

分担研究報告書

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精緻化及び標準化のための研究

in vitro 試験のデータ収集

研究分担者 魏 民 公立大学法人大阪公立大学 准教授

研究要旨

毒物及び劇物、いわゆる毒劇物は、原則として、動物を用いた急性毒性試験における LD₅₀ 又は LC₅₀ 値に基づいて判定されており、吸入暴露が想定される化合物については吸入毒性情報が重要となる。しかし、全身暴露法には大規模な暴露装置を要し、実施可能な施設が限られていることに加え、近年では 3R に配慮した *in vitro* 評価法の確立も求められている。本研究では、急性吸入毒性評価における *in vitro* 試験代替法として A549-NRU assay をさらに検討・精緻化するとともに、得られた LC₅₀ 値を TIPS 法における初期投与量設定に活用し、毒劇物指定に資する評価手法の確立を図ることを目的とした。本年度は、先行研究において小川班により構築された A549-NRU assay を用い、新たに 13 物質の細胞毒性評価を実施した。すべての被験物質において、A549 細胞に対する用量依存的な細胞毒性が認められ、再現性の高い安定した *in vitro* LC₅₀ (A549-NRU) 値が得られた。これまでに検討した 48 物質に本年度の 13 物質を加えた計 61 物質を対象として、*in vitro* LC₅₀ 値とラット 4 時間吸入暴露試験由来の *in vivo* LC₅₀ 値との相関解析を行った。その結果、水溶性化合物及びアルデヒド・ケトン官能基を有する化学物質において、両者の間に有意な正の相関が認められた。また、concordance 評価では、13 被験物質のうち 10 物質 (77%)、計 61 物質では 45 物質 (74%) が、*in vitro* LC₅₀ 値と *in vivo* LC₅₀ 値の差が±1 log₁₀ 単位以内となる許容範囲内に収まった。さらに、A549-NRU assay から得られた LC₅₀ 値に基づいて TIPS 用 LD₅₀ 推定値を算出し、実施中の TIPS 試験における初期投与量設定に活用した。以上の結果から、A549-NRU assay は、急性吸入毒性評価における *in vitro* 予測評価系として有用であり、毒劇物指定に資する *in vitro* 試験代替法となり得ることが示された。また、本 assay により得られる LC₅₀ 値は、TIPS 試験における初期投与量設定に科学的根拠を与える情報としても有用であると考えられた。今後は、適用可能な化学物質の範囲をより明確にするとともに、実施中の TIPS 試験との比較検証を通じて、本手法の妥当性及び実用性をさらに検討する必要がある。

研究協力者

藤岡正喜 公立大学法人大阪公立大学 講師

A. 研究目的

毒物及び劇物、いわゆる毒劇物は、原則として、動物を用いた急性毒性試験における LD₅₀ 又は LC₅₀ 値に基づいて判定されており、投与経路としては経口、経皮及び吸入が想定されている。ヒトへの吸入暴露が想定される化合物については、吸入試験による評価が必要であるが、全身暴露法には大規模な暴露装置を要するため、実施可能な施設は限られている。また、頭部又は鼻部暴露法では、長時間の拘束ストレスが試験結果に影響を及ぼす可能性がある。こうした制約により、毒劇物判定並びに化学品の分類及び表示に関する世界調和システム (GHS) 分類に使用可能な吸入毒性情報は限定的である。さらに、近年では 3R に配慮した *in vitro* 評価法の確立も求められている。

先行研究において小川班により、A549 ヒト肺がん細胞株を用い、Neutral Red の取込みを指標とした細胞毒性評価法である A549-NRU assay が構築され、本 assay により得られる LC₅₀ 値が *in vivo* 吸入毒性和相関するこ

とが報告されている (Vachiraarunwong et al., Toxicol Lett. 2026; 415:111803)。また、同研究において、A549-NRU assay により得られた LC₅₀ 値に基づく予測値とラット 4 時間吸入暴露試験の LC₅₀ 値がある程度一致すること、さらに、ラットを用いた経気管肺内噴霧投与方法 (intra-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法) では、全身吸入暴露法と比較して同等の毒性を示す、あるいは細胞傷害性や刺激性が強い物質ではより強い毒性として検出される傾向があることが示されている。

本研究では、急性吸入毒性評価における *in vitro* 試験代替法として A549-NRU assay をさらに検討・精緻化するとともに、得られた LC₅₀ 値を TIPS 法における初期投与量設定に活用し、毒劇物指定に資する評価手法の確立を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1. A549-NRU assay

A549-NRU assay を用いて、13 物質の細胞毒性評価を実施した (Table 1)。Day 0 に、6-well プレートに A549 細胞を 2 × 10⁵ cells/well で播種した。Day 1 に、被験物質を RPMI 培地中で、15 mL チューブを用いて調製し、

vortex により約 5 秒間混和した。事前に用意した A549 細胞から培地を除去し、PBS で 1 回洗浄した後、調製した被験物質含有培地を添加し、37°C、5% CO₂条件下で 15 分間インキュベーションした。

細胞毒性評価は、Neutral Red uptake 法により実施した。Neutral Red 含有 RPMI 培地を調製し、顕微鏡観察後、被験物質含有培地を除去して PBS で 2 回洗浄した。その後、Neutral Red 含有 RPMI 培地を添加し、37°C、5% CO₂条件下で 3 時間インキュベーションした。培地を除去した後、PBS で 2 回洗浄し、酢酸-エタノール溶液 (50%エタノール、49% Milli-Q 水、1%氷酢酸) を各 well に 1 mL 添加して振盪した。溶出液を 96-well プレートに 180 μ L ずつ分注し、吸光度計を用いて 540 nm における吸光度を測定した。

2. *in vitro* LC₅₀ の算出

Neutral Red assay により得られた吸光度データを GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いて解析し、LC₅₀ を算出した。各被験物質について、投与濃度を対数変換した値を用い、非線形回帰解析 (log[agonist] vs. normalized response-variable slope) により近似曲線を作成し、LC₅₀ (A549-NRU) を求めた。

3. *in vitro* LC₅₀ (A549-NRU) と *in vivo* LC₅₀ (ラット 4 時間吸入暴露試験) との相関解析

A549-NRU assay で得られた *in vitro* LC₅₀ (A549-NRU) と、既報のラット 4 時間吸入暴露試験における *in vivo* LC₅₀ 値との相関解析を行った。被験物質は、水溶性及び官能基の種類に基づいて分類し (Table 1)、各群で解析を実施した。相関解析には Pearson の相関分析を適用し、得られた結果を散布図として示した。

動物を用いた吸入暴露試験における LC₅₀ 値は、PubChem、製品評価技術基盤機構 (NITE)、Haz-Map 及び National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) を情報源として収集した。なお、ラット 4 時間吸入暴露試験における LC₅₀ 値が範囲濃度として報告されている場合には、相関解析にはその下限値を採用した。

4. A549-NRU assay とラット 4 時間吸入毒性試験における LC₅₀ 値の concordance 評価

各化学物質について、*in vitro* LC₅₀ 値と、ppm から mg/mL に換算した *in vivo* LC₅₀ 相当値を比較し、その差を log₁₀ フォールド変化として算出した。この値が ± 1 log₁₀ 単位の範囲内に収まる場合を「許容範囲内」と定義した。

(倫理面の配慮)
該当なし

C. 研究結果

1. A549-NRU assay

13 被験物質すべてにおいて、A549 細胞に対する細胞毒性が用量依存的に認められた。A549-NRU assay により算出した LC₅₀ (A549-NRU) 値を Table 2 に示す。いずれの被験物質においても、再現性の高い安定した *in*

vitro LC₅₀ (A549-NRU) 値が得られた。

2. *in vitro* LC₅₀ (A549-NRU) と *in vivo* LC₅₀ (ラット 4 時間吸入暴露試験) との相関解析

これまでに検討した 48 物質に新たに 13 被験物質を加え、計 61 物質を対象として、LC₅₀ (A549-NRU) 値と化学物質の水溶性及び官能基特性との関係を解析した。その結果、先行する 48 物質の解析結果と同様に、水溶性化合物及びアルデヒド・ケトン官能基を有する化学物質において、LC₅₀ (A549-NRU) 値とラット 4 時間吸入暴露試験由来の *in vivo* LC₅₀ 値との間に有意な正の相関が認められた。相関係数は、それぞれ 0.36 及び 0.90 であった (Figure 1)。

