

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名:気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する研究  
:迅速化かつ国際化に向けてに関する研究

分担研究課題名:気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法  
-動物実験およびデータ管理・統括に関する研究

研究分担者: 津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

## 研究要旨

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

## A. 研究目的

空気中の化学物質は不可避的に肺から体内に取り込まれるため、事業場における気中物質の安全性の評価と管理は重要である。しかしながらわが国でも「毒物及び劇物取締法」(毒劇法)によって指定された大多数の化合物の毒性評価は、経口投与・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。また、国際的にもGHS(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)に記載されている物質にも吸入曝露試験が実施されているものは非常に少ない。その理由は、吸入曝露試験

には大規模な専用施設とその稼働に高額な費用が要求されるためである。

本研究の目的は、吸入曝露試験の絶対的不足を補う目的で、実施容易な気管内投与法を開発して国内外において標準的試験法としての採用を提案することにある。申請者はラットにおける気管内投与法によって、直径がナノサイズの炭素線維・金属線維や粒子の障害性について「経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)」を開発し、世界に先駆けて4種の異なる形状のカーボンナノチューブと一種のチタン酸カリウムの肺または胸膜中皮における発がん性を見出し、

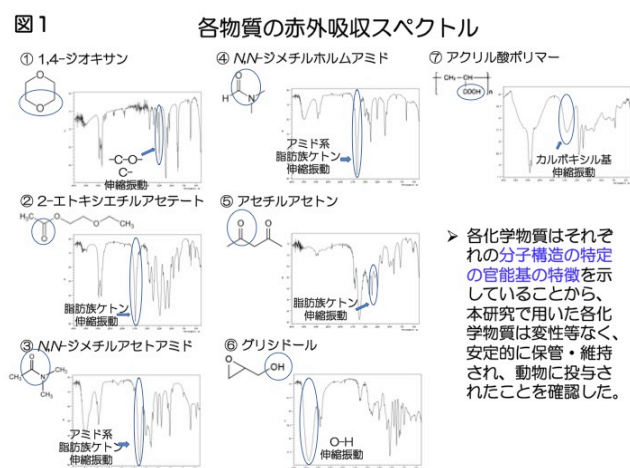
吸入曝露試験に替わる気管内投与の有用性を国内外に示してきた。これは、OECD TEST GUIDELINE: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON INHALATION TOXICITY TESTING #39 (p59)に引用され、また Archives of Toxicology, Particle and Fibre Toxicology (2019-20 IF は夫々 5.6 および 6.9) 等に掲載されるようになり、TIPS 投与の有用性と実用性が世界に認められつつある。実施あたって技術的な考慮からまず液状物質、固形体等を検体として選び、主に日本バイオアッセイ研究セ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

## B. 研究方法

### 投与物質の検定

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

図 1 : 投与物質の検定



### ① *in vitro* Neutral red 毒性試験 :

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

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

図 2

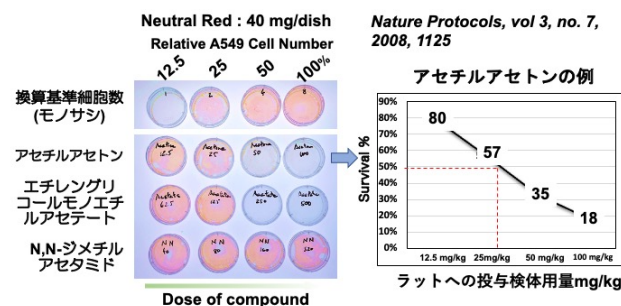
培養液中の検体の投与量 (mg/ml) =

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

図 3

### Neutral red 肺細胞取り込み試験

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



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

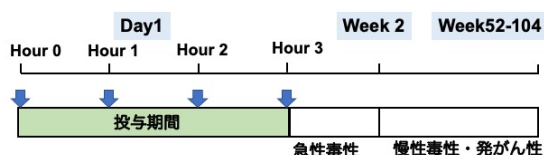
### ② *in vivo* 試験 :

R1 年度において投与方法についての 1) 1,4-ジオキサン (DOX) を用いた結果より、3 時間に 4 回 (0、1、2、3 時) で投与する方法を開発してきた。Neutral red 試験における A549 細胞の LD50 を示す培地中の検体の値 (mg/L) から、各用量 2 匹の 10 用量程度による TIPS 予備試験の LD50 値を求め、これより TIPS 本試験にて 4~5 用量を設定し、この 1/4 量を 3 時間に 4 回に分けて投与した。予備試験では *in vitro* 暫定 LD50 を挟む約 10 段階の用量 (mg/g) にて 1 投与群 2 匹にて LD 値 (LD50 ではない) を求めた。次にこの値を挟む 4~7 用量にて各用量群 7~10 匹にて LD50 値を求めた。用量は公比 2~3 を基準として設定した (図 4)。

