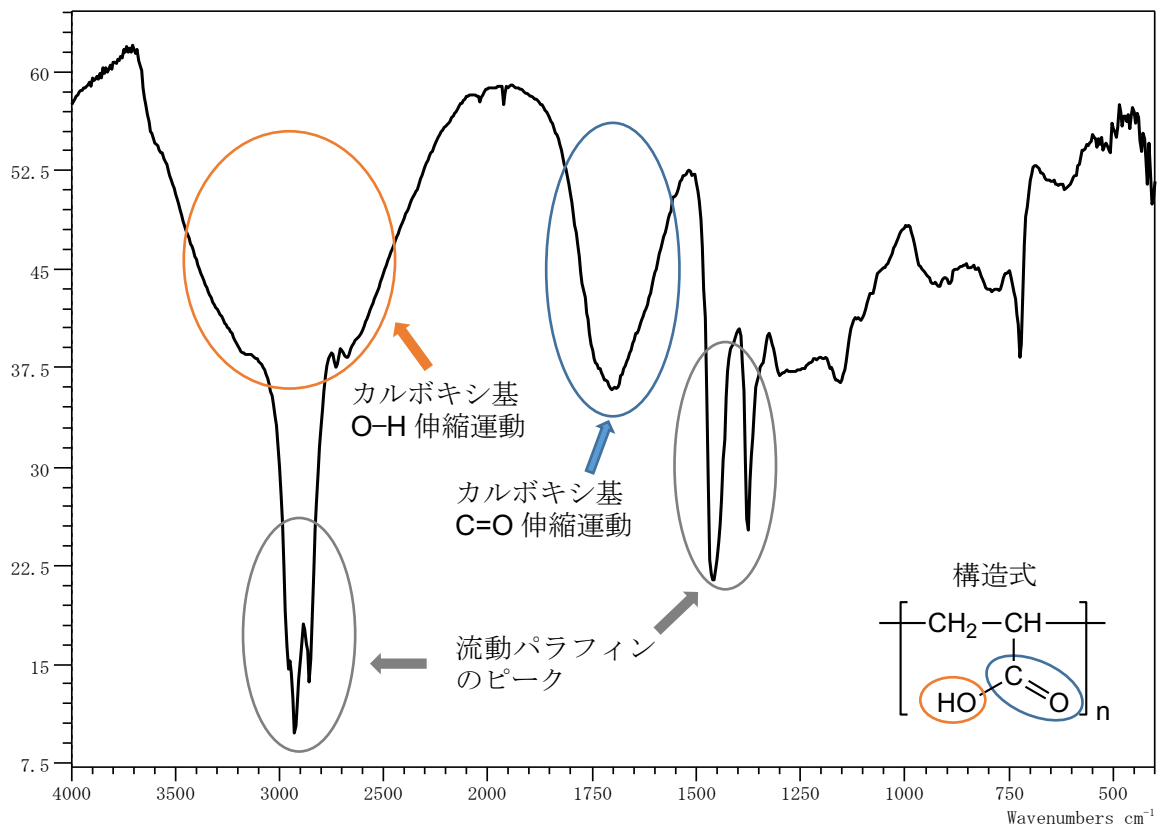


図 8. アクリル酸ポリマーの赤外吸収スペクトル及び構造式・赤外吸収特性運動

令和2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に関する研究

分担研究課題名: 多層カーボンナノチューブ曝露による活性カルボニル化合物産生とDNA
付加体形成に関する研究

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*、*in vivo* 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)、DNA 付加体の網羅的解析による評価系の構築を試みた。先ずマウスマクロファージ様細胞RAW264.7に試行検体として種々の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を曝露させた結果、対照群と比較して MWCNT 曝露による酸化ストレス由来の RCsの生成が確認された。また、MWCNT を TIPS によって曝露されたラット肺組織中の DNA 付加体を検出した結果、MWCNT 曝露によって DNA 付加体が増加傾向を示していた。RCsや DNA 付加体の生成を測定することで、酸化ストレスを評価し、また、化学物質曝露による毒性評価に利用することが可能と考えられた。現在、1) 4-ジオキササン、2) グリシドール、3) *N,N*-ジメチルホルムアミド、4) アクリル酸ポリマー、5) アセチルアセトン、6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、7) *N,N*-ジメチルアセトアミドについて試みている。