3. A549-NRU assay とラット 4 時間吸入毒性試験における LC₅₀ 値の concordance 評価

in vitro LC₅₀ (A549-NRU) 値とラット 4 時間吸入毒性試験由来の *in vivo* LC₅₀ 値について、log₁₀ 変換値の差が ± 1 log₁₀ 単位以内に収まる場合を「許容範囲内」と定義した。Table 2 に示すとおり、13 被験物質のうち 10 物質 (77%) がこの基準を満たした。さらに、これまでに検討した 48 物質を加えた計 61 物質を対象とした解析では、61 物質中 45 物質 (74%) が許容範囲内に収まった。

4. A549-NRU assay 由来の LC₅₀ 値に基づく TIPS 用 LD₅₀ 推定値

共同研究者である小川及び高須の研究グループにより確立された算出式に基づき、A549-NRU assay から得られた *in vitro* LC₅₀ 値を用いて算出した TIPS 用 LD₅₀ 推定値を Table 3 に示す。

本研究で新たに得られた 13 物質の LC₅₀ (A549-NRU) 値及び TIPS 用 LD₅₀ 推定値は、実施中の TIPS 試験における初期投与量設定に用いられている。

D. 考察

本研究では、先行研究において小川班により構築された A549-NRU assay を用い、新たに 13 物質について *in vitro* LC₅₀ (A549-NRU) 値を算出した。その結果、これまでに検討した 48 物質を含む解析と同様に、水溶性物質及びアルデヒド・ケトン官能基を有する化学物質において、*in vitro* LC₅₀ 値とラット 4 時間吸入暴露試験由来の *in vivo* LC₅₀ 値との間に正の相関が認められた。このことから、類似した物理化学的特性や官能基を有する化学物質では、共通した毒性発現特性を示す可能性が示唆された。

また、concordance 評価では、7 割以上の物質において、A549-NRU assay から得られた *in vitro* LC₅₀ 値とラット 4 時間吸入暴露試験由来の *in vivo* LC₅₀ 値との差が ± 1 log₁₀ 単位以内の範囲に収まった。この結果は、A549-NRU assay により得られる細胞毒性情報が、急性吸入毒性評価における *in vitro* 予測評価系として有用であることを支持するものである。したがって、本 assay は、急性吸入毒性評価における *in vitro* 試験代替法として、毒劇物指定に資する評価手法となり得ると考えられる。

さらに、A549-NRU assay 由来の LC₅₀ 値に基づいて算出した TIPS 用 LD₅₀ 推定値は、実施中の TIPS 試験における初期投与量設定に活用されている。これにより、TIPS 試験の投与量設定をより合理的かつ効率的に行うことが可能となり、*in vivo* 試験の効率化及び使用動物数の削減にも寄与することが期待される。すなわち、A549-NRU assay は、急性吸入毒性評価における *in vitro* 予測評価系として有用であるとともに、TIPS 試験の初期投与量設定に科学的根拠を与える評価手法としても有用であると考えられる。

一方で、本 assay の適用性は、化学物質の水溶性や官能基特性に依存する可能性があり、すべての化学物質に一律に適用できるとは限らない。特に、肝毒性や神経毒性など、肺局所の細胞毒性以外の機序により急性毒性を示す物質については、A549-NRU assay のみでは毒性を十分に反映できない可能性がある。今後は、適用可能な化学物質の範囲をより明確にするとともに、より広範な化学物質を対象とした追加検証を通じて、本手法の妥当性及び実用性をさらに検討する必要がある。

E. 結論

本研究により、A549-NRU assay は、急性吸入毒性評価における *in vitro* 予測評価系として有用であり、毒劇物指定に資する *in vitro* 試験代替法となり得ることが示された。また、本 assay から得られた LC₅₀ 値に基づいて TIPS 試験における初期投与量を設定することは、投与量設定に科学的根拠を与えるとともに、*in vivo* 試験の効率化、使用動物数の削減及び評価精度の向上に資すると考えられる。さらに、本研究で得られた知見は、実施中の TIPS 試験への適用を通じて検証が進められており、急性吸入毒性評価における *in vitro* 試験代替法としての妥当性及び実用性の検証、並びに手法のさらなる精緻化に寄与する基盤的知見を提供するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, Suzuki S, Guo R, Qiu G, Kawamura Y, Shibano K, Noura I, Praseatsook K, Akane H, Takasu S, Tsuda H, Ogawa K, Wanibuchi H, Gi M. Developing a novel *in vitro* toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats. *Toxicol Lett*. 2026; 415: 111803.
2. Maeda-Tateishi, T., Nagata, Y., Imanishi, Y., Hirakawa, T., Tan, SS., Emoto, M., Gi M. Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation. *J Toxicol Pathol*. 2025; 39(1):31-38.
3. Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, Naiki-Ito A, Abdallah S, Tsuda H. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol*. 2026; 46(4): 1232-1245.
4. Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, Tsuda H, Naiki-Ito A. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled

- Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(18): 41067725.
5. Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, Kakehashi A, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, Naiki-Ito A, Tsuda H, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials* (Basel). 2025; 15(23): 41369478.
 6. Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Praseatsook K, Kawamura Y, Kakehashi A, Noura I, Xie X, Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*. 2025; 13(10): 41150527.
 7. Turner MC, Godderis L, Guenel P, Hopf N, Quintanilla-Vega B, Soares-Lima SC, Chaiklieng S, Da Silva J, Fustinoni S, Gi M, Heck JE, Huaux F, Johanson G, Kirkeleit J, Kirsanov K, Richiardi L, Teixeira JP, Terron A, Topinka J, White MC, Benbrahim-Tallaa L, Facchin C, Kunzmann A, Madia F, Pasqual E, Wedekind R, Deng X, Suonio E, Viegas S, Barry A, Dolatkah R, Dongoran RA, Gonzalez-Gil EM, Onyije FM, Mattock H, de Conti A, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives. *Lancet Oncol*. 2025; 26 (5): 548-549.
 8. Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(1): 59-67.
 9. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, Setthaya P, Sato K, Wanibuchi H, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*). *Nutrients*. 2025; 17(4): 40004973.
 10. Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, Dissook S, Wanibuchi H, Taya S, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(13).
 11. Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(2): 147-154: 40649735.
 12. Nakano M, Gi M, Toyooka T, Suzuki S, Wanibuchi H, Takebayashi T. Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. *J Occup Health*. 2025; 67(1): 39930727.
 13. Kakehashi A, Suzuki S, Nishidoi Y, Hagihara A,

Ikenaga H, Shiota M, Qiu G, Noura I, Kuwae Y, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Gi M, Kawada N, Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* (Basel). 2025; 17(13): 40647510.

14. Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Noura I, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*. 2025; 38(2): 161-165.