図4

### 投与方法

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



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

以下に検体の用途・毒性・発がん性等を示す

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

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

さらに、追加化合物として以下の物質について

Neutral red 試験を終了し用量を算定した。

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

(倫理面の配慮)

本研究における倫理面への配慮については、各班員は「動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日、法律第105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)」を遵守するとともに、当該法令の規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施した。ヒト組織から得た材料は扱っていない。

### C. 研究結果

使用した検体はすべて計測した特性検査を満たすものであることが証明された。

#### ① *in vitro* 毒性試験

Neutral redの取り込みを指標とした用量設定試験ではこの *in vitro* 暫定LD<sub>50</sub>を挟む約10段階の用量 (mg/g) にて1投与群2匹にてLD値 (LD<sub>50</sub>ではない) を求めた

#### ② *in vivo* 試験 : LD<sub>50</sub>値

R1年度において投与方法についての1) 1,4-ジオキサン (DOX) を用いた結果より、3時間に4回 (0、1、2、3時) で投与する方法において肺障害が軽微で、毒性標的臓器の腎におけるアポトーシスカウントでみる腎尿細管上皮障害はもっとも顕著であった。ことからこのモデルを用いた他の物質を被検体とした試験を行なった。以下のその概要を示す。

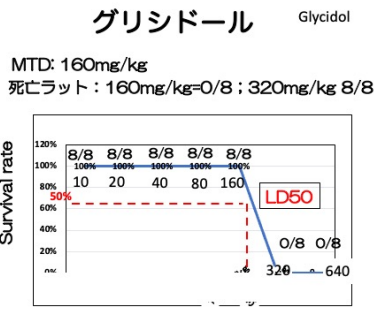
なお投与群は1用量8匹とした。投与量はmg/kg, (死亡数/母数) は生存率を示す。

#### 2) グリシドール (図5)

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

→ LD<sub>50</sub>は160 (8/8) と320 (0/8) の間にあることが示された。

図5

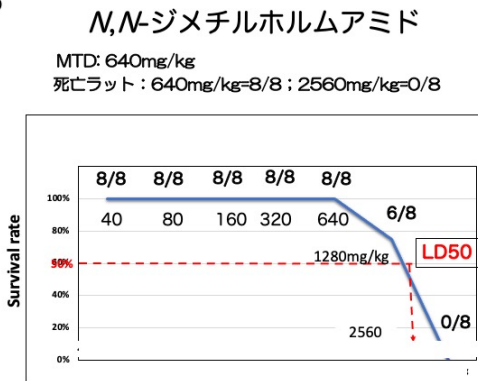


→ LD50 TIPSは160 mg/kg と 320 mg/kgの間

3) *N,N*-ジメチルホルムアミド (図6)

40 (8/8) 、 80 (8/8) 、 160 (8/8) 、 320 (8/8) ,  
640 (8/8) 、 1280 (6/8) 、 2560mg (0/8)  
→ LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) の間にあること  
が示された。

図6

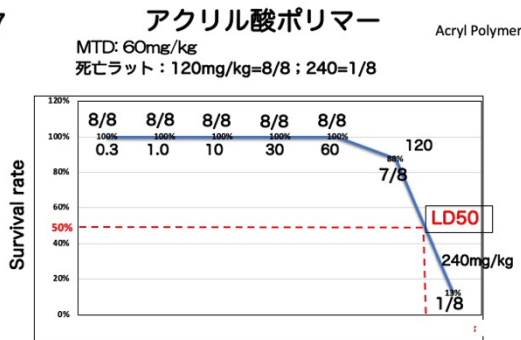


→ TIPSの LC50は1280mg/kg と 2560mg/kgの間にある

4) アクリル酸ポリマー (図7)

0.3 (8/8) 、 1.0 (8/8) 、 3.0 (8/8) 、 10 (8/8) ,  
30 (8/8) 、 60 (6/8) 、 120 (7/8) 、 240mg (1/8)  
→ LD50は120 (7/8) と240 (1/8) の間にあることが  
示された。

図7

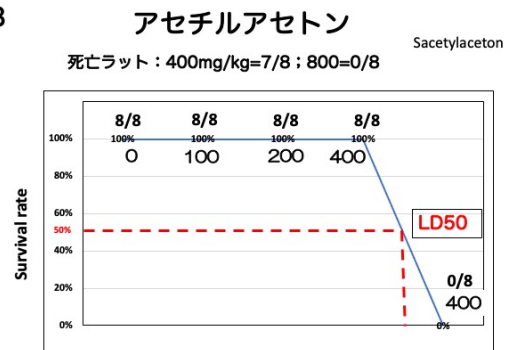


→ TIPSの は120mg/kg と 240mg/kgの間にある

5) アセチルアセトン (図8)

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

図8

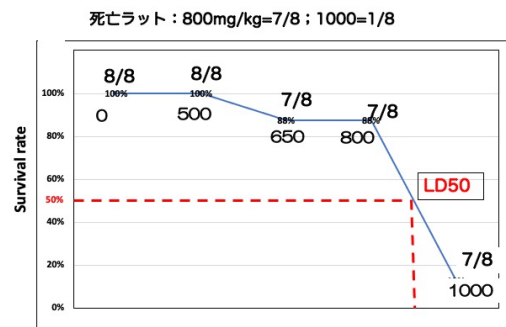


→ TIPSの LC50は400mg/kg と 800mg/kgの間にある

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

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

図9 エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート

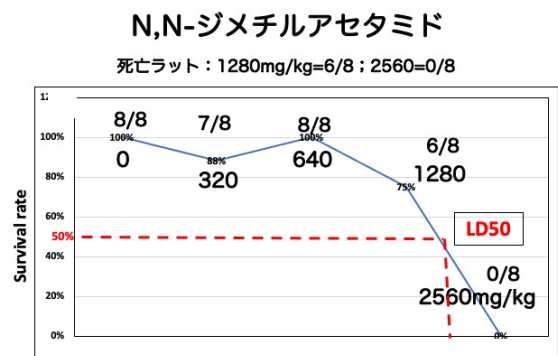


→ TIPSの LC50は800mg/kg と 1000mg/kgの間にある

7) *N,N*-ジメチルアセトアミド (図10)

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

図10

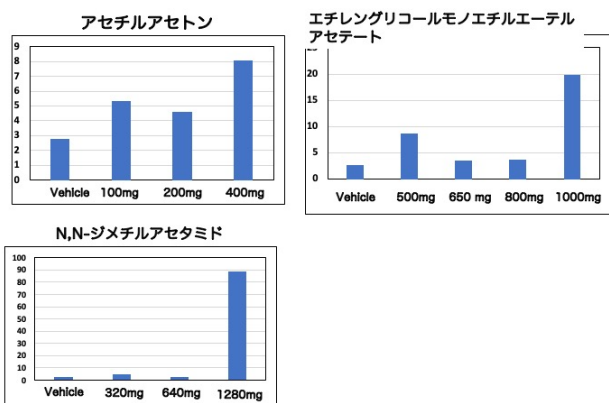


→ TIPSの LC50は1280mg/kg と2560mg/kgの間にある

### ③ 肺胞気管支洗浄液 (BALF) の炎症細胞成分

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

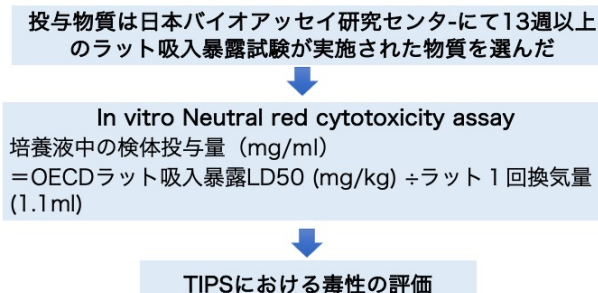
図11 気管支洗浄液中のWBC数 ( $10^2/\mu$ l)



### D. 考察

本方法の Neutral red を用いた肺細胞培養液の検体濃度から細胞の LD50 値を求め、それを検体の気管内投与による致死量からその培地の濃度を TIPS 投与液の濃度に変換してラットの LD50 値を判定する方法の目処がついた。本方法の1時間に1回 (0, 1, 2, 3時間経過時) 計4回投与し、さらに生存ラットについては2週間の経過観察をする LD50 判定は目論見通りの結果が得られつつあると考える。(図12)

図12 構築された評価システム



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

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

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

表1

吸入暴露のLC50 (4時間暴露値)と 得られたTIPS LC50の比較

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

\* OECD資料のLC50値より換算

### E. 結論

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

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

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

### F. 研究発表

1. 論文発表

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