

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及び

その精緻化に関する研究

(22KD1003)

令和5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

令和6（2024）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究 -- 3

小川久美子

II. 分担研究報告書

1. ラットを用いたTIPS法による気管内投与急性吸入毒性試験及び呼吸器の毒性評価並びに全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析に関する研究 ----- 17
高須伸二、赤根弘敏、小川久美子
(資料) Tables 1-1~6, 2
 2. *in vitro* 試験の実施 ----- 30
魏 民、藤岡正喜
(資料) 表 1, 2、 図 1, 2
 3. *in vitro*試験による用量設定と*in vivo* への外挿性検討 ----- 37
津田 洋幸
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 39

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書(令和5年度)

毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究

研究代表者：小川 久美子（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長）

研究要旨

本研究では、(1) *in vivo* 試験代替法として、吸入暴露が想定される物質の毒劇物判定における TIPS 法の検証、及び、(2) *in vitro* 試験代替法として、ヒト肺癌細胞株(A549)の細胞毒性を指標とした評価法を検討・精緻化し、毒劇物の指定に資する手法の確立を図ることを目的としている。

毒物又は劇物は、原則、動物を用いた急性毒性試験における LD50/LC50 値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。しかし、全身吸入暴露法は大規模な暴露装置が必要となるなどの困難があるため、吸入毒性情報は限定的である。本研究課題では、汎用性の高い経気管肺内噴霧投与方法（Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法）による気管内投与毒性試験について、急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的とする。令和5年度は、令和4年度に実施した TIPS 法による急性毒性試験の病理組織学的検査及び新たに8物質（2-プトキシエタノール、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン、クロロアセトン、2,3-ブタンジオン、*o*-クロロフェノール、メタクリロニトリル、1-ニトロプロパン及びシクロヘキサノン）について TIPS 法による LD50 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。得られた TIPS 法の LD50 を吸入暴露法及び *in vitro* の Neutral red assay から換算した LD50/LC50 と比較した。その結果、TIPS 法の LD50 が吸入暴露法の 0.5~2 倍であった物質が 5/14 物質、0.25~0.5 倍であった物質が 3/14 物質、0.25 倍以下であった物質が 6/14 物質であった。TIPS 法の LD50 は吸入暴露法と同程度、又は低値を示したことから、TIPS 法では吸入暴露法と比較して毒性が同等あるいは強く表れる物質がある可能性が考えられた。また、Neutral red assay は TIPS 法による急性毒性とある程度相関すると考えられ、急性毒性試験の投与濃度設定に有用な指標となりえる可能性が考えられた。

また、近年は *in vitro* 試験等に基づく、毒性や刺激性等から判断する評価法も希求されている。昨年度より、本研究ではラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与方法（Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS法）を行う際の *in vitro* 投与量設定法として、ヒト肺腺癌細胞株A549を用いた改変Neutral Red Uptake assay（A549 NRU assay）を構築し、試験プロトコルの最適化とその有用性について検討を行っている。本年度は水溶性物質8種に加えて有機溶媒などの非水溶性物質10種についてもLC50の検討を行った。加えて、昨年度及び本年度に得られたLC50について、4時間ラット吸入ばく露試験におけるLD50との相関解析を行った。その結果、非水溶性物質についてもA549 NRU assayによってLC50が得られることをはじめ明らかにした。また水溶性物質においてLC50（A549 NRU assay）がLD50（4時間ラット吸入ばく露試験）と正の相関が得られたことから、A549 NRU assayが *in vitro* 投与量設定法として有用であることが確認できた。

さらに、検体に発がん性が疑われる場合は、TIPS法にて肺内への4時間吸入毒性試験終了後の残存動物について無処置にて長期に観察することによって、発がん性を評価への応用が期待される。事実、我々はいくつかの多層カーボンナノチューブ（MWCNT）についてTIPS投与後長期観察することによって発癌性を見出し報告してきた。TIPS法は生理食塩水または、墨汁投与試験の実施により、最大2.0 mL/kg体重の容量での4回投与まで一般状態の異常及び死亡例が見られなかったことから、この研究で

TIPS法による短期試験後2年まで観察することによって、長期吸入暴露試験に代わる試験法の開発を行なってきた。被験物質は、このプロジェクトで今までに検索されてきた13物質のうち、IARC Monographにおけるヒトにおける発がん物質（要因）の分類においてGroup 2A（おそらくあり）4物質、Group 2B（可能性あり）4物質、Group 3（疑われるがデータ不十分）2物質であるが、TIPSによる短期投与2年後の発がん性との整合性について解析を進めている。

キーワード: 吸入、急性毒生、経気管肺内噴霧投与法、A549 NRU assay、代替法

研究分担者：高須伸二

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究分担者：赤根弘敏

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究分担者：津田洋幸

名古屋市立大学大学院医学研究科 特任教授

研究分担者：魏 民

大阪公立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

研究協力者：藤岡正喜

大阪公立大学大学院医学研究科 分子病理学 特任講師

A. 研究目的

A1. ラットを用いた TIPS 法

毒物又は劇物は、原則、動物を用いた急性毒性試験における LD₅₀/LC₅₀ 値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。特にヒトへの吸入暴露が想定される化合物については吸入による評価が必要である。しかし、全身吸入暴露法は大規模な暴露装置が必要となるため、実施可能な施設はわずかであり、頭部/鼻部暴露法は拘束ストレスが影響する。そうした背景から国際的にも、化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GHS) における吸入毒性情報は限定的である。

津田研究分担者等は、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方法 (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、多種の多層カーボンナノチューブ (MWCNT-7 等) の肺又は胸膜中皮に対する発がん性を報告した¹⁾。また、

急性吸入毒性試験の代替法開発に関する先行科研究費研究では、TIPS 法による LD₅₀ の暴露量と吸入暴露法による LC₅₀ から求められる暴露量との差は、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²⁾。しかし、吸入暴露試験の代替法として確立するには更なる検証が必要である。

本研究課題では津田らにより検討されてきた TIPS 法による気管内投与毒性試験について、急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的とする。本年度は、令和 4 年度に実施した TIPS 法の病理組織学的検査及び新たに 8 物質 (2-ブトキシエタノール、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、クロロアセトン、2,3-ブタンジオン、o-クロロフェノール、メタクリロニトリル、1-ニトロプロパン、シクロヘキサノン) について TIPS 法による LD₅₀ 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。

A2. *in vitro* 試験の実施

近年は *in vitro* 試験等に基づく、毒性や刺激性等から判断する評価法も希求されている。また、前述の経路の内、特に重要なヒトへの吸入ばく露が想定される化合物は、吸入による評価が必要であるが、全身吸入ばく露法は大規模なばく露装置が必要となるため、実施可能な施設は世界的にみてもわずかである。そこで、全身吸入ばく露法の代替法としてラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与方法 (Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法) を用いることとするが、その用量設定のために多数のラットを用いることは 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の観点から適切ではない。そこで、本研究では細胞株を用い

た *in vitro* 法により LC₅₀ を推定し、少ない匹数で TIPS 法を行うための、*in vitro* 投与濃度設定試験を開発する。その方法として、取り扱いが簡便でかつヒトの肺胞上皮由来であるヒト肺腺癌細胞株(A549)の細胞毒性を指標とした評価法を検討・精緻化し、毒劇物の指定に資する手法の確立を図ることを目的とする。

昨年度の研究で、我々はラットを用いた TIPS 法の *in vitro* 投与量設定法として、細胞毒性評価法として一般的に知られている Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay を一部改変した A549 NRU assay を用いて、その汎用性と結果の妥当性について検討を行い、TIPS 法における LD₅₀ 値と良好な相関が得られている。本年度は A549 NRU assay の汎用性を検証するために、水溶性物質に加え非水溶性物質についても新たに A549 NRU assay で検討を実施した。

A3. 用量設定と外挿性検討

従来のラットにおける 4 時間吸入毒性データ (LD₅₀ 4 時間値) を、津田らが多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の長期毒性評価において考案してきた簡便な経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法を用いて応用しようとするものである。用量設定については A549 肺がん細胞を用いた *in vitro* 急性毒性試験から得られた値を用いて、TIPS 法応用して LD₅₀ 値を見出そうとするものである。これによって高額な専用の吸入暴露施設を要しない安価な吸入毒性の評価方法が可能となる。被験物質に発がん性が疑われる場合は、TIPS 法にて肺内に 4 時間吸入毒性試験終了後残存動物において無処置にて長期に観察することによって、発がん性を評価することもできるかについて、明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

B1. ラットを用いた TIPS 法

B1-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験の病理組織学的検査

令和 4 年度に実施した TIPS 法 6 試験 (N,N-ジメ

チルアセタミド (CAS RN: 127-19-5)、N,N-ジメチルホルムアミド (CAS RN: 68-12-2)、*tert*-ブチルアルコール (CAS RN: 75-65-0)、アクリル酸 (CAS RN: 79-10-7)、2-ジメチルアミノエタノール (CAS RN: 108-01-0)、ヘキサヒドロ-1H-アゼピン (CAS RN: 111-49-9)) について、気管、気管支、肺、肝臓、心臓、脾臓、胸腺、腎臓、副腎の病理組織学的検査を実施した。

B1-2) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における LD₅₀ の判定並びに吸入暴露法及び *in vitro* Neutral red assay との比較
新規被験物質として 2-ブトキシエタノール (CAS RN: 111-76-2)、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (CAS RN: 110-18-9)、クロロアセトン (CAS RN: 78-95-5)、2,3-ブタンジオン (CAS RN: 431-03-8)、*o*-クロロフェノール (CAS RN: 95-57-8)、メタクリロニトリル (CAS RN: 126-98-7)、1-ニトロプロパン (CAS RN: 108-03-2) 及びシクロヘキサノン (CAS RN: 108-94-1) について TIPS 法による LD₅₀ 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。

投与は昨年度と同様に 12 週齢の F344 ラットにイソフルラン吸入麻酔下 (導入 4%) で、ラット用金属製気管内噴霧スプレー (針長 80 mm、内径 0.8 mm、外径 1.0 mm) (夏目製作所) 及び喉頭鏡 (夏目製作所) を用いて 1 日 4 回 (1 時間間隔) で投与した。1 回当たりの投与容量は 2.0 mL/kg とした。投与量は、過去に報告された吸入暴露法の LC₅₀ 値を既報のラット呼吸量 (J Appl Toxicol. 2000, 20(4):273-90.) を用いて換算した値 (LD₅₀ (inhalation)) 及び本研究班で魏らが実施した *in vitro* の Neutral red assay の結果を考慮して設定した。

令和 4 から 5 年度に実施した被験物質 14 剤の TIPS 法で得られた LD₅₀ 値 (LD₅₀ (TIPS)) を LD₅₀ (inhalation) または *in vitro* Neutral red assay から求めた値 (LD₅₀ (Neutral red assay)) と比較した。なお、LD₅₀ (Neutral red assay) は本研究班のヒト肺癌細胞(A549)を用いた *in vitro* Neutral red assay における LC₅₀ (uL/mL) を TIPS 法の被験物質投与溶液の濃度とした場合の総投与量とし

て概算した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物の飼育・処置に当たっては、動物愛護の精神に則るとともに倫理規定に十分配慮し、気管内投与は麻酔下で実施し、解剖時には麻酔下での安楽死を施すなど、苦痛軽減に努めた。

B2. *in vitro* 試験の実施

[被験物質及び細胞株]

本年度において、使用した被験物質を表 1 に示す。評価に用いる培養細胞として吸入ばく露を想定し、ヒト肺腺癌細胞株 A549 を選択し、液体培地として 10%FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド含有) を使用した。

表 1 被験物質及び使用した培地並びに LC₅₀(A549 NRU assay)と LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験換算値)

No.	Chemicals	CAS RN	Water soluble	Vehicle	FBS	LC ₅₀ (µL/mL) A549 NRU assay	Estimated LD ₅₀ (mg/kg) in TIPS ^c
1 ^a	1-Chloro-2-propanol	127-00-4	○	RPMI-1640	+	34.96	311.8
2 ^a	1-Nitropropane	108-03-2	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	11.18	89.1
3 ^a	1,2-Dichloroethane	107-06-2	×	2% DMSO in RPMI-1640	-	6.3	62.7
4 ^b	1,2-Dichloropropane	78-87-5	×	2% DMSO in RPMI-1640	-	2.88	26.7
5 ^a	2-Butoxyethanol	111-76-2	○	RPMI-1640	+	23.33	168.2
6 ^a	2,3-Butanedione	431-03-8	○	RPMI-1640	+	10.2	80.7
7 ^a	Acetylacetone	123-54-6	○	RPMI-1640	+	16.07	124.9
8 ^a	Allyl acetate	591-87-7	×	1% Ethanol in RPMI-1640	-	15.99	118.6
9 ^b	Carbon tetrachloride	56-23-5	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	2.25	28.7
10 ^b	Chloroacetone	78-95-5	○	RPMI-1640	+	0.1	0.9
11 ^a	Cyclohexanone	108-94-1	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	16.86	127
12 ^a	Dichloromethane	19759/2	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	12	127.2
13 ^a	Glycidol	556-52-5	○	RPMI-1640	+	12.27	112.2
14 ^a	Methacrylonitrile	126-98-7	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	22.14	141.7
15 ^a	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine	110-18-9	○	RPMI-1640	+	4.91	30.5
16 ^a	<i>o</i> -Chlorophenol	95-57-8	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	0.98	9.9
17 ^a	Polyacrylic Acid 5000	9003-1-4	○	RPMI-1640	+	105.3	84.24
18 ^a	Quinoline	91-22-5	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	1.41	12.3

^a Use 6-well polystyrene plate and ^b Use 6-well glass plate.