2. 学会発表

1. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん：(第 114 回日本病理学会総会、令和 7 年 4 月、宮城)
2. Arpamas Vachiraarunwong、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂鈺、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、Kwanchanok Praseatsook、鰐淵英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 *in vitro* 毒性試験系の開発：(第 52 回日本毒性学会学術年会、令和 7 年 7 月、沖縄)
3. 梯アンナ、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機、鈴木周五. MAFLD/MASH 肝発がんマーカーや分子機序への最近の洞察：(第 38 回発癌病理研究会、令和 7 年 8 月、千葉)
4. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による肝発がん機序の検討：(2025 年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会、令和 7 年 9 月、長野)
5. 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機、鈴木周五. ヒト浸潤性膵管癌における新規早期診断マーカーとしての PRDX3 の検討及び発がん機序解明：(がん予防学術大会 2025、令和 7 年 9 月、名古屋)
6. Arpamas Vachiraarunwong, Kwanchanok Praseatsook, Rawiwan Wongpoomchai, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, Supachai Yodkeree, Min Gi. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae：(がん予防学術大会 2025、令和 7 年 9 月、名古屋)
7. 郭潤傑、Arpamas Vachiraarunwong、鈴木周五、藤岡正喜、Guiyu Qiu、河村百合菜、梯アンナ、鰐淵英機、魏民. DMH 投与ラットにおける大腸発がん初期の遺伝子発現変動：(第 84 回日本癌学会学術総会、令和 7 年 9 月、石川)
8. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Runjie Guo、野浦郁恵、河村百合菜、鰐淵英機. カーボンナノチューブ誘発ラット肺発がんにおける物性の違いを踏まえた遺伝子発現変化の比較：(第 84 回日本癌学会学術総会、令和 7 年 9 月、石川)
9. Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura,

Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cells: (第 84 回日本癌学会学術総会、令和 7 年 9 月、石川)

10. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、河村百合菜、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸(DMA)の経胎盤ばく露による F1 マウスにおける発がん性の検討：(第 84 回日本癌学会学術総会、令和 7 年 9 月、石川)
11. 梯アンナ、西土井悠作、野浦郁恵、邱桂鈺、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機、鈴木周五. ヒト浸潤性膵管癌における新規診断及び予後マーカーとして Peroxiredoxin 3 の解析：(第 84 回日本癌学会学術総会、令和 7 年 9 月、石川)
12. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、ワチラアルンウオン アルパマス、邱桂鈺、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の経胎盤ばく露による F1 マウス肝発がん機序における DNA メチル化異常の関与：(メタルバイオサイエンス研究会 2025、令和 7 年 9 月、東京)
13. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、ワチラアルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるラット海馬に及ぼす影響：(メタルバイオサイエンス研究会 2025、令和 7 年 9 月、東京)
14. Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Comparative hepatotoxicity of carboxylate and sulfonate per- and polyfluoroalkyl substances in immortalized human hepatocytes：(第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、令和 7 年 10 月、大阪)
15. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について：(第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、令和 7 年 10 月、大阪)
16. 藤岡正喜、鈴木周五、魏民、Vachiraarunwong Arpamas、野浦郁恵、邱桂鈺、河村百合菜、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による次世代雄性マウスにおける肝発がん機序の検討：(第 30 回ヒ素シンポジウム、令和 7 年 12 月、大阪)
17. Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Yurina Kawamura, Ikue Noura, Anna Kakehashi, Min Gi, Hideki Wanibuchi. Comparative evaluation of responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells：(第 30 回ヒ素シンポジウム、令和 7 年 12 月、大阪)
18. Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Masaki Fujioka, Yurina Kawamura, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Shugo Suzuki. A novel *in vitro* toxicology

assay for predicting inhalation toxicity in rats. Society of Toxicology 2026 Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, U.S.A. (Mar. 22-25, 2026)

19. Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Guiyu Qiu, Arpamas Vachiraarunwong, Anna Kakehashi, and Min Gi. Evaluation of the Hepatotoxic Effects of Various PFAS in a Short-Term Rat Study. Society of Toxicology 2026 Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, U.S.A. (Mar. 22-25, 2026)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

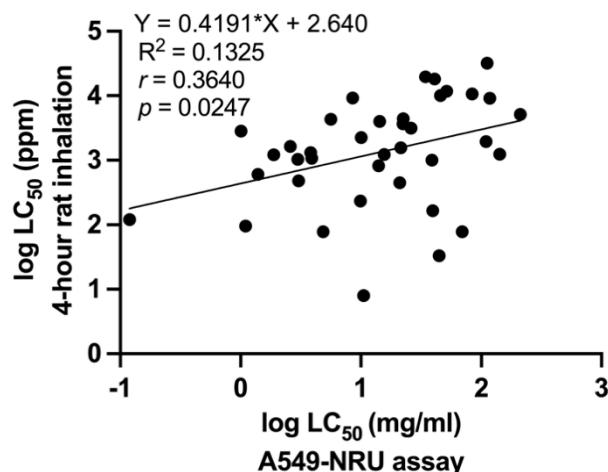
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A



B

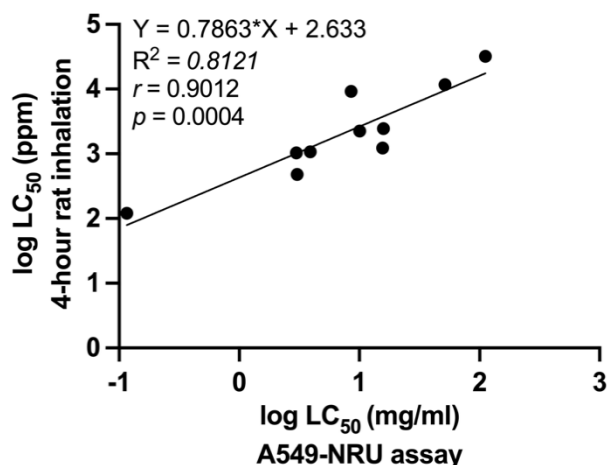


Figure 1. Significant correlation between LC_{50} values from the A549-NRU assays and reported LC_{50} values from 4-hour rat inhalation studies, categorized by (A) water-soluble chemicals (n = 38), (B) chemicals containing aldehyde and ketone groups (n = 10).

Table 1. General information and physicochemical properties of the tested chemicals.

No.	Chemicals	CAS RN	MW	Density (g/mL)	Log K_{ow}	Water soluble	Functional groups
1	1,2-Epoxy-3-isopropoxypropane	4016-14-2	116.16	0.92	0.50	Yes	Epoxide
2	2-Butanone	78-93-3	72.11	0.80	0.29	Yes	Ketone
3	2-Chloroethanol	107-07-3	80.51	1.20	-0.06	Yes	Alcohol
4*	3,4-Dihydro-2-methoxy-2H pyran	4454-05-1	114.14	1.01	N/A	Yes	Cyclic ether
5	Ethyl acetate	141-78-6	88.11	0.90	0.73	Yes	Ester
6	Ethyl mercaptan	75-08-1	62.14	0.84	1.50	Yes	Thiol
7	Ethylenediamine	107-15-3	60.10	0.90	-1.20	Yes	Amine
8	Furfuryl Alcohol	98-00-0	98.10	1.13	0.28	Yes	Alcohol
9	N,N-Diethylhydroxylamine	3710-84-7	89.14	0.87	-0.17	Yes	Hydroxylamine
10	Propionaldehyde	123-38-6	58.08	0.80	0.59	Yes	Aldehyde
11*	Propylene oxide	75-56-9	58.08	0.83	0.03	Yes	Epoxide
12	Tetrahydrofuran	109-99-9	72.11	0.89	0.46	Yes	Cyclic ether
13	Vinyl acetate	108-05-4	86.09	0.93	0.73	Yes	Ester

* Glass plates were used.

Table 2. Concordance between LC₅₀ values from A549-NRU assays and converted values from 4-hour rat inhalation studies of all chemicals.

No.	Chemicals	MW	LC ₅₀ from A549-NRU assays (mg/mL)	Reported LC ₅₀ from 4-hour rat inhalation studies (ppm)*	Estimated LC ₅₀ in lung (mg/mL) **	Log ₁₀ fold change of LC ₅₀ from A549-NRU to reported 4-hour rat inhalation (mg/mL) #	Within ±1 log unit ##
1	1,2-Epoxy-3-isopropoxypropane	116.16	21.53	1555	27.78	-0.11	Yes
2	2-Butanone	72.11	51.52	11700	129.74	-0.40	Yes
3	2-Chloroethanol	80.51	44.69	33	0.41	2.04	No
4	3,4-Dihydro-2-methoxy-2H pyran	114.14	5.61	4307 - 4538 ^a	75.60	-1.13	No
5	Ethyl acetate	88.11	34.48	19600	265.58	-0.89	Yes
6	Ethyl mercaptan	62.14	22.52	4420	42.24	-0.27	Yes
7	Ethylenediamine	60.10	1.01	2828 - 5656 ^a	26.14	-1.41	No
8	Furfuryl Alcohol	98.10	9.93	233	3.52	0.45	Yes
9	N,N-Diethylhydroxylamine	89.14	26.10	3140	43.04	-0.22	Yes
10	Propionaldehyde	58.08	8.56	9200	82.17	-0.98	Yes
11	Propylene oxide	58.08	14.33	4000	35.73	-0.40	Yes
12	Tetrahydrofuran	72.11	40.94	18187	201.68	-0.69	Yes
13	Vinyl acetate	86.09	22.34	3680	48.72	-0.34	Yes

*Information regarding the LC₅₀ values from 4-hour rat inhalation of chemicals was obtained from the National Institute of Technology and Evaluation (NITE, https://www.chem-info.nite.go.jp/chem/english/ghs/ghs_nite_all_fy_e.html). **Estimated LC₅₀ in the lung (mg/mL) was converted from reported LC₅₀ (ppm) based on estimated inhaled dose using the formula: $LC_{50} \text{ (mg/mL)} = [(LC_{50} \text{ (ppm)} \times MW \times 0.188 \times 240) / (24.45 \times 1000)] / 12$, where MW is the molecular weight of each chemical, 0.188 is the estimated respiratory volume (L/min) of a rat with 300 g body weight (Bide et al. 2000), 240 is the exposure duration in minutes, 24.45 is the molar volume of an ideal gas at 25°C and 1 atm, and 12 is the approximated lung vital capacity (mL) of a young rat (300 g) (Hoffman et al. 2014). These parameters may vary across strains and experimental conditions, potentially affecting the estimated lung concentrations. #Log₁₀ fold change = $\log_{10} (LC_{50} \text{ from A549-NRU} / LC_{50} \text{ from 4-hour rat inhalation})$. A value between -1 and +1 indicates agreement within a 10-fold range. ##Indicates whether the log₁₀ fold change is within ±1 log unit (10-fold range), a commonly accepted threshold for predictive accuracy in toxicity assessment (OECD 2010; Spielmann et al. 1999). ^aFor LC₅₀ values reported as a range (Table 1), the lower concentration was used for log₁₀ fold change analysis.

Table 3. *in vitro* LC₅₀ values from the A549-NRU assays and estimated LD₅₀ values for TIPS of tested chemicals.

No.	Chemicals	LC ₅₀ from A549-NRU assays (mg/mL)	Estimated LD ₅₀ for TIPS (mg/kg)*
1	1,2-Epoxy-3-isopropoxypropane	21.53	172.22
2	2-Butanone	51.52	412.16
3	2-Chloroethanol	44.69	357.50
4	3,4-Dihydro-2-methoxy-2H pyran	5.61	44.88
5	Ethyl acetate	34.48	275.87
6	Ethyl mercaptan	22.52	180.20
7	Ethylenediamine	1.01	8.06
8	Furfuryl Alcohol	9.93	79.42
9	N,N-Diethylhydroxylamine	26.10	208.80
10	Propionaldehyde	8.56	68.45
11	Propylene oxide	14.33	114.61
12	Tetrahydrofuran	40.94	327.52
13	Vinyl acetate	22.34	178.75

*Estimated LD₅₀ for TIPS were calculated using the formula: LD₅₀ (mg/kg) = LC₅₀ (mg/mL) × 2 mL/kg/time × 4 times. Each administration corresponds to 2 mL/kg, given four times (0, 1, 2, and 3 h) to simulate a 4-hour inhalation exposure (Saleh et al. J Appl Toxicol. 2026; 46(4): 1232-1245).