

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)指定化合物の吸入曝露毒性評価には高額な費用が要求されるために、実際の曝露とは異なる経口・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、従来の吸入曝露試験に代わり得る簡便な気管内投与法を開発して、事業場等における吸入曝露における安全基準に用いることのできる簡便で信頼性の高い新規の毒性評価法を開発して OECD テストガイドラインへの採択を目指すことにある。代表者らは今までにラットを用いた経気管肺内噴霧投与(TIPS)による試験法を開発し、MWCNT-7を含む多層(MWCNT)～2層(DWCNT)までのカーボンナノチューブ(CNT)およびチタン酸カリウム線維等の毒性および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、この分野のトップジャーナル(Particle and Fibre Toxicology, IF 8～9)に採択されてきた。

本研究は、*in vitro*試験法とTIPS法を組み併せて毒物劇物の有害性評価に適用できる簡便で安価な評価試験法として発展させようとするものである。この方法の開発段階において日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)にて短期吸入曝露試験が実施された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、*in vitro*におけるNeutral Red試験から得られたA549肺がん細胞に対するLD50データを、TIPS法に応用して(3時間に0,1,2,3時の4回)投与後2週間までのLD50値を得た。その結果、本法で1,4-dioxaneのLD50値は1300mg～1560mg/kgの範囲にあり、これはJBRCにおける通常の吸入曝露試験のLC50値1600mg/kgに近似する値であった。この手法の妥当性と普遍化を目指して現在までに13種の物質について以下のデータを得た。(1～4はその値の既知の値の倍数値)。

R1年度には1)1,4-ジオキサン:1、R2-3度には、2)ポリアクリル酸ナトリウム:1、3)エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート:1、4)グリシドール:1.7～2.4、5)アセチルアセトン:2.0～3.6、6)N,N-ジメチルアセトアミド:1.9～3.8、7)N,N-ジメチルホルムアミド:3.0～3.9、8)グリシルメサクリレート:4、9)アクロレイン:1、10)キシレン:2、11)1,2-ジクロロエタン:1、12)キノリン:4以上、13)t-ブチルアルコール:3以下、であった。11物質は既存の吸入曝露LC50値の4倍以内(異なった施設における試験結果との差異範囲)、2物質は近似値であった。これは4時間吸入曝露試験における結果の施設間の差異の範囲であるに収まる。以上の13物質の結果から、本法は吸入曝露法LC50の近接値がTIPS短期投与法にて得られることが示された。

以上から、OECDテストガイドライン等のLC50(4h)と、得られたTIPS LD50の比較において、13物質中11種に既存データの4倍以内であった。使用ラット数は1物質について40～50匹程度であり、世界で求められている動物数の削減方針に叶うものである。

### 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、事業場等の環境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・腹腔内投与法等で代替されていて、本来の吸入曝露のリスク評価が実施されていないものが多数ある。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高額な稼働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、実施容易な肺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種の壁層数の異なった形状のカーボンナノチューブと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肺または胸膜中皮における発がん性を見出し、吸入曝露試験に代わる TIPS 投与の有用性を国内外に示してきた。これは、OECD TEST GUIDELINE: DRAFT GUIDANCE DOCUMENT ON INHALATION TOXICITY TESTING #39 (p59)に引用され、また Archives of Toxicology, Particle and Fibre Toxicology、Particle and Fibre Toxicology) 等の高い IF ジャーナルに掲載されて、そ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 (GHS の呼吸器毒性ラベルの付いている物質が多い) 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。

### 試験法

#### ① *in vitro* Neutral Red 毒性試験

検体に曝露された A549 細胞の Neutral red の取り込の計測による LD50 を求めた。この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) として推奨されている (図 1)。

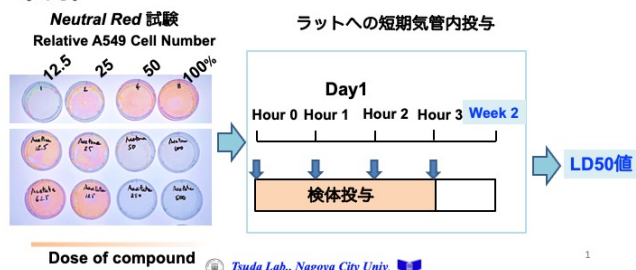
#### 図 1 試験法の構成 (*In vivo* と *In vitro* 結合試験)

##### 1) Neutral red cytotoxicity assay

培養液中の検体投与量 (mg/ml) の LD50 用量 (mg/L) をラットにおける TIPS 用量の下限值として以下の実験を行う。

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

2) ラットにおいて、短時間に 3~4 回のと TIPS 投与を行い、2 週後の D50 値を求め。



具体的には、Neutral redの肺がん細胞への取り込み率毒性評価の指標とする用量設定試験ではこの *in vitro* 暫定LD50を挟む約5~6段階の用量にて1投与群5~10匹にてLD値を求めた。

条件：細胞は肺胞上皮由来がんA549細胞

250,000/dish をRPMI10%FBS培養液にて培養し、その中に検体 (LD50価の0.1~10倍) を加えNeutral red 0.033mg/mL加えてその濃度によってA549細胞の50%致死用量を探索する方法 (図2のAとB) で。それに「もつづいて、体重当たりの用量 (群) を決めた (図2のC)。

#### ② *in vivo* TIPS 試験：

上記のNeutral red試験より導き出された体重あたりの投与量 (図2のC) を3時間に4回 (0、1、2、3時) で投与した。

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た。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 (図2、図3)。

図2

#### TIPS用量域の設定方法 (5~6用量) Dose setting

| A   | B  | C  |
|---|--|--|
| 被験物質溶液の密度   | A549細胞のNeutral red 試験における被験物質溶液の濃度域を選ぶ   | ラットのTIPS投与における被験物質溶液の濃度域を選ぶ                            |
| Density of the test substance solution (shown in the package bottle etc.) | Select a candidate concentrations of the test substance solution in Neutral red test | Select a suitable candidate concentrations TIPS dosing |

図3

#### 得られたプロトコルに従って1,4-DioxeneのTIPSによるLC50値の評価をしてみた (Ex. 公差320)

| Group   | Dose                     | Day 1                 | Day 8 | No. of Rats |
|---------|--------------------------|-----------------------|-------|-------------|
| Group 1 | Vehicle (saline)         | Assumed lethality     |       | 7           |
| Group 2 | 240mg/kg x 4 = 960mg/kg  | 0 % lethality         |       | 7           |
| Group 3 | 320mg/kg x 4 = 1280mg/kg | 20 % lethality        |       | 7           |
| Group 4 | 400mg/kg x 4 = 1600mg/kg | 50 % lethality (LD50) |       | 7           |
| Group 5 | 480mg/kg x 4 = 1920mg/kg |                       |       | 7           |
| Group 6 | 560mg/kg x 4 = 2240mg/kg | 80 % lethality        |       | 7           |
| Group 7 | 640mg/kg x 4 = 2560mg/kg | 100 % lethality       |       | 7           |

Observe mortality rates within 1 week then do sacrifice on day 8

参考：吸入曝露からのLC計算値=1920=480x4mg/kg  
Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

以下に検体の用途・毒性・発がん性 (WHO国際癌研究機構・IARC の発がん性の評価) 等を示す

1) 1,4-ジオキサン (報告済み)：洗剤用品原料、溶剤、IARC Group 2B

- 2) ポリアクリル酸ナトリウム：水吸収樹脂
- 3) 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）：塗料、インキ、血液・精巣毒性、IARC G3
- 4) グリシドール：天然油脂、ビニル樹脂安定剤、肝障害、IARC Group 2A
- 5) アセチルアセトン：接着剤原料、溶剤、吸引毒性
- 6) *N,N*-ジメチルアセトアミド：肺・気管・肝・腎・副腎・脾・睾丸障害、IARC G2B
- 7) *N,N*-ジメチルホルムアミド：アクリル樹脂の合成、肝障害、IARC Group 2A
- 8) グリシルメサクリレート：塗料、帯電防止剤、IARC Group 2A
- 9) アクロレイン：医薬品等の原料、IARC Group 2A
- 10) キシレン：塗料等の溶剤、IARC Group 3
- 11) 1,2-ジクロロエタン：有機溶剤、フィルム洗浄剤（IARC Group 2B）
- 12) キノリン：農薬原料、IARC Group 2B)
- 13) *n*-ブチルアルコール：溶剤

### ③ 毒性発現の機序解析

伴野班員には、IL-6 産生増加を指標とした判定法について検討していただく。魏班員には、A549 細胞の遺伝子解析による毒性判定法の開発をしていただく。

（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

### 投与物質の検定

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。

### 試験結果

#### ① *in vitro* Neutral red毒性試験

Neutral redの取り込みを指標とした結果は用量設定試験ではこの*in vitro* 暫定LD50を挟む約10段階の用量 (mg/g) にて1投与群5~10匹にてLD値 (LD50ではない) を求めた。

条件は：細胞は肺胞上皮由来がんA549細胞

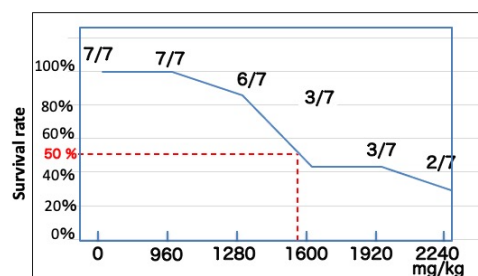
250,000/dish をRPMI10%FBS培養液にて培養し、その中に検体 (LD50価の0.1~10倍) を加えNeutral red 0.033mg/mL加えてその濃度によってA549細胞の50%致死用量を得た。その致死用量の2倍量を最高用量群として、図2に示す計算式にて1回投与量を算出し、それを下記の方法にて4回投与した。

#### ② *in vivo* TIPS 試験

投与は3時間に4回 (0、1、2、3時) で経気管肺内噴霧投与 (TIPS) する方法にて実施した。以下に13物質についての結果を示す。

#### 1) 1,4-ジオキサン (図4)

図4 1) 1,4-ジオキサン (IARC G2B) (1,4-Dioxane)



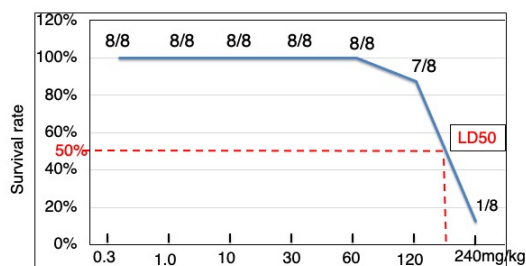
→ TIPSのLD50は1280mg/kgと1920mg/kgの間にある

Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

TIPS の LD50 は 1280 (6/7) と 1600 (3/7) mg/kg の間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

#### 2) ポリアクリル酸ナトリウム (図5)

図5 2) ポリアクリル酸ナトリウム (Sodium polyacrylate)



→ TIPSのLD50は120mg/kgと240mg/kgの間にある

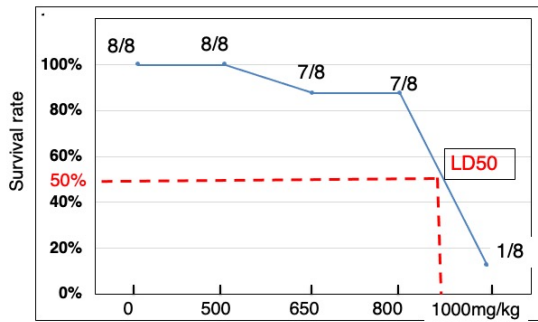
Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

TIPS の LD50 は 120 (7/8) と 240 (1/8) mg/kg の間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

3) 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 6)

図6

3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート(G3)  
(Ethylene glycol monoethyl ether acetate)



→ TIPSのLC50は800mg/kgと1000mg/kgの間にある

Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

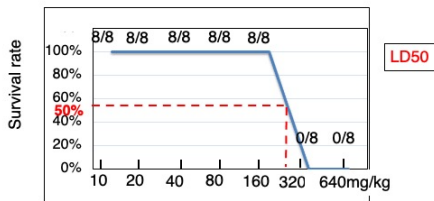
6

LD50は800 (7/8) と1000 (1/8) mg/kgの間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

4) グリシドール (図 7)

図7

4) グリシドール(G2A)  
(Glycidol)



→ TIPSのLD50 TIPSは160 mg/kgと320 mg/kgの間にある

Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

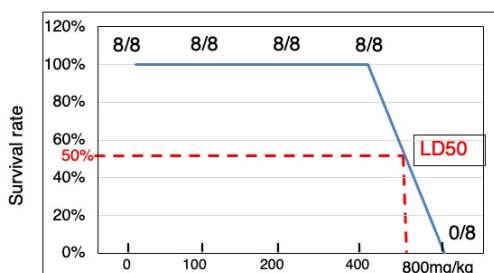
7

LD50は160 (8/8) と320 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

5) アセチルアセトン (図 8)

図8

5) アセチルアセトン  
(Acetylacetone or 2,4-pentadione)



→ TIPSのLC50は400mg/kgと800mg/kgの間にある

Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

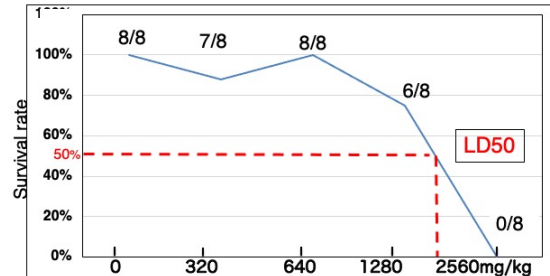
- 12 -

LD50は400 (8/8) と800 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

6) N,N-ジメチルアセトアミド (図 9)

図9

6) N,N-ジメチルアセトアミド (G2B)



→ TIPSのLC50は1280mg/kgと2560mg/kgの間にある

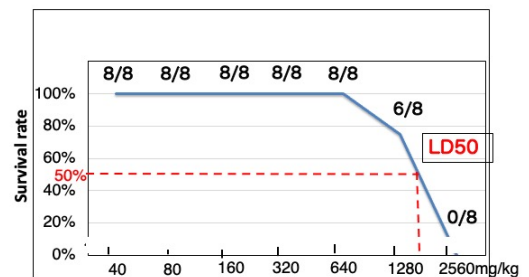
Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

7) N,N-ジメチルホルムアミド (図10)

図10

7) N,N-ジメチルホルムアミド (G2A)



→ TIPSのLC50は1280mg/kgと2560mg/kgの間にある

Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

2560

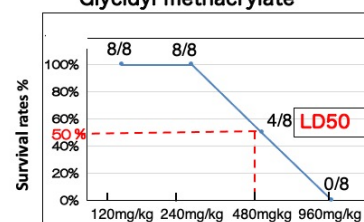
10

LD50は1280 (6/8) と2560 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

8) グリシジルメサクリレート (図 11)

図11

8) グリシジルメサクリレート (G2A)  
Glycidyl methacrylate



→ TIPSのLC50は240mg/kgと960mg/kgの間にある

3.4 = 13.7 mg/kg      112mg/kg      120 × 4 = 480mg/kg  
Neutral red test      Converted      TIPS LD50  
80 % survival data      OECD Inhalation      data LC50  
mg/kg                      data                      (mg/kg)

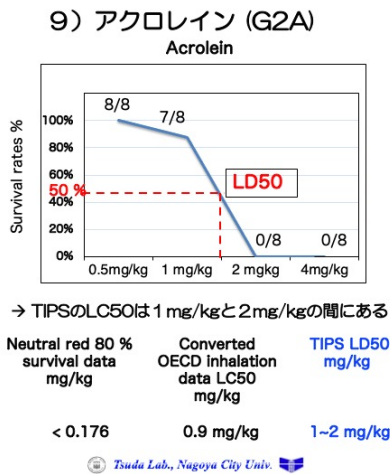
Tsuda Lab., Nagoya City Univ.

11

LD50は480 (4/8) mg/kgにある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

9) アクロレイン (図12)

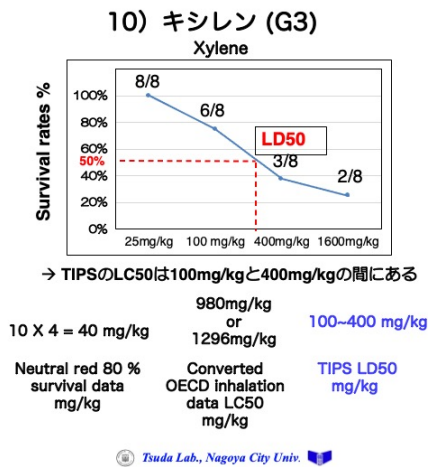
図12



LD50は1 (7/8) と2 (0/8) mg/kgの間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

10) キシレン (図13)

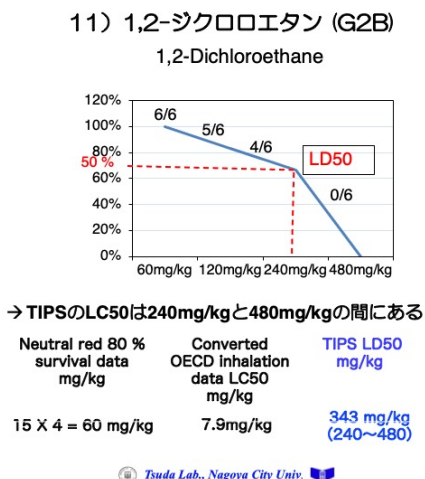
図13



LD50は100 (6/8) と400 (3/8) mg/kgの間にある (吸入曝露試験における施設間の差異以内)。

11) 1,2-ジクロロエタン (図14)

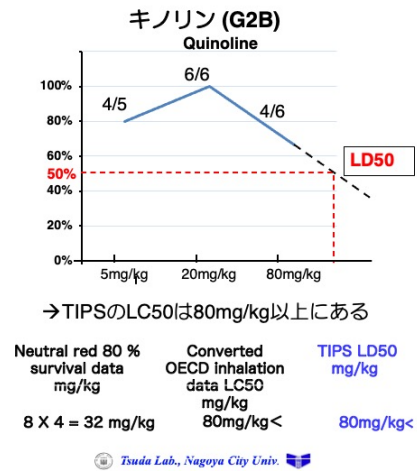
図14



LD50は240 (4/6) と480 (0/6) mg/kgの間にある (吸入曝露値とほぼ一致)。

12) キノリン (図15)

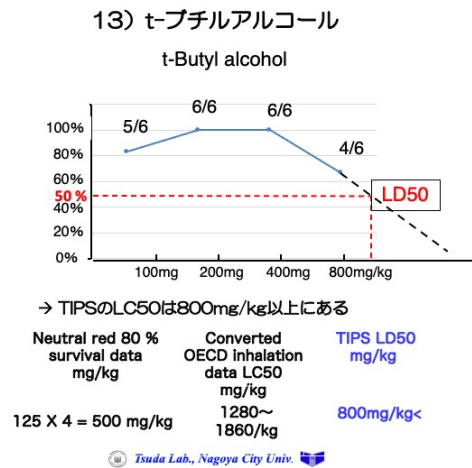
図15



LD50は480mg (4/6) 以上にある。

13) t-ブチルアルコール (図16)

図16

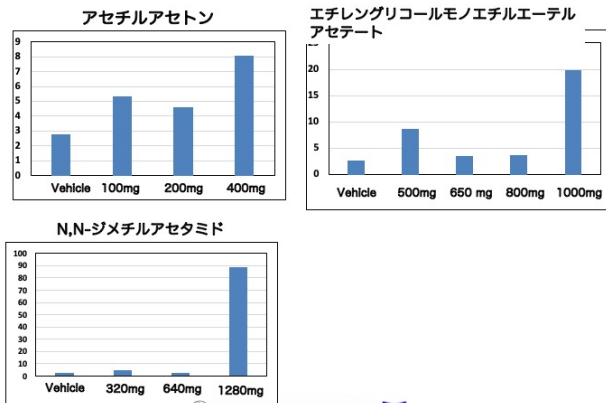


LD50は800mg/kg (4/6) 以上にある。

③ 肺の急性毒性変化

3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート、5) アセチルアセトンおよび6) N,N-ジメチルアセトアミド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では、BALF WBC 数/μl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になり得ると考える。

図17 気管支洗浄液中のWBC数 (10<sup>2</sup>/μl)



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、得た肺がん細胞の致死量を 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たった。本方法の1時間に1回(0, 1, 2, 3時間経過時)計4回投与してLD50 値を得て、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、13 物質のうち 11 物質は従来の 4 時間吸入曝露試験による LC50 値の上限と下限の差異の 4 倍以内 (=吸入曝露試験における施設間の差異以内) であり、信頼度の高い試験法であると考え (表 1, 2)。

以上から、同時に高額な装置と稼働費用要する吸入曝露を必要としない、安価で実用可能な「吸入曝露」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

吸入曝露のLC50 (4時間曝露値)と 得られたTIPS LD50の比較

| 検体                              | 既存の吸入曝露のLC50 (4時間曝露値) mg/kg* | TIPS LD50 mg/kg** | 吸入曝露LC50 : TIPS LD50 (上限値の比較) |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 1) 1-4 ジオキサン (G2B)              | 1492~2216                    | 1600~1920         | 1 : 1 (吸入曝露値内)                |
| 2) ポリアクリル酸ナトリウム                 | 93.7~2466                    | 120~240           | 1 : 1 (吸入曝露値内)                |
| 3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート (G3) | 522~1041                     | 800~1000          | 1 : 1 (吸入曝露値内)                |
| 4) グリシドール (G2A)                 | 92.4~130.7                   | 160~320           | 1 : 1.7 ~ 2.4                 |
| 5) アセチルアセトン                     | 220                          | 400~800           | 1 : 2.0 ~ 3.6                 |
| 6) N,N-ジメチルアセトアミド (G2B)         | 96.12~671                    | 1280~2560         | 1 : 1.9 ~ 3.8                 |
| 7) N,N-ジメチルホルムアミド (G2A)         | 328~651<br>または > 254         | 1280~ 2560        | 1 : 3.0 ~ 3.9                 |

OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、\*\*の値が\*の表示最大値の4倍 (LC値の施設間の差異の上限) 以内であれば TIPSの結果は妥当と考える

表 2

吸入曝露のLC50 (4時間曝露値)と得られたTIPS LD50の比較

| 検体                    | 既存の吸入曝露のLC50 (4時間曝露値) mg/kg* | TIPS LD50 mg/kg** | 吸入曝露LC50 : TIPS LD50 (上限値の比較) |
|-----------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 8) グリシジルメサクリレート (G2A) | 112                          | 480               | 1 : 4                         |
| 9) アクロレイン (G2A)       | 0.9                          | 1~2               | 1 : 1 (吸入曝露値内)                |
| 10) キシレン (G3)         | 522~1041                     | 100 ~400          | 1 : 2                         |
| 11) 1,2-ジクロロエタン (G2B) | 345                          | 240~480           | 1 : 1 (吸入曝露値内)                |
| 12) キノリン (G2B)        | 25                           | <80               | 1 : ?                         |
| 13) n-ブチルアルコール        | 1280~1860                    | 800<              | 1 : ?                         |

OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、\*\*の値が\*の表示最大値の4倍 (LC値の試験実施施設間の差異の上限) 以内であれば TIPSの結果は妥当と考える

E. 結論

この方法によって、比較的毒性の強い物質でも首尾良く既存の JBRC等による従来の吸入曝露試験によるLC50 (4 hr)に近似する値 (吸入曝露試験のおよそ4倍以内・吸入曝露試験結果の施設間の差異の範囲) が得られることが分かった。今後Neutral Red 試験の培地の検討と用量の算定方法・TIPS投与回数 の改良によってさらに既存の LC50値に近い値の得られる方法に発展させて、OECD ガイドラインへの採用を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka H., Gunasekaran S., Saleh D., Alexander TW, Alexander DB., Ohara H., Tsuda H. Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer. *Biochem. Cell Biol.* 99:159-165 (2021).
2. Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*, 12: 1-13 (2021) doi: 10.3389/fimmu.2021.758941,

2. 学会発表

1. Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaied, Omnia Hosny Mohammed, William T Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double walled carbon

nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS -7) in rat model. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年7月)

2. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda 気管内投与法によるカーボンナノホーン(CNH)およびカーボンナノブラシ(CNB)の肺および胸膜における短期毒性試験 日本毒性病理学会, 神戸 (2022年1月)
3. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T.

Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation Society of Toxicology, San Diego (2022年3月)

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得出願中:特願 2021-146
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし