

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

in vitro 試験の実施

研究分担者 魏 民

大阪公立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

研究協力者 藤岡 正喜

大阪公立大学大学院医学研究科 分子病理学 特任講師

研究要旨

毒物又は劇物（毒劇物）は、原則として動物を用いた急性毒性試験におけるLD₅₀・LC₅₀値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。一方、近年は*in vitro*試験等に基づく、毒性や刺激性等から判断する評価法も希求されている。そこで、本研究では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）を行う際の*in vitro*投与量設定法として、細胞毒性評価法として使用されているマウス線維芽細胞 3T3を用いたNeutral Red Uptake Cytotoxicity Assay(OECD GD 129)を一部改変し、ヒト肺腺癌細胞株A549を用いた改変Neutral Red Uptake assay (A549 NRU assay) を構築し、試験プロトコールの最適化とその有用性について検討を行った。その結果、A549 NRU assayでの至適条件を設定し、6つの化学物質 (Acetylacetone、1,2-Dichloroethane、N,N-Dimethylacetamide、N-Dimethylformamide、Glycidol 及びPolyacrylic Acid 5000の本試験におけるLC₅₀を算出し、良好な再現性も確認できた。以上より、TIPS法の*in vitro*投与量設定試験としてA549 NRU assayを構築することができた。

A. 研究目的

毒物又は劇物（毒劇物）は、原則として動物を用いた急性毒性試験における LD₅₀・LC₅₀ 値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。一方、近年は *in vitro* 試験等に基づく、毒性や刺激性等から判断する評価法も希求されて

いる。また、前述の経路の内、特に重要なヒトへの吸入ばく露が想定される化合物は、吸入による評価が必要であるが、全身ばく露法は大規模なばく露装置が必要となるため、実施可能な施設がわずかである。そこで、本研究では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) を行うが、その用量設定に多数のラットを用いるのは 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の観点から適切ではない。そこで、推定される LC₅₀ を *in vitro* により推定し、少ない匹数で TIPS 法を行うために、*in vitro* 投与濃度設定試験を開発する。その方法として、ヒト肺腺癌細胞株(A549)の細胞毒性を指標とした評価法を検討・精緻化し、毒劇物の指定に資する手法の確立を図ることを目的とする。

本年度では、ラットを用いた TIPS 法の *in vitro* 投与量設定法として、細胞毒性評価法として一般的に知られている Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay を一部改変した A549 NRU assay を用いて、その汎用性と結果の妥当性について検討を行った。

B. 研究方法

[被験物質及び細胞株]

津田等の先行研究からの技術移転及び、施設間バリデーションを行うため、A549 細胞における毒性用量を 6 化学物質について検討した。本研究で使用した被験物質を表 1 に示す評価に用いる培養細胞として吸入ばく露を想定してヒト肺腺癌細胞株 A549 を選択し、液体培地として 10%FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 (L-グルタミン、フェノールレッド含有) を使用した。

表 1 被験物質及び LC₅₀

Chemical	CAS RN®	LC ₅₀ (µL/mL)
Acetylacetone (ACAC)	123-54-6	15
1,2-Dichloroethane (DCE)	107-06-2	5
N,N-Dimethylacetamide (DMAC)	127-19-5	117
N,N-Dimethylformamide (DMF)	68-12-2	116
Glycidol	556-52-5	12
10% Polyacrylic Acid 5000 (PA5000)	9003-01-4	105

[播種細胞数の検討]

Neutral red assay における至適播種細胞数を検討するために、6-well プレートに A549 細胞を 0.25x10⁵、0.5x10⁵、1.0x10⁵、2.0x10⁵、4.0x10⁵ 及び 8.0x10⁵ 細胞でそれぞれ播種し、24 時間後に WST-8 法にて得られた吸光度と播種細胞数の相関を評価した。

[Neutral red assay]

Day 0 において、6-well プレートに A549 細胞を 2x10⁵ 細胞で播種した。Day 1 には、被験物質の調製のために、15 mL チューブに被験物質を培地と混合し、vortex にて 5 秒程度強く振盪した。

培地を吸引後 PBS で 1 回洗浄し、事前に調製した被験物質を混合した培地を well 内に添加した(2 ml/well; 2 wells/被験物質)。その後 37°C の 5% CO₂ インキュベーターにて 15 分間インキュベーションした。

Neutral red 法による吸光度測定を行うために、Neutral red 含有 RPMI 培地を調製した(100 分の 1 量、Neutral red 最終濃度 0.33%)。顕微鏡観察を実施後、培地を吸引し、さらに PBS で 2 回洗浄後、先程調製した Neutral red 含有 RPMI 溶液を well 内に添加した。その後、37°C の 5%CO₂ インキュベーターにて 3-4 時間インキュベーションした。インキュベーション完了後、培地を除去し PBS で 2 回洗浄し、酢酸-エタノール溶液(50%エタノール + 49% ミリ Q 水 + 1% 氷酢酸)を 1 mL ずつ加え dish を shaking した。新たに用意した 96 well プレートに、Well 内の酢酸-エタノール溶液を 180 µL ずつ移し替え、吸光度計にて 540 nm の波長で計測を行った。

[LC₅₀ の算出]

Neutral red assayにて得られた吸光度について、近似曲線を GraphPad Prism software で解析し、LC₅₀ を算出した。詳細な方法として、近似曲線の投与濃度を Log 変換した値を用いて、非線形回帰(カーブフィット法)で得られた値を log(agonist) vs normalized response – Variable slope 解析にて LC₅₀ を算出した。

C. 研究結果

[播種細胞数の検討]

A549細胞を播種し、その24時間後のWST-8法で得られた吸光度と播種数の相関について検討した結果、0.25~2.0x10⁵ 細胞で良好な線形近似($r^2 = 0.99$)が得られた。したがって、その最大値である2.0x10⁵ 細胞が本試験における至適播種細胞数として設定できた。

[Neutral red assay]

Neutral red assayを実施し、得られた各被験物質のLC₅₀を表1に示す。なお、各被験物質について、2回以上独立した試験を行い、ほぼ同様な結果が得られることを確認した。

D. 考察

本研究ではラットを用いた TIPS 法の投与量を設定する準備試験として、急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験として知られている Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay (OECD GD 129)の一部を改変し実施した。吸入ばく露環境を想定し、使用細胞をマウス線維芽細胞 3T3 からヒト肺腺癌細胞株である A549 に改変し、Neutral red assay の至適条件の構築と被験物質を用いた試験の汎用性について検討を行った。その結果、本試験における至適播種細胞数

を決定し、さらに今回検討した被験物質では良好な再現性が得られた。本研究のような *in vitro* の LC₅₀ 値データから *in vivo* の LD₅₀ 値を予測する方法は「*in vitro* 細胞毒性試験による急性経口毒性試験の初回投与量設定試験 (2006)」として ICCVAM のバリデーション研究の結果から OECD で推薦されている(OECD GD 129)。従って、A549 NRU assay は TIPS 法の投与量設定試験として有用である可能性ことが示唆された。

E. 結論

本研究により、TIPS 法の *in vitro* 投与量設定試験として A549 NRU assay を構築し、その至適条件の設定及び良好な再現性が確認できた。本年度は、水溶性物質の被験物質を用いた検討を行ったが、今後は脂溶性の被験物質を用いた検討を行う予定である。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) Yamaguchi T, Gi M (co-first author), Fujioka M, Shugo S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. J Toxicol Pathol. 2023; 36 (2): 123-129.
- 2) Matsue T, Gi M (Co-first author), Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of β -catenin signaling. Cancer Sci. 2022; 113(8): 2642-2653.
- 3) Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K,

Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, Wanibuchi H, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis.* 2022; 13 (8): 694.

- 4) Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 2022; 35: 247-254.

F.2 学会発表

- 1) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 1, 4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発がんリスク評価.

第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)

- 2) 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、鰐淵英機. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 3) 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. ヒ素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常の関与. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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