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短期毒性評価に関して先ず、それ自体が代謝されないでMφによる活性酸素処理に着目し、さらに他の化合物の代謝による活性酸素産生に応用する戦略をとった。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)生成及びその核酸付加体について、質量分析計を用いて測定することで、MWCNT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、MWCNTのTIPS後のラット肺組織中DNA付加体を測定した。

B. 研究方法

1. マウスマクロファージ様細胞におけるMWCNT曝露と活性カルボニル化合物の解析
マウスマクロファージ様細胞RAW264.7に構造の異なる多層カーボンナノチューブ(MWCNT-A, -B, -7, -N, DWCNT)を10 µg/mLになるように曝露し、24時間後に培養上清を回収した。そのうち、200 µL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。

2. ラット肺組織中 DNA 付加体の解析

DWCNT (0.125, 0.25, 0.5 mg/rat)、MWCNT-7 (0.5 mg/rat) を経気管肺内噴霧投与した 1 か月後のラット肺組織 20 mg から DNA を抽出した。抽出した DNA を酵素的にヌクレオシドに加水分解した。肺組織は津田研究室にて実施されたラットの肺を用いた。得られた DNA 加水分解物を LC/MS 解析試料とした。DNA 付加体は DNA 付加体の分子イオンピーク [M+H]⁺ からデオキシリボースの脱離によって生じる [M+H-116]⁺ 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)

動物実験は名古屋市立大学動物実験委員会の承認を受け、規定に則り、適切に行われた (津田報告書参照)。

C. 研究結果

1. マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 における MWCNT 曝露による活性カルボニル化合物の網羅的解析を行った結果、対照群 143 peaks、MWCNT-A 142 peaks、MWCNT-B 169 peaks、MWCNT-7 152 peaks、MWCNT-N 134 peaks、DWCNT 197 peaks の RCs が検出された。そのうち、対照群と比較して MWCNT-A は 60 peaks、MWCNT-B は 88 peaks、MWCNT-7 は 63 peaks、MWCNT-N は 49 peaks、DWCNT は 100 peaks が増加傾向を示した。増加傾向を示した RCs のうち、有意に増加した RCs はいずれも未知の化合物であった。

2. ラット肺組織における DWCNT 曝露による DNA 付加体の網羅的解析を行った結果、DWCNTs の肺内投与によって Total の Peak 数に大きな変動は見られなかった。対照群と Peak を比較すると、0.125 mg/rat では、73 peaks、0.25 mg/rat では、81 peaks、0.5 mg/rat では、67 peaks、MWCNT-7 0.5 mg/rat では、62 peaks が対照群と比較して増加傾向を示した。ま

た、DWCNT 濃度依存的に増加する付加体も検出できたが、DWCNT と MWCNT-7 を比較すると、MWCNT-7 で高値を示した付加体は DWCNT 0.5mg/rat でも高値を示しており、MWCNT-7 と DWCNT 0.5mg/rat での付加体の差は認められなかった。また、増加傾向を示した DNA 付加体はいずれも未知の化合物であった。

D. 考察

RAW264.7 細胞において MWCNT 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、種々の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、MWCNT 肺内投与ラット肺組織中の DNA 付加体も対照群と比較して増加傾向を示していた。MWCNTs 肺内投与ラットの肺組織においては、MWCNTs を貪食して活性化した肺胞マクロファージが活性酸素を過剰に産生することで肺組織の傷害を引き起こすことが示唆されている。これらのことから、*in vitro*, *in vivo* での RCs や DNA 付加体を網羅的に検出することは、種々の化学物質の毒性の評価に適していると考えられる。

しかし、マクロファージ様培養細胞 RAW264.7、肺組織ともに MWCNT 曝露によって増加傾向を示した RCs、DNA 付加体はいずれも未知の化合物であったことから、毒性メカニズムの解明のために化学構造の同定をする必要がある。また、肺癌細胞 A549 における MWCNT 曝露による RCs および RCs-DNA 付加体の生成について LC/MS を用いた網羅的解析、及び RCs による毒性評価を試みる。

E. 結論

本研究では、*in vitro*, *in vivo* における化学物質の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) および DNA 付加体の網羅的解析法を用いた。MWCNT を用いた評価では、曝露によって生じた RCs 生成および DNA 付加体の増加を測定することが出来た。しかし、増加した化合物はいずれも未知のもの

であった。対象となっている検体について *in vitro*, *in vivo* における RCs 生成や DNA 付加体、その他代謝物を測定することで、急性毒性の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. 健康危機情報

MWCNTs を曝露することで、肺組織での酸化ストレスが増悪し、DNA 傷害、炎症を惹起することが考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

T. Yamazaki, M. Biswas, K. Kosugi, M. Nagashima, M. Inui, S. Tomono, H. Takagi, I. Ichimonji, F. Nagaoka, A. Ainai, H. Hasegawa, J. Chiba, S. Akashi-Takamura. A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza. *Frontiers in Immunology*. 2020. eCollection 2020.

2. 学会発表

該当項目なし

H. 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2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に関する研究

分担研究課題名 被検物質のDNA障害性の解析に関する研究
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

これまでに、津田グループが独自に開発した実施容易な経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法を用いて日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) にて実施された毒物劇物を含む物質の急性毒性に関わる毒性について、マイクロアレイ解析による解析を試みて有害性評価に適用して発展させようとするものである。手法の開発においてはJBRCにてLC50について試験された1, 4-ジオキサン、2) グリシドール、3) *N,N*-ジメチルホルムアミド、4) アクリル酸ポリマー、5) アセチルアセトン、6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、7) *N,N*-ジメチルアセトアミド等について発がん性のデータを得る方法についてマイクロアレイ解析を試みている。それに先立ち津田研究室にて実施してきたカーボンナノチューブについての解析を施行してデータを取り、短期毒性の評価と同時に肺と胸膜中皮に対する発がん性が見られたマ40層の多層カーボンナノチューブMWCNT-7および2層のDWCNTについて、気管内投与で誘発したラット肺腫瘍および中皮腫についてマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析を実施し、腫瘍のアレイ解析を行った。その結果、DWCNT誘発肺腺癌で1028個、MWCNT-7誘発肺腺癌で906個、MWCNT-7誘発した中皮腫で1047個の遺伝子が2倍以上の発現変動を認めた。また、DWCNT、MWCNT-7で誘発された肺腺癌において、共通の発現変動が認められた遺伝子は301個存在した。MWCNT-7で誘発された肺腺癌と中皮腫の遺伝子発現変動を比較した結果、共通の変動が認められた遺伝子は230個であったが、それぞれ特異的な変動が見られた遺伝子は590および815個であった。さらに、肺腺癌においては誘発物質が異なるにもかかわらず、多くのパスウェイが共通していることがわかった。一方、MWCNT-7誘発中皮腫では、Actin Cytoskeleton SignalingやCalcium Signalingなどのパスウェイの活性化がみられ、肺腺癌とは異なることが判明した。以上より、異なる種類のカーボンナノチューブで誘発したラット肺発がんには共通する発がん機序が存在することが示唆された。現在、上記7物質についてについて解析の可能な物質から解析を試みている。

A. 研究目的

カーボンナノチューブは、生体内においてアスベストに似て難分解性で、マクロファージの胞体内や、肺および胸膜組織、縦隔リンパ節に沈着して強い持続性異物炎症を誘発するために、発がんの可能性が懸念されてきた。これまでに、津田グループが独自に開発した実施容易な経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法を用いて、40層の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) であるMWCNT-7、およびそれに比べてはるかに層数の薄い2層のDWCNTにおいて、肺または胸膜中皮に発がん性があることを明らかにしてきた。本研究ではこれらのマイクロアレイ解析による解析を、日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) にて実施された毒物劇物を含む物質の急性毒性に関わる毒性について試みて有害性評価に適用して発展させようとするものである。

