

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書(令和4年度)

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

研究代表者：小川 久美子（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長）

研究要旨

本研究では、(1) *in vivo* 試験代替法として、吸入暴露が想定される物質の毒劇物判定における TIPS 法の検証、及び、(2) *in vitro* 試験代替法として、ヒト肺癌細胞株(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している。

毒物又は劇物は、原則、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。しかし、全身吸入暴露法は大規模な暴露装置が必要となるなどの困難があるため、吸入毒性情報は限定的である。本研究では、汎用性の高い経気管肺内噴霧投与方法（Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法）による気管内投与毒性試験の急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的に、被験物質 6 剤（*N,N*-ジメチルアセタミド、*N,N*-ジメチルホルムアミド、*tert*-ブチルアルコール、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1*H*-アゼピン）について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施し、TIPS 法で得られた LD₅₀ 値と全身吸入暴露における LC₅₀ 値を比較した。その結果、*N,N*-ジメチルアセタミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミドの LD₅₀ 値と全身吸入暴露における LC₅₀ 値の差異は 4 倍以内であった。*tert*-ブチルアルコールの差異は 0.18~0.36 倍であったが、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1*H*-アゼピンでは 4 分の 1 (0.25 倍) を超える差異が認められた。今後、新たに 6~10 物質について気管内投与急性毒性試験を実施して LD₅₀ 値の判定及び毒性影響の検討を実施するとともに、投与液の物理化学的性状の検討や肺、気管などの呼吸器を含む諸臓器の病理組織学的検査を実施し、今回認められた TIPS 法と全身吸入暴露法の差異の要因を検討する予定である。

また、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。

さらに、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）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。

キーワード：吸入、急性毒生、経気管肺内噴霧投与方法、A549 NRU assay、代替法

研究分担者：高須伸二

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究分担者：赤根弘敏

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

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：David B. Alexander

名古屋市立大学大学院医学研究科 客員教授

研究協力者：William T. Alexander

名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

研究協力者：Mohammed Mourad Saleh

名古屋市立大学大学院医学研究科 博士課程院生

研究協力者：Omnia Hosny Mohamed Ahmed

名古屋市立大学大学院医学研究科 博士課程院生

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

るため、実施可能な施設はわずかであり、頭部・鼻部暴露法は拘束ストレスが影響する。そうした背景から国際的にも、化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GSH) における吸入毒性情報は限定的である。

津田研究分担者等は、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、多種の多層カーボンナノチューブ (MWCNT-7 等) の肺又は胸膜中皮に対する発がん性を報告した¹⁾。また、急性吸入毒性試験の代替法開発に関する先行科研究費研究では、TIPS 法による LD₅₀ の暴露量と全身吸入暴露法による LC₅₀ から求められる暴露量との差は、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²⁾。しかし、吸入暴露試験の代替法として確立するには更なる検証が必要である。

そこで、本研究課題では津田らにより検討されてきた TIPS 法による気管内投与毒性試験の急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的に、本年度は 6 化合物について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施し、TIPS 法で得られた LD₅₀ 値を全身吸入暴露における LC₅₀ 値と比較した。

A2. 用量設定と外挿性検討

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

A. 研究目的

A1. ラットを用いた TIPS 法

毒物又は劇物は、原則、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。特にヒトへの吸入暴露が想定される化合物については吸入による評価が必要である。しかし、全身吸入暴露法は大規模な暴露装置が必要とな

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。

A3. *in vitro* 試験の実施

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

B1. ラットを用いた TIPS 法

B1-1. 被験物質及び動物

N,N-ジメチルアセタミド (99.9%)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (100.0%)、*tert*-ブチルアルコール (100.0%)、アクリル酸 (99.8%)、2-ジメチルアミノエタノール (100.0%) 及びヘキサヒドロ-1*H*-アゼピン (99.9%) は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。生理食塩液は株式会社大塚製薬工場から購入した。動物は 10 から 11 週齢の雄性 F344 ラットをジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社から購入し、1 週間以上の馴化後、実験に供した。動物の飼育は、温度 24 ± 1°C、湿度 55 ± 5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明・12 時間消灯の環境下でバリエーションシステムの動物室にて行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。

B1-2. TIPS 法による気管内投与急性毒性試験

津田らの先行研究と異なる実験施設及び器具で実施することから、被験物質を用いた本試験を実施するのに先立ち投与条件の確認を行った。12 ~ 14 週齢の F344 ラットを用いて、イソフルラン吸入麻酔下で生理食塩液を 1 日 4 回 (1 時間間隔) 投与した。投与はラット用金属製気管内噴霧スプレー (針長 80 mm、内径 0.8 mm、外径 1.0 mm) (夏目製作所) を用いて一回当たり 0.2 ~ 2.0 mL/kg 体重の容量で実施し、気管内の挿入はラット用喉頭鏡 (夏目製作所) を用いて素早く実施した。投与後は呼吸異常等の有無など一般状態を確認した。また、生理食塩液で希釈した墨汁を同様の方法で投与し投与液の肺内の分散状態を目視で確認した。

次に、被験物質 6 剤について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施した。12 週齢の雄

性 F344 ラットにイソフルラン吸入麻酔下で各被験物質投与液（媒体：生理食塩液）を 2.0 mL/kg の容量で 1 日 4 回（1 時間間隔）投与した。被験物質の投与量は全身吸入暴露法の LC50 値等を参考に既報のラット呼吸量³⁾を用いて換算した LD50 値をもとに設定した（Table 1, 2）。投与直後から投与後 14 日まで一般状態観察を行った。途中死亡・瀕死動物及び投与後 14 日の生存動物は全例とも解剖に供した。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物の飼育・処置に当たっては、動物愛護の精神に則るとともに倫理規定に十分配慮し、気管内投与は麻酔下で実施し、解剖時には麻酔下での安楽死を施すなど、苦痛軽減に努めた。

B2. 用量設定と外挿性検討

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。

B3. *in vitro* 試験の実施

B3-1. 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®	LC50 (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

B3-2. 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。

B3-3. 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 μ L ずつ移し替え、吸光度計にて 540 nm の波長で計測を行った。

B3-4. 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

C1. ラットを用いた TIPS 法

気管内投与の技術及び投与条件確認のため、一回当たり 0.2~2.0 mL/kg 体重の生理食塩液を投与した結果。一般状態の異常及び死亡例は見られなかった。生理食塩液で希釈した墨汁を同様の方法で投与した結果、1.0 mL/kg 体重以上の投与群で投与液が肺全葉に拡散するのが確認された。

被験物質 6 剤の TIPS 法で得られた LD₅₀ 値 (LD₅₀ (TIPS)) 及び全身吸入暴露における LC₅₀ 値 (LC₅₀ (inhalation)) を比較した結果を Table 2 に示す。*N,N*-ジメチルアセタミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミドの LD₅₀ (TIPS) と LC₅₀ (inhalation) の差異は 4 倍以内であった、また、*tert*-ブチルアルコールの差異は 0.18~0.36 倍であった、一方、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンでは 0.04~0.17 倍と何れも 4 分の 1 (0.25 倍) を超える差異が認められた。

C2. 用量設定と外挿性検討

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。

C3. in vitro 試験の実施

C3-1. 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。

C3-2. 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

D1. ラットを用いた TIPS 法

気管内投与の技術及び投与条件確認の結果、生理食塩液を最大 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、本条件で TIPS 法を実施することは可能であると確認された。また、墨汁の投与により 0.5 mL/kg より少ない容量では投与液の肺への拡散に偏りがみられたことから、TIPS 法による気管内投与急性毒性試験は 2.0 mL/kg の容量で実施することとした。

被験物質 6 剤について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施した結果、*N,N*-ジメチルアセタミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミドの LD₅₀ (TIPS) と LC₅₀ (inhalation) の差異は 4 倍以内であった、この 2 剤は津田らの先行研究においても検討されており、今回得られた結果と先行研究結果との間に差異は認められず²⁾、良好な施設間の

再現性が確認された。

一方、*tert*-ブチルアルコールの LD₅₀ (TIPS) と LC₅₀ (inhalation) の差異は 0.18~0.36 倍であったが、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンではより大きな差異が認められた。津田らの先行研究では LD₅₀ (TIPS) と LC₅₀ (inhalation) の差は概ね 4 倍以内であったことから、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンの 3 剤については、全身吸入暴露法に比べて TIPS 法を用いて実施した本実験条件の方がより毒性が強く表れている可能性が考えられた。今後、新たに 6~10 物質について気管内投与急性毒性試験を実施して LD₅₀ 値の判定及び毒性影響の検討を実施するとともに、投与液の物理化学的性状の検討や肺、気管などの呼吸器を含む諸臓器の病理組織学的検査を実施し、今回認められた TIPS 法と全身吸入暴露法の差異の要因を検討する予定である。

D2. 用量設定と外挿性検討

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。

D3. *in vitro* 試験の実施

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

E1. ラットを用いた TIPS 法

TIPS 法の投与条件を確認し、TIPS 法で得られた LD₅₀ 値を全身吸入暴露における LC₅₀ 値と比較した結果、*N,N*-ジメチルアセタミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミドの差異は 4 倍以内であった一方、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンではより大きな差異が認められた。今後、投与液の物理化学的性状の検討や肺、気管などの呼吸器を含む諸臓器の病理組織学的検査を実施し、今回認められた TIPS 法と全身吸入暴露法の差異の要因を検討する予定である。

E2. 用量設定と外挿性検討

4 時間吸入毒性試験のデータ (LD₅₀, 4 時間値) に代わる TIPS 投与方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。

E3. *in vitro* 試験の実施

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. Takasu S., Ishii Y., Namiki M., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Nohmi T., Ogawa K. Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acetyl-2,5-dimethylfuran in male *gpt* delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2023, 172, doi: 10.1016/j.fct.2022.113544.
2. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Matsushita K., Kijima A., Nohmi T., Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt* delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 168, doi: 10.1016/j.fct.2022.113365.
3. Ishii Y., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Namiki M., Takasu S., Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging, *Food Chem. Toxicol.* 2022, 161, doi: 10.1016/j.fct.2022.112851.
4. Akane H., Toyoda T., Mizuta Y., Cho YM., Ide T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *J Appl Toxicol.* 2022, 42, 1603-17.
5. Toyoda T., Kobayashi T., Miyoshi N., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci.* 2022, 47, 457-66.
6. Yamada T., Toyoda T., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Cho YM., Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci.* 2022, 189, 51-61.
7. 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- κ B Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model Nutrients 14, 42 (2022) <https://doi.org/10.3390/nu14010042>
8. 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>
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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. 瀧本憲史, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 満元達也, 渋谷 淳, 小川久美子, アセトアミドのラット肝発がん機序における chromoanagenesis の関与の可能性, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
2. 高須伸二, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 相馬明玲, 能美健彦, 小川久美子, *gpt delta* ラットを用いた肝中期試験法による 6-methoxyquinoline の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性の評価, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
3. 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験による 2-isopropyl-N-2,3-trimethyl butylamide (ITB) の評価, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
4. 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, Acetamide 投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
5. 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子, 全ゲノム解析から明らかになった acetamide のラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子 *c-Myc* の関与, 第51回日本環境変異原ゲノム学会2022年11月, 広島
6. 瀧本 憲史, 石井 雄二, 満元 達也, 並木 萌香, 高須 伸二, 渋谷 淳, 小川 久美子, ラット肝細胞における Acetamide の大型小核誘発機序に関する研究, 第51回日本環境変異原ゲノム学会 2022年11月, 広島
7. 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 並木萌香, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序, 第51回日本環境変異原ゲノム学会2022年11月, 広島
8. 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志, フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価, 第51回日本環境変異原ゲノム学会2022年11月, 広島
9. 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, Acetamide の肝発がん機序に関する検討: 血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
10. 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, Acetamide が誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
11. Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
12. Toyoda T., Yamada T., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
13. Ogawa K., Akagi J., Mizuta Y., Akane H., Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
14. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, 結晶子径6 nmの超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性, 日本薬学会第143年会 2023年3月, 札幌

15. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 渡邊正悟, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之, 単環芳香族アミンの新規尿中代謝物はラット膀胱上皮におけるALDH1A1の発現を誘導する, 日本農芸化学会2023年度大会 2023年3月, Web開催
16. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子, ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
17. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, γ -H2AX免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
18. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割とCD44との関連, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
19. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 薬剤性腎障害の慢性化病変におけるCD44陽性尿細管の病態生理学的意義, 第5回医薬品毒性機序研究会 2022年12月, 東京
20. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介, コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価 第44回日本バイオマテリアル学会, 2022年11月, 東京都
21. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性, 第59回全国衛生化学技術協議会年会 2022年11月, 川崎
22. 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出, 第81回日本癌学会学術総会 2022年9月, 横浜
23. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子, 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における γ -H2AXの役割, 第81回日本癌学会学術総会 2022年9月, 横浜
24. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索, 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2022年8月, 東京
25. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介, コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価, 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2022年8月, 東京
26. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之, 細胞毒性を有するo-Toluidineとo-anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する, 第29回日本がん予防学会総会 2022年7月, 京都
27. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子, 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
28. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, γ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
29. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いたCD44の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
30. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, ナノサイズ酸化チタン(IV)の毒性研究, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌

31. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, AKIからCKDへの移行におけるCD44の役割とバイオマーカーとしての応用, 第65回日本腎臓学会学術総会 2022年6月, 神戸
32. 森川朋美, 豊田武士, 赤根弘敏, 松下幸平, 小川久美子, ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験, 日本食品化学学会第28回総会・学術大会 2022年5月, 東京
33. 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
34. 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)
35. 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)
36. 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
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

参考文献

- 1) Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci.* 110(8):2485-2492. 2019.
- 2) 津田 洋幸. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書 化学物質リスク研究事業「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」平成31年度～令和3年度総合研究報告書. 2022.
- 3) Bide RW, Armour SJ, Yee E. Allometric respiration/body mass data for animals to be used for estimates of inhalation toxicity to young adult humans. *J Appl Toxicol.* 20(4):273-90. 2000.