

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3年度 総括研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

令和4年（2022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. 酸化ストレス由来 DNA 付加体による炎症誘導	
伴野 勘	16
3. 被検物質の DNA 障害性の解析	
魏 民	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

令和3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）指定化合物の吸入曝露毒性評価には高額な費用が要求されるために、実際の曝露とは異なる経口・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、従来の吸入曝露試験に代わり得る簡便な気管内投与法を開発して、事業場等における吸入曝露における安全基準に用いることのできる簡便で信頼性の高い新規の毒性評価法を開発してOECDテストガイドラインへの採択を目指すことにある。代表者らは今までにラットを用いた経気管肺内噴霧投与（TIPS）による試験法を開発し、MWCNT-7を含む多層（MWCNT）～2層（DWCNT）までのカーボンナノチューブ（CNT）およびチタン酸カリウム線維等の毒性および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、この分野のトップジャーナル（Particle and Fibre Toxicology, IF 8～9）に採択されてきた。

本研究は、*in vitro*試験法とTIPS法を組み併せて毒物劇物の有害性評価に適用できる簡便で安価な評価試験法として発展させようとするものである。この方法の開発段階において日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）にて短期吸入曝露試験が実施された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、*in vitro*におけるNeutral Red試験から得られたA549肺がん細胞に対するLD50データを、TIPS法に応用して（3時間に0, 1, 2, 3時の4回）投与後2週間までのLD50値を得た。その結果、本法で1,4-dioxaneのLD50値は1300mg～1560mg/kgの範囲にあり、これはJBRCにおける通常の吸入曝露試験のLC50値1600mg/kgに近似する値であった。この手法の妥当性と普遍化を目指して現在までに13種の物質について以下のデータを得た。（1～4はその値の既知の値の倍数値）。

R1年度には1) 1,4-ジオキサン：1、R2-3度には、2) ポリアクリル酸ナトリウム：1、3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート：1、4) グリシドール：1.7～2.4、5) アセチルアセトン：2.0～3.6、6) N,N-ジメチルアセトアミド：1.9～3.8、7) N,N-ジメチルホルムアミド：3.0～3.9、8) グリシルメサクリレート：4、9) アクロレイン：1、10) キシレン：2、11) 1,2-ジクロロエタン：1、12) キノリン：4以上、13) t-ブチルアルコール：3以下、であった。11物質は既存の吸入曝露LC50値の4倍以内（異なった施設における試験結果との差異範囲）、2物質は近似値であった。これは4時間吸入曝露試験における結果の施設間の差異の範囲であるに収まる。以上の13物質の結果から、本法は吸入曝露法LC50の近接値がTIPS短期投与法にて得られることが示された。

以上から、OECDテストガイドライン等のLC50(4h)と、得られたTIPS LD50の比較において、13物質中11種に既存データの4倍以内であった。使用ラット数は1物質について40～50匹程度であり、世界で求められている動物数の削減方針に叶うものである。

伴野 勘 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

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、事業場等の環境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・腹腔内投与法等で代替されていて、本来の吸入曝露のリスク評価が実施されていないものが多数ある。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高額な稼働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、実施容易な肺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種の壁層数の異なった形状のカーボンナノチューブと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、吸入曝露試験に代わる TIPS 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, Particle and Fibre Toxicology) 等の高い IF ジャーナルに掲載されて、そ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 (GHS の呼吸器毒性ラベルの付いている物質が多い) 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。また毒性発現機序として機序として酸化ストレス惹起によって生じる脂質過酸化物 DNA 付加体の炎症誘導の有無についてマクロファージによる IL-6 産生によって評価した。さらに検体に曝露された A549 細胞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、その肺毒性の発現機序の検討を行った。現在、いくつかの部室について遺伝子解析が実施中であるが、本研究より、化学物質の吸入曝露による肺毒性の発現機序の解明に寄与するデータを得ることが期待されている。

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 (㈱島津製作所 IR Affinity-1) により 4000~400cm⁻¹ (0.00025cm~0.0025cm) 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 : 試験物質の検定例

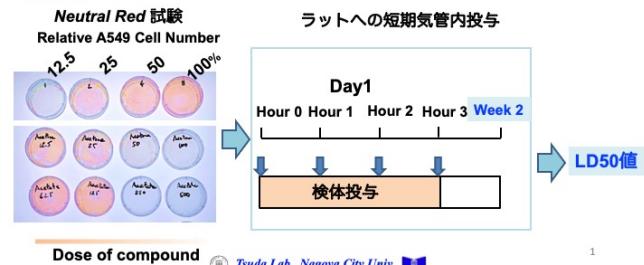
図 1 試験法の構成 (In vivo と In vitro 結合試験)

1) Neutral red cytotoxicity assay

培養液中の検体投与量 (mg/ml) のLD50用量 (mg/L) をラットにおけるTIPDS用量の下限値として以下の実験を行う。

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

2) ラットにおいて、短時間に 3~4 回の TIPS 投与を行い、2 週後の D50 値を求める。



試験法

① in vitro Neutral Red 毒性試験

検体に曝露された A549 細胞の Neutral red の取り込みの計測による LD50 を求めた。この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) として推奨されている (図 1)。

具体的には、Neutral red の肺がん細胞への取り込み率毒性評価の指標とする用量設定試験ではこの in vitro 暫定 LD50 を挟む約 5~6 段階の用量にて 1 投与群 5~10 匹にて LD 値を求めた。

条件は: 細胞は肺胞上皮由来がん A549 細胞

250,000/dish を RPMI10%FBS 培養液にて培養し、その中に検体 (LD50 値の 0.1~10 倍) を加え Neutral red 0.033mg/mL 加えてその濃度によって A549 細胞の 50% 致死用量を探索する方法 (図 2 の A と B) で。それに「もとづいて、体重当たりの用量 (群) を決めた (図 2 の C)。

② in vivo TIPS 試験 :

上記の Neutral red 試験より導き出された体重あたりの投与量 (図 2 の C) を 3 時間に 4 回 (0, 1, 2, 3 時) で投与した。

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た。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 (図 2、図 3)。

図2

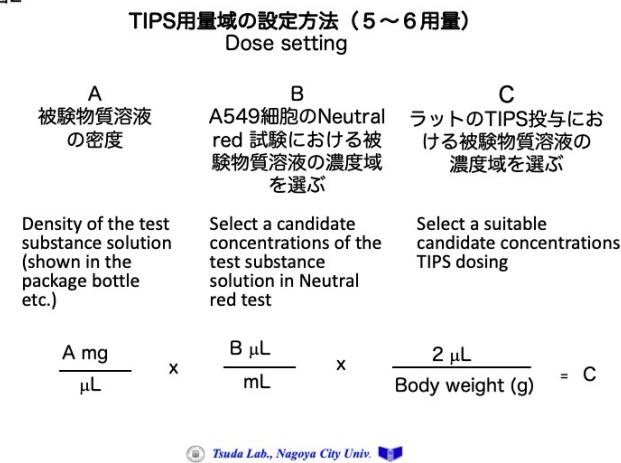
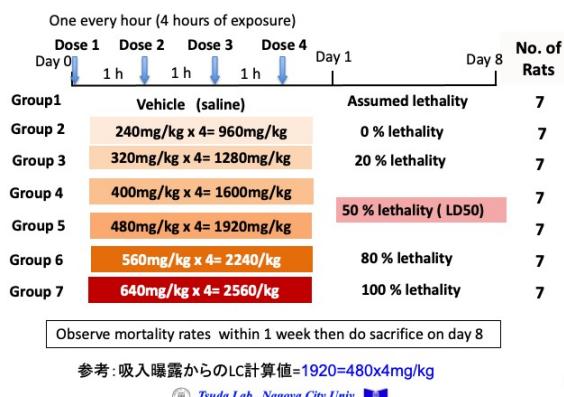


図3 得られたプロトコルに従って1,4-DioxeneのTIPSによるLC50値の評価をしてみた (Ex. 公差320)



以下に検体の用途・毒性・発がん性 (WHO国際癌研究機構・IARC の発がん性の評価) 等を示す

- 1) 1,4-ジオキサン (報告済み) : 洗剤用品原料、溶剤、IARC Group 2B
- 2) ポリアクリル酸ナトリウム : 水吸収樹脂
- 3) 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) : 塗料、インキ、血液・精巢毒性、IARC G3
- 4) グリシドール: 天然油脂、ビニル樹脂安定剤、肝障害、IARC Group 2A
- 5) アセチルアセトン: 接着剤原料、溶剤、吸引毒性
- 6) *N,N*-ジメチルアセトアミド: 肺・気管・肝・腎・副腎・脾・睾丸障害、IARC G2B
- 7) *N,N*-ジメチルホルムアミド: アクリル樹脂の合成、肝障害、IARC Group 2A
- 8) グリシルメタクリレート: 塗料、帯電防止剤、IARC Group 2A
- 9) アクロレイン: 医薬品等の原料、IARC Group 2A
- 10) キシレン: 塗料等の溶剤、IARC Group 3

- 11) 1,2-ジクロロエタン: 有機溶剤、フィルム洗浄剤 (IARC Group 2B)
- 12) キノリン: 農薬原料、IARC Group 2B)
- 13) n-ブチルアルコール: 溶剤

③ 毒性発現の機序解析

リノール酸由来脂質過酸化物、HNE、acrolein、glyoxal-DNAまたはdG付加体単体を曝露させた培養上清ではIL-6の産生は見られなかった。しかし、カチオン性脂質リポソーム製剤DOTAPと混合し、細胞内への取り込みを促進させた場合、種々のDNA付加体-DOTAPリポソームを1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように曝露したマクロファージ培養上清中のIL-6濃度をELISA法により測定すると、DOTAP単体、DNA-DOTAP、Glyoxal-DNA-DOTAPではIL-6の産生増強は確認することはできなかった。一方で、Positive controlであるCpG-B-ODN、リノール酸由来脂質過酸化物-DNA付加体-DOTAP、HNE-DNA-DOTAPではIL-6産生増加を観察する。

A549細胞の遺伝子解析で半 1×10^6 個のA549細胞を30 mm dishにまき、翌日にLD50用量の被験物質を混じた培地に交換し15分間曝露後、PBSで洗浄する。A549細胞から、RNase Mini Kit (Qiagen社)を用いて、total RNAを精製・抽出した。被験物質は以下の通り: 1,4-dioxane、Acrolein、Glycidyl methacrylate及びXylene。各サンプルから得られたtotal RNAに対して、GeneChip® Clariom D Assay, Human (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)を用いて解析する。

(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

投与物質の検定

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。

試験結果

① *in vitro* Neutral red毒性試験

Neutral redの取り込みを指標とした結果は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5～10匹にてLD値 (LD50ではない) を求めた。

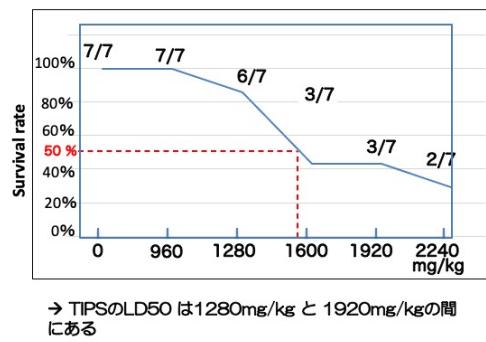
条件は: 細胞は肺胞上皮由来がんA549細胞250,000/dish をRPMI10%FBS培養液にて培養し、その中に検体 (LD50値の0.1～10倍) を加えNeutral red 0.033mg/mL加えてその濃度によってA549細胞の50%致死用量を得た。その致死用量の2倍量を最高用量群をとして、図2に示す計算式にて1回投与量を算出し、それを下記の方法にて4回投与した。

② *in vivo* TIPS 試験

投与は3時間に4回 (0、1、2、3時) で経気管肺内噴霧投与 (TIPS) する方法にて実施した。以下に13物質についての結果を示す。

1) 1,4-ジオキサン (図4)

図4 1) 1,4-ジオキサン (IARC G2B)
(1,4-Dioxane)



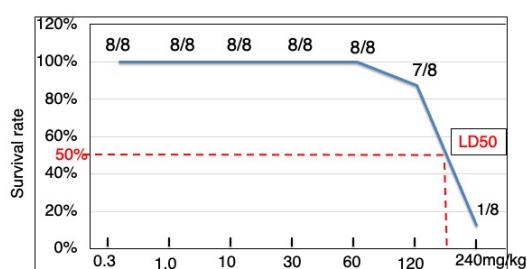
→ TIPSのLD50は1280mg/kgと1920mg/kgの間にある

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

TIPS の LD50 は 1280 (6/7) と 1600 (3/7) mg/kg の間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

2) ポリアクリル酸ナトリウム (図5)

図5 2) ポリアクリル酸ナトリウム
(Sodium polyacrylate)



→ TIPSのLD50は120mg/kgと240mg/kgの間にある

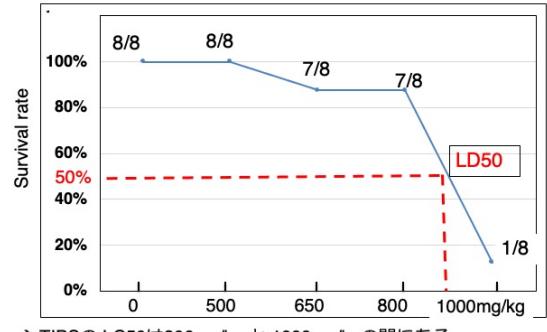
© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

TIPS の LD50 は 120 (7/8) と 240 (1/8) mg/kg の間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

3) 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6)

図6

3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート(G3)
(Ethylene glycol monoethyl ether acetate)



→ TIPSのLC50は800mg/kgと1000mg/kgの間にある

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

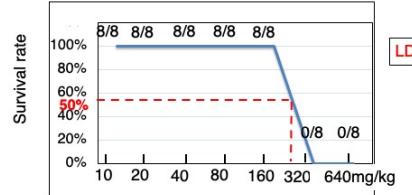
6

LD50は800 (7/8) と1000 (1/8) mg/kgの間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

4) グリシドール (図7)

図7

4) グリシドール(G2A)
(Glycidol)



→ TIPSのLD50 TIPSは160 mg/kgと320 mg/kgの間にある

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

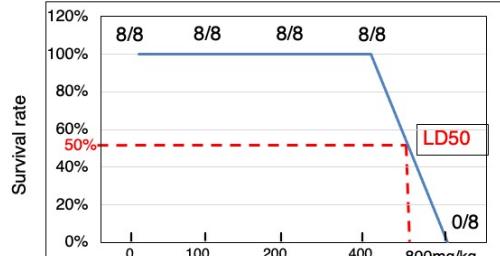
7

LD50は160 (8/8) と320 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

5) アセチルアセトン (図8)

図8

5) アセチルアセトン
(Acetylacetone or 2,4-pentadione)



→ TIPSのLC50は400mg/kgと800mg/kgの間にある

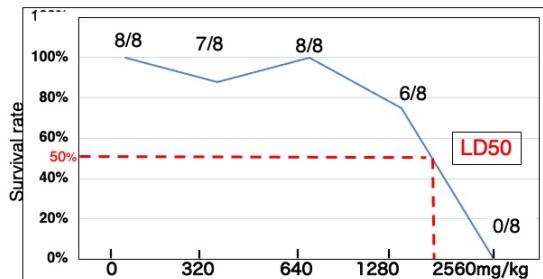
© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

LD50は400 (8/8) と800 (0/8) mg/kgの間にある（吸入曝露試験における施設間の差異以内）。

6) *N,N*-ジメチルアセトアミド（図9）

図9

6) *N,N*-ジメチルアセタミド (G2B)



