別添4.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

令和6年度 分担研究報告書

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

ラットを用いたTIPS法による気管内投与急性吸入毒性試験及び呼吸器の毒性評価並びに
全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析に関する研究

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
研究代表者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究要旨

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。本研究課題では、汎用性の高い経気管肺内噴霧投与方法（intra-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法）による気管内投与毒性試験について、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とする。

令和6年度は、令和5年度に実施した TIPS 法による急性毒性試験の病理組織学的検査及び新たに10物質について TIPS 法による LD₅₀ 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。これまでに TIPS 法による試験を実施した24剤のうち、TIPS 法の LD₅₀ が吸入暴露法の0.5～2倍であったものが13剤、0.25～0.5倍であったものが5剤、0.25倍以下であったものが6剤であった。この結果は、昨年度までの結果と同様の傾向であったことから、TIPS 法では全身吸入暴露法と比較して毒性が同等、あるいは強く表れる物質があることが確認された。また、昨年度までの検討と同様に TIPS 法の LD₅₀ と Neutral red assay 法の LD₅₀ の間に強い正の相関性が認められた。各剤について TIPS 法の LD₅₀ に基づいた GHS 分類を行い、既報の吸入による急性毒性の有害性区分と比較したところ、18剤では TIPS 法による有害性区分が既報の区分と概ね一致し、6剤では TIPS 法でより強い有害性区分に分類された。後者の化合物は、皮膚刺激性の GHS 分類においても強い有害性区分に分類されており、TIPS 法の結果に基づいて GHS 分類した場合、細胞傷害性や刺激性が強い物質は、吸入試験に比較して強い有害性区分に分類される可能性があると考えられた。

A. 研究目的

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（GHS）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（intra-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費研究では、TIPS 法による LD₅₀ の暴露量と吸入暴露法による 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。

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について、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とする。本年度は、令和 5 年度に実施した TIPS 法の病理組織学的検査及び新たに 10 物質について TIPS 法による LD₅₀ 値の判定及び毒性影響の検討を実施した。

B. 研究方法

B-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における LD₅₀ の判定

新規被験物質として 1-クロロ-2-プロパノール（CAS RN: 127-00-4）、2-メトキシエ

タノール（CAS RN: 109-86-4）、2-ニトロプロパン（CAS RN: 79-46-9）、アセトニトリル（CAS RN: 75-05-8）、酢酸アリル（CAS RN: 591-87-7）、アリルアルコール（CAS RN: 107-18-6）、アニリン（CAS RN: 62-53-3）、2-ブトキシエタノール（CAS RN: 111-76-2）、マロニトリル（CAS RN: 109-77-3）及びメチルヒドラジン（CAS RN: 60-34-4）について TIPS 法による LD₅₀ 値を判定した。

投与は 12 週齢の F344 ラットまたは 8 週齢の SD ラットにイソフルラン吸入麻酔下（導入 4%）で、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）及び喉頭鏡（夏目製作所）を用いて 1 日 4 回（1 時間間隔）投与した。投与容量は 2.0 mL/kg とした。投与量は、過去に報告された全身吸入暴露法の LC₅₀ 値を既報のラット呼吸量³⁾を用いて換算し、*in vitro* 試験の結果等も考慮して設定した。

また、本法において難水溶性物質の投与を想定し、人工肺サーファクタントの新規投与媒体としての可能性を検討した。人工肺サーファクタントは、既報（YAKUGAKU ZASSHI 2012. 132(7) 817—822）⁴⁾を参考に調整し、キシレンの溶解性を検討した。

B-2) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における呼吸器の毒性評価並びに全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析

令和 5 度実施した TIPS 法 8 試験（2-ブトキシエタノール（CAS RN: 111-76-2）、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（CAS RN: 110-18-9）、クロロアセトン（CAS RN: 78-95-5）、2,3-ブタンジオン（CAS RN: 431-03-8）、o-クロロフェノール（CAS RN: 95-57-8）、メタクリロニトリル（CAS RN: 126-98-7）、1-ニトロプロパン

(CAS RN: 108-03-2) 及びシクロヘキサノン (CAS RN: 108-94-1)) 並びに令和 6 度を実施した TIPS 法 5 試験 (1-クロロ-2-プロパノール、2-ニトロプロパン、酢酸アリル、アリルアルコール及びアニリン) について、気管、気管支、肺、肝臓、脾臓、腎臓の病理組織学的検査を実施した。また、酢酸アリル及びアリルアルコールについては、さらに胃、小腸及び大腸の病理組織学的検査を実施した。