^c Estimated LD₅₀ value (mg/kg) in TIPS are calculated from the following formula based on a rat body weight of 250 g
 $LD_{50} \text{ value (mg/kg)} = (LC_{50} (\mu\text{L/ml}) \times 2^{\text{Density}}) \times 0.25$

[A549 NRU assay]

A549 NRU assay の概要について、図 1 に示す。

Day 0 において、6-well プレート (1,2-Dichloropropane 及び Carbon tetrachloride の場合はガラス製、その他の物質の場合はポリスチレン製) に A549 細胞を 2×10^5 細胞で播種した。Day 1 には、被験物質の調製のために、15 mL チューブに

被験物質を培地と混合し、vortex にて 5 秒程度強く振盪した。

培地を吸引後 PBS で 1 回洗浄し、事前に調製した被験物質を混合した培地(水溶性物質の場合は 10%FBS 含有 RPMI-1640、非水溶性物質の場合は、2% DMSO 含有 RPMI-1640(1,2-Dichloropropane)、1%エタノール含有 RPMI-1640(Allyl acetate)、2%エタノール含有 RPMI-1640(1-Nitropropane, Carbon tetrachloride, Cyclohexanone, Dichloromethane, Methacrylonitrile, *o*-Chlorophenol, Quinoline))を well 内にそれぞれ添加した(2 ml/well; 2 wells/被験物質)。その後 37°C の 5% CO₂ インキュベーターにて 15 分間インキュベーションした。

培地を吸引し、さらに PBS で 2 回洗浄後、調製した Neutral red 含有 RPMI 溶液(Neutral red 最終濃度 0.33%)を well 内に添加した。その後、37°C の 5%CO₂ インキュベーターにて 3 時間インキュベーションした。インキュベーション完了後、培地を除去し PBS で 2 回洗浄し、酢酸-エタノール溶液(50%エタノール + 49% ミリ Q 水 + 1% 氷酢酸)を 1 mL ずつ加えプレートを shaking することで細胞内に取り込まれた Neutral red を回収した。新たに用意した 96 well プレートに、Well 内の酢酸-エタノール溶液を 180 µL ずつ移し替え、吸光度計にて 540 nm の波長で計測を行った。

なお、各被験物質について、2 回以上独立した試験を行った。

[LC₅₀ の算出]

A549 NRU assay にて得られた吸光度について、近似曲線を GraphPad Prism software で解析し、LC₅₀ を算出した。詳細な方法として、近似曲線の投与濃度を Log 変換した値を用いて、非線形回帰(カーブフィット法)で得られた値を log(agonist) vs normalized response – Variable slope 解析にて LC₅₀ を算出した。

[A549 NRU assay で得られた LC₅₀ 値の検証]

昨年度および本年度で得られた各被験物質の A549 NRU assay における LC₅₀ 値について、毒

性情報などの情報が化学物質毎に収録されている Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) より 4 時間ラット吸入ばく露試験における LD₅₀ 値を収集し、LC₅₀(A549 NRU assay) および LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験) との相関比較 (Pearson の相関分析) を実施し、得られた結果を散布図として作図した。

図 1 A549 NRU assay の概要



B3. 用量設定と外挿性検討

4 時間吸入毒性試験のデータ (LD₅₀ 4 時間値) に代わる TIPS 投与法の短期毒性試験における生存 (LD₅₀ 値群を含む致死を免れた動物) についてその後 2 年間無処置観察することによって、

被験物質の発がん性についての解析を実施している。

(倫理面への配慮)

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

C1. ラットを用いた TIPS 法

C1-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験の病理組織学的検査

気管、気管支、肺、肝臓における病理組織学的所見は以下の通りであった。

① N,N-ジメチルアセタミド

2560 mg/kg 群の投与日死亡例では、軽度から重度の気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の軽微な急性炎症並びに軽微から軽度なうっ血、水腫および出血がみられた。

投与後 14 日まで死亡が認められなかった用量においては、640 mg/kg 群の 1 例で軽微な細気管支の粘液細胞化生がみられた。

② N,N-ジメチルホルムアミド

4000 mg/kg 群の投与日死亡例では、軽微から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の軽微な急性炎症並びに軽微から重度なうっ血、水腫および出血がみられた。

2000 mg/kg 群の投与後 3 日死亡例では、軽微から中等度な細気管支および肺胞上皮の壊死並びに肺の急性炎症、軽微から重度な肺のうっ血、水腫および出血に加え、軽度から中等度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の再生/過形成がみられた。また、肝臓で重度な小葉中心性肝細胞壊死がみられた。

投与後 14 日まで死亡が認められなかった用量においては、500 および 1000 mg/kg 群の各 1 例で軽微な細気管支の粘液細胞化生、1000 mg/kg 群の 1 例で軽微な気管支の粘液貯留がみられた。

③ tert-ブチルアルコール

1600 mg/kg 群の投与日死亡例では、中等度から重度の気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の軽微な急性炎症並びに軽微から中等度なうっ血、水腫および出血がみられた。

投与後 14 日まで死亡がみられなかった用量においては、200 および 800 mg/kg 群で軽微な細気管支の粘液細胞化生が散見された。

④ アクリル酸

63、125 および 250 mg/kg 群の投与日死亡例では、重度の気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺で軽微から軽度な急性炎症、軽微から重度なうっ血、水腫および出血がみられた。

31 mg/kg 群の投与後 8 から 11 日の死亡例では、中等度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の急性炎症、軽微から重度な肺のうっ血、水腫および出血に加え、中等度から重度な気管支および細気管支上皮の再生/過形成、軽度から中等度の気管支および細気管支の肉芽組織、軽度な肺胞中核の肥厚、軽度から中等度の細気管支の粘液細胞化生、気管から肺胞腔内の粘液貯留がみられた。また、肝臓で軽微から軽度な小葉中心性肝細胞壊死がみられた。

31 mg/kg 群の投与後 14 日生存例では、軽度から重度な気管支および細気管支上皮の再生/過形成、軽微な気管支および細気管支の肉芽組織、軽度な肺の急性/慢性炎症、軽微な水腫、軽微から重度な細気管支の粘液細胞化生、軽微から軽度な気管から肺胞腔内の粘液貯留が認められた。

投与後 14 日まで死亡がみられなかった 16 mg/kg 群では、軽微から中等度な単核細胞浸潤、細気管支の粘液細胞化生、軽微な細気管支および肺胞の粘液貯留が認められた。

⑤ 2-ジメチルアミノエタノール

300 mg/kg 群の投与日死亡例では、軽度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺で軽微から中等度な急性炎症、軽微から重度なうっ血、水腫および出血がみられた。

150 mg/kg 群の投与後 1 から 2 日死亡例では、重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、軽微から重度な気管から肺の急性炎症、気管および気管支粘膜下の水腫、肺のうっ血、水腫お

よび出血がみられた。また、1 例の肝臓で軽微な小葉中心性肝細胞壊死がみられた。

投与後 14 日まで死亡が認められなかった用量においては、19 および 75 mg/kg 群で軽微な細気管支の粘液細胞化生が散見された。

⑥ ヘキサヒドロ-1H-アゼピン

31、63 および 125 mg/kg 群の投与日死亡例では、中等度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺で軽微から軽度な急性炎症、軽微から中等度なうっ血、水腫および出血がみられた。

31 mg/kg 群の投与後 4 から 12 日死亡例では、中等度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、中等度な肺の急性/慢性炎症、軽微から重度な肺のうっ血、水腫および出血に加え、軽微から中等度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の再生/過形成がみられた。また、投与後 11 から 12 日死亡例で、軽微から中等度な気管支および細気管支の肉芽組織、軽微から重度な気管支から肺胞腔内の粘液貯留が認められた。

投与後 14 日まで死亡が認められなかった用量においては、16 mg/kg 群で軽微から軽度な気管、気管支、細気管支上皮の再生/過形成並びに細気管支の粘液細胞化生、気管腔内の粘液貯留、8 mg/kg 群で軽微な気管上皮の再生が散見された。

気管および肺以外の諸臓器の病理組織学的検査において、各物質の投与後 14 日生存例および投与後 1 日以降の死亡例で、胸腺で萎縮および tingible body macrophage の増加、脾臓で白脾髄の萎縮、副腎で皮質のびまん性肥大および空胞の増加が散見されたが、投与後の状態悪化に伴ってみられる二次的な変化と考えられた。心臓、脾臓、胸腺、肝臓、腎臓、副腎において、その他の被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

C1-2) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における LD50 の判定並びに吸入暴露法及び *in vitro* Neutral red assay との比較
令和 4 年度に実施した 6 剤及び令和 5 年度に実施した被験物質 8 剤の TIPS 法で得られた LD50 (TIPS)、及び吸入暴露試験の LC50 値から換算した LD50 (inhalation) または *in vitro* Neutral red

assay から求めた LD50 (Neutral red assay) と比較した結果は以下の通りであった。

LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) を比較した結果、TIPS 法の LD50 が吸入暴露法の 0.5~2 倍であった物質が 5/14 物質、0.25~0.5 倍であった物質が 3/14 物質、0.25 倍以下であった物質が 6/14 物質であり、LD50 (TIPS) は LD50 (inhalation) と同程度、又は低値を示した。

LD50 (TIPS) と LD50 (Neutral red assay) を比較した結果、LD50 (TIPS) と LD50 (Neutral red assay) の差は 7 剤で 2 倍以内、6 剤で 2~5 倍以内であり、5 倍を超える差がみられたのはクロロアセトンの 1 剤のみであった。また、LD50 (TIPS) と LD50 (Neutral red assay) の相関性を検討した結果、強い正の相関 ($r=0.95$) が認められ、線形近似 ($R^2=0.91$) が得られた。

C2. *in vitro* 試験の実施

[A549 NRU assay]

A549 NRU assay を実施し得られた各被験物質の LC₅₀ および LC₅₀ より算出した TIPS 法の LD₅₀ (換算値) を表 1 に示す。

1-Chloro-2-propanol の LC₅₀ は 34.96 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 311.8 mg/kg であった。1-Nitropropane の LC₅₀ は 11.18 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 89.1 mg/kg であった。1,2-Dichloroethane の LC₅₀ は 6.30 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 62.7 mg/kg であった。1,2-Dichloropropane の LC₅₀ は 2.88 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 26.7 mg/kg であった。2-Butoxyethanol の LC₅₀ は 23.33 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 168.2 mg/kg であった。2,3-Butanedione の LC₅₀ は 10.20 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 80.7 mg/kg であった。Acetylacetone の LC₅₀ は 16.07 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 124.9 mg/kg であった。Allyl acetate の LC₅₀ は 15.99 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 118.6 mg/kg であった。Carbon tetr

achloride の LC₅₀ は 2.25 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 28.7 mg/kg であった。Chloroacetone の LC₅₀ は 0.10 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 0.9 mg/kg であった。Cyclohexane の LC₅₀ は 16.86 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 127.0 mg/kg であった。Dichloromethane の LC₅₀ は 12.00 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 311.8 mg/kg であった。Glycidol の LC₅₀ は 12.27 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 112.2 mg/kg であった。Methacrylonitrile の LC₅₀ は 22.14 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 141.7 mg/kg であった。N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine の LC₅₀ は 4.91 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 30.5 mg/kg であった。o-Chlorophenol の LC₅₀ は 0.98 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 9.9 mg/kg であった。Polyacrylic Acid 5000 の LC₅₀ は 105.30 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 84.2 mg/kg であった。Quinoline の LC₅₀ は 1.41 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 12.3 mg/kg であった。

表 2 昨年度及び本年度使用被験物質の LC₅₀(A549 NRU assay) と LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験換算値)

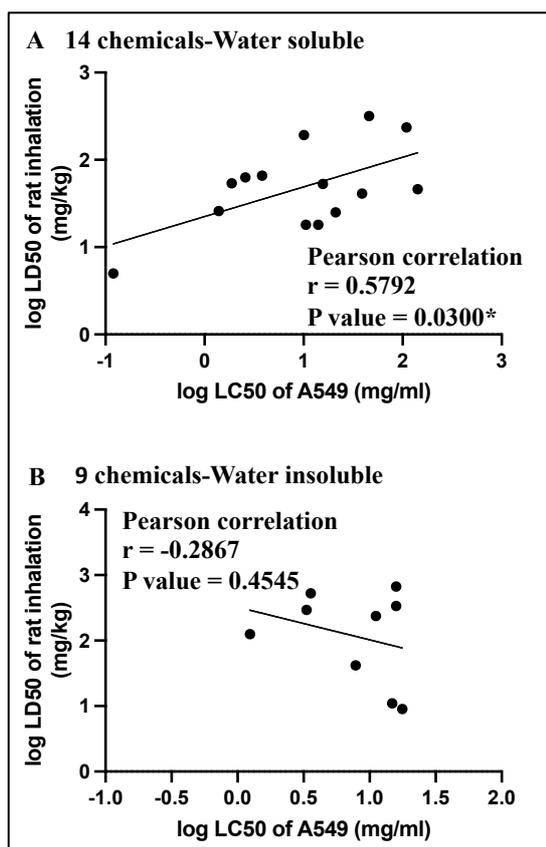
No.	Chemicals	CAS RN	Water soluble	LC ₅₀ (mg/ml) A549 NRU assay	LD ₅₀ 4-hours rat	
					ppm ^c	mg/kg ^d
1 ^a	1-Chloro-2-propanol	127-00-4	○	38.97	1000	41
2 ^a	1-Nitropropane	108-03-2	×	11.14	6200	237
3 ^a	1,2-Dichloroethane	107-06-2	×	7.84	1000	42
4 ^b	1,2-Dichloropropane	78-87-5	×	3.33	6059	294
5 ^a	2-Butoxyethanol	111-76-2	○	21.03	486	25
6 ^a	2-Dimethylaminoethanol	108-01-0	○	2.59	1641	63
7 ^a	2,3-Butanedione	431-03-8	○	10.09	5200	192
8 ^a	Acetylacetone	123-54-6	○	15.62	1224	53
9 ^a	Acrylic acid	1979/10/7	○	1.88	1730	54
10 ^a	Allyl acetate	591-87-7	×	14.83	250	11
11 ^b	Carbon tetrachloride	56-23-5	×	3.58	8000	528
12 ^a	Chloroacetone	78-95-5	○	0.12	121	5
13 ^a	Cyclohexanone	108-94-1	×	15.88	8000	337
14 ^a	Dichloromethane	1975/9/2	×	15.9	18371	670
15 ^a	Glycidol	556-52-5	○	14.02	580	18
16 ^a	Hexahydro-1H-azepine	111-49-9	○	1.39	604	26
17 ^a	Methacrylonitrile	126-98-7	×	17.71	328	9
18 ^a	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	110-18-9	○	3.81	1318	66
19 ^a	N,N-Dimethylacetamide	127-19-5	○	141.89	1238	46
20 ^a	N,N-Dimethylformamide	1968/12/2	○	109.18	7500	235
21 ^a	o-Chlorophenol	95-57-8	×	1.24	2270	125
22 ^a	Polyacrylic Acid 5000	9003/1/4	○	10.53	8	18
23 ^a	Quinoline	91-22-5	×	1.53	N/A	N/A

N/A: Not available. ^a Use 6-well polystyrene plate. ^b Use 6-well glass plate.
^c Information on the LD₅₀ of 4-hours rat inhalation (ppm) of these chemicals was obtained from
^d LD₅₀ value (mg/kg) are calculated from the following formula based on a rat body weight of
LD₅₀ value (mg/kg) = 0.042*1000*LC₅₀ (ppm)*(MW/24.45/1000)*0.25

[A549 NRU assay で得られた LC₅₀ 値の検証]

昨年度及び本年度にて得られた LC₅₀ (A549 NRU assay) および Pubchem より収集した LD₅₀ (4 時間ラット吸入ばく露試験)を表 2 に示す。水溶性物質 (14 種) および非水溶性物質 (9 種) ごとに Pearson の相関解析を行い、得られた散布図を図 2 に示す。Pearson の相関解析の結果、水溶性物質では r 値が 0.5792 と正の相関性を示し、加えて P 値が 0.0300 と有意な相関が示された (図 2A)。非水溶性物質では r 値が -0.2867 と弱い負の相関が示され、 P 値が 0.4545 であり、統計学的有意差はみられなかった (図 2B)。

図 2 水溶性物質(A)および非水溶性物質(B)における LC₅₀(A549 NRU assay)および LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験)の相関比較



C3. 用量設定と外挿性検討

現在の所、8物質について2年の観察期間を終了している。屠殺時の所見は、6物質の各群32匹～56匹の肉眼的結節性病変はGlycidol (IARC 2

A) において肺に1匹認められた。それ以外の投与群には、肺、胸膜中皮、肝、腎等において肉眼的に観察される結節性病変はみられていない。病理組織標本を作成し、詳細に検索する予定である。

D. 考察

D1. ラットを用いた TIPS 法

D1-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験の病理組織学的検査

令和4年度に TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験を実施した6剤は、いずれも投与日から投与後4日の死亡例において肺のうっ血、水腫、出血がみられ、気管から肺胞上皮にかけて壊死が観察された。さらに、アクリル酸及びヘキサヒドロ-1H-アゼピン投与群の投与後8日以降の死亡例では、投与による上皮傷害を示唆する上皮の再生/過形成が認められた。以上の所見から、被験物質曝露による気道上皮の直接傷害に起因し呼吸困難に至ったものと考えられた。組織学的検索を行った心臓、脾臓、胸腺、肝臓、腎臓および副腎において、死因と考えられる所見は認められなかったことから、呼吸器系への影響が主な毒性標的と考えられた。

LD50 (TIPS) と LC50 (吸入暴露) が概ね5倍以内であった *N,N*-ジメチルアセタミド、*N,N*-ジメチルホルムアミド及び *tert*-ブチルアルコールと比較し、TIPS 法でより強い毒性が表れたアクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンでは、上皮の壊死や炎症性反応が強い傾向がみられた。さらにアクリル酸及びヘキサヒドロ-1H-アゼピン投与群の投与後8日以降の死亡例では、気管から細気管支で肉芽組織の形成がみられ、これらの物質による組織傷害性の強さが示唆された。LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) の差の大きさに関し、令和5年度に投与実験を実施した2-プトキシエタノール、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン等についても病理組織学的検査を実施して呼吸器及び全身諸臓器への毒性影響を検討していく予定である。また、呼吸器系以外の臓器に対して毒性標

的性を有する化学物質についても LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) の相関性について検討が必要と考えられる。

D1-2) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における LD50 の判定並びに吸入暴露法及び *in vitro* Neutral red assay との比較

TIPS 法の LD50 と吸入暴露法及び *in vitro* の Neutral red assay から換算した LD50/LC50 を比較した結果、TIPS 法の LD50 が吸入暴露法の 0.5 ~ 2 倍であった物質が 5/14 物質、0.25 ~ 0.5 倍であった物質が 3/14 物質、0.25 倍以下であった物質が 6/14 物質であり、TIPS 法の LD50 は吸入暴露法と同程度、又は低値を示した。このことから、TIPS 法では吸入暴露法と比較して毒性が同等、あるいは強く表れる物質がある可能性が考えられた。これまで実施した病理組織学的検査において、TIPS 法で吸入暴露法と比較してより強い毒性が表れた物質では呼吸器の傷害が強い傾向がみられた。このことから、TIPS 法でより強い毒性を示す要因の一つに、被験物質の呼吸器上皮に対する直接的な傷害性や細胞毒性が関係する可能性が考えられた。今後、呼吸器以外に毒性標的を有する化学物質の検索も含めて、被験物質の物性、細胞毒性、呼吸器刺激性、ADME、毒性発現機序など考慮し、毒性が強く出る要因について、さらなる検討が必要であると考えられた。

LD50 (TIPS) と LC50 (Neutral red assay) を比較した結果、両者の間に強い正の相関性が認められ、5 倍を超える差がみられたのはクロロアセトンの 1 剤のみであった。このことから、*in vitro* Neutral red assay における LC50 は TIPS 法による LD50 とある程度相関する可能性が考えられた。さらに、アクリル酸やヘキサヒドロ-1H-アゼピンでは LD50 (TIPS) と LC50 (inhalation) の差が 0.03 倍から 0.09 倍と大きな差がみられていたが、このような物質においても LC50 (Neutral red assay) との差は最大で 3 倍程度であった。従って、LC50 (Neutral red assay) は TIPS 法による急性毒性試験の投与濃度設定の指標となりえる可能性が考えられた。しかし、何れの被験物質においても LC50 (Neutral red assay) は LD50 (TIPS)

よりも低値を示していたことから、投与量の換算方法など、さらなる検討が必要であると考えられた。

D2. *in vitro* 試験の実施

本研究では昨年度より、ラットを用いた TIPS 法の投与量を設定する準備試験として、急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験として知られている Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay (OECD GD 129)の一部を改変した A549 NRU assay を実施している。LC₅₀ (A549 NRU assay) を基に実施した TIPS 法 (赤根ら) で得られた LD₅₀ は、おおむね相関がみられたことから、A549 NRU assay は TIPS 法の LD₅₀ を決定するための *in vitro* 代替投与量設定試験法として有用であることが示唆されている。

本年度は、昨年度に引き続き水溶性物質の LC₅₀ を検討することで TIPS 法の LD₅₀ を決定すると共に、新たに有機溶媒などの非水溶性物質にて A549 NRU assay を実施した。その結果、水溶性溶媒のみならず、非水溶性溶媒についても LC₅₀ を算出することが出来た。したがって、これまで検討が困難であった有機溶媒などの非水溶性物質についても、A549 NRU assay によって LC₅₀ を算出できることが明らかとなった。

また、水溶性物質において、A549 NRU assay で得られた LC₅₀ は 4 時間ラット吸入ばく露試験における LD₅₀ と正の相関が得られたことから、A549 NRU assay が水溶性物質における有用な LC₅₀ の *in vitro* 評価法であることが明らかとなった。一方、非水溶性物質については負の弱い相関がみられた。非水溶性物質の官能基や溶解度、細胞障害性の有無などの化学性状ごとに相関解析を行うことで、A549 NRU assay の精緻化を図る予定である。

D3. 用量設定と外挿性検討

Glycidol 投与群の肺における肉眼的所見では、LD50 値に近い高用量群で明らかな結節性病変の発生を 1 例観察したが、前がん病変の発生についても病理組織学的に検討をした上で、こ

の方法の発がん試験としての有用性について結論を出したい。

E. 結論

E1. ラットを用いた TIPS 法

病理組織学的検索では、気道上皮の壊死及び肺のうっ血、水腫等が共通してみられた。LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) または LD50 (Neutral red assay) を比較した結果、TIPS 法は吸入暴露法と比較して毒性が同等、あるいは強く表れる物質がある可能性が考えられた。また、Neutral red assay における LC50 は TIPS 法による急性毒性とある程度相関する可能性が考えられ、急性毒性試験の投与濃度設定に用いる指標となりえる可能性が考えられた。

E2. *in vitro* 試験の実施

本年度は、昨年度構築した TIPS 法の *in vitro* 投与量設定試験である A549 NRU assay の汎用性および *in vivo* 評価系における LD₅₀ 値との相関比較を実施した、その結果、A549 NRU assay により有機溶媒などの非水溶性物質においても LC₅₀ を算出することが可能となった。また、水溶性物質については LC₅₀ (A549 NRU assay) が LD₅₀ (4 時間ラット吸入ばく露試験) と緩やかな正の相関を示された。今後も引き続き、A549 NRU assay の汎用性を検証すると共に、非水溶性物質における知見を蓄積することで、A549 NRU assay の精緻化を図る。

E3. 用量設定と外挿性検討

4 時間吸入毒性試験のデータ (LD50 4 時間値) に代わる TIPS 投与方法による短期毒性試験における生存 (LD50 値群を含む致死を免れた動物) について発がん性評価への応用を検討中であり、結果が期待される。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1) Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their

contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol. Sci.* 2024, 198 (1), 40-49.

- 2) Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat. Res.* 2024, 894, 503729.
- 3) Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch. Toxicol.* 2023, 97 (12), 3273-3283.
- 4) Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin. *Food Chem. Toxicol.* 2023, 179, 113965.
- 5) Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2023, 30 (1), 9-22.
- 6) Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors. *J Appl Toxicol.* (in press)
- 7) Toyoda T., Kobayashi T., Miyoshi N., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to o-toluidine and o-anisidine. *Arch Toxicol.* 2023, 97: 3197-207.
- 8) Toyoda T., Sone M., Matsushita K., Akane H., Akagi J., Morikawa T., Mizuta Y., Cho Y.M.,

- Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. *J Toxicol Sci.* 2023, 48: 323-32.
- 9) Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Role of CD44 expressed in renal tubules during maladaptive repair in renal fibrogenesis in an allopurinol-induced rat model of chronic kidney disease. *J Appl Toxicol.* 2024, 44: 455-69.
 - 10) Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Expression of CD44 in renal tubular epithelial cells in fibrotic lesions in the kidney of rat model of chronic kidney disease induced by cyclosporine. *J Toxicol Pathol.* 2024, 37: 55-67.
 - 11) Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol.* 2023, 175: 113702.
 - 12) Akagi J., Mizuta Y., Akane H., Toyoda T., Ogawa K. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2023, 20: 13.
 - 13) Sun Y., Saito K., Ushiki A., Abe M., Saito Y., Kashiwada T., Horimasu Y., Gemma A., Tatsumi K., Hattori N., Tsushima K., Takemoto K., Ishikawa R., Momiyama T., Matsuyama S., Arakawa N., Akane H., Toyoda T., Ogawa K., Sato M., Takamatsu K., Mori K., Nishiya T., Izumi T., Ohno Y., Saito Y., Hanaoka M. Identification of kynurenine and quinolinic acid as promising serum biomarkers for drug-induced interstitial lung diseases. *Respir Res.* 2024, 25: 31.
 - 14) Gi M., Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M., Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. *Arch. Toxicol.* #38762666, 2024, In press.
 - 15) Vachiraarunwong A, Gi M (Corresponding author), Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M., Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. *Arch. Toxicol.* #38630284, 2024, In press.
 - 16) Zhang QY, Zhong MT, Gi M., Chen YK, Lai MQ, Liu JY, Liu YM, Wang Q, Xie XL. Inulin alleviates perfluorooctanoic acid-induced intestinal injury in mice by modulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Environ Pollut* 2023, 342:123090.
 - 17) Yamamoto T, Gi M (Co-first author), Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M., Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2023,15, 5274.
 - 18) Yokota Y, Suzuki S, Gi M., Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M., Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology* 2023, 488:153483.
 - 19) Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Fujioka M., Gi M., Wanibuchi H, Uchida J. Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 2023, 128(12):2197-2205.
 - 20) Suzuki S, Gi M., Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M., Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules* 2023, 14(1), 36.
 - 21) Suzuki S, Gi M., Fujioka M., Kakehashi A, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces

bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. *Toxicol Lett* 2023, 384:128-135.

- 22) Michiba A, Gi M, Yokohira M, Sakurai E, Teramoto A, Kiriyama Y, Yamada S, Wanibuchi H, Tsukamoto T. Early detection of genotoxic hepatocarcinogens in rats using gammaH2AX and Ki-67: prediction by machine learning. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2023, 195(2):202-212.
- 23) Beal MA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell DP, Parsons BL et al: Interpretation of in vitro concentration-response data for risk assessment and regulatory decision-making. Report from the 2022 IWGT quantitative analysis expert working group meeting. *Environ Mol Mutagen* 2023.
- 24) Yamaguchi T., Gi M. (Co-first author), Fujioka M, Suzuki S., Oishi Y., Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol*, 2023. 36, 123-129.
- 25) Sultana N, Fukamachi K, Jiegou Xu, Tsuda H, Suzui M. mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). *Fundam Toxicol Sci.* 10:27-30, 2023.
- 26) Sultana N, Fukamachi K, Roy DC, Jiegou Xu, Tsuda H, Suzui M. mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats. *Fundam Toxicol Sci.* 10:137-141, 2023.

F.2. 学会発表

1. Acetamideの肝発がんに寄与する肝細胞質内封入体の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 相馬明玲, 小川久美子, 日本薬学会第144年会 2024年3月, 神奈川
2. Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30, and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. Ogawa

- K., Akagi J., Mizuta Y., Uneyama M., Akane H., Toyoda T. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
3. Effective method for early detection of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Uneyama M., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
4. Early detection of renal carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. Toyoda T., Matsushita K., Akane H., Uneyama M., Morikawa T., Ogawa K. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
5. Acetamideのラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与, 石井雄二, 山上洋平, 田原麻衣子, 河上強志, 瀧本憲史, 笠松健吾, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
6. 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出, 笠松健吾, 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 小澤俊介, 渋谷淳, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
7. SDラットを用いたdecyltrimethoxysilaneの13週間反復投与試験, 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
8. TSH産生阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出における病理学的解析と血中ホルモン値の比較, 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
9. シクロスポリン誘発ラット腎線維化モデルにおける尿細管の形態とCD44発現, 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
10. γ -H2AX免疫染色によるラット腎発がん物質の早期検出, 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘

- 敏, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
11. ラット肝発がん物質の早期検出におけるALDH3A1と γ -H2AX免疫染色の有用性評価, 畝山瑞穂, 豊田武士, 赤木純一, 赤根弘敏, 水田保子, 森川朋美, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
 12. アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索, 石井雄二, 瀧本憲史, 田原麻衣子, 河上強志, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子, 第52回日本環境変異原ゲノム学会2023年11月, 福岡
 13. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出, 赤根弘敏, 豊田武士, 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子, 第82回日本癌学会学術総会 2023年8月, 神奈川
 14. アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモスリプシス様染色体再構成の関与, 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子, 第82回日本癌学会学術総会2023年8月, 神奈川
 15. 腎発がん物質の28日間反復経口投与はラット腎臓に γ -H2AX形成を誘導する, 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子, 第82回日本癌学会学術総会2023年8月, 神奈川
 16. 齧歯類に見られるacetamideの肝発がん性の種差に関する研究, 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 相馬明玲, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
 17. 脱ヨウ素酵素阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較, 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子, 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
 18. シクロスポリン誘発慢性腎障害におけるCD44の役割及びバイオマーカーとしての可能性, 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
 19. γ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発, 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
 20. 結晶子径6nmの二酸化チタンナノ粒子のラットにおける90日間反復経口投与毒性試験, 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 豊田武士, 小川久美子, 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
 21. 2-Isopropyl-N-2,3-trimethyl buthylamideの包括的毒性評価, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 高須伸二, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美子, 日本食品化学学会 第29回総会・学術大会 2023年6月, 富山
 22. 藤岡正喜, 魏民, 芝野佳奈, 邱桂鈺, Vachiraarunwong Arpamas, 郭潤傑, 鈴木周五, 鰐淵英機. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与法の*in vitro*投与量設定法の開発 (第50回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、令和5年11月18日、東京)
 23. Min Gi, Masaki Fujioka, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Arpamas Vachiraarunwong, Runie Guo, Anna Kakehashi, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an *in vitro* dosing assay for trans-tracheal intrapulmonary spraying administration of chemicals in rats (第40回日本毒性病理学会総会及び学術集会、令和6年1月24日、東京)
 24. Tsuda H. Carbon nanotubes (CNT), innovative materials of the 21st century: carcinogenicity evaluation of CNT with different wall structures, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

参考文献

- 1) Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci.* 110(8):2485-2492. 2019.
- 2) 津田 洋幸. 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」平成 31 年度～令和 3 年度総合研究報告書. 2022.
- 3) Bide RW, Armour SJ, Yee E. Allometric respiration/body mass data for animals to be used for estimates of inhalation toxicity to young adult humans. *J Appl Toxicol.* 20(4):273-90. 2000.

毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及び

その精緻化に関する研究

令和5年度 分担研究報告書

ラットを用いたTIPS法による気管内投与急性吸入毒性試験及び呼吸器の毒性評価並びに全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析に関する研究

研究分担者 高須伸二 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
赤根弘敏 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

毒物又は劇物は、原則、動物を用いた急性毒性試験における LD50/LC50 値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。しかし、全身吸入暴露法は大規模な暴露装置が必要となるなどの困難があるため、吸入毒性情報は限定的である。本研究課題では、汎用性の高い経気管肺内噴霧投与方法（Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法）による気管内投与毒性試験について、急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的とする。

令和5年度は、令和4年度に実施した TIPS 法による急性毒性試験の病理組織学的検査及び新たに8物質（2-ブトキシエタノール、N,N,N,N-テトラメチルエチレンジアミン、クロロアセトン、2,3-ブタンジオン、o-クロロフェノール、メタクリロニトリル、1-ニトロプロパン及びシクロヘキサノン）について TIPS 法による LD50 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。得られた TIPS 法の LD50 を吸入暴露法及び *in vitro* の Neutral red assay から換算した LD50/LC50 と比較した。その結果、TIPS 法の LD50 が吸入暴露法の 0.5~2 倍であった物質が 5/14 物質、0.25~0.5 倍であった物質が 3/14 物質、0.25 倍以下であった物質が 6/14 物質であった。TIPS 法の LD50 は吸入暴露法と同程度、又は低値を示したことから、TIPS 法では吸入暴露法と比較して毒性が同等あるいは強く表れる物質がある可能性が考えられた。また、Neutral red assay は TIPS 法による急性毒性とある程度相関すると考えられ、急性毒性試験の投与濃度設定に有用な指標となりえる可能性が考えられた。

A. 研究目的

毒物又は劇物は、原則、動物を用いた急性毒性試験における LD50/LC50 値から判

定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。特にヒトへの吸入暴露が想定される化合物については吸

入による評価が必要である。しかし、全身吸入暴露法は大規模な暴露装置が必要となるため、実施可能な施設はわずかであり、頭部／鼻部暴露法は拘束ストレスが影響する。そうした背景から国際的にも、化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）における吸入毒性情報は限定的である。

津田研究分担者等は、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方法（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、多種の多層カーボンナノチューブ（MWCNT-7 等）の肺又は胸膜中皮に対する発がん性を報告した¹⁾。また、急性吸入毒性試験の代替法開発に関する先行科研費研究では、TIPS 法による LD50 の暴露量と吸入暴露法による LC50 から求められる暴露量との差は、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²⁾。しかし、吸入暴露試験の代替法として確立するには更なる検証が必要である。

本研究課題では津田らにより検討されてきた TIPS 法による気管内投与毒性試験について、急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的とする。本年度は、令和 4 年度に実施した TIPS 法の病理組織学的検査及び新たに 8 物質（2-ブトキシエタノール、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、クロロアセトン、2,3-ブタンジオン、o-クロロフェノール、メタクリロニトリル、1-ニトロプロパン、シクロヘキサノン）について TIPS 法による LD50 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。

B. 研究方法

B-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験の病理組織学的検査

査

令和 4 年度に実施した TIPS 法 6 試験（N,N-ジメチルアセタミド（CAS RN: 127-19-5）、N,N-ジメチルホルムアミド（CAS RN: 68-12-2）、tert-ブチルアルコール（CAS RN: 75-65-0）、アクリル酸（CAS RN: 79-10-7）、2-ジメチルアミノエタノール（CAS RN: 108-01-0）、ヘキサヒドロ-1H-アゼピン（CAS RN: 111-49-9））について、気管、気管支、肺、肝臓、心臓、脾臓、胸腺、腎臓、副腎の病理組織学的検査を実施した。

B-2) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における LD50 の判定並びに吸入暴露法及び *in vitro* Neutral red assay との比較

新規被験物質として 2-ブトキシエタノール（CAS RN: 111-76-2）、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（CAS RN: 110-18-9）、クロロアセトン（CAS RN: 78-95-5）、2,3-ブタンジオン（CAS RN: 431-03-8）、o-クロロフェノール（CAS RN: 95-57-8）、メタクリロニトリル（CAS RN: 126-98-7）、1-ニトロプロパン（CAS RN: 108-03-2）及びシクロヘキサノン（CAS RN: 108-94-1）について TIPS 法による LD50 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。

投与は昨年度と同様に 12 週齢の F344 ラットにイソフルラン吸入麻酔下（導入 4%）で、ラット用金属製気管内噴霧スプレー（針長 80 mm、内径 0.8 mm、外径 1.0 mm）（夏目製作所）及び喉頭鏡（夏目製作所）を用いて 1 日 4 回（1 時間間隔）で投与した。1 回当たりの投与容量は 2.0 mL/kg とした。投与量は、過去に報告された吸入暴露法の LC50 値を既報のラット呼吸量（J Appl Toxicol. 2000, 20(4):273-90.）を用いて換算した値（LD50（inhalation））及び本研究班で魏らが実施した *in vitro* の Neutral red

assay の結果を考慮して設定した。

令和4から5年度に実施した被験物質14剤のTIPS法で得られたLD50値(LD50(TIPS))をLD50(inhalation)または*in vitro* Neutral red assay から求めた値(LD50(Neutral red assay))と比較した。なお、LD50(Neutral red assay)は本研究班のヒト肺癌細胞(A549)を用いた*in vitro* Neutral red assayにおけるLC50(uL/mL)をTIPS法の被験物質投与溶液の濃度とした場合の総投与量として概算した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物の飼育・処置に当たっては、動物愛護の精神に則るとともに倫理規定に十分配慮し、気管内投与は麻酔下で実施し、解剖時には麻酔下での安楽死を施すなど、苦痛軽減に努めた。

C. 研究結果

C-1) ラットを用いたTIPS法による気管内投与急性吸入毒性試験の病理組織学的検査

気管、気管支、肺、肝臓における病理組織学的所見をTable 1-1~1-6に示す。

② *N,N*-ジメチルアセタミド

2560 mg/kg 群の投与日死亡例では、軽度から重度の気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の軽微な急性炎症並びに軽微から軽度なうっ血、水腫および出血がみられた。

投与後14日まで死亡が認められなかった用量においては、640 mg/kg 群の1例で軽微な細気管支の粘液細胞化生がみられた。

② *N,N*-ジメチルホルムアミド

4000 mg/kg 群の投与日死亡例では、軽微か

ら重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の軽微な急性炎症並びに軽微から重度なうっ血、水腫および出血がみられた。

2000 mg/kg 群の投与後3日死亡例では、軽微から中等度な細気管支および肺胞上皮の壊死並びに肺の急性炎症、軽微から重度な肺のうっ血、水腫および出血に加え、軽度から中等度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の再生/過形成がみられた。また、肝臓で重度な小葉中心性肝細胞壊死がみられた。

投与後14日まで死亡が認められなかった用量においては、500および1000 mg/kg 群の各1例で軽微な細気管支の粘液細胞化生、1000 mg/kg 群の1例で軽微な気管支の粘液貯留がみられた。

③ *tert*-ブチルアルコール

1600 mg/kg 群の投与日死亡例では、中等度から重度の気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の軽微な急性炎症並びに軽微から中等度なうっ血、水腫および出血がみられた。

投与後14日まで死亡がみられなかった用量においては、200および800 mg/kg 群で軽微な細気管支の粘液細胞化生が散見された。

④ アクリル酸

63、125および250 mg/kg 群の投与日死亡例では、重度の気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺で軽微から軽度な急性炎症、軽微から重度なうっ血、水腫および出血がみられた。

31 mg/kg 群の投与後8から11日の死亡例では、中等度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺の急性炎症、軽微から重度な肺のうっ血、水腫および出血に加え、中等度から重度な気管支および細気管支上皮の再生/過形成、軽度から

中等度の気管支および細気管支の肉芽組織、軽度な肺胞中核の肥厚、軽度から中等度の細気管支の粘液細胞化生、気管から肺胞腔内の粘液貯留がみられた。また、肝臓で軽微から軽度な小葉中心性肝細胞壊死がみられた。

31 mg/kg 群の投与後 14 日生存例では、軽度から重度な気管支および細気管支上皮の再生/過形成、軽微な気管支および細気管支の肉芽組織、軽度な肺の急性/慢性炎症、軽微な水腫、軽微から重度な細気管支の粘液細胞化生、軽微から軽度な気管から肺胞腔内の粘液貯留が認められた。

投与後 14 日まで死亡がみられなかった 16 mg/kg 群では、軽微から中等度な単核細胞浸潤、細気管支の粘液細胞化生、軽微な細気管支および肺胞の粘液貯留が認められた。