→ TIPSのLC50は1280mg/kgと2560mg/kgの間にある

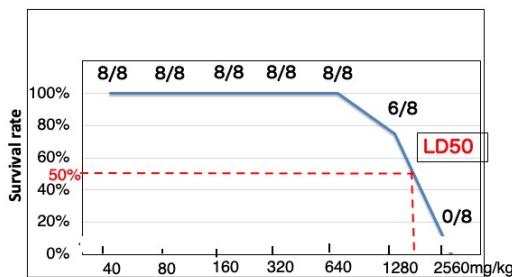
© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) mg/kgの間にある（吸入曝露試験における施設間の差異以内）。

7) *N,N*-ジメチルホルムアミド（図10）

図10

7) *N,N*-ジメチルホルムアミド (G2A)



→ TIPSのLC50は1280mg/kgと2560mg/kgの間にある

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

2560

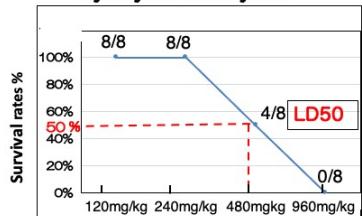
10

LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) mg/kgの間にある（吸入曝露試験における施設間の差異以内）。

8) グリシジルメサクリレート（図11）

図11 8) グリシジルメサクリレート (G2A)

Glycidyl methacrylate



→ TIPSのLC50は240mg/kgと960mg/kgの間にある

3.4 = 13.7 mg/kg 112mg/kg 120 x 4 = 480mg/kg
Neutral red test Converted TIPS LD50
80 % survival data OECD inhalation (mg/kg)
mg/kg data LC50 mg/kg

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

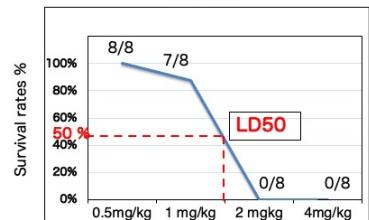
11

LD50は480 (4/8) mg/kgにある（吸入曝露試験における施設間の差異以内）。

9) アクロレイン（図12）

図12

9) アクロレイン (G2A) Acrolein



→ TIPSのLC50は1 mg/kgと2 mg/kgの間にある

Neutral red 80 % Converted TIPS LD50
survival data OECD inhalation mg/kg
mg/kg data LC50 mg/kg

< 0.176 0.9 mg/kg 1~2 mg/kg

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

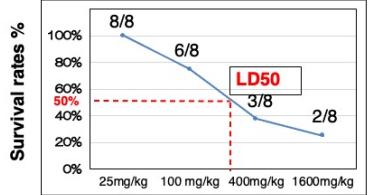
12

LD50は1 (7/8) と2 (0/8) mg/kgの間にある（吸入曝露値とほぼ一致）。

10) キシレン（図13）

図13

10) キシレン (G3) Xylene



→ TIPSのLC50は100mg/kgと400mg/kgの間にある

980mg/kg 100~400 mg/kg
10 X 4 = 40 mg/kg or
1296mg/kg Neutral red 80 % Converted TIPS LD50
survival data OECD inhalation mg/kg
mg/kg data LC50 mg/kg

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

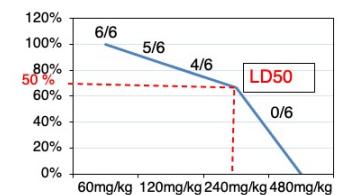
13

LD50は100 (6/8) と400 (3/8) mg/kgの間にある（吸入曝露試験における施設間の差異以内）。

11) 1,2-ジクロロエタン（図14）

図14

11) 1,2-ジクロロエタン (G2B) 1,2-Dichloroethane



→ TIPSのLC50は240mg/kgと480mg/kgの間にある

Neutral red 80 % Converted TIPS LD50
survival data OECD inhalation mg/kg
mg/kg data LC50 mg/kg

15 X 4 = 60 mg/kg 7.9mg/kg 343 mg/kg
(240~480)

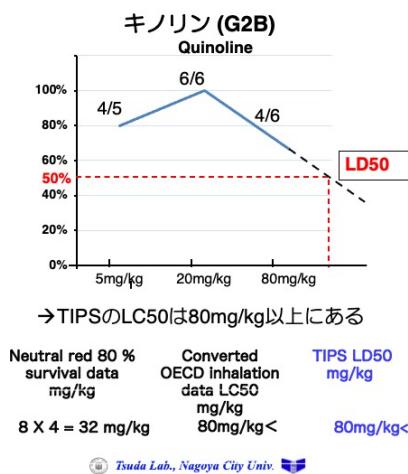
© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

14

LD50は240 (4/6) と480 (0/6) mg/kgの間にある（吸入曝露値とほぼ一致）。

12) キノリン (図15)

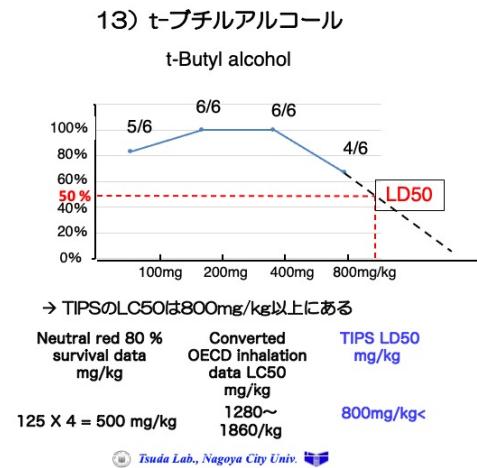
図15



LD50は480mg (4/6) 以上にある。

13) t-ブチルアルコール (図16)

図16

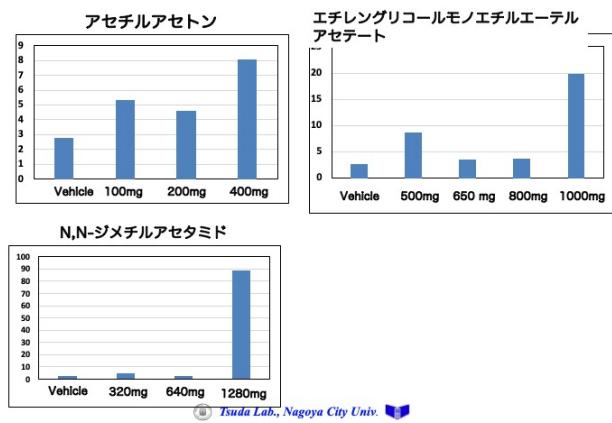


LD50は800mg/kg (4/6) 以上にある。

③ 肺の急性毒性変化

3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、5) アセチルアセトンおよび6) N,N-ジメチルアセトアミド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では、BALF 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になり得ると考える。（図17：肺胞気管支洗浄液のWBC数）

図17 気管支洗浄液中のWBC数 ($10^2/\mu$ l)



DNA 付加体の炎症誘導の解析においては、酸化ストレス惹起によって生じる脂質過酸化物 DNA 付加体の炎症誘導の有無をマクロファージによる IL-6 産生によって評価した結果、脂質過酸化物 DNA 付加体は IL-6 産生を増強することを見出した。今後、詳細な炎症誘発メカニズムの解明を試みる必要がある。

A549 細胞における遺伝子発現解析が進行中である。

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、得た肺がん細胞の致死量を 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 回投与して LD50 値を得て、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、13 物質のうち 11 物質は従来の 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 倍以内 (= 吸入曝露試験における施設間の差異以内) であり、信頼度の高い試験法であると考える (表 1, 2)。

以上から、同時に高額な装置と稼動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 LD50の比較

検体	既存の吸入曝露の 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 (G2B)	1492-2216	1600-1920	1 : 1 (吸入曝露値内)
2) ポリアクリル酸ナトリウム	93.7-2466	120-240	1 : 1 (吸入曝露値内)
3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (G3)	522-1041	800-1000	1 : 1 (吸入曝露値内)
4) グリセドール (G2A)	92.4-130.7	160-320	1 : 1.7-2.4
5) アセチルアセトン		220	1 : 2.0-3.6
6) N,N-ジメチルアセトアミド (G2B)	96.12-671	1280-2560	1 : 1.9-3.8
7) N,N-ジメチルホルムアミド (G2A)	328-651 または >254	1280-2560	1 : 3.0-3.9

OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、**の値が*の表示最大値の4倍 (LC値の施設間の差異の上限) 以内に入ればTIPSの結果は妥当と考える

表2

吸入暴露のLC50 (4時間暴露値)と得られたTIPS LD50の比較

検体	既存の吸入暴露の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)
8) グリシジルメサクリレート (G2A)	112	480	1 : 4
9) アクロレイン (G2A)	0.9	1~2	1 : 1 (吸入暴露値閾内)
10) キシレン (G3)	522~1041	100~400	1 : 2
11) 1,2-ジクロロエタン (G2B)	345	240~480	1 : 1 (吸入暴露値閾内)
12) キノリン (G2B)	25	<80	1 : ?
13) t-ブチルアルコール	1280~1860	800<	1 : ?

OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、**の値が*の表示最大値の4倍 (LC値の試験実施施設間の差異の上限) 以内入ればTIPSの結果は妥当と考える

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ. 

19

またこれまでに脂質過酸化分解物である活性カルボニル化合物は、アルデヒド基やケトン基を化学構造に有する事から、タンパク質のアミノ基やDNAやRNAのアミノ基と反応することで、タンパク質の機能不全、DNA損傷や突然変異誘導を惹起すること事が分かっている。本研究結果により、DNA付加体自体にも炎症反応誘導能を持つことが示唆された。一般的に細菌やミトコンドリア由来の核酸はTLR7やTLR9といった自然免疫に関わる受容体を介して炎症反応を誘導する。今後、脂質過酸化反応物由来DNA付加体についてもTLR7やTLR9との関わりについて詳細に検討する必要がある。

E. 結論

本研究では、*in vitro* 毒性試験における毒性評価方法として、化学物質曝露に伴う酸化ストレスに着目した。酸化ストレス惹起によって生じる脂質過酸化物DNA付加体の炎症誘導の有無をマクロファージによるIL-6産生によって評価した結果、脂質過酸化物DNA付加体はIL-6産生を増強することを見出した。今後、詳細な炎症誘発メカニズムの解明を試みる必要がある。

E. 結論

この方法によって、比較的毒性の強い物質でも首尾良く既存のJBRC等による従来の吸入曝露試験によるLC50(4 hr)に近似する値(吸入曝露試験のおよそ4倍以内・吸入曝露試験結果の施設間の差異の範囲)が得られることが分かった。今後Neutral Red試験の培地の検討と用量の算定方法・TIPS投与回数の改良によってさらに既存のLC50値に近い値の得られる方法に発展させて、OECDガイドラインへの採用を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka H., Gunasekaran S., Saleh D., Alexander TW, Alexander DB., Ohara H., Tsuda H. Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer. *Biochem. Cell Biol.* 99:159-165 (2021).
2. Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*, 12: 1-13 (2021) doi: 10.3389/fimmu.2021.758941,
3. Kobayashi A, Ito A, Shirakawa I, Tamura A, Tomono S, Shindou H, Hedde PN, Tanaka M, Tsuboi N, Ishimoto T, Akashi-Takamura S, Maruyama S, Suganami T. Dietary Supplementation with Eicosapentaenoic Acid Inhibits Plasma Cell Differentiation and Attenuates Lupus Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 2021. 12:650856.
4. Ariyoshi T, Hagiwara M, Tomono S, Eguchi S, Minemura A, Miura D, Oka K, Takahashi M, Yamagishi Y, Mikamo H. Clostridium butyricum MIYAIRI 588 Modifies Bacterial Composition under Antibiotic-Induced Dysbiosis for the Activation of Interactions via Lipid Metabolism between the Gut Microbiome and the Host. *Biomedicines*. 2021. 9(8):1065.
5. Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North B J, Watahiki A, Fukumoto S, Asara J M, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep*, 37(6), 10.1016/j.celrep.2021.109, 2021.
6. Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 13(14), 10.3390/cancers13143613, 2021.
7. Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuaphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 13 (6), 10.3390/cancers13061216, 2021.
8. 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, 202

2. 学会発表

1. Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaiied, Omnia Hosny Mohammed, William T Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double walled carbon nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS -7) in rat model. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）
2. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda 気管内投与法によるカーボンナノホーン(CNH)およびカーボンナノブラシ(CNB)の肺および胸膜における短期毒性試験 日本毒性病理学会、神戸（2022年1月）
3. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation Society of Toxicology, San Diego (2022年3月)
4. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸、(2021年7月)
5. Gi Min, Suzuki Shugo, Masaki Fujioka, Kakehashi Anna, Wanibuchi Hideki. A novel gene expression based ultra-short-term rat model for predicting genotoxic hepatocarcinogens. 第80回日本癌学会学術総会、横浜、(2021年9月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得出願中:特願 2021-146
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

令和3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）指定化合物の吸入曝露毒性評価には高額な費用が要求されるために、実際の曝露とは異なる経口・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、従来の吸入曝露試験に代わり得る簡便な気管内投与法を開発して、事業場等における吸入曝露における安全基準に用いることのできる簡便で信頼性の高い新規の毒性評価法を開発して OECD テストガイドラインへの採択を目指すことにある。代表者らは今までにラットを用いた経気管肺内噴霧投与 (TIPS) による試験法を開発し、MWCNT-7 を含む多層 (MWCNT) ~ 2 層 (DWCNT) までのカーボンナノチューブ (CNT) およびチタン酸カリウム線維等の毒性および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、この分野のトップジャーナル (Particle and Fibre Toxicology, IF 8~9) に採択されてきた。

本研究は、*in vitro* 試験法と TIPS 法を組み併せて毒物劇物の有害性評価に適用できる簡便で安価な評価試験法として発展させようとするものである。この方法の開発段階において日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) にて短期吸入曝露試験が実施された 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、*in vitro* における Neutral Red 試験から得られた A549 肺がん細胞に対する LD50 データを、TIPS 法に応用して (3 時間に 0, 1, 2, 3 時の 4 回) 投与後 2 週間までの LD50 値を得た。その結果、本法で 1,4-dioxane の LD50 値は 1300mg~1560mg/kg の範囲にあり、これは JBRC における通常の吸入曝露試験の LC50 値 1600mg/kg に近似する値であった。この手法の妥当性と普遍化を目指して現在までに 13 種の物質について以下のデータを得た。(1~4 はその値の既知の値の倍数値)。

R1 年度には 1) 1,4-ジオキサン: 1 、R2~3 度には、2) ポリアクリル酸ナトリウム: 1 、3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート: 1 、4) グリシドール: 1.7~2.4 、5) アセチルアセトン: 2.0~3.6 、6) *N,N*-ジメチルアセトアミド: 1.9~3.8 、7) *N,N*-ジメチルホルムアミド: 3.0~3.9 、8) グリシルメサクリレート: 4 、9) アクロレイン: 1 、10) キシレン: 2 、11) 1,2-ジクロロエタン: 1 、12) キノリン: 4 以上、13) *t*-ブチルアルコール: 3 以下、であった。11 物質は既存の吸入曝露 LC50 値の 4 倍以内 (異なった施設における試験結果との差異範囲)、2 物質は近似値であった。これは 4 時間吸入曝露試験における結果の施設間の差異の範囲であるに収まる。以上の 13 物質の結果から、本法は吸入曝露法 LC50 の近接値が TIPS 短期投与法にて得られることが示された。

以上から、OECD テストガイドライン等の LC50(4h) と、得られた TIPS LD50 の比較において、13 物質中 11 種に既存データの 4 倍以内であった。使用ラット数は 1 物質について 40~50 匹程度であり、世界で求められている動物数の削減方針に叶うものである。