B-3) TIPS 法における LD₅₀ と全身吸入暴露試験法における LD₅₀ 及び *in vitro* Neutral red assay における LC₅₀ の比較

令和 6 年度までに実施した被験物質計 24 剤について、TIPS 法で求められた LD₅₀ (LD₅₀ (TIPS)) を全身吸入暴露試験法の LD₅₀ (LD₅₀ (inhalation)) 及び *in vitro* Neutral red assay から求めた LD₅₀ (LD₅₀ (NRU assay)) と比較した。さらに、毒劇物判定における本法の有用性を検討する目的で、LD₅₀ (TIPS) を基に GHS 分類における気体の判定基準に準じて各被験物質を分類し、既報の吸入による急性毒性、皮膚刺激性及び眼刺激性に関する GHS 区分と比較した。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

C-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における呼吸器の

毒性評価並びに全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析

令和 6 年度までに実施した被験物質 24 剤について、投与後 3 日までにみられた死亡例における一般状態所見 (24 剤) を Table 1-1~1-4 に、気管、気管支、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、小腸及び大腸の病理組織学的所見 (19 剤) を Table 2-1~2-5 に示す。

[一般状態]

投与後の一般状態観察において、メタクリロニトリルを除いた 23 剤で、呼吸不整がみられた。また、12 剤 (o-クロロフェノール、ヘキサヒドロ-1H-アゼピン、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、2,3-ブタンジオン、シクロヘキサノン、2-イソプロトキシエタノール、tert-ブチルアルコール、アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド) ではさらに重度の呼吸困難が認められた。

その他、アニリンでチアノーゼ、2-ブトキシエタノールで蒼白及び赤色尿、2-イソプロトキシエタノールで赤色尿、1-ニトロプロパンで自発運動低下、傾眠及び歩行失調、2-ニトロプロパンで蒼白、体温低下及び自発運動低下、1-クロロ-2-プロパノールで自発運動低下及び傾眠、メチルヒドラジンで強直性痙攣、マロニトリルで振戦、間代性痙攣及び腹臥位/横臥位、メタクリロニトリルで腹臥位/横臥位及び間代性痙攣、酢酸アリルで泥状便、腹臥位/横臥位及び虚脱、アリルアルコールで泥状便、自発運動低下及び虚脱が観察された。

[病理組織学的検査]

19 剤の病理組織学的検査において、以下の所見が認められた。

①呼吸器系：気管、気管支、細気管支及び肺胞上皮の壊死、肺の急性炎症、うっ血、

水腫、出血が19剤で共通して観察された。

②肝臓：N,N-ジメチルホルムアミド、2-ブトキシエタノール、2-ニトロプロパン及び1-クロロ-2-プロパノールで小葉中心性肝細胞壊死、酢酸アリル及びアリルアルコールで小葉周辺性肝細胞壊死が認められた。

③脾臓：2-ブトキシエタノールでうっ血、褐色色素沈着、髄外造血亢進、メタクリロニトリルでうっ血、褐色色素沈着がみられた。

④腎臓：2-ブトキシエタノール及び2-ニトロプロパンでヘモグロビン/赤血球円柱が認められた。

⑤消化器系：酢酸アリル及びアリルアルコールで十二指腸、結腸及び直腸粘膜の壊死、盲腸及び直腸における水腫が認められた。

また、キシレンを生理食塩水及び人工調整サーファクタントに添加した結果、キシレンは生理食塩水ではほとんど溶解しなかった一方、人工サーファクタントでは200 mg/mL程度の濃度まで懸濁することができた。

C-2) TIPS 法における LD₅₀ と全身吸入暴露試験法における LD₅₀ 及び *in vitro* Neutral red assay における LC₅₀ の比較

令和6年度までに実施した被験物質24剤について、LD₅₀(TIPS)をLD₅₀(inhalation)並びにLD₅₀(NRU assay)と比較した結果をTable 3に示す。24剤のうち、LD₅₀(TIPS)がLD₅₀(inhalation)の0.5~2倍であったものが13剤、0.25~0.5倍であったものが5剤、0.25倍以下であったものが6剤であった。

LD₅₀(TIPS)とLD₅₀(inhalation)の相関性を検討した結果、中程度の正の相関($r=0.52$)が認められた。一方、LD₅₀(TIPS)とLD₅₀(NRU assay)の比較では強い正の相関($r=0.94$)が認められ、線形近似