⑤ 2-ジメチルアミノエタノール

300 mg/kg 群の投与日死亡例では、軽度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺で軽微から中等度な急性炎症、軽微から重度なうっ血、水腫および出血がみられた。

150 mg/kg 群の投与後 1 から 2 日死亡例では、重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、軽微から重度な気管から肺の急性炎症、気管および気管支粘膜下の水腫、肺のうっ血、水腫および出血がみられた。また、1 例の肝臓で軽微な小葉中心性肝細胞壊死がみられた。

投与後 14 日まで死亡が認められなかった用量においては、19 および 75 mg/kg 群で軽微な細気管支の粘液細胞化生が散見された。

⑥ ヘキサヒドロ-1H-アゼピン

31、63 および 125mg/kg 群の投与日死亡例では、中等度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、肺で軽微か

ら軽度な急性炎症、軽微から中等度なうっ血、水腫および出血がみられた。

31 mg/kg 群の投与後 4 から 12 日死亡例では、中等度から重度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の壊死、中等度な肺の急性/慢性炎症、軽微から重度な肺のうっ血、水腫および出血に加え、軽微から中等度な気管、気管支、細気管支および肺胞上皮の再生/過形成がみられた。また、投与後 11 から 12 日死亡例で、軽微から中等度な気管支および細気管支の肉芽組織、軽微から重度な気管支から肺胞腔内の粘液貯留が認められた。

投与後 14 日まで死亡が認められなかった用量においては、16 mg/kg 群で軽微から軽度な気管、気管支、細気管支上皮の再生/過形成並びに細気管支の粘液細胞化生、気管腔内の粘液貯留、8 mg/kg 群で軽微な気管上皮の再生が散見された。

気管および肺以外の諸臓器の病理組織学的検査において、各物質の投与後 14 日生存例および投与後 1 日以降の死亡例で、胸腺で萎縮および tingible body macrophage の増加、脾臓で白脾髄の萎縮、副腎で皮質のびまん性肥大および空胞の増加が散見されたが、投与後の状態悪化に伴ってみられる二次的な変化と考えられた。心臓、脾臓、胸腺、肝臓、腎臓、副腎において、その他の被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

C-2) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における LD50 の判定並びに吸入暴露法及び *in vitro* Neutral red assay との比較

令和 4 年度に実施した 6 剤及び令和 5 年度に実施した被験物質 8 剤の TIPS 法で得られた LD50 (TIPS)、及び吸入暴露試験の LC50 値から換算した LD50 (inhalation) ま

たは *in vitro* Neutral red assay から求めた LD50 (Neutral red assay) と比較した結果を Table 2 に示す。

LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) を比較した結果、TIPS 法の LD50 が吸入暴露法の 0.5~2 倍であった物質が 5/14 物質、0.25~0.5 倍であった物質が 3/14 物質、0.25 倍以下であった物質が 6/14 物質であり、LD50 (TIPS) は LD50 (inhalation) と同程度、又は低値を示した。

LD50 (TIPS) と LD50 (Neutral red assay) を比較した結果、LD50 (TIPS) と LD50 (Neutral red assay) の差は 7 剤で 2 倍以内、6 剤で 2~5 倍以内であり、5 倍を超える差がみられたのはクロロアセトンの 1 剤のみであった。また、LD50 (TIPS) と LD50 (Neutral red assay) の相関性を検討した結果、強い正の相関 ($r=0.95$) が認められ、線形近似 ($R^2=0.91$) が得られた。

D. 考察

D-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験の病理組織学的検査

令和 4 年度に TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験を実施した 6 剤は、いずれも投与日から投与後 4 日の死亡例において肺のうっ血、水腫、出血がみられ、気管から肺胞上皮にかけて壊死が観察された。さらに、アクリル酸及びヘキサヒドロ-1H-アゼピン投与群の投与後 8 日以降の死亡例では、投与による上皮傷害を示唆する上皮の再生/過形成が認められた。以上の所見から、被験物質曝露による気道上皮の直接傷害に起因し呼吸困難に至ったものと考えられた。組織学的検索を行った心臓、脾臓、胸腺、肝臓、腎臓および副腎において、死因と考えられる所見は認められなかったことから、呼吸器系への影響が主な毒性

標的と考えられた。

LD50 (TIPS) と LC50 (吸入暴露) が概ね 5 倍以内であった *N,N*-ジメチルアセタミド、*N,N*-ジメチルホルムアミド及び *tert*-ブチルアルコールと比較し、TIPS 法でより強い毒性が表れたアクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンでは、上皮の壊死や炎症性反応が強い傾向がみられた。さらにアクリル酸及びヘキサヒドロ-1H-アゼピン投与群の投与後 8 日以降の死亡例では、気管から細気管支で肉芽組織の形成がみられ、これらの物質による組織傷害性の強さが示唆された。LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) の差の大きさに関し、令和 5 年度に投与実験を実施した 2-ブトキシエタノール、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン等についても病理組織学的検査を実施して呼吸器及び全身諸臓器への毒性影響を検討していく予定である。また、呼吸器系以外の臓器に対して毒性標的性を有する化学物質についても LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) の相関性について検討が必要と考えられる。

D-2) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における LD50 の判定並びに吸入暴露法及び *in vitro* Neutral red assay との比較

TIPS 法の LD50 と吸入暴露法及び *in vitro* の Neutral red assay から換算した LD50/LC50 を比較した結果、TIPS 法の LD50 が吸入暴露法の 0.5~2 倍であった物質が 5/14 物質、0.25~0.5 倍であった物質が 3/14 物質、0.25 倍以下であった物質が 6/14 物質であり、TIPS 法の LD50 は吸入暴露法と同程度、又は低値を示した。このことから、TIPS 法では吸入暴露法と比較して毒性が同等、あるいは強く表れる物質がある可能性が考えられた。これまで実施した病理組織学

的検査において、TIPS法で吸入暴露法と比較してより強い毒性が表れた物質では呼吸器の傷害が強い傾向がみられた。このことから、TIPS法でより強い毒性を示す要因の一つに、被験物質の呼吸器上皮に対する直接的な傷害性や細胞毒性が関係する可能性が考えられた。今後、呼吸器以外に毒性標的を有する化学物質の検索も含めて、被験物質の物性、細胞毒性、呼吸器刺激性、ADME、毒性発現機序など考慮し、毒性が強く出る要因について、さらなる検討が必要であると考えられた。

LD50 (TIPS) と LC50 (Neutral red assay) を比較した結果、両者の間に強い正の相関性が認められ、5倍を超える差がみられたのはクロロアセトンの1剤のみであった。このことから、*in vitro* Neutral red assay における LC50 は TIPS 法による LD50 とある程度相関する可能性が考えられた。さらに、アクリル酸やヘキサヒドロ-1H-アゼピンでは LD50 (TIPS) と LC50 (inhalation) の差が 0.03 倍から 0.09 倍と大きな差がみられていたが、このような物質においても LC50 (Neutral red assay) との差は最大で3倍程度であった。従って、LC50 (Neutral red assay) は TIPS 法による急性毒性試験の投与濃度設定の指標となりえる可能性が考えられた。しかし、何れの被験物質においても LC50 (Neutral red assay) は LD50 (TIPS) よりも低値を示していたことから、投与量の換算方法など、さらなる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

病理組織学的検索では、気道上皮の壊死及び肺のうっ血、水腫等が共通してみられた。LD50 (TIPS) と LD50 (inhalation) または LD50 (Neutral red assay) を比較した結果、TIPS法は吸入暴露法と比較して毒

性が同等、あるいは強く表れる物質がある可能性が考えられた。また、Neutral red assay における LC50 は TIPS 法による急性毒性とある程度相関する可能性が考えられ、急性毒性試験の投与濃度設定に用いる指標となりえる可能性が考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol. Sci.* 2024, 198 (1), 40-49.
- 2) Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of gpt delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat. Res.* 2024, 894, 503729.
- 3) Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch. Toxicol.* 2023, 97 (12), 3273-3283.
- 4) Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin. *Food Chem. Toxicol.* 2023, 179, 113965.

- 5) Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2023, 30 (1), 9-22.
 - 6) Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors. *J Appl Toxicol.* (in press)
 - 7) Toyoda T., Kobayashi T., Miyoshi N., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to o-toluidine and o-anisidine. *Arch Toxicol.* 2023, 97: 3197-207.
 - 8) Toyoda T., Sone M., Matsushita K., Akane H., Akagi J., Morikawa T., Mizuta Y., Cho Y.M., Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. *J Toxicol Sci.* 2023, 48: 323-32.
 - 9) Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Role of CD44 expressed in renal tubules during maladaptive repair in renal fibrogenesis in an allopurinol-induced rat model of chronic kidney disease. *J Appl Toxicol.* 2024, 44: 455-69.
 - 10) Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Expression of CD44 in renal tubular epithelial cells in fibrotic lesions in the kidney of rat model of chronic kidney disease induced by cyclosporine. *J Toxicol Pathol.* 2024, 37: 55-67.
 - 11) Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol.* 2023, 175: 113702.
 - 12) Akagi J., Mizuta Y., Akane H., Toyoda T., Ogawa K. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. Part Fibre Toxicol. 2023, 20: 13.
 - 13) Sun Y., Saito K., Ushiki A., Abe M., Saito Y., Kashiwada T., Horimasu Y., Gemma A., Tatsumi K., Hattori N., Tsushima K., Takemoto K., Ishikawa R., Momiyama T., Matsuyama S., Arakawa N., Akane H., Toyoda T., Ogawa K., Sato M., Takamatsu K., Mori K., Nishiya T., Izumi T., Ohno Y., Saito Y., Hanaoka M. Identification of kynurenine and quinolinic acid as promising serum biomarkers for drug-induced interstitial lung diseases. *Respir Res.* 2024, 25: 31.
- F.2 学会発表
- 1) Acetamideの肝発がんに関与する肝細胞質内封入体の形成機序, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 相馬明玲, 小川久美子, 日本薬学会第144年会 2024年3月, 神奈川
 - 2) Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30, and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. Ogawa

- K., Akagi J., Mizuta Y., Uneyama M., Akane H., Toyoda T. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
- 3) Effective method for early detection of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Uneyama M., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
- 4) Early detection of renal carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. Toyoda T., Matsushita K., Akane H., Uneyama M., Morikawa T., Ogawa K. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
- 5) Acetamideのラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与, 石井雄二, 山上洋平, 田原麻衣子, 河上強志, 瀧本憲史, 笠松健吾, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
- 6) 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出, 笠松建吾, 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 小澤俊介, 渋谷淳, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
- 7) SDラットを用いたdecyltrimethoxysilaneの13週間反復投与試験, 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
- 8) TSH産生阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出における病理学的解析と血中ホルモン値の比較, 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
- 9) シクロスポリン誘発ラット腎線維化モデルにおける尿細管の形態とCD44発現, 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
- 10) γ -H2AX免疫染色によるラット腎発がん物質の早期検出, 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
- 11) ラット肝発がん物質の早期検出におけるALDH3A1と γ -H2AX免疫染色の有用性評価, 畝山瑞穂, 豊田武士, 赤木純一, 赤根弘敏, 水田保子, 森川朋美, 小川久美子, 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
- 12) アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索, 石井雄二, 瀧本憲史, 田原麻衣子, 河上強志, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子, 第52回日本環境変異原ゲノム学会2023年11月, 福岡
- 13) ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出, 赤根弘敏, 豊田武士, 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子, 第82回日本癌学会学術総会2023年8月, 神奈川
- 14) アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモスリプシス様染色体再構成の関与, 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子, 第82回日本癌学会学術総会2023年8月, 神奈川
- 15) 腎発がん物質の28日間反復経口投与はラット腎臓に γ -H2AX形成を誘導する, 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子, 第82回日本癌学会学術総会2023年

8月，神奈川

- 16) 齧歯類に見られるacetamideの肝発がん性の種差に関する研究，瀧本憲史，石井雄二，満元達也，相馬明玲，高須伸二，渋谷淳，小川久美子，第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月，神奈川
- 17) 脱ヨウ素酵素阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較，赤根弘敏，豊田武士，松下幸平，森川朋美，小坂 忠司，田島均，青山博昭，小川久美子，第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月，神奈川
- 18) シクロスポリン誘発慢性腎障害におけるCD44の役割及びバイオマーカーとしての可能性，松下幸平，豊田武士，赤根弘敏，森川朋美，小川久美子，第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月，神奈川
- 19) γ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発，豊田武士，松下幸平，赤根弘敏，森川朋美，小川久美子，第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月，神奈川
- 20) 結晶子径6 nmの二酸化チタンナノ粒子のラットにおける90日間反復経口投与毒性試験，赤木純一，水田保子，赤根弘敏，畝山瑞穂，豊田武士，小川久美子，第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月，神奈川
- 21) 2-Isopropyl-N-2,3-trimethyl butylamideの包括的毒性評価，石井雄二，瀧本憲史，満元達也，高須伸二，並木萌香，能美健彦，小川久美子，日本食品化学学会 第29回総会・学術大会 2023年6月，富山

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

参考文献

- 1) Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci*. 110(8):2485-2492. 2019.
- 2) 津田 洋幸. 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」平成31年度～令和3年度総合研究報告書. 2022.
- 3) Bide RW, Armour SJ, Yee E. Allometric respiration/body mass data for animals to be used for estimates of inhalation toxicity to young adult humans. *J Appl Toxicol*. 20(4):273-90. 2000.

Table 1-1. Histopathological findings in F344 rats treated with *N,N*-dimethylacetamide

		Dose (mg/kg)	320	640	1280	2560
		Necropsy day	14	14	14	0
		No. of animals examined	6	6	6	6
Trachea	Necrosis, epithelium		-	-	-	+ ~ +++
Bronchi	Necrosis, epithelium		-	-	-	++ ~ +++
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse		-	-	-	++ ~ +++
	Inflammation, acute alveolar/interstitial		-	-	-	±
	Congestion		-	-	-	+
	Edema		-	-	-	± ~ +
	Hemorrhage		-	-	-	± ~ +
	Metaplasia, mucous cell, bronchioles		-	- ~ ±	-	-
	Liver		/	/	-	-

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

/, not examined

Table 1-2. Histopathological findings in F344 rats treated with *N,N*-dimethylformamide

		Dose (mg/kg)	500	1000	2000	4000
		Necropsy day	14	14	3	0
		No. of animals examined	5	6	5	6
Trachea	Necrosis, epithelium		-	-	-	± ~ +++
	Regeneration, epithelium		-	-	+ ~ ++	-
Bronchi	Necrosis, epithelium		-	-	-	+++
	Regeneration, epithelium		-	-	+ ~ ++	-
	Mucus retention, bronchial lumen		- ~ ±	-	-	-
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse		-	-	- ~ ++	++ ~ +++
	Inflammation, acute alveolar/interstitial		-	-	± ~ ++	±
	Congestion		-	-	+ ~ ++	+ ~ +++
	Edema		-	-	± ~ +	+ ~ ++
	Hemorrhage		-	-	- ~ +++	± ~ ++
	Regeneration/hyperplasia, bronchioles		-	-	+ ~ ++	-
	Metaplasia, mucous cell, bronchioles		- ~ ±	- ~ ±	-	-
Liver	Necrosis, hepatocyte, centrilobular		/	-	+++	-

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

/, not examined

Table 1-3. Histopathological findings in F344 rats treated with *t*-butyl alcohol

		Dose (mg/kg)			
		200	400	800	1600
		Necropsy day			
		14	14	14	0
		No. of animals examined			
		6	5	5	3
Trachea	Necrosis, epithelium	-	-	-	++ ~ +++
Bronchi	Necrosis, epithelium	-	-	-	+++
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse	-	-	-	+++
	Inflammation, acute alveolar/interstitial	-	-	-	±
	Congestion	-	-	-	+
	Edema	-	-	-	+
	Hemorrhage	-	-	-	± ~ +
	Metaplasia, mucous cell, bronchioles	- ~ ±	-	- ~ ±	-
	Liver		/	/	-

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

/, not examined

Table 1-4. Histopathological findings in F344 rats treated with acrylic acid

		Dose (mg/kg)					
		16	31		63	125	250
		Necropsy day					
		14	14	8-11	0	0	0
		No. of animals examined					
		6	3	3	6	6	3
Trachea	Necrosis, epithelium	-	-	- ~ ++	+++	+++	+++
	Mucus retention, tracheal lumen	-	- ~ +	- ~ +	-	-	-
Bronchi	Necrosis, epithelium	-	-	- ~ +++	+++	+++	+++
	Regeneration/hyperplasia, epithelium	-	- ~ +	- ~ ++	-	-	-
	Granulation tissue, subepithelial	-	- ~ ±	- ~ +	-	-	-
	Mucus retention, bronchial lumen	-	- ~ ±	± ~ +	-	-	-
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse	-	-	++ ~ +++	+++	+++	+++
	Inflammation, acute/chronic alveolar/interstitial	-	- ~ +	++ ~ +++	±	± ~ +	±
	Congestion	-	-	± ~ +++	± ~ +++	++	+++
	Edema	-	- ~ ±	- ~ +	+	+	+
	Hemorrhage	-	-	+ ~ ++	± ~ +	± ~ +	±
	Regeneration/hyperplasia, bronchioles	-	++ ~ +++	++ ~ +++	-	-	-
	Thickening, alveolar septa, multifocal	-	+	- ~ +	-	-	-
	Granulation tissue, bronchioles	-	- ~ ±	+ ~ ++	-	-	-
	Infiltration, mononuclear cell, peribronchiolar/alveolar/perivascular	± ~ ++	-	-	-	-	-
	Mucus retention, bronchioles/alveoli	- ~ ±	± ~ +	+	-	-	-
Metaplasia, mucous cell, bronchioles	± ~ ++	± ~ +++	+ ~ ++	-	-	-	
Liver	Necrosis, hepatocyte, centrilobular	-	-	± ~ +	-	-	-

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

/, not examined

Table 1-5. Histopathological findings in F344 rats treated with 2-dimethylaminoethanol

		Dose (mg/kg)		19		75		150		300	
		Necropsy day		Day 14		Day 14		Day 1-2		Day 0	
		No. of animals examined		6		6		6		6	
Trachea	Necrosis, epithelium	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
	Inflammation, acute	-	-	-	-	-	-	± ~ +++	-	-	-
	Edema, submucosa	-	-	-	-	-	-	± ~ +++	-	-	-
Bronchi	Necrosis, epithelium	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
	Inflammation, acute	-	-	-	-	-	-	± ~ +++	-	-	-
	Edema, submucosa	-	-	-	-	-	-	± ~ ++	-	-	-
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse	-	-	-	-	-	-	+++	+	~	+++
	Inflammation, acute alveolar/interstitial	-	-	-	-	-	-	++	±	~	+
	Congestion	-	-	-	-	-	-	± ~ +++	±	~	+
	Edema	-	-	-	-	-	-	+ ~ ++	±	~	+
	Hemorrhage	-	-	-	-	-	-	± ~ +	±	~	+
	Metaplasia, mucous cell, bronchioles	- ~ ±	- ~ ±	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver	Necrosis, hepatocyte, centrilobular	/	-	-	-	-	-	- ~ ±	-	-	-

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

/, not examined

Table 1-6. Histopathological findings in F344 rats treated with hexahydro-1H-azepine

		Dose (mg/kg)		8		16		31		63		125	
		Necropsy day		14		14		11-12		4		0	
		No. of animals examined		4		6		2		1		3	
Trachea	Necrosis, epithelium	-	-	-	-	- ~ +++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Regeneration/hyperplasia, epithelium	- ~ ±	- ~ ±	- ~ ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Granulation tissue, subepithelial	-	-	- ~ ++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mucus retention, tracheal lumen	-	- ~ ±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bronchi	Necrosis, epithelium	-	-	-	-	- ~ +++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Regeneration/hyperplasia, epithelium	-	- ~ +	- ~ ±	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	Granulation tissue, subepithelial	-	-	± ~ ++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mucus retention, bronchial lumen	-	-	± ~ +	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse	-	-	++ ~ +++	+++	+++	++ ~ +++	+++	++ ~ +++	+++	+++	+++	+++
	Inflammation, acute/chronic alveolar/interstitial	-	-	++	++	+	+	+	±	~	++	±	~
	Congestion	-	-	++ ~ +++	+++	± ~ ++	±	~	++	±	~	++	±
	Edema	-	-	+ ~ +++	±	+	+	+	±	~	++	±	~
	Hemorrhage	-	-	+ ~ +++	+	± ~ ++	±	~	++	±	~	++	±
	Regeneration/hyperplasia, bronchioles	-	- ~ ±	- ~ ++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mucus retention, bronchioles/alveoli	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metaplasia, mucous cell, bronchioles	-	- ~ +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liver	Necrosis, hepatocyte, centrilobular	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

/, not examined

Table 2. Comparison of LD50 in TPS with those in inhalation study and in *in vitro* Neutral red assay.

Test substance	LD 50 (m g/kg)	LD 50 (TPS) / LD 50 (Inhalation)*	LD 50 (TPS) / LD 50 (Neutral red assay)**
<i>N,N</i> -Dimethylacetamide	1280 – 2560	2.0 – 4.0	1.1 – 2.3
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	1000 – 2000	0.91 – 1.8	1.1 – 2.3
<i>tert</i> -Butyl alcohol	800 – 1600	0.18 – 0.36	2.2 – 4.4
Acrylic acid	16 – 31	0.03 – 0.06	0.53 – 1.0
2-Dimethylaminoethanol	75 – 150	0.09 – 0.17	3.6 – 7.2
Hexahydro-1H-azepine	16 – 31	0.04 – 0.09	1.4 – 2.8
2-Butoxyethanol	200 – 400	0.79 – 1.6	1.2 – 2.4
<i>N,N,N',N'</i> -Tetraethylethylenediamine	120 – 240	0.13 – 0.26	3.9 – 7.9
Chloroacetone	32 – 64	0.48 – 0.96	34 – 69
2,3-Butanedione	320 – 640	0.12 – 0.24	4.0 – 7.9
<i>o</i> -Chlorophenol	20 – 40	0.07 – 0.13	2.0 – 4.0
Methacrylonitrile	50 – 100	0.38 – 0.76	0.35 – 0.71
1-Nitropropane	240 – 480	0.30 – 0.60	2.7 – 5.4
Cyclohexanone	160 – 320	0.11 – 0.22	1.3 – 2.5

*LD 50 (Inhalation) referred to the previous reports.

**LC50 (Neutral red assay) was calculated as the total dose (four doses) assuming that the LC50 (µL/mL) determined in present *in vitro* study was the concentration of test substance solution used in TPS study.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及び

その精緻化に関する研究

令和5年度 分担研究報告書

in vitro 試験の実施

研究分担者 魏 民

大阪公立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

研究協力者 藤岡 正喜

大阪公立大学大学院医学研究科 分子病理学 特任講師

研究要旨

毒物又は劇物（毒劇物）は、原則として動物を用いた急性毒性試験におけるLD₅₀・LC₅₀値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。一方、近年は*in vitro*試験等に基づく、毒性や刺激性等から判断する評価法も希求されている。昨年度より、本研究ではラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与方法（Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS法）を行う際の*in vitro*投与量設定法として、ヒト肺腺癌細胞株A549を用いた改変Neutral Red Uptake assay（A549 NRU assay）を構築し、試験プロトコールの最適化とその有用性について検討を行っている。本年度は水溶性物質8種に加えて有機溶媒などの非水溶性物質10種についても LC₅₀ の検討を行った。加えて、昨年度及び本年度に得られたLC₅₀について、4時間ラット吸入ばく露試験における LD₅₀ との相関解析を行った。その結果、非水溶性物質についても A549 NRU assay によって LC₅₀ が得られることをはじめて明らかにした。また水溶性物質においてLC₅₀（A549 NRU assay）が LD₅₀（4 時間ラット吸入ばく露試験）と正の相関が得られたことから、A549 NRU assay が*in vitro*投与量設定法として有用であることが確認できた。

A. 研究目的

毒物又は劇物（毒劇物）は、原則として動物を用いた急性毒性試験における LD₅₀・LC₅₀ 値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。一方、近年は*in vitro* 試験等に基づく、毒性や刺激性等から判断する評価法も希求されて

いる。また、前述の経路の内、特に重要なヒトへの吸入ばく露が想定される化合物は、吸入による評価が必要であるが、全身吸入ばく露法は大規模なばく露装置が必要となるため、実施可能な施設は世界的にみてもわずかである。そこで、全身吸入ばく露法の代替法としてラットを用いた被験物質の経

気管肺内噴霧投与方法 (Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法) を用いることとするが、その用量設定のために多数のラットを用いることは 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の観点から適切ではない。そこで、本研究では細胞株を用いた *in vitro* 法により LC₅₀ を推定し、少ない匹数で TIPS 法を行うための、*in vitro* 投与濃度設定試験を開発する。その方法として、取り扱いが簡便でかつヒトの肺胞上皮由来であるヒト肺腺癌細胞株(A549)の細胞毒性を指標とした評価法を検討・精緻化し、毒劇物の指定に資する手法の確立を図ることを目的とする。

昨年度の研究で、我々はラットを用いた TIPS 法の *in vitro* 投与量設定法として、細胞毒性評価法として一般的に知られている Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay を一部改変した A549 NRU assay を用いて、その汎用性と結果の妥当性について検討を行い、TIPS 法における LD₅₀ 値と良好な相関が得られている。本年度は A549 NRU assay の汎用性を検証するために、水溶性物質に加え非水溶性物質についても新たに A549 NRU assay で検討を実施した。

B. 研究方法

[被験物質及び細胞株]

本年度において、使用した被験物質を表 1 に示す。評価に用いる培養細胞として吸入ばく露を想定し、ヒト肺腺癌細胞株 A549 を選択し、液体培地として 10%FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド含有) を使用した。

表 1 被験物質及び使用した培地並びに LC₅₀(A549 NRU assay)と LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験換算値)

No.	Chemicals	CAS RN	Water soluble	Vehicle	FBS	LC ₅₀ (µL/mL) A549 NRU assay	Estimated LD ₅₀ (mg/kg) in TIPS ^c
1 ^a	1-Chloro-2-propanol	127-00-4	○	RPMI-1640	+	34.96	311.8
2 ^a	1-Nitropropane	108-03-2	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	11.18	89.1
3 ^a	1,2-Dichloroethane	107-06-2	×	2% DMSO in RPMI-1640	-	6.3	62.7
4 ^b	1,2-Dichloropropane	78-87-5	×	2% DMSO in RPMI-1640	-	2.88	26.7
5 ^a	2-Butoxyethanol	111-76-2	○	RPMI-1640	+	23.33	168.2
6 ^a	2,3-Butanedione	431-03-8	○	RPMI-1640	+	10.2	80.7
7 ^a	Acetylacetone	123-54-6	○	RPMI-1640	+	16.07	124.9
8 ^a	Allyl acetate	591-87-7	×	1% Ethanol in RPMI-1640	-	15.99	118.6
9 ^b	Carbon tetrachloride	56-23-5	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	2.25	28.7
10 ^b	Chloroacetone	78-95-5	○	RPMI-1640	+	0.1	0.9
11 ^a	Cyclohexanone	108-94-1	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	16.86	127
12 ^a	Dichloromethane	1975-92	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	12	127.2
13 ^a	Glycidol	556-52-5	○	RPMI-1640	+	12.27	112.2
14 ^a	Methacrylonitrile	126-98-7	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	22.14	141.7
15 ^a	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	110-18-9	○	RPMI-1640	+	4.91	30.5
16 ^a	<i>o</i> -Chlorophenol	95-57-8	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	0.98	9.9
17 ^a	Polyacrylic Acid 5000	9003-1-4	○	RPMI-1640	+	105.3	84.24
18 ^a	Quinoline	91-22-5	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	1.41	12.3

^a Use 6-well polystyrene plate and ^b Use 6-well glass plate.

^c Estimated LD₅₀ value (mg/kg) in TIPS are calculated from the following formula based on a rat body weight of 250 g
LD₅₀ value (mg/kg) = (LC₅₀ (µl/ml) × 2 × Density) × 0.25

[A549 NRU assay]

A549 NRU assay の概要について、図 1 に示す。

Day 0 において、6-well プレート(水溶性物質の場合はポリスチレン製、非水溶性物質の場合はガラス製)に A549 細胞を 2 x 10⁵ 細胞で播種した。Day 1 には、被験物質の調製のために、15 mL チューブに被験物質を培地と混合し、vortex にて 5 秒程度強く振盪した。

培地を吸引後 PBS で 1 回洗浄し、事前に調製した被験物質を混合した培地(水溶性物質の場合は 10%FBS 含有 RPMI-1640、非水溶性物質の場合は、2% DMSO 含有 RPMI-1640(1,2-Dichloropropane)、1%エタノール含有 RPMI-1640(Allyl acetate)、2%エタノール含有 RPMI-1640(1-Nitropropane, Carbon tetrachloride, Cyclohexanone, Dichloromethane, Methacrylonitrile, *o*-Chlorophenol, Quinoline)) を well 内にそれぞれ添加した(2 ml/well; 2 wells/被験物質)。その後 37°C の 5% CO₂ インキュベーターにて 15 分間インキュベーションした。

培地を吸引し、さらに PBS で 2 回洗浄後、調製した Neutral red 含有 RPMI 溶液(Neutral red 最終濃度 0.33%)を well 内に添加した。その後、37°Cの 5%CO₂ インキュベーターにて 3 時間インキュベーションした。インキュベーション完了後、培地を除去し PBS で 2 回洗浄し、酢酸-エタノール溶液(50%エタノール + 49% ミリ Q 水 + 1% 氷酢酸)を 1 mL ずつ加えプレートを shaking することで細胞内に取り込まれた Neutral red を回収した。新たに用意した 96 well プレートに、Well 内の酢酸-エタノール溶液を 180 μL ずつ移し替え、吸光度計にて 540 nm の波長で計測を行った。

なお、各被験物質について、2 回以上独立した試験を行った。

[LC₅₀ の算出]

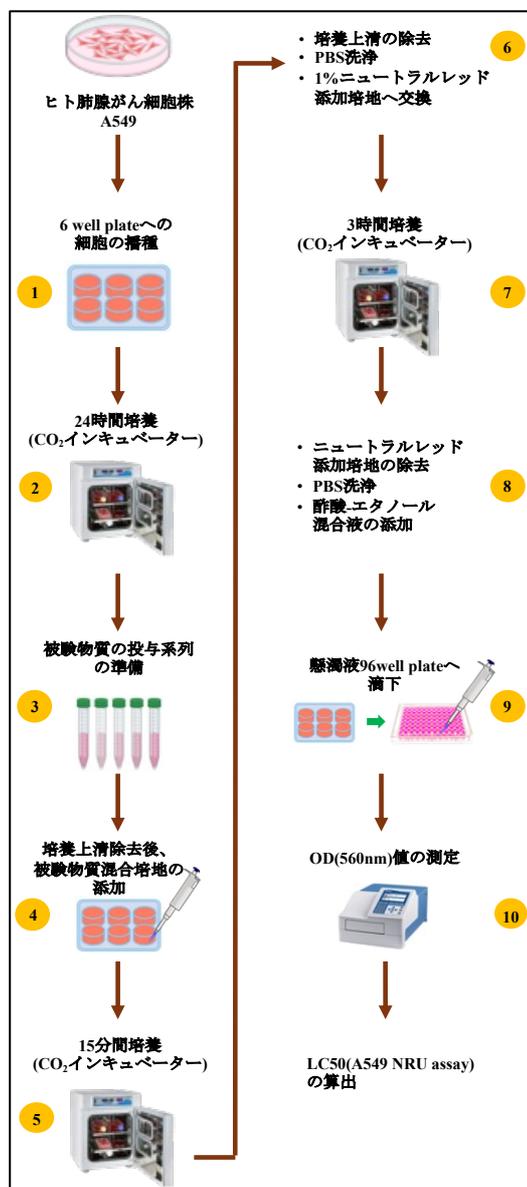
A549 NRU assay にて得られた吸光度について、近似曲線を GraphPad Prism software で解析し、LC₅₀ を算出した。詳細な方法として、近似曲線の投与濃度を Log 変換した値を用いて、非線形回帰(カーブフィット法)で得られた値を log(agonist) vs normalized response – Variable slope 解析にて LC₅₀ を算出した。

[A549 NRU assay で得られた LC₅₀ 値の検証]

昨年度および本年度で得られた各被験物質の A549 NRU assay における LC₅₀ 値について、毒性情報などの情報が化学物質毎に収載されている Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) より 4 時間ラット吸入ばく露試験における LD₅₀ 値を収集し、LC₅₀ (A549 NRU assay) および LD₅₀ (4 時間ラット吸入ばく露試験) との相関比較(Pearson の相関分析)を実施し、得

られた結果を散布図として作図した。

図 1 A549 NRU assay の概要



C. 研究結果

[A549 NRU assay]

A549 NRU assayを実施し得られた各被験物質のLC₅₀およびLC₅₀より算出したTIPS法のLD₅₀ (換算値) を表 1 に示す。

1-Chloro-2-propanol の LC₅₀ は 34.96 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 311.8 mg/kg であった。1-Nitropropa

ne の LC₅₀ は 11.18 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 89.1 mg/kg であった。1,2-Dichloroethane の LC₅₀ は 6.30 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 62.7 mg/kg であった。1,2-Dichloropropane の LC₅₀ は 2.88 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 26.7 mg/kg であった。2-Butoxyethanol の LC₅₀ は 23.33 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 168.2 mg/kg であった。2,3-Butanedione の LC₅₀ は 10.20 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 80.7 mg/kg であった。Acetylacetone の LC₅₀ は 16.07 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 124.9 mg/kg であった。Allyl acetate の LC₅₀ は 15.99 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 118.6 mg/kg であった。Carbon tetrachloride の LC₅₀ は 2.25 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 28.7 mg/kg であった。Chloroacetone の LC₅₀ は 0.10 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 0.9 mg/kg であった。Cyclohexane の LC₅₀ は 16.86 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 127.0 mg/kg であった。Dichloromethane の LC₅₀ は 12.00 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 311.8 mg/kg であった。Glycidol の LC₅₀ は 12.27 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 112.2 mg/kg であった。Methacrylonitrile の LC₅₀ は 22.14 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 141.7 mg/kg であった。N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine の LC₅₀ は 4.91 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 30.5 mg/kg であった。o-Chlorophenol の LC₅₀ は 0.98 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値)

は 9.9 mg/kg であった。Polyacrylic Acid 5000 の LC₅₀ は 105.30 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 84.2 mg/kg であった。Quinoline の LC₅₀ は 1.41 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 12.3 mg/kg であった。

表 2 昨年度及び本年度使用被験物質の LC₅₀(A549 NRU assay)と LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験換算値)

No.	Chemicals	CAS RN	Water soluble	LC ₅₀ (mg/ml) A549 NRU assay	LD ₅₀ 4-hours rat	
					ppm ^c	mg/kg ^d
1 ^a	1-Chloro-2-propanol	127-00-4	○	38.97	1000	41
2 ^a	1-Nitropropane	108-03-2	×	11.14	6200	237
3 ^a	1,2-Dichloroethane	107-06-2	×	7.84	1000	42
4 ^b	1,2-Dichloropropane	78-87-5	×	3.33	6059	294
5 ^a	2-Butoxyethanol	111-76-2	○	21.03	486	25
6 ^a	2-Dimethylaminoethanol	108-01-0	○	2.59	1641	63
7 ^a	2,3-Butanedione	431-03-8	○	10.09	5200	192
8 ^a	Acetylacetone	123-54-6	○	15.62	1224	53
9 ^a	Acrylic acid	1979/10/7	○	1.88	1730	54
10 ^b	Allyl acetate	591-87-7	×	14.83	250	11
11 ^b	Carbon tetrachloride	56-23-5	×	3.58	8000	528
12 ^a	Chloroacetone	78-95-5	○	0.12	121	5
13 ^a	Cyclohexanone	108-94-1	×	15.88	8000	337
14 ^a	Dichloromethane	1975/9/2	×	15.9	18371	670
15 ^a	Glycidol	556-52-5	○	14.02	580	18
16 ^a	Hexahydro-1H-azepine	111-49-9	○	1.39	604	26
17 ^a	Methacrylonitrile	126-98-7	×	17.71	328	9
18 ^a	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	110-18-9	○	3.81	1318	66
19 ^a	N,N-Dimethylacetamide	127-19-5	○	141.89	1238	46
20 ^a	N,N-Dimethylformamide	1968/12/2	○	109.18	7500	235
21 ^a	o-Chlorophenol	95-57-8	×	1.24	2270	125
22 ^a	Polyacrylic Acid 5000	9003/1/4	○	10.53	8	18
23 ^a	Quinoline	91-22-5	×	1.53	N/A	N/A

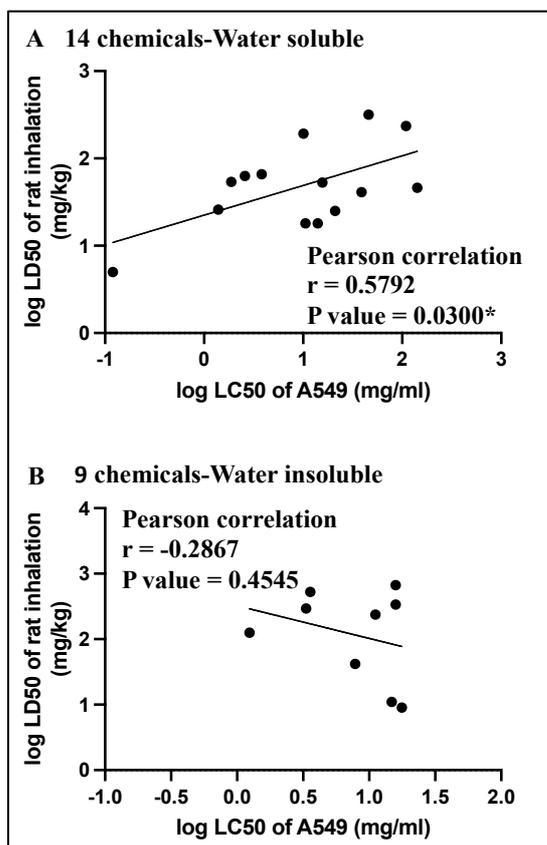
N/A: Not available. ^a Use 6-well polystyrene plate. ^b Use 6-well glass plate. ^c Information on the LD₅₀ of 4-hours rat inhalation (ppm) of these chemicals was obtained from Pubchem. ^d LD₅₀ value (mg/kg) are calculated from the following formula based on a rat body weight of 250g. LD₅₀ value (mg/kg) = 0.042*1000*LC₅₀ (ppm)*(MW/24.45/1000)*0.25

[A549 NRU assay で得られた LC₅₀ 値の検証]

昨年度及び本年度にて得られた LC₅₀ (A549 NRU assay) および Pubchem より収集した LD₅₀ (4 時間ラット吸入ばく露試験)を表 2 に示す。水溶性物質 (14 種) および非水溶性物質 (9 種) ごとに Pearson の相関解析を行い、得られた散布図を図 2 に示す。Pearson の相関解析の結果、水溶性物質では r 値が 0.5792 と正の相関性を示し、加えて P 値が 0.0300 と有意な相関が示された (図 2A)。非水溶性物質では r 値が -0.2867 と弱い負の相関が示され、P 値が 0.4545 であり、統計学的有意差はみられな

かった (図 2B)。

図 2 水溶性物質(A)および非水溶性物質(B)における LC₅₀(A549 NRU assay)および LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験)の相関比較



D. 考察

本研究では昨年度より、ラットを用いた TIPS 法の投与量を設定する準備試験として、急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試として知られている Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay (OECD GD 129)の一部を改変した A549 NRU assay を実施している。LC₅₀ (A549 NRU assay) を基に実施した TIPS 法 (赤根ら) で得られた LD₅₀ は、おおむね相関がみられたことから、A549 NRU assay は TIPS 法の LD₅₀ を決定するための *in vitro* 代替投与量設定試験法として有用であることが示唆されている。