B. 研究方法

凍結腫瘍組織および非癌部組織から、RNase Mini Kit (Qiagen社)を用いて、total RNAを精製・抽出した。解析材料は以下の通り：DWCNTで誘発した肺腺癌1例 (D7-Adc)および同個体の非癌部 (D7-N)；MWCNT-7で誘発した肺腺癌1例 (M7-Adc)および同個体の非癌部 (M7-N1)；DWCNT-7で誘発した中皮腫1例 (M7-MM)および同個体の非癌部 (M7-N2)；無処置ラット (溶媒群)の肺組織3例

(Con.)。各組織から得られたtotal RNAに対して、GeneChip® Clariom D Assay, Rat (Affymetrix社)を用いたマイクロアレイ解析を行った。得られた遺伝子発現データについて、Ingenuity pathway analysis (IPA) software (Qiagen社)を用いて解析した。

C. 研究結果

腫瘍および非腫瘍部における遺伝子発現差を確認した結果、DWCNT誘発肺腺癌で1028個、MWCNT-7誘発肺腺癌で906個、MWCNT-7誘発した中皮腫で1047個の遺伝子が2倍以上の発現変動を認めた。また、DWCNTおよびMWCNT-7で誘発された肺腺癌において、共通の発現変動が認められた遺伝子は301個存在した。

MWCNT-7で誘発された肺腺癌と中皮腫の遺伝子発現変動を比較した結果、共通の変動が認められた遺伝子は230個であったが、それぞれ特異的な変動が見られた遺伝子は590および815個であった。

各腫瘍における活性化および不活性化 (青色) されているパスウェイを図1に示す。各腫瘍におけるパスウェイを比較したところ、3つの肺腺癌においては誘発物質が異なるにもかかわらず、多くのパスウェイが共通していることがわかった。一方、MWCNT-7誘発中皮腫では、Actin Cytoskeleton Signaling、Calcium

Signaling、ILK Signaling、GP6 Signaling、PAK Signaling などのパスウェイの活性化がみられ、肺腺癌とは異なることが判明した。

図1 各腫瘍におけるパスウェイの比較

D. 考察

DWCNT および MWCNT-7 で誘発した肺腺癌において認められた遺伝子発現変動と、変化を認めたパスウェイに共通するものが多く存在することから、カーボンナノチューブは種類によらず、共通するシグナル伝達経路の活性化を引き起こすことが示唆された。一方、Actin Cytoskeleton Signaling、Calcium Signaling、ILK Signaling、GP6 Signaling、PAK Signaling などのパスウェイ活性化されたことは、MWCNT-7 で誘発した中皮腫のみでみられたことから、これらのパスウェイは中皮腫の発生に関与することが考えられた。今後は、肺腺癌および中皮腫の発生にキーとなる遺伝子を探索する予定である。

E. 結論

異なる種類のカーボンナノチューブで誘発したラット肺発がんには共通する発がん機序が存在することが示唆された。一方、MWCNT-7は異なる機序により肺腺癌および中皮腫を誘発することが考えられた。この結果を異なる化学物質の毒性、とくに発癌性への応用について検討を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 336, 32-38, 2021.
2. Kakehashi A, Chariyakornkul, A, Suzuki S, Khanphram N, Tatsumi K, Yamano S. Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 13(6), 2021.
3. Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 96: 180-187, 2020.
4. Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani. T Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of

cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett*, 479: 89-99, 2020.

5. Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol*, 33: 279-285, 2020.
6. Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 21, 2020.
7. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*, 94: 927-937, 2020.