($R^2=0.87$)が得られた。

LD₅₀(TIPS)に基づくGHS区分と吸入による急性毒性、皮膚刺激性及び眼刺激性に関するGHS区分との比較をTable 4に示す。

LD₅₀(TIPS)に基づくGHS区分を急性吸入毒性に基づく区分と比較した結果、*o*-クロロフェノール、ヘキサヒドロ-1H-アゼピン、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン及び*tert*-ブチルアルコールの6剤では、LD₅₀(TIPS)に基づくGHS区分が既報のGHS区分よりも強い有害性区分に分類されたが、その他の18剤については有害性の区分が概ね一致した。さらに、TIPS法でより強い有害性区分に分類された6剤のうち、*tert*-ブチルアルコールを除く5剤は*in vitro* Neutral red assayで低値を示す物質であり、既報の皮膚及び眼刺激性に基づくGHS区分において強い有害性区分(GHS区分1)に分類されるものと一致した。

D. 考察

D-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における呼吸器の毒性評価並びに全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析

令和6年度までにTIPS法による気管内投与急性吸入毒性試験及び病理組織学的検査を実施した19剤は、いずれも投与日から投与後3日の死亡例において気管から肺胞上皮にかけて壊死が広範囲に観察され、肺の急性炎症、うっ血、水腫、出血がみられた。*in vitro* Neutral red assayにおいて細胞毒性が強い上位6剤(Table 1-1及び2-1：クロロアセトン、*o*-クロロフェノール、ヘキサヒドロ-1H-アゼピン、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びテトラメチルエチレンジアミン)は気管から肺に特に重度の壊死が認められ、細胞毒性の強さ

との関連性が示唆された。上記に加えて 6 剤 (Table 1-2 : 2,3-ブタンジオン、シクロヘキサノン、tert-ブチルアルコール、アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド 4000 mg/kg 群及び N,N-ジメチルアセトアミド) では一般状態観察において呼吸困難がみられた。呼吸器系以外への影響を示唆する一般状態所見や、組織学的検索を行った肝臓、脾臓及び腎臓における死因と考えられる所見が認められなかったことから、これらの物質は TIPS 法による曝露においては呼吸器系への影響が主な毒性標的であり、被験物質曝露による気道、肺胞上皮の直接傷害に起因し呼吸困難に至ったものと考えられた。

呼吸器系以外の影響として、以下の所見が認められた。

①血液系への影響を示唆する所見として、アニリンでチアノーゼ、2-ブトキシエタノールで蒼白、赤色尿、脾臓のうっ血、褐色色素沈着及び髄外造血亢進、腎臓のヘモグロビン/赤血球円柱、2-イソブトキシエタノールで赤色尿、2-ニトロプロパンで蒼白、腎臓のヘモグロビン/赤血球円柱、メタクリロニトリルで脾臓のうっ血及び褐色色素沈着が認められた。

②麻酔作用に関する所見として、1-ニトロプロパンで自発運動低下、傾眠及び歩行失調、2-ニトロプロパンで自発運動低下、1-クロロ-2-プロパノールで自発運動低下及び傾眠が認められた。

③神経系への影響を示唆する所見として、メチルヒドラジンで強直性痙攣、メタクリロニトリルで間代性痙攣、マロノニトリルで振戦及び間代性痙攣、酢酸アリル及びアリルアルコールで虚脱が認められた。

④肝臓への影響として、N,N-ジメチルホルムアミド、2-ブトキシエタノール、2-ニトロプロパン、1-クロロ-2-プロパノールで小葉

中心性肝細胞壊死、酢酸アリル及びアリルアルコールで小葉周辺性肝細胞壊死が認められた。

⑤消化器系への影響として、酢酸アリル及びアリルアルコールで十二指腸、結腸及び直腸粘膜の壊死、盲腸及び直腸の水腫が認められた。

これらの物質は、一般状態観察において呼吸困難は認められず、病理組織学的検査で認められた気管及び肺における壊死は軽度な傾向がみられた。特に、LD₅₀ (TIPS) が LD₅₀ (NRU assay) よりも低値であった 7 剤 (メチルヒドラジン、メタクリロニトリル、マロノニトリル、酢酸アリル、アリルアルコール、2-ニトロプロパン、1-クロロ-2-プロパノール) では、上記の神経系や肝臓への影響が *in vivo* 試験における死亡率に関与している可能性が示唆された。