本年度は、昨年度に引き続き水溶性物質の LC₅₀ を検討することで TIPS 法の LD₅₀ を決定すると共に、新たに有機溶媒などの非水溶性物質にて A549 NRU assay を実施した。その結果、水溶性溶媒のみならず、非水溶性溶媒についても LC₅₀ を算出することが出来た。したがって、これまで検討が困難であった有機溶媒などの非水溶性物質についても、A549 NRU assay によって LC₅₀ を算出できることが明らかとなった。

また、水溶性物質において、A549 NRU assay で得られた LC₅₀ は 4 時間ラット吸入ばく露試験における LD₅₀ と正の相関が得られたことから、A549 NRU assay が水溶性物質における有用な LC₅₀ の *in vitro* 評価法であることが明らかとなった。一方、非水溶性物質については負の弱い相関がみられた。非水溶性物質の官能基や溶解度、細胞障害性の有無などの化学性状ごとに相関解析を行うことで、A549 NRU assay の精緻化を図る予定である。

E. 結論

本年度は、昨年度構築した TIPS 法の *in vitro* 投与量設定試験である A549 NRU assay の汎用性および *in vivo* 評価系における LD₅₀ 値との相関比較を実施した、その結果、A549 NRU assay により有機溶媒などの非水溶性物質においても LC₅₀ を算出することが可能となった。また、水溶性物質については LC₅₀ (A549 NRU assay) が LD₅₀ (4 時間ラット吸入ばく露試験) と緩やかな正の相関を示された。今後も引き続き、A549 NRU assay の汎用性を検証すると共に、非水溶性物質における知見を蓄積することで、A549 NRU assay の精緻化を図る。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. Arch. Toxicol. #38762666, 2024, In press.
2. Vachiraarunwong A, Gi M (Corresponding author), Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. Arch. Toxicol. #38630284, 2024, In press.
3. Zhang QY, Zhong MT, Gi M, Chen YK, Lai MQ, Liu JY, Liu YM, Wang Q, Xie XL. Inulin alleviates perfluorooctanoic acid-induced intestinal injury in mice by modulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Environ Pollut 2023, 342:123090.
4. Yamamoto T, Gi M (Co-first author), Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis. Cancers (Basel). 2023,15, 5274.
5. Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. Toxicology 2023, 488:153483.
6. Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H, Uchida J. Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma. Br J Cancer 2023, 128(12):2197-2205.
7. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. Biomolecules 2023, 14(1), 36.
8. Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. Toxicol Lett 2023, 384:128-135.
9. Michiba A, Gi M, Yokohira M, Sakurai E, Teramoto A, Kiriya Y, Yamada S, Wanibuchi H, Tsukamoto T. Early detection of genotoxic hepatocarcinogens in rats using gammaH2AX and Ki-67: prediction by machine learning. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 2023, 195(2):202-212.
10. Beal MA, Chen G, Dearfield KL, Gi M,

Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell DP, Parsons BL et al: Interpretation of in vitro concentration-response data for risk assessment and regulatory decision-making. Report from the 2022 IWGT quantitative analysis expert working group meeting. Environ Mol Mutagen 2023.

11. Yamaguchi T., Gi M. (Co-first author), Fujioka M., Suzuki S., Oishi Y., Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. J Toxicol Pathol, 2023. 36, 123-129.

F.2 学会発表

1. 藤岡正喜、魏民、芝野佳奈、邱桂鈺、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、鈴木周五、鰐淵英機. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与方法の *in vitro* 投与量設定法の開発 (第 50 回産業中毒・生物学

的モニタリング研究会、令和 5 年 11 月 18 日、東京)

2. Min Gi, Masaki Fujioka, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Arpamas Vachiraarunwong, Runie Guo, Anna Kakehashi, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an in vitro dosing assay for trans-tracheal intrapulmonary spraying administration of chemicals in rats (第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、令和 6 年 1 月 24 日、東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

研究課題名：毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発
及びその精緻化に関する研究

分担研究課題名：*in vitro* 試験による用量設定と *in vivo* への外挿性検討

研究分担者 津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任教授

研究要旨

本研究は、ラットにおける4時間吸入毒性データ（LD50 4時間値）の用量について、A549肺がん細胞を用いた *in vitro* 急性毒性試験から得られた値を用いることにより、経気管肺内噴霧投与（TIPS）による簡便な急性吸入毒性試験を開発しようとするものである。これによって高額な専用の吸入暴露施設を要しない安価な吸入毒性の評価方法が可能となる。検体に発がん性が疑われる場合は、TIPS法にて肺内への4時間吸入毒性試験終了後の残存動物について無処置にて長期に観察することによって、発がん性を評価への応用が期待される。事実、我々はいくつかの多層カーボンナノチューブ（MWCNT）についてTIPS投与後長期観察することによって発癌性を見出し報告してきた。TIPS法は生理食塩水または、墨汁投与試験の実施により、最大2.0 mL/kg体重の容量での4回投与まで一般状態の異常及び死亡例が見られなかったことから、この研究でTIPS法による短期試験後2年まで観察することによって、長期吸入暴露試験に代わる試験法の開発を行ってきた。被験物質は、このプロジェクトで今までに検索されてきた13物質のうち、IARC Monographにおけるヒトにおける発がん物質（要因）の分類においてGroup 2A（おそらくあり）4物質、Group 2B（可能性あり）4物質、Group 3（疑われるがデータ不十分）2物質であるが、TIPSによる短期投与2年後の発がん性との整合性について解析を進めている。

A. 研究目的

従来のラットにおける4時間吸入毒性データ（LD50 4時間値）を、津田らが多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の長期毒性評価において考案してきた簡便な経気管肺内噴霧投与（TIPS）法を用いて応用しようとするものである。用量設定についてはA549肺がん細胞を用いた *in vitro* 急性毒性試験から得られた値を用いて、TIPS法応用してLD50値を見出そうとするものである。これによって高額な専用の吸入暴露施設を要しない安価な吸入毒性の評価方法が可能となる。被験物質に発がん性が疑われる場合は、TIPS法にて肺内に4時間吸入毒性試験終了後残存動物において無処置にて長期に観察することによって、発がん性を評価することもできるかについて、明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

4時間吸入毒性試験のデータ（LD50 4時間値）に代わるTIPS投与法の短期毒性試験における生存（LD50値群を含む致死を免れた動物）についてその後2年間無処置観察することによって、被験物質の発がん性についての解析を実施している。

C. 研究結果

現在の所、8物質について2年の観察期間を終了

している。屠殺時の所見は、6物質の各群32匹～56匹の肉眼的結節性病変はGlycidol（IARC 2A）において肺に1匹認められた。それ以外の投与群には、肺、胸膜中皮、肝、腎等において肉眼的に観察される結節性病変はみられていない。病理組織標本を作成し、詳細に検索する予定である。

D. 考察

Glycidol投与群の肺における肉眼的所見では、LD50値に近い高用量群で明確な結節性病変の発生を1例観察したが、前がん病変の発生についても病理組織学的に検討をした上で、この方法の発がん試験としての有用性について結論を出したい。

E. 結論

4時間吸入毒性試験のデータ（LD50 4時間値）に代わるTIPS投与法による短期毒性試験における生存（LD50値群を含む致死を免れた動物）について発がん性評価への応用を検討中であり、結果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sultana N, Fukamachi K, Jiegou Xu, **Tsuda H**, Suzui M. mRNA expression profile of cytokines in rat

primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). Fundam Toxicol Sci. 10:27-30, 2023.

2. Sultana N, Fukamachi K, Roy DC, Jiegou Xu, **Tsuda H**, Suzui M. mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats. Fundam Toxicol Sci. 10:137-141, 2023.

2. 学会発表

1. **Tsuda H**. Carbon nanotubes (CNT), innovative materials of the 21st century: carcinogenicity evaluation of CNT with different wall structures, The 51st International Symposium of the Princess

Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)

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

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
該当なし							

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
Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K.	Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats.	Toxicol. Sci.	198 (1)	40-49	2024
Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T.	Possible contribution of 8-hydroxydeoxy-guanosine to gene mutations in the kidney DNA of <i>gpt</i> delta rats following potassium bromate treatment.	Mutat. Res.	894	503729	2024
Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K.	Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats.	Arch. Toxicol.	97 (12)	3273-3283	2023
Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T.	A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin,	Food Chem. Toxicol.	179	113965	2023
Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K.	Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice.	Jpn. J. Food Chem. Safety	30 (1)	9-22	2023

<u>Akane H.</u> , Toyoda T., Matsushita K., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., <u>Ogawa K.</u>	Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors.	J Appl Toxicol.		in press	2024
Toyoda T., Kobayashi T., Miyoshi N., Matsushita K., <u>Akane H.</u> , Morikawa T., <u>Ogawa K.</u>	Mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to o-toluidine and o-anisidine.	Arch Toxicol.	97	3197-207	2023
Toyoda T., Sone M., Matsushita K., <u>Akane H.</u> , Akagi J., Morikawa T., Mizuta Y., Cho Y.M., <u>Ogawa K.</u>	Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX.	J Toxicol Sci.	48	323-32	2023
Matsushita K., Toyoda T., <u>Akane H.</u> , Morikawa T., <u>Ogawa K.</u>	Role of CD44 expressed in renal tubules during maladaptive repair in renal fibrogenesis in an allopurinol-induced rat model of chronic kidney disease.	J Appl Toxicol.,	44:.	455-69	2024
Matsushita K., Toyoda T., <u>Akane H.</u> , Morikawa T., <u>Ogawa K.</u>	Expression of CD44 in renal tubular epithelial cells in fibrotic lesions in the kidney of rat model of chronic kidney disease induced by cyclosporine.	J Toxicol Pathol.	37	55-67	2024
Matsushita K., Toyoda T., <u>Akane H.</u> , Morikawa T., <u>Ogawa K.</u>	A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats.	Food Chem Toxicol	175	113702	2023
Akagi J., Mizuta Y., <u>Akane H.</u> , Toyoda T., <u>Ogawa K.</u>	Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats.	Part Fibre Toxicol.	20	13	2023

Sun Y, Saito K, Ushiki A, Abe M, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Takemoto K, Ishikawa R, Momiyama T, Matsuyama S, Arakawa N, <u>Akane H</u> , <u>Toyoda T</u> , <u>Ogawa K</u> , Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M.	Identification of kynurenine and quinolinic acid as promising serum biomarkers for drug-induced interstitial lung diseases.	Respir Res.	25:	31	2024
<u>Gi M</u> , Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, <u>Fujioka M</u> , Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H.	A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats.	Arch. Toxicol.		In press	2024
Vachiraarunwong A, <u>Gi M</u> (<u>Corresponding author</u>), Kiyono T, Suzuki S, <u>Fujioka M</u> , Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H.	Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells.	Arch. Toxicol.		In press	2024
Zhang QY, Zhong MT, <u>Gi M</u> , Chen YK, Lai MQ, Liu JY, Liu YM, Wang Q, Xie XL.	Inulin alleviates perfluorooctanoic acid-induced intestinal injury in mice by modulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.	Environ Pollut.	342	123090	2023

Yamamoto T, <u>Gi M</u> (Co-first author), Yamashita S, Suzuki S, <u>Fujioka M</u> , Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H.	DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis.	Cancers (Basel).	15	5274	2023
Yokota Y, Suzuki S, <u>Gi M</u> , Yanagiba Y, Yoneda N, <u>Fujioka M</u> , Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H.	o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice.	Toxicology	488	153483	2023
Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, <u>Fujioka M</u> , <u>Gi M</u> , Wanibuchi H, Uchida J.	Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma.	Br J Cancer	128(12)	2197-2205	2023
Suzuki S, <u>Gi M</u> , Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, <u>Fujioka M</u> , Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H.	Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis.	Biomolecules	14(1)	36	2023
Suzuki S, <u>Gi M</u> , <u>Fujioka M</u> , Kakehashi A, Wanibuchi H.	Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway.	Toxicol Lett	384	128-135	2023
Michiba A, <u>Gi M</u> , Yokohira M, Sakurai E, Teramoto A, Kiriya Y, Yamada S, Wanibuchi H, Tsukamoto T.	Early detection of genotoxic hepatocarcinogens in rats using gammaH2AX and Ki-67: prediction by machine learning.	Toxicol Sciences	195(2)	202-212	2023

Beal MA, Chen G, Dearfield KL, <u>Gi M</u> , Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell DP, Parsons BL et al:	Interpretation of in vitro concentration-response data for risk assessment and regulatory decision-making. Report from the 2022 IWGT quantitative analysis expert working group meeting.	Environ Mol Mutagen.			2023
Yamaguchi T., <u>Gi M</u> . (Co-first author), <u>Fujioka M.</u> , Suzuki S., Oishi Y., Wanibuchi H.	A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks.	J Toxicol Pathol	36	123-129	2023
Sultana N, Fukamachi K, Jiegou Xu, <u>Tsuda H</u> , Suzui M.	mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT).	Fundam Toxicol Sci.	10	27-30	2023
Sultana N, Fukamachi K, Roy DC, Jiegou Xu, <u>Tsuda H</u> , Suzui M.	mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats.	Fundam Toxicol Sci.	10	137-141	2023

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和5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 毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 ・ 部長
(氏名・フリガナ) 小川 久美子 ・ オガワ クミコ

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)
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"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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」、「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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和5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 毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 ・ 主任研究官

(氏名・フリガナ) 高須 伸二 ・ タカス シンジ

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)
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"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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」、「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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和5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 毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 ・ 主任研究官
(氏名・フリガナ) 赤根 弘敏 ・ アカネ ヒロトシ

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)
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"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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」、「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6年3月31日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎

次の職員の令和5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 毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学研究科・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)
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」、「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。

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 福島 伸一

次の職員の令和5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 毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及びその精緻化に関する研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 大阪公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		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)
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 type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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。