2. 学会発表

1. 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明、第 93 回産業衛生学会、WEB 開催 (2020 年 4 月)
2. 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用、第 47 回日本毒性学会学術年会、WEB 開催 (2020 年 6 月)
3. 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開、第 27 回がん予防学会総会、WEB 開催 (2020 年 9 月)
4. Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice、第 79 回日本癌学会学術総会、WEB 開催 (2020 年 10 月)
5. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出、第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、WEB 開催 (2021 年 1 月)

G. 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

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

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
Wang Q., Zhao Z., Alexander DB, Zhao D., Jiegou Xu, Tsuda H.	Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes	J. Toxic. Pathol.	33(3)	145-151	2020
Saleh D., Alexander TW., Numano T., Ahmed M.H.O., Gunasekaran S., Alexander DB., Abdelgazzar AM., Takase H., Jiegou Xu., Naiki-ito A., Takashi S., Hirose A., Ohnishi M., Kannno J., Tsuda H.	Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat.	Particle and Fibre Toxicology	17	48 https://doi.org/10.1186/s12989-020-00382-y	2020
Sudo H., Tsuji AB., Sugyo A., Kurosawa G., Kurosawa Y., Alexander DB., Tsuda H., Saga T., Higashi T.	Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213 has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression.	Int. J. Mol. Sci.	21(7)	2304 https://doi.org/10.3390/ijms21072304	2020
Kato H, Naiki-ito A (Corresponding Author), Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S.	DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer.	Carcinogenesis	in press		

Suzuki S, Cohen SM, Arnold L, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S.	Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin.	Toxicol Lett.	336	32-38	2021
Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H.	Role of γ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats.	J Toxicol Pathol.	33(4)	279-285	2020
Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A, Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K.	The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease.	Physiol Rep.	8(17)	e14556	2020
Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S.	A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats.	Arch Toxicol.	94	4085-4097	2020
Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, Naiki-Ito A, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohtani Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K.	Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation.	Neurol Urodyn.	39	1922-1929	2020
Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T.	Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis.	Andrology	8	1895-1906	2020
Mapoung S, Suzuki S, Fujii S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovattarnporn C, Takahashi S,	Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prospermatogenesis Inhibitor In Vitro and In Vivo.	Molecules	25	2737	2020

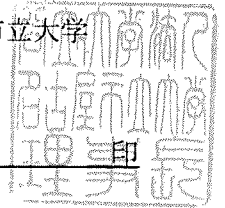
Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S.	Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer.	Carcinogenesis	41	1145-1157	2020
Yeewa 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
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
Yamazaki T., Biswas M., Kosugi K., Nagashima M., Inui M., Tomono S., Takagi H., Ichimonji I., Nagaoka F., Ainai A., Hasegawa H., Chiba J., Akashi-Takamura S.	A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza.	Frontiers in Immunology	11	doi: 10.3389/fimmu.2020.606518	2020
Takehashi A, Chariyakornkul, A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Wanibuchi H.	Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Basel)	13(6)	1216	2021
Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gai M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shizaki K, Nakagama H.	Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci	96	180-187	2020

Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamazaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T	Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer.	Cancer Lett	479	89-99	2020
Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H.	Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Int J Mol Sci	21(20)	7746	2020
Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H.	Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model.	Arch Toxicol	94	927-937	2020

令和 3 年 3 月 26 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学名古屋市立大学
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 2 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) 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 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"/>	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。

令和 3年 3月 26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 印

次の職員の令和2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 3年 4月 9日

国立医薬品食品衛生研究所長 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 印

次の職員の令和2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の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) 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部 技術専門役
(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 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。

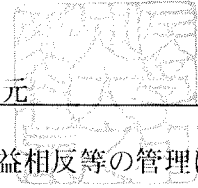
令和3年3月26日

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 祖父江 元 印



次の職員の令和2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

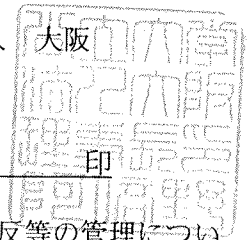
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理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

令和 3年 3月 23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 印



次の職員の令和2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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大阪市立大学	<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。