また、人工肺サーファクタントはキシレンの溶解性を著しく改善したことから、本法において難水溶性物質を投与するための新規投与媒体となる可能性が考えられた。今後、人工肺サーファクタントを投与媒体として用いた際の肺内分布や生体影響、至適濃度などを検討することで、投与媒体としての妥当性を検討する。

D-2) TIPS 法における LD₅₀ と全身吸入暴露試験法における LD₅₀ 及び *in vitro* Neutral red assay における LC₅₀ の比較

本年度までに実施した 24 剤のうち、LD₅₀ (TIPS) が LD₅₀ (inhalation) の 0.5~2 倍であったものが 13 剤、0.25~0.5 倍であったものが 5 剤、0.25 倍以下であったものが 6 剤であり、何れの被験物質の LD₅₀ (TIPS) とも LD₅₀ (inhalation) と同程度、又は低値を示した。この結果は、昨年度までの検討結果と同様の傾向を示したことから、TIPS 法では全身吸入暴露法と比較して毒性が

同等、あるいは強く表れる物質があることが確認された。

LD₅₀ (TIPS) と LD₅₀ (NRU assay) の比較では、LD₅₀ (TIPS) は LD₅₀ (NRU assay) より高値となる傾向がみられたものの、両者の間に強い正の相関性が認められたことから、Neutral red assay は TIPS 法による急性毒性と相関することが確認され、LD₅₀ (NRU assay) は TIPS 法による急性毒性試験の投与量設定の指標となりえる可能性が示された。

さらに、毒劇物判定における本法の有用性を検討する目的で、各剤について LD₅₀ (TIPS) に基づいた GHS 分類を行い、既報の吸入による急性毒性の有害性区分と比較した。その結果、18/24 剤では TIPS 法による有害性区分が既報の区分と概ね一致し、6/24 剤では TIPS 法でより強い有害性区分に分類された。TIPS 法でより強い有害性区分に分類された 6 剤のうち、十分な急性吸入毒性情報が得られなかった *tert*-ブチルアルコールを除く 5 剤 (o-クロロフェノール、ヘキサヒドロ-1H-アゼピン、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン) は、魏らが実施した *in vitro* Neutral red assay で強い細胞毒性を示した剤であり、組織学的検索で気管及び肺に重度な呼吸上皮壊死が観察された。さらに、既報の皮膚刺激性の GHS 分類においても強い有害性区分 (GHS 区分 1) に分類されていた。以上より、TIPS 法の結果に基づいて GHS 分類した場合、細胞傷害性や刺激性が強い物質は、吸入試験に比較して強い有害性区分に分類される可能性があると考えられた。

一方、*in vitro* Neutral red assay における細胞毒性がより軽度であり、既報において皮膚刺激性に関して GHS 区分 2 以上に分類された物質は、概ね既報と同程度の有害性

区分に分類された。さらに TIPS 法では呼吸器以外の臓器に対する影響も検出可能であり、呼吸器系の軽度な傷害に加えて神経系や肝臓等への影響がみられた 7 剤で LD₅₀ (TIPS) が LD₅₀ (NRU assay) よりも低値を示した。以上のことから、本法は、呼吸器以外への影響を考慮した急性毒性の評価が可能であり、細胞毒性や刺激性と併せた評価を行うことで、毒劇物判定及び GHS 分類のための急性吸入毒性試験の代替法として有用である可能性が示された。

E. 結論

E-1) ラットを用いた TIPS 法による気管内投与急性吸入毒性試験における呼吸器の毒性評価並びに全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析

病理組織学的検査を行った物質では、いずれも死亡例の気管から肺胞上皮の壊死、肺の急性炎症、うっ血、水腫、出血が認められた。TIPS 法の結果に基づき被験物質を GHS 分類すると、細胞傷害性や刺激性が強い物質は吸入試験に比較して強い有害性区分に分類され、組織学的検査において気管から肺に特に重度の壊死が認められたことから、毒性の増強は呼吸器上皮への直接的な細胞毒性の強さとの関連性が示唆された。それ以外の物質は概ね既報と同程度の有害性区分に分類された。また、TIPS 法では呼吸器以外の臓器に対する影響も検出可能であった。特に LD₅₀ (TIPS) が LD₅₀ (NRU assay) よりも低値であった 7 剤では神経系や肝臓への影響が認められ、*in vivo* 試験における死亡率に関与している可能性が示唆された。本法は、細胞毒性や刺激性と併せた評価を行うことで、毒劇物判定及び GHS 分類のための急性吸入毒性試験の代替法として有用である可能性が示された。