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、事業場等の環境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・腹腔内投与法等で代替されていて、本来の吸入曝露のリスク評価が実施されていないものが多数ある。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高額な稼働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、実施容易な肺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 種の壁層数の異なった形状のカーボンナノチューブと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、吸入曝露試験に代わる TIPS 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、Particle and Fibre Toxicology 等の高い IF ジャーナルに掲載されて、そ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 (GHS の呼吸器毒性ラベルの付いている物質が多い) 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 4000~400cm⁻¹ (0.00025cm~0.0025cm) 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。

試験法

① in vitro Neutral Red 毒性試験

検体に曝露された A549 細胞の Neutral red の取り込の計測による LD50 を求めた。この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) として推奨されている (図 1)。

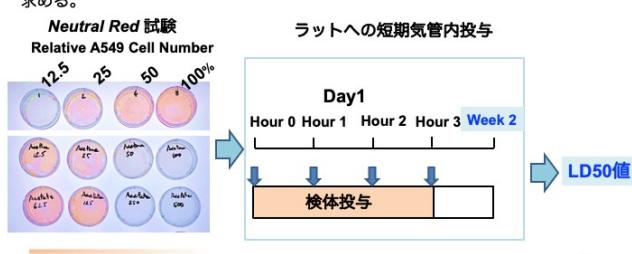
図1 試験法の構成 (In vivo と In vitro 結合試験)

1) Neutral red cytotoxicity assay

培養液中の検体投与量 (mg/ml) の LD50 用量 (mg/L) をラットにおける TIPDS 用量の下限値として以下の実験を行う。

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

2) ラットにおいて、短時間に 3~4 回の TIPS 投与を行い、2 週後の D50 値を求める。



具体的には、Neutral red の肺がん細胞への取り込み率毒性評価の指標とする用量設定試験ではこの *in vitro* 暫定 LD50 を挟む約 5~6 段階の用量にて 1 投与群 5~10 匹にて LD 値を求めた。

条件：細胞は肺胞上皮由来がん A549 細胞 250,000/dish を RPMI 10% FBS 培養液にて培養し、その中に検体 (LD50 値の 0.1~10 倍) を加え Neutral red 0.033mg/mL 加えてその濃度によって A549 細胞の 50% 致死用量を探索する方法 (図 2 の A と B) で。それに「もとづいて、体重当たりの用量 (群) を決めた (図 2 の C)。

② in vivo TIPS 試験：

上記の Neutral red 試験より導き出された体重あたりの投与量 (図 2 の C) を 3 時間に 4 回 (0, 1, 2, 3 時) で投与した。

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た。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 (図 2、図 3)。

図2

TIPS 用量域の設定方法 (5~6 用量)
Dose setting

A 被験物質溶液 の密度	B A549細胞の Neutral red 試験における被 験物質溶液の濃度域 を選ぶ	C ラットの TIPS 投与における被験物質溶液の濃度域を選ぶ
Density of the test substance solution (shown in the package bottle etc.)	Select a candidate concentrations of the test substance solution in Neutral red test	Select a suitable candidate concentrations TIPS dosing

図3 得られたプロトコルに従って 1,4-Dioxene の TIPS による LC50 値の評価をしてみた (Ex. 公差 320)

Day 0	One every hour (4 hours of exposure)				Day 8	No. of Rats
	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose 4		
	1 h	1 h	1 h	1 h	Day 1	
Group 1	Vehicle (saline)				Assumed lethality	7
Group 2	240mg/kg x 4= 960mg/kg				0 % lethality	7
Group 3	320mg/kg x 4= 1280mg/kg				20 % lethality	7
Group 4	400mg/kg x 4= 1600mg/kg				50 % lethality (LD50)	7
Group 5	480mg/kg x 4= 1920mg/kg					7
Group 6	560mg/kg x 4= 2240mg/kg				80 % lethality	7
Group 7	640mg/kg x 4= 2560mg/kg				100 % lethality	7

Observe mortality rates within 1 week then do sacrifice on day 8

参考: 吸入曝露からの LC 計算値 = 1920 = 480 x 4mg/kg

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

3

以下に検体の用途・毒性・発がん性 (WHO 国際癌研究機構・IARC の発がん性の評価) 等を示す

1) 1,4-ジオキサン (報告済み) : 洗剤用品原料、溶剤、IARC Group 2B

- 2) ポリアクリル酸ナトリウム：水吸収樹脂
- 3) 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）：塗料、インキ、血液・精巢毒性、IARC G3
- 4) グリシドール：天然油脂、ビニル樹脂安定剤、肝障害、IARC Group 2A
- 5) アセチルアセトン：接着剤原料、溶剤、吸引毒性
- 6) *N,N*-ジメチルアセトアミド：肺・気管・肝・腎・副腎・脾・睾丸障害、IARC G2B
- 7) *N,N*-ジメチルホルムアミド：アクリル樹脂の合成、肝障害、IARC Group 2A
- 8) グリシルメサクリレート：塗料、帯電防止剤、IARC Group 2A
- 9) アクロレイン：医薬品等の原料、IARC Group 2A
- 10) キシレン：塗料等の溶剤、IARC Group 3
- 11) 1,2-ジクロロエタン：有機溶剤、フィルム洗浄剤（IARC Group 2B）
- 12) キノリン：農薬原料、IARC Group 2B
- 13) n-ブチルアルコール：溶剤

③ 毒性発現の機序解析

伴野班員には、IL-6 産生増加を指標とした判定法について検討していただく。魏班員には、A549 細胞の遺伝子解析による毒性判定法の開発をしていただく。

（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

投与物質の検定

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。

試験結果

① *in vitro* Neutral red毒性試験

Neutral redの取り込みを指標とした結果は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5~10匹にてLD値 (LD50ではない) を求めた。

条件は：細胞は肺胞上皮由来がんA549細胞

250,000/dish をRPMI10%FBS培養液にて培養し、その中に検体 (LD50値の0.1~10倍) を加えNeutral red 0.033mg/mL加えてその濃度によってA549細胞の50%致死用量を得た。その致死用量の2倍量を最高用量群をして、図2に示す計算式にて1回投与量を算出し、それを下記の方法にて4回投与した。

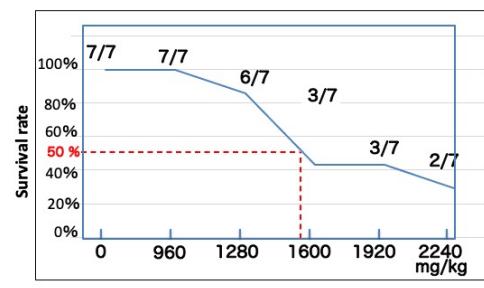
② *in vivo* TIPS 試験

投与は3時間に4回 (0、1、2、3時) で経気管肺内噴霧投与 (TIPS) する方法にて実施した。以下に13物質についての結果を示す。

1) 1,4-ジオキサン (図4)

図4

1) 1,4-ジオキサン (IARC G2B) (1,4-Dioxane)



→ TIPSのLD50は1280mg/kgと1920mg/kgの間にある

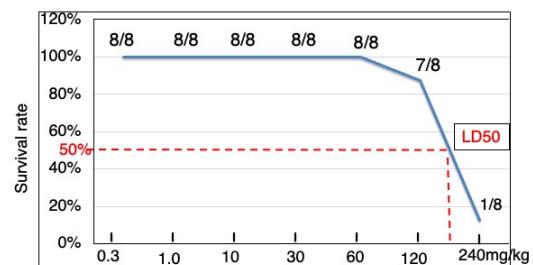
© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

TIPS の LD50 は 1280 (6/7) と 1600 (3/7) mg/kg の間にある（吸入曝露値とほぼ一致）。

2) ポリアクリル酸ナトリウム (図5)

図5

2) ポリアクリル酸ナトリウム (Sodium polyacrylate)



→ TIPSのLD50は120mg/kgと240mg/kgの間にある

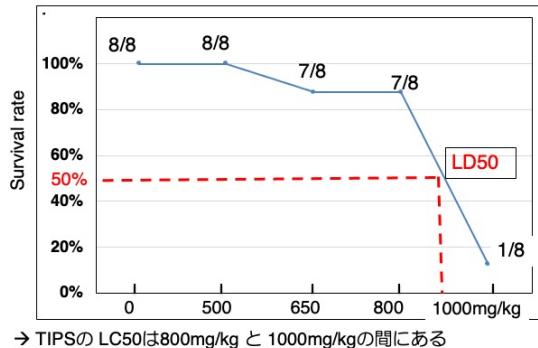
© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

TIPS の LD50 は 120 (7/8) と 240 (1/8) mg/kg の間にあり（吸入曝露値とほぼ一致）。

3) 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 6)

図6

3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート(G3)
(Ethyleneglycol monoethyl ether acetate)

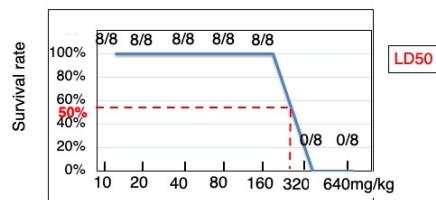


LD50は800 (7/8) と1000 (1/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

4) グリシドール (図 7)

図7

4) グリシドール(G2A)
(Glycidol)



→ TIPSのLD50 TIPSは160 mg/kg と 320 mg/kgの間にある

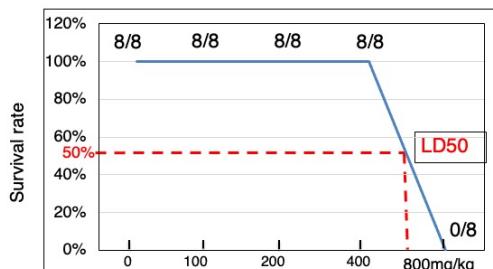
7

LD50は160 (8/8) と320 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

5) アセチルアセトン (図 8)

図8

5) アセチルアセトン
(Acetylacetone or 2,4-pentadione)



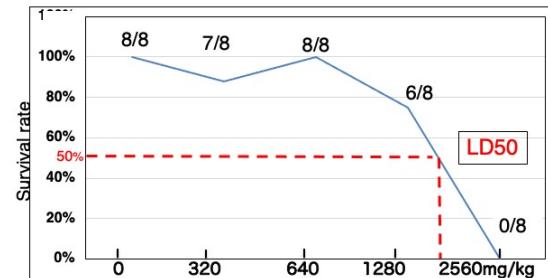
8

LD50は400 (8/8) と800 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

6) *N,N*-ジメチルアセトアミド (図 9)

図9

6) *N,N*-ジメチルアセタミド (G2B)



→ TIPSのLC50は1280mg/kg と2560mg/kgの間にある

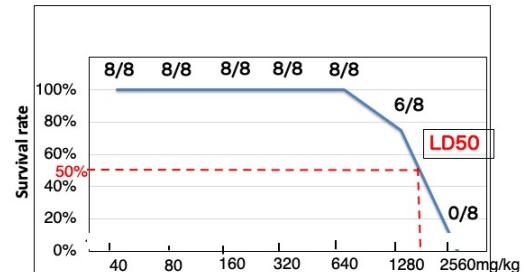
9

LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

7) *N,N*-ジメチルホルムアミド (図10)

図10

7) *N,N*-ジメチルホルムアミド (G2A)



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

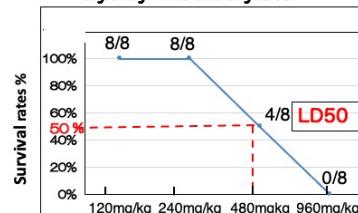
10

LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

8) グリシジルメサクリレート (図 11)

図11

8) グリシジルメサクリレート (G2A)
Glycidyl methacrylate



→ TIPSのLC50は240mg/kgと960mg/kgの間にある

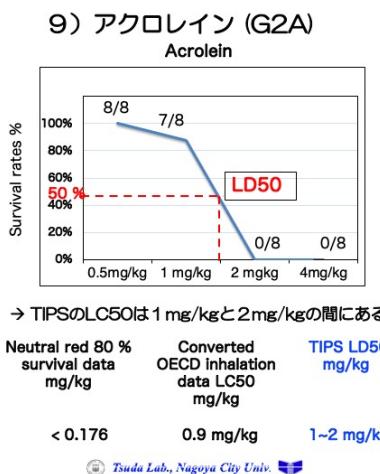
3.4 = 13.7 mg/kg 112mg/kg 120 x 4 = 480mg/kg
Neutral red test Converted TIPS LD50
80 % survival data OECD inhalation (mg/kg)
mg/kg data LC50 mg/kg

11

LD50は480(4/8) mg/kgにある（吸入曝露試験における施設間の差異以内）。

9) アクロレイン (図12)

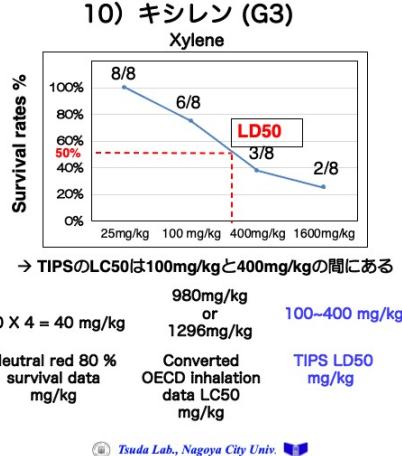
図12



LD50は1(7/8)と2(0/8) mg/kgの間にある（吸入曝露値とほぼ一致）。

10) キシレン (図13)

図13



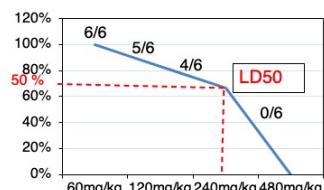
LD50は100(6/8)と400(3/8) mg/kgの間にある（吸入曝露試験における施設間の差異以内）。

11) 1,2-ジクロロエタン (図14)

図14

11) 1,2-ジクロロエタン (G2B)

1,2-Dichloroethane



→ TIPSのLC50は240mg/kgと480mg/kgの間にある

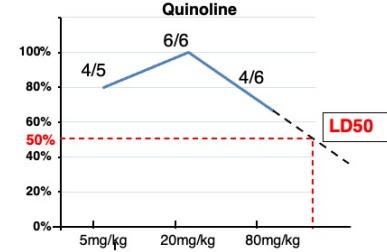
Neutral red 80 % survival data mg/kg	Converted OECD Inhalation data LC50 mg/kg	TIPS LD50 mg/kg
15 X 4 = 60 mg/kg	7.9mg/kg	343 mg/kg (240-480)

LD50は240(4/6)と480(0/6) mg/kgの間にある（吸入曝露値とほぼ一致）。

12) キノリン (図15)

図15

キノリン (G2B) Quinoline

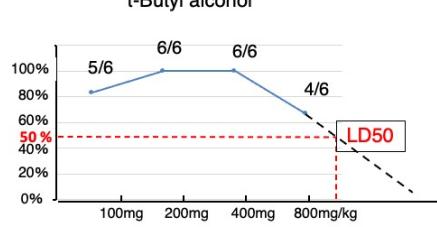


LD50は480mg(4/6)以上にある。

13) t-ブチルアルコール (図16)

図16

13) t-ブチルアルコール t-Butyl alcohol

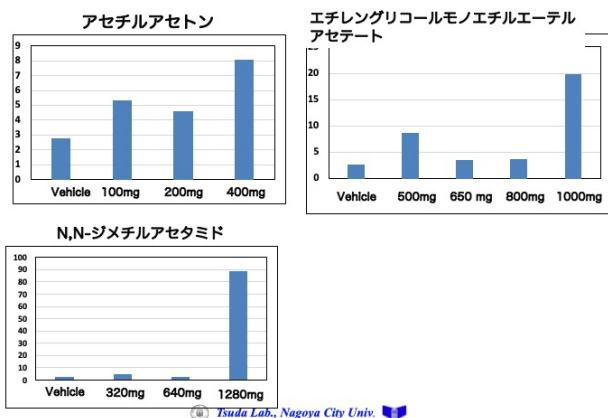


LD50は800mg/kg(4/6)以上にある。

③ 肺の急性毒性変化

3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、5) アセチルアセトンおよび6) *N,N*-ジメチルアセトアミド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では、BALF WBC 数/μl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になり得ると考える。

図17 気管支洗浄液中のWBC数 ($10^2/\mu\text{l}$)



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、得た肺がん細胞の致死量を 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 回投与して LD50 値を得て、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、13 物質のうち 11 物質は従来の 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 倍以内 (= 吸入曝露試験における施設間の差異以内) であり、信頼度の高い試験法であると考える (表 1, 2)。

以上から、同時に高額な装置と稼動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 LD50の比較

検体	既存の吸入曝露の 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) 1-4 ジオキサン (G2B)	1492-2216	1600-1920	1 : 1 (吸入曝露値範囲内)
2) ポリアクリル酸ナトリウム	93.7-2466	120-240	1 : 1 (吸入曝露値範囲内)
3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (G3)	522-1041	800-1000	1 : 1 (吸入曝露値範囲内)
4) グリシドール (G2A)	92.4-130.7	160-320	1 : 1.7 ~ 2.4
5) アセチルアセトン	220	400-800	1 : 2.0 ~ 3.6
6) N,N-ジメチルアセトアミド (G2B)	96.12-671	1280-2560	1 : 1.9 ~ 3.8
7) N,N-ジメチルホルムアミド (G2A)	328-651 または > 254	1280 ~ 2560	1 : 3.0 ~ 3.9

OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、** の値が* の表示最大値の4倍 (LC値の施設間の差異の上限) 以内に入れば TIPSの結果は妥当と考える

表2

吸入曝露のLC50 (4時間曝露値)と得られたTIPS LD50の比較

検体	既存の吸入曝露の 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)
8) グリジルメサクリレート (G2A)	112	480	1 : 4
9) アクロレイン (G2A)	0.9	1~2	1 : 1 (吸入曝露値範囲内)
10) キシレン (G3)	522-1041	100~400	1 : 2
11) 1,2-ジクロロエタン (G2B)	345	240~480	1 : 1 (吸入曝露値範囲内)
12) キノリン (G2B)	25	<80	1 : ?
13) t-ブチルアルコール	1280-1860	800<	1 : ?

OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、** の値が* の表示最大値の4倍 (LC値の試験実施施設間の差異の上限) 以内に入れば TIPSの結果は妥当と考える

© Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

19

E. 結論

この方法によって、比較的毒性の強い物質でも首尾良く既存の JBRC 等による従来の吸入曝露試験による LC50 (4 hr) に近似する値 (吸入曝露試験のおよそ 4 倍以内・吸入曝露試験結果の施設間の差異の範囲) が得られることが分かった。今後 Neutral Red 試験の培地の検討と用量の算定方法・TIPS 投与回数の改良によってさらに既存の LC50 値に近い値の得られる方法に発展させて、OECD ガイドラインへの採用を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka H., Gunasekaran S., Saleh D., Alexander TW, Alexander DB., Ohara H., Tsuda H. Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer. Biochem. Cell Biol. 99:159-165 (2021).
2. Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. Frontiers in Immunology, 12: 1-13 (2021) doi: 10.3389/fimmu.2021.758941,

2. 学会発表

1. Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaiied, Omnia Hosny Mohammed, William T Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double walled carbon

nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS -7) in rat model. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）

2. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda 気管内投与法によるカーボンナノホーン(CNH)およびカーボンナノブラシ(CNB)の肺および胸膜における短期毒性試験 日本毒性病理学会、神戸（2022年1月）
3. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T.

Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation Society of Toxicology, San Diego (2022年3月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得出願中:特願 2021-146
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

令和3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:酸化ストレス由来 DNA 付加体による炎症誘導

分担研究者 伴野勲 愛知医科大学 医学部 感染・免疫学講座

研究要旨

化学物質や多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露による発がん機序の解明を目的とした。化学物質や MWCNT 曝露によって產生される活性酸素種や活性窒素種は生体内の脂質やアミノ酸、核酸などを酸化分解し、活性カルボニル化合物(Reactive Carbonyl species:RCs)を產生する。RCs は化学構造にアルデヒド基やケトン基を有することからDNAと容易に付加体を形成し、遺伝子突然変異を誘導することから発がんとの関連性が強く示唆されている。

本研究では、DNA 付加体の炎症誘導の有無を明らかとするために、生体内に豊富に含有し活性酸素種による酸化分解で多種の RCs を產生させる脂肪酸であるリノール酸(C18:2)を酸化させた脂質過酸化物と DNA と反応させた後、マクロファージ様細胞 RAW264.7 に曝露させた。曝露 24 時間後の培養上清中の炎症性サイトカインである IL-6 の濃度を ELISA で測定した結果、脂質過酸化物 DNA 付加体の曝露によって IL-6 の產生増強が確認された。このことから、脂質過酸化物はDNAとの付加反応による突然変異誘導能以外にも生じたDNA付加体により炎症誘発も惹起することが示唆された。

A. 研究目的

化学物質や多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露による発がん機序の解明を目的とした。化学物質や MWCNT 曝露によって產生される活性酸素種や活性窒素種は生体内の脂質やアミノ酸、核酸などを酸化分解し、活性カルボニル化合物(Reactive Carbonyl species:RCs)を產生する。RCs は化学構造にアルデヒド基やケトン基を有することからDNAと容易に付加体を形成し、遺伝子突然変異を誘導することから発がんとの関連性が強く示唆されている。本研究では、DNA 付加体の炎症誘導の有無を検討した。

B. 研究方法

DNA 付加体の炎症誘導の有無を明らかとするため

に、生体内に豊富に含有し活性酸素種による酸化分解で多種の RCs を產生させる脂肪酸であるリノール酸(C18:2)を酸化させた脂質過酸化物溶液、代表的な脂質過酸化物である 4-hydroxy-2-nonenal(HNE)、acrolein および glyoxal をそれぞれ DNA、deoxyguanosine(dG)と反応させた。生成した DNA 付加体および positive control として CpG-B-ODN とカチオン性脂質 DOTAP リポソーム製剤を混合したもの、または、DNA、dG 付加体単体をマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に曝露させた。曝露 24 時間後の培養上清中の炎症性サイトカインである IL-6 の濃度を ELISA で測定した。

(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

リノール酸由来脂質過酸化物、HNE、acrolein、glyoxal-DNAまたはdG付加体単体を曝露させた培養上清ではIL-6の産生は見られなかった。しかし、カチオン性脂質リポソーム製剤DOTAPと混合し、細胞内への取り込みを促進させた場合、種々のDNA付加体-DOTAPリポソームを1、10 µg/mLになるように曝露したマクロファージ培養上清中のIL-6濃度をELISA法により測定すると、DOTAP単体、DNA-DOTAP、Glyoxal-DNA-DOTAPではIL-6の産生増強は確認することはできなかった。一方で、Positive controlであるCpG-B-ODN、リノール酸由来脂質過酸化物-DNA付加体-DOTAP(Fig.1)、HNE-DNA-DOTAPでは有意なIL-6産生増加が確認できた。

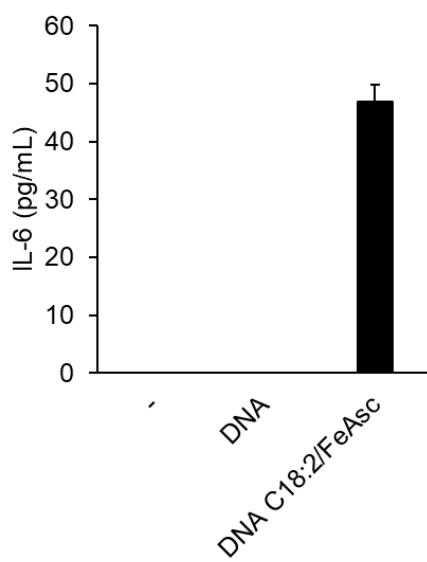


Figure 1 リノール酸由来DNA付加体によるIL-6産生

D. 考察

これまでに脂質過酸化分解物である活性カルボニル化合物は、アルデヒド基やケトン基を化学構造に有する事から、タンパク質のアミノ基やDNAやRNAのアミノ基と反応することで、タンパク質の機能不全、DNA損傷や突然変異誘導を惹起することで発がんに関与する事が分かっている。本研究結果により、DNA付加体自体にも炎症反応誘導能を持つことが

示唆された。一般的に細菌やミトコンドリア由来の核酸はTLR7やTLR9といった自然免疫に関わる受容体を介して炎症反応を誘導する。今後、脂質過酸化反応物由来DNA付加体についてもTLR7やTLR9との関わりについて詳細に検討する必要がある。

E. 結論

本研究では、in vitro 毒性試験における毒性評価方法として、化学物質曝露に伴う酸化ストレスに着目した。酸化ストレス惹起によって生じる脂質過酸化物DNA付加体の炎症誘導の有無をマクロファージによるIL-6産生によって評価した結果、脂質過酸化物DNA付加体はIL-6産生を増強することを見出した。今後、詳細な炎症誘発メカニズムの解明を試みる必要がある。

F. 健康危機情報

酸化ストレスに伴い生じる脂質過酸化物由来DNA付加体はDNA損傷、突然変異誘導以外にも炎症反応を誘導し、細胞を傷害することが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Kobayashi A, Ito A, Shirakawa I, Tamura A, Tomono S, Shindou H, Hedde PN, Tanaka M, Tsuboi N, Ishimoto T, Akashi-Takamura S, Maruyama S, Suganami T. Dietary Supplementation with Eicosapentaenoic Acid Inhibits Plasma Cell Differentiation and Attenuates Lupus Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 2021. 12:650856.

Ariyoshi T, Hagiwara M, Tomono S, Eguchi S, Minemura A, Miura D, Oka K, Takahashi M, Yamagishi Y, Mikamo H. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 Modifies Bacterial Composition under Antibiotic-Induced Dysbiosis for the Activation of Interactions via Lipid Metabolism between the Gut Microbiome and the Host. *Biomedicines*. 2021. 9(8):1065.

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

令和3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

津田研究代表者等は、これまでにラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与法(Trans-tracheal intrapulmonary spraying; TIPS 法)による汎用性の高い吸入暴露評価法を開発し、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。さらに、ヒト肺癌細胞株(A549 細胞)における Neutral Red を指標とした細胞毒性が TIPS 法の投与濃度設定に有用であることが明らかになり、*in vivo* 用量設定試験の代替法への応用が期待される。本年度では、1, 4-dioxane、Acrolein、Glycidyl methacrylate 及び Xylene の曝露した A549 細胞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、その肺毒性の発現機序の検討を行った。現在、遺伝子解析が実施中であるが、本研究より、化学物質の吸入曝露による肺毒性の発現機序の解明に寄与するデータを得ることが期待されている。

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。津田研究代表者等は、これまでにラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与法

(Trans-tracheal intrapulmonary spraying; TIPS 法)による汎用性の高い吸入暴露評価法を開発し、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。また、TIPS 法による LD50 の曝露量と全身吸入曝露法による LC50 から求められる曝露との差は、施設間最大許容差異の 4 倍以内とその有用性が示された。さらに、ヒト肺癌細胞株(A549 細胞)における Neutral Red を指標とした細胞毒性が TIPS 法の投与濃度設定に有用であることが、*in vivo* 用量設定試験の代替法への応用が期待される。本年度では、被験物質の曝露した A549 細胞について遺伝子発現解析を実施し、その肺毒性の発現機序の検討を行った。

B. 研究方法

1x10⁶ 個の A549 細胞を 30 mm dish にまき、翌日に LD50 用量の被験物質を混じた培地に交換し 15 分間曝露後、PBS で洗浄する。A549 細胞から、RNase Mini Kit (Qiagen 社)を用いて、total RNA を精製・抽

出した。被検物質は以下の通り: 1, 4-dioxane、Acrolein、Glycidyl methacrylate 及び Xylene。各サンプルから得られた total RNA に対して、GeneChip® Clariom D Assay, Human (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) を用いて解析する。

C. 研究結果

現在、被検物質を曝露した A549 細胞における遺伝子発現解析が進行中である。

D. 考察

A549 細胞における遺伝子発現データについて、パスウェイ解析を行うことにより、各被験物質の毒性機序の解明に寄与するデータが得られると考えられる。また、毒性機序に基づいた分類の可能性について検討する予定である。

E. 結論

本研究より、化学物質の吸入曝露による肺毒性の発現機序の解明に寄与するデータを得ることが期待されている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North B J, Watahiki A, Fukumoto S, Asara J M, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep*, 37(6), 10.1016/j.celrep.2021.109, 2021.
2. Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*, 13(14), 10.3390/cancers13143613, 2021.
3. Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H.

Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*, 13 (6), 10.3390/cancers13061216, 2021.

4. 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. 学会発表

1. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸、(2021 年 7 月)
2. Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Wanibuchi Hideki. A novel gene expression based ultra-short-term rat model for predicting genotoxic hepatocarcinogens. 第 80 回日本癌学会学術総会、横浜、(2021 年 9 月)
3. 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 1, 4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性及び発がん性の定量解析. 第 38 回日本毒性病理学会総会・第 1 回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸 (2022 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
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

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
Tanaka H., Gu nasekaran S., S aleh D., Alexan der TW, Alexan der DB., Ohara H., Tsuda H.	Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer.	<i>Biochem. Cel l Biol.</i>	99	159-165	2021
Wang Qiqi, Wa ng Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander D B., Tsuda H. , Z hao D and Xu J.	Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production	<i>Frontiers in Immunology</i>	12	1-13 doi: 10.338 9/fimmu.20 21.758941	2021
Kobayashi A, It o A, Shirakawa I, Tamura A, T omono S. , Shind ou H, Hedde P N, Tanaka M, Tsuboi N, Ishimoto T, Akashi- Takamura S, Maruyama S, Sug anami T.	Dietary Supplementation with Eicosapentaenoic Acid Inhibits Plasma Cell Differentiation and Attenuates Lupus Autoimmunity.	<i>Frontiers in Immunology</i>		doi: 12:650856.	2021
Ariyoshi T, Hag ihara M, Tomono S. , Eguchi S, Minemura A, Mi iura D, Oka K, Takahashi M, Yamagishi Y, Mi kamo H.	Clostridium butyricum MIYAIRI 588 Modifies Bacterial Composition under Antibiotic-Induced Dysbiosis for the Activation of Interactions via Lipid Metabolism between the Gut Microbiome and the Host.	<i>Biomedicines</i>	9(8)	1065	2021

Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North B J, Watahiki A, Fukumoto S, Asara J M, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H.	Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability.	Cell Rep	37(6)	doi: 10.1016/j.celrep.2021.109	2021
Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H.	Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Base)	13(14)	1 doi: 0.3390/cancers13143613	2021
Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuangphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H.	Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis.	Cancers (Base)	13 (6)	doi: 10.3390/cancers13061216	2021
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

令和 4 年 3 月 24 日

国立医薬品食品衛生研究所 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3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

研究：迅速化かつ国際化に向けてに関する研究

3. 研究者名 (所属部署・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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 4年 3月 30日

国立医薬品食品衛生研究所 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



次の職員の令和 3 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

研究: 迅速化かつ国際化に向けてに関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部 感染・免疫学講座・助教

(氏名・フリガナ) 伴野 勉・トモノ ススム

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input 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 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 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 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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ■ 未受講 □
-------------	------------

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 ■ 無 □ (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 ■ 無 □ (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 ■ 無 □ (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 □ 無 ■ (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 4年 3月 24日

国立医薬品食品衛生研究所 殿

機関名 公立大学法人 大阪市立大学

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 3 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に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 大阪市立大学大学院医学研究科 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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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C O I 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C O I 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C O I 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C O I 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。