

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5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。昨年度より、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、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ている。本年度は水溶性物質8種に加えて有機溶媒などの非水溶性物質10種についてもLC₅₀の検討を行った。加えて、昨年度及び本年度に得られたLC₅₀について、4時間ラット吸入ばく露試験におけるLD₅₀との相関解析を行った。その結果、非水溶性物質についてもA549 NRU assayによってLC₅₀が得られることをはじめて明らかにした。また水溶性物質においてLC₅₀（A549 NRU assay）がLD₅₀（4時間ラット吸入ばく露試験）と正の相関が得られたことから、A549 NRU assayが*in vitro*投与量設定法として有用であることが確認できた。

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、全身吸入ばく露法は大規模なばく露装置が必要となるため、実施可能な施設は世界的にみてもわずかである。そこで、全身吸入ばく露法の代替法として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) を用いることとするが、その用量設定のために多数のラットを用いることは 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の観点から適切ではない。そこで、本研究では細胞株を用いた *in vitro* 法により LC₅₀ を推定し、少ない匹数で TIPS 法を行うための、*in vitro* 投与濃度設定試験を開発する。その方法として、取り扱いが簡便でかつヒトの肺胞上皮由来であるヒト肺腺癌細胞株(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。

昨年度の研究で、我々はラットを用いた 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い、TIPS 法における LD₅₀ 値と良好な相関が得られている。本年度は A549 NRU assay の汎用性を検証するために、水溶性物質に加え非水溶性物質についても新たに A549 NRU assay で検討を実施した。

B. 研究方法

[被験物質及び細胞株]

本年度において、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、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 被験物質及び使用した培地並びに LC₅₀(A549 NRU assay)と LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験換算値)

No.	Chemicals	CAS RN	Water soluble	Vehicle	FBS	LC ₅₀ (μL/mL) A549 NRU assay	Estimated LD ₅₀ (mg/kg) in TIPS ^c
1 ^a	1-Chloro-2-propanol	127-00-4	○	RPMI-1640	+	34.96	311.8
2 ^a	1-Nitropropane	108-03-2	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	11.18	89.1
3 ^a	1,2-Dichloroethane	107-06-2	×	2% DMSO in RPMI-1640	-	6.3	62.7
4 ^b	1,2-Dichloropropane	78-87-5	×	2% DMSO in RPMI-1640	-	2.88	26.7
5 ^a	2-Butoxyethanol	111-76-2	○	RPMI-1640	+	23.33	168.2
6 ^a	2,3-Butanedione	431-03-8	○	RPMI-1640	+	10.2	80.7
7 ^a	Acetylacetone	123-54-6	○	RPMI-1640	+	16.07	124.9
8 ^a	Allyl acetate	591-87-7	×	1% Ethanol in RPMI-1640	-	15.99	118.6
9 ^b	Carbon tetrachloride	56-23-5	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	2.25	28.7
10 ^b	Chloroacetone	78-95-5	○	RPMI-1640	+	0.1	0.9
11 ^a	Cyclohexanone	108-94-1	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	16.86	127
12 ^a	Dichloromethane	1975-97-2	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	12	127.2
13 ^a	Glycidol	556-52-5	○	RPMI-1640	+	12.27	112.2
14 ^a	Methacrylonitrile	126-98-7	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	22.14	141.7
15 ^a	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	110-18-9	○	RPMI-1640	+	4.91	30.5
16 ^a	<i>o</i> -Chlorophenol	95-57-8	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	0.98	9.9
17 ^a	Polyacrylic Acid 5000	9003-1-4	○	RPMI-1640	+	105.3	84.24
18 ^a	Quinoline	91-22-5	×	2% Ethanol in RPMI-1640	-	1.41	12.3

^a Use 6-well polystyrene plate and ^b Use 6-well glass plate.

^c Estimated LD₅₀ value (mg/kg) in TIPS are calculated from the following formula based on a rat body weight of 250 g
 $LD_{50} \text{ value (mg/kg)} = (LC_{50} (\mu\text{L/mL}) \times 2 \times \text{Density}) \times 0.25$

[A549 NRU assay]

A549 NRU assay の概要について、図 1 に示す。

Day 0 において、6-well プレート(水溶性物質の場合はポリスチレン製、非水溶性物質の場合はガラス製)に A549 細胞を 2 x 10⁵ 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(水溶性物質の場合は 10%FBS 含有 RPMI-1640、非水溶性物質の場合は、2% DMSO 含有 RPMI-1640(1,2-Dichloropropane)、1%エタノール含有 RPMI-1640(Allyl acetate)、2%エタノール含有 RPMI-1640(1-Nitropropane, Carbon tetrachloride, Cyclohexanone, Dichloromethane, Methacrylonitrile, *o*-Chlorophenol, Quinoline)) を well 内にそれぞれ添加した(2 ml/well; 2 wells/被検物質)。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。

培地を吸引し、さらに PBS で 2 回洗浄後、調製した Neutral red 含有 RPMI 溶液(Neutral red 最終濃度 0.33%)を well 内に添加した。その後、37℃の 5%CO₂ インキュベーターにて 3 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 ずつ加えプレートを shaking することで細胞内に取り込まれた Neutral red を回収した。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。

なお、各被験物質について、2 回以上独立した試験を行った。

[LC₅₀ の算出]

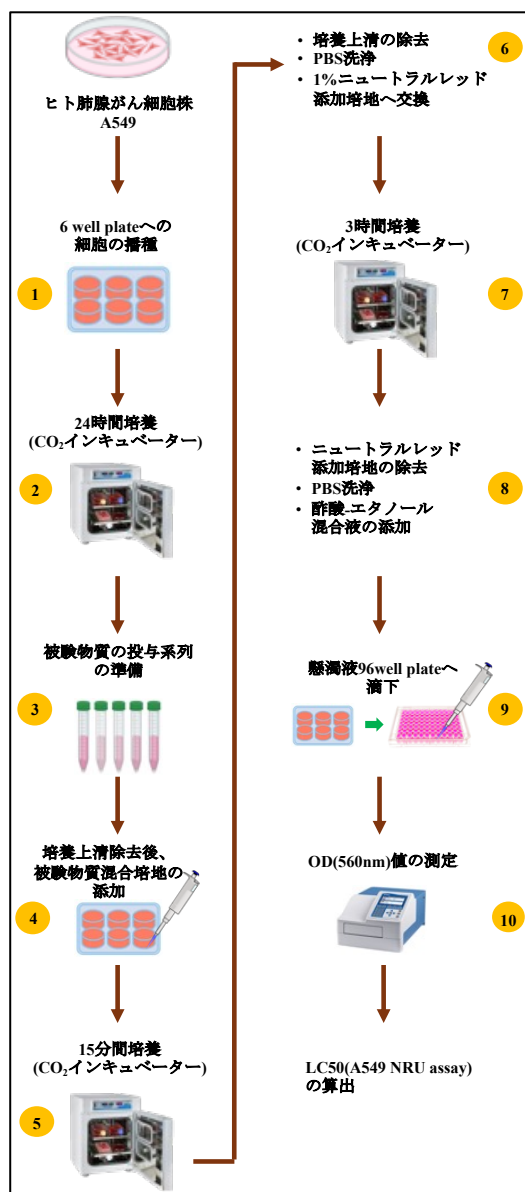
A549 NRU assay にて得られた吸光度について、近似曲線を GraphPad Prism software で解析し、LC₅₀ を算出した。詳細な方法として、近似曲線の投与濃度を Log 変換した値を用いて、非線形回帰(カーブフィット法)で得られた値を log(agonist) vs normalized response – Variable slope 解析にて LC₅₀ を算出した。

[A549 NRU assay で得られた LC₅₀ 値の検証]

昨年度および本年度で得られた各被験物質の A549 NRU assay における LC₅₀ 値について、毒性情報などの情報が化学物質毎に収載されている Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) より 4 時間ラット吸入ばく露試験における LD₅₀ 値を収集し、LC₅₀ (A549 NRU assay) および LD₅₀ (4 時間ラット吸入ばく露試験) との相関比較(Pearson の相関分析)を実施し、得