E-2) TIPS 法における LD₅₀ と全身吸入暴露試験法における LD₅₀ 及び *in vitro* Neutral red assay における LC₅₀ の比較

本年度までに求められた LD₅₀ (TIPS) と LC₅₀ (inhalation) 及び LC₅₀ (Neutral red assay) を比較した結果、TIPS 法は全身吸入暴露法と比較して毒性が同等、あるいは強く表れる物質がある可能性が考えられた。また、*in vitro* の Neutral red assay における指標は TIPS 法による急性毒性とある程度相関する可能性が考えられ、急性毒性試験の投与濃度設定に用いる指標となりえる可能性が考えられたが、投与量の換算方法など、さらなる検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Takimoto N, Ishii Y, Mitsumoto T, Takasu S, Namiki M, Toyoda T, Shibutani M, Ogawa K. Involvement of nuclear atrophy of binucleated hepatocytes in the large micronucleus formation induced by rat hepatocarcinogen acetamide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2025 496:117243.
2. Uneyama, M., Toyoda, T., Doi, Y., Matsushita, K., Akane, H., Morikawa, T., Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of linalool oxide in Crl:CD(SD) rats. *J Toxicol Pathol*. 2024; 37:151-161.
3. Nakamura, K., Ishii, Y., Takasu, S., Namiki, M., Soma, M., Takimoto, N., Matsushita, K., Shibutani, M., Ogawa, K. Chromosome aberrations cause tumorigenesis through chromosomal rearrangements in a hepatocarcinogenesis rat model. *Cancer Sci*. 2024; 115: 3612-3621.
4. Bourcier, T., McGovern, T., Cavaliero, T., Ebere, G., Nishikawa, A., Nishimura, J., Ogawa, K., Pasanen, M., Vespa, A., Van der Laan, JW. ICH S1 prospective evaluation study: weight of evidence approach to predict outcome and value of 2-year rat carcinogenicity studies. A report from the regulatory authorities subgroup. *Front Toxicol*. 2024; 11:1353783.
5. Matsushita, K., Toyoda, T., Akane, H., Morikawa, T., Ogawa, K. CD44 expression in renal tubular epithelial cells in the kidneys of rats with cyclosporine-induced chronic kidney disease. *J Toxicol Pathol*. 2024; 37:55-67.
6. Akane, H., Toyoda, T., Matsushita, K., Morikawa, T., Kosaka, T., Tajima, H., Aoyama, H., Ogawa, K. Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors. *J Appl Toxicol*. 2024; 44: 1084-1103.
7. Nishikawa, A., Nagano, K., Kojima, H., Fukushima, S., Ogawa, K. Pathogenesis of chemically induced nasal cavity tumors in rodents: contribution to adverse outcome pathway. *J Toxicol Pathol*. 2024; 37:11-27.
8. Sun, Y., Saito, K., Ushiki, A., Abe, M., Saito, Y., Kashiwada, T., Horimasu, Y., Gemma, A., Tatsumi, K., Hattori, N., Tsushima, K., Takemoto, K., Ishikawa, R., Momiyama, T., Matsuyama, SI., Arakawa,

- N., Akane, H., Toyoda, T., Ogawa, K., Sato, M., Takamatsu, K., Mori, K., Nishiya, T., Izumi, T., Ohno, Y., Saito, Y., Hanaoka, M. Identification of kynurenine and quinolinic acid as promising serum biomarkers for drug-induced interstitial lung diseases. *Respir Res.* 2024; 25:31.
9. Matsushita, K., Toyoda, T., Akane, H., Morikawa, T., Ogawa, K. Role of CD44 expressed in renal tubules during maladaptive repair in renal fibrogenesis in an allopurinol-induced rat model of chronic kidney disease. *J Appl Toxicol.* 2024; 44: 455-469.
10. Hibi D, Soma M, Suzuki Y, Takasu S, Ishii Y, Umemura T. Appearance of sex-determining region Y-box 9 (SOX9)- and glutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive hepatocytes as possible carcinogenic events in the early stage of furan-induced hepatocarcinogenesis. *J Appl Toxicol.* 2024; 44:1976-1985..
11. Akane, H., Toyoda, T., Matsushita, K., Uneyama, M., Morikawa, T., Kosaka, T., Tajima, H., Aoyama, H., Ogawa, K. Comparisons of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses with blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with promoters of thyroid hormone metabolism. *Toxicol Pathol.* 2025; 53:251-266.
- F.2 学会発表
1. Akane H, Toyoda T, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Aoