

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

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

分担研究課題名 被検物質の DNA 障害性の解析

分担研究者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

### 研究要旨

津田研究代表者等は、これまでにラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与方法(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、吸入暴露試験に替わる気管内投与の有用性を国内外に示してきた。さらに、ヒト肺癌細胞株(A549 細胞)における Neutral Red を指標とした細胞毒性が TIPS 法の投与濃度設定に有用であることが明らかになり、*in vivo* 用量設定試験の代替法への応用が期待される。本年度では、1, 4-dioxane、Acrolein、Glycidyl methacrylate 及び Xylene の曝露した A549 細胞についてマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析を実施し、その肺毒性の発現機序の検討を行った。現在、遺伝子解析が実施中であるが、本研究より、化学物質の吸入暴露による肺毒性の発現機序の解明に寄与するデータを得ることが期待されている。

### A. 研究目的

空気中の化学物質は不可避免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暴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、吸入暴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、吸入暴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方法を開発して国内外において標準的試験法としての採用を提案することにある。津田研究代表者等は、これまでにラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与方法

(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、吸入暴露試験に替わる気管内投与の有用性を国内外に示してきた。また、TIPS 法による LD50 の曝露量と全身吸入暴露法による LC50 から求められる曝露との差は、施設間最大許容差異の 4 倍以内とその有用性が示された。さらに、ヒト肺癌細胞株(A549 細胞)における Neutral Red を指標とした細胞毒性が TIPS 法の投与濃度設定に有用であることが、*in vivo* 用量設定試験の代替法への応用が期待される。本年度では、被験物質の曝露した A549 細胞について遺伝子発現解析を実施し、その肺毒性の発現機序の検討を行った。

### B. 研究方法

1x10<sup>6</sup> 個の A549 細胞を 30 mm dish にまき、翌日に LD50 用量の被験物質を混じた培地に交換し 15 分間曝露後、PBS で洗浄する。A549 細胞から、RNase Mini Kit (Qiagen 社)を用いて、total RNA を精製・抽

出した。被検物質は以下の通り: 1, 4-dioxane、Acrolein、Glycidyl methacrylate 及び Xylene。各サンプルから得られた total RNA に対して、GeneChip® Clariom D Assay, Human (Affymetrix 社)を用いたマイクロアレイ解析を行った。得られた遺伝子発現データについて、Ingenuity pathway analysis (IPA) software (Qiagen 社) を用いて解析する。

### C. 研究結果

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

### D. 考察

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

### E. 結論

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

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

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

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

4. Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett*, 336: 32-38, 2021.

#### 2. 学会発表

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

### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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