られた結果を散布図として作図した。

図 1 A549 NRU assay の概要



C. 研究結果

[A549 NRU assay]

A549 NRU assayを実施し得られた各被験物質のLC₅₀およびLC₅₀より算出したTIPS法のLD₅₀ (換算値) を表 1 に示す。

1-Chloro-2-propanol の LC₅₀ は 34.96 μ L/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 311.8 mg/kg であった。1-Nitropropa

ne の LC₅₀ は 11.18 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 89.1 mg/kg であった。1,2-Dichloroethane の LC₅₀ は 6.30 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 62.7 mg/kg であった。1,2-Dichloropropane の LC₅₀ は 2.88 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 26.7 mg/kg であった。2-Butoxyethanol の LC₅₀ は 23.33 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 168.2 mg/kg であった。2,3-Butanedione の LC₅₀ は 10.20 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 80.7 mg/kg であった。Acetylacetone の LC₅₀ は 16.07 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 124.9 mg/kg であった。Allyl acetate の LC₅₀ は 15.99 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 118.6 mg/kg であった。Carbon tetrachloride の LC₅₀ は 2.25 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 28.7 mg/kg であった。Chloroacetone の LC₅₀ は 0.10 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 0.9 mg/kg であった。Cyclohexane の LC₅₀ は 16.86 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 127.0 mg/kg であった。Dichloromethane の LC₅₀ は 12.00 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 311.8 mg/kg であった。Glycidol の LC₅₀ は 12.27 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 112.2 mg/kg であった。Methacrylonitrile の LC₅₀ は 22.14 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 141.7 mg/kg であった。N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine の LC₅₀ は 4.91 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 30.5 mg/kg であった。o-Chlorophenol の LC₅₀ は 0.98 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値)

は 9.9 mg/kg であった。Polyacrylic Acid 5000 の LC₅₀ は 105.30 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 84.2 mg/kg であった。Quinoline の LC₅₀ は 1.41 uL/mL であり、TIPS 法における LD₅₀ (換算値) は 12.3 mg/kg であった。

表 2 昨年度及び本年度使用被験物質の LC₅₀(A549 NRU assay)と LD₅₀(4 時間ラット吸入ばく露試験換算値)

No.	Chemicals	CAS RN	Water soluble	LC ₅₀ (mg/ml) A549 NRU assay	LD ₅₀ 4-hours rat	
					ppm ^c	mg/kg ^d
1 ^a	1-Chloro-2-propanol	127-00-4	○	38.97	1000	41
2 ^a	1-Nitropropane	108-03-2	×	11.14	6200	237
3 ^a	1,2-Dichloroethane	107-06-2	×	7.84	1000	42
4 ^b	1,2-Dichloropropane	78-87-5	×	3.33	6059	294
5 ^a	2-Butoxyethanol	111-76-2	○	21.03	486	25
6 ^a	2-Dimethylaminoethanol	108-01-0	○	2.59	1641	63
7 ^a	2,3-Butanedione	431-03-8	○	10.09	5200	192
8 ^a	Acetylacetone	123-54-6	○	15.62	1224	53
9 ^a	Acrylic acid	1979/10/7	○	1.88	1730	54
10 ^a	Allyl acetate	591-87-7	×	14.83	250	11
11 ^b	Carbon tetrachloride	56-23-5	×	3.58	8000	528
12 ^a	Chloroacetone	78-95-5	○	0.12	121	5
13 ^a	Cyclohexanone	108-94-1	×	15.88	8000	337
14 ^a	Dichloromethane	1975/9/2	×	15.9	18371	670
15 ^a	Glycidol	556-52-5	○	14.02	580	18
16 ^a	Hexahydro-1H-azepine	111-49-9	○	1.39	604	26
17 ^a	Methacrylonitrile	126-98-7	×	17.71	328	9
18 ^a	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	110-18-9	○	3.81	1318	66
19 ^a	N,N-Dimethylacetamide	127-19-5	○	141.89	1238	46
20 ^a	N,N-Dimethylformamide	1968/12/2	○	109.18	7500	235
21 ^a	o-Chlorophenol	95-57-8	×	1.24	2270	125
22 ^a	Polyacrylic Acid 5000	9003/1/4	○	10.53	8	18
23 ^a	Quinoline	91-22-5	×	1.53	N/A	N/A

N/A: Not available, ^a Use 6-well polystyrene plate, ^b Use 6-well glass plate.

^c Information on the LD₅₀ of 4-hours rat inhalation (ppm) of these chemicals was obtained from Pubchem.

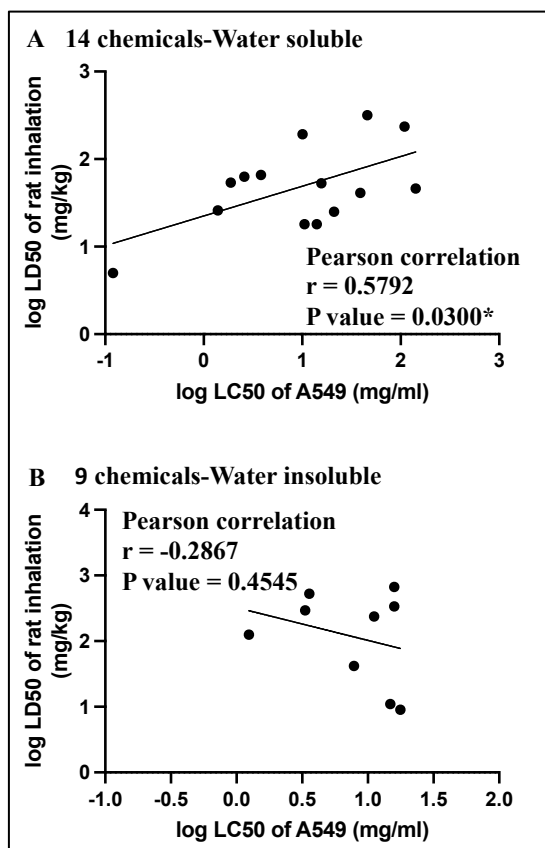
^d LD₅₀ value (mg/kg) are calculated from the following formula based on a rat body weight of 250g.
LD₅₀ value (mg/kg) = 0.042*1000*LC₅₀ (ppm)*(MW/24.45/1000)*0.25

[A549 NRU assay で得られた LC₅₀ 値の検証]

昨年度及び本年度にて得られた LC₅₀ (A549 NRU assay) および Pubchem より収集した LD₅₀ (4 時間ラット吸入ばく露試験)を表 2 に示す。水溶性物質 (14 種) および非水溶性物質 (9 種) ごとに Pearson の相関解析を行い、得られた散布図を図 2 に示す。Pearson の相関解析の結果、水溶性物質では r 値が 0.5792 と正の相関性を示し、加えて P 値が 0.0300 と有意な相関が示された (図 2A)。非水溶性物質では r 値が -0.2867 と弱い負の相関が示され、P 値が 0.4545 であり、統計学的有意差はみられな

かった (図 2B)。

図 2 水溶性物質(A)および非水溶性物質(B)における LC_{50} (A549 NRU assay)および LD_{50} (4 時間ラット吸入ばく露試験)の相関比較



D. 考察

本研究では昨年度より、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* 細胞毒性試として知られている Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay (OECD GD 129)の一部を改変した A549 NRU assay を実施している。 LC_{50} (A549 NRU assay) を基に実施した TIPS 法 (赤根ら) で得られた LD_{50} は、おおむね相関がみられたことから、A549 NRU assay は TIPS 法の LD_{50} を決定するための *in vitro* 代替投与量設定試験法として有用であることが示唆されている。

本年度は、昨年度に引き続き水溶性物質の LC_{50} を検討することで TIPS 法の LD_{50} を決定すると共に、新たに有機溶媒などの非水溶性物質にて A549 NRU assay を実施した。その結果、水溶性溶媒のみならず、非水溶性溶媒についても LC_{50} を算出することが出来た。したがって、これまで検討が困難であった有機溶媒などの非水溶性物質についても、A549 NRU assay によって LC_{50} を算出できることが明らかとなった。

また、水溶性物質において、A549 NRU assay で得られた LC_{50} は 4 時間ラット吸入ばく露試験における LD_{50} と正の相関が得られたことから、A549 NRU assay が水溶性物質における有用な LC_{50} の *in vitro* 評価法であることが明らかとなった。一方、非水溶性物質については負の弱い相関がみられた。非水溶性物質の官能基や溶解度、細胞障害性の有無などの化学性状ごとに相関解析を行うことで、A549 NRU assay の精緻化を図る予定である。

E. 結論

本年度は、昨年度構築した TIPS 法の *in vitro* 投与量設定試験である A549 NRU assay の汎用性および *in vivo* 評価系における LD_{50} 値との相関比較を実施した、その結果、A549 NRU assay により有機溶媒などの非水溶性物質においても LC_{50} を算出することが可能となった。また、水溶性物質については LC_{50} (A549 NRU assay)が LD_{50} (4 時間ラット吸入ばく露試験)と緩やかな正の相関を示された。今後も引き続き、A549 NRU assay の汎用性を検証すると共に、非水溶性物質における知見を蓄積することで、A549 NRU assay の精緻化を図る。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Gi M, Suzuki S, Kanki M, Yokohira M, Tsukamoto T, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Qiu G, Guo R, Wanibuchi H. A novel support vector machine-based one-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. Arch. Toxicol. #38762666, 2024, In press.
2. Vachiraarunwong A, Gi M (Corresponding author), Kiyono T, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Guo R, Yamamoto T, Kakehashi A, Shiota M, Wanibuchi H. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. Arch. Toxicol. #38630284, 2024, In press.
3. Zhang QY, Zhong MT, Gi M, Chen YK, Lai MQ, Liu JY, Liu YM, Wang Q, Xie XL. Inulin alleviates perfluorooctanoic acid-induced intestinal injury in mice by modulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Environ Pollut 2023, 342:123090.
4. Yamamoto T, Gi M (Co-first author), Yamashita S, Suzuki S, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Kakehashi A, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. DNA Methylation Aberrations in Dimethylarsinic Acid-Induced Bladder Carcinogenesis. Cancers (Basel). 2023,15, 5274.
5. Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. Toxicology 2023, 488:153483.
6. Yamamoto S, Kato M, Takeyama Y, Azuma Y, Yukimatsu N, Hirayama Y, Otoshi T, Yamasaki T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H, Uchida J. Irradiation plus myeloid-derived suppressor cell-targeted therapy for overcoming treatment resistance in immunologically cold urothelial carcinoma. Br J Cancer 2023, 128(12):2197-2205.
7. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. Biomolecules 2023, 14(1), 36.
8. Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid induces bladder carcinogenesis via the amphiregulin pathway. Toxicol Lett 2023, 384:128-135.
9. Michiba A, Gi M, Yokohira M, Sakurai E, Teramoto A, Kiriya Y, Yamada S, Wanibuchi H, Tsukamoto T. Early detection of genotoxic hepatocarcinogens in rats using gammaH2AX and Ki-67: prediction by machine learning. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 2023, 195(2):202-212.
10. Beal MA, Chen G, Dearfield KL, Gi M,

Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell DP, Parsons BL et al: Interpretation of in vitro concentration-response data for risk assessment and regulatory decision-making. Report from the 2022 IWGT quantitative analysis expert working group meeting. Environ Mol Mutagen 2023.

11. Yamaguchi T., Gi M. (Co-first author), Fujioka M., Suzuki 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, 123-129.

F.2 学会発表

1. 藤岡正喜、魏民、芝野佳奈、邱桂鈺、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、鈴木周五、鰐淵英機. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与法の *in vitro* 投与量設定法の開発 (第 50 回産業中毒・生物学

的モニタリング研究会、令和 5 年 11 月 18 日、東京)

2. Min Gi, Masaki Fujioka, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Arpamas Vachiraarunwong, Runie Guo, Anna Kakehashi, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an in vitro dosing assay for trans-tracheal intrapulmonary spraying administration of chemicals in rats (第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、令和 6 年 1 月 24 日、東京)

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