

厚生労働科学研究費補助金 ((化学物質リスク研究事業)

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開発及び

その精緻化に関する研究

令和4年度 分担研究報告書

分担研究課題名：*in vitro* 試験による用量設定と *in vivo* への外挿性検討

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任教授

研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 客員教授

William T. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

Mohammed Mourad Saleh 名古屋市立大学大学院医学研究科 博士課程院生

Omnia Hosny Mohamed Ahmed 名古屋市立大学大学院医学研究科 博士課程院

研究要旨

本研究は、ラットにおける4時間吸入毒性データ (LD₅₀、4時間値) の用量について、A549 肺がん細胞を用いた *in vitro* 急性毒性試験から得られた値を用いることにより、経気管肺内噴霧投与 (TIPS) による簡便な急性吸入毒性試験を開発しようとするものである。これによって高額な専用の吸入暴露施設を要しない安価な吸入毒性の評価方法が可能となる。検体に発がん性が疑われる場合は、TIPS 法にて肺内への4時間吸入毒性試験終了後の残存動物について無処置にて長期に観察することによって、発がん性を評価への応用が期待される。事実、我々はいくつかの多層カーボンナノチューブ (MWCNT) について TIPS 投与後長期観察することによって発癌性を見出し報告してきた。TIPS 法は生理食塩水または、墨汁投与試験の実施により、最大 2.0 mL/kg 体重の容量での4回投与まで一般状態の異常及び死亡例が見られなかったことから、この研究で TIPS 法による短期試験後2年まで観察することによって、長期吸入暴露試験に代わる試験法の開発を行ってきた。被験物質は、このプロジェクトで今までに検索されてきた13物質のうち、IARC Monograph におけるヒトにおける発がん物質 (要因) の分類において Group 2A (おそらくあり) 4物質、Group 2B (可能性あり) 4物質、Group 3 (疑われるがデータ不十分) 2物質であるが、TIPS による短期投与2年後の発がん性との整合性について解析を進めている。

A. 研究目的

従来のラットにおける4時間吸入毒性データ(LD₅₀、4時間値)を、津田らが多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の長期毒性評価において考案してきた簡便な経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を用いて応用しようとするものである。用量設定についてはA549肺がん細胞を用いた*in vitro*急性毒性試験から得られた値を用いて、TIPS法応用してLD₅₀値を見出そうとするものである。これによって高額な専用の吸入暴露施設を要しない安価な吸入毒性の評価方法が可能となる。被験物質に発がん性が疑われる場合は、TIPS法にて肺内に4時間吸入毒性試験終了後残存動物において無処置にて長期に観察することによって、発がん性を評価することもできるかについて、明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

4時間吸入毒性試験のデータ(LD₅₀、4時間値)に代わるTIPS投与法の短期毒性試験における生存(LD₅₀値群を含む致死を免れた動物)についてその後2年間無処置観察することによって、被験物質の発がん性についての解析を実施している。

(倫理面への配慮)

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

現在の所、8物質について2年の観察期間を終了している。屠殺時の所見は、6物質の各群32匹~56匹の肉眼的結節性病変はGlycidol(IARC 2A)において肺に1匹認められた。それ以外の投与群には、肺、胸膜中皮、肝、腎等において肉眼的に観察される結節性病変はみられていない。病理組織標本を作成し、詳細に検索する予定である。

D. 考察

Glycidol投与群の肺における肉眼的所見では、LD₅₀値に近い高用量群で明らかな結節性病変の発生を1例観察したが、前がん病変の発生についても病理組織学的に検討をした上で、この方法の発がん試験としての有用性について結論を出したい。

E. 結論

4時間吸入毒性試験のデータ(LD₅₀、4時間値)に代わるTIPS投与法による短期毒性試験における生存(LD₅₀値群を含む致死を免れた動物)について発がん性評価への応用を検討中であり、結果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoyama Y., Naiki-Ito A., Xiaochen K., Komura M., Kato H., Nagayasu Y., Inaguma S., Tsuda H., Tomita M., Matsuo Y., Takiguchi S., Takahashi S.
Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF- B Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model *Nutrients* 14, 42

(2022)

<https://doi.org/10.3390/nu14010042>

2. Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Particle and Fibre Toxicology*, 19:30(2022)
<https://doi.org/10.1186/s12989-022-00469-8>

2. 学会発表

1. Saleh D., Alexander TW., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S., Takase H., Naiki-Ito A., Suzuki S., Gi M., Taquahashi, Y., Hirose A., Kanno J.,

Tsuruoka S., Tsuda H. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY、オランダ 2022.9.18-22

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
特願 PCT/JP2022/033427 (毒性試験方法)
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。