

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

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

分担研究課題名:吸入曝露物質の有害性評価における経気管肺内噴霧投与法の有用性の解析
に関する研究

分担研究者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 准教授

研究要旨

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多いため、気中物質有害物質のリスク評価と管理は重要である。しかしながら、吸入曝露試験には専用施設と莫大な費用を要するため、わが国では吸入曝露しうる毒物および劇物取締法(毒劇法)によって指定された化合物の安全性試験は、経口・皮膚塗布・腹腔内投与等で代替されている。本研究の目的は、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として開発した経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)を、毒劇法指定物質の有害性評価に応用することにある。

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

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多いため、吸入曝露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。しかしながら毒物および劇物取締法(毒劇法)によって指定された、空気中有害物質の多くは、経口、皮膚塗布や腹腔内投与など別経路の投与による動物試験により代替されている。この背景には、吸入曝露試験を実施するための特殊施設

や高額な費用が関係している。

申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)を用いた試験デザインを開発してきた。これまでにTIPS法をもちいて世界に先駆けて4種の異なった形状のカーボンナノチューブと1種のチタン酸カリウムの肺または胸膜中皮における発がん性を見出し、吸入曝露試験に替わる気管内投与の有用性を示している。本研究では、毒劇法指定物質の有

害性評価を高度化および迅速化するべく、TIPS 法による評価を応用することにある。

今年度は、既に日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) における吸入曝露試験にて LC50 値が得られている物質について、まず *in vitro* における LD50 値を算出し、TIPS 法における投与濃度を決定した。F344 ラットに対して TIPS 投与を行い、得られる LD50 値の妥当性について、吸入曝露試験の LC50 (4h) と比較検討した。

B. 研究方法

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

被験物質

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

(倫理面への配慮)

動物実験については、平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦

痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており (医動 20-28)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行った。

C. 研究結果

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

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

(6) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (EGMA):

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

LD50: 800~1000 mg/kg

(7) *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA)

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

LD50: 1280~2560 mg/kg

D. 考察

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

E. 結論

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

- kidney disease. *Physiol Rep.* 8(17):e14556, 2020.
6. ○Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 94:4085-4097, 2020.
 7. Hotta Y, Takahashi S, Tokoro M, Naiki-Ito A, Maeda K, Kawata R, Kataoka T, Ohta Y, Hamakawa T, Takahashi S, Yasui T, Kimura K. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improved bladder function and hemodynamics in rats with bilateral internal iliac artery ligation. *Neurourol Urodyn.* 39:1922-1929, 2020.
 8. Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 8:1895-1906, 2020.
 9. Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkiengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 25:2737, 2020.
 10. ○Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 41:1145-1157, 2020.
 11. Yeewa R, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 12: pii: E558, 2020.
 12. ○Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagayasu Y, Nagai T, Etani T, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. *Cancer Sci.* 111:1165-1179, 2020.
2. 学会発表
 1. 内木綾、加藤寛之、稲熊真悟、山下依子、高橋智。MiR-8080 は androgen receptor スプライスバリエーションの発現低下により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第 109 回日本病理学会、Web 開催 (2020 年 7 月)
 2. Aya Naiki-Ito, Hiroyuki Kato, Taku Naiki, Satoru Takahashi. Cancer chemoprevention by antioxidant luteolin, symposium, 第 79 回日本癌学会学術総会、広島 (2020 年 10 月)
 3. 内木綾. 酸化ストレスから見た発癌機序の分子病理学的解析と臨床応用への試み (A 演説)、第 66 回日本病理学会秋期特別総会、浜松 (2020 年 11 月)
 4. 内木綾、加藤寛之、小村理行、高橋智。Luteolin は mTOR シグナルと p21 発現の制御により膀胱癌を抑制する、第 37 回日本毒性病理学会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
1. 特許取得
大学の特許として届出済み (審査中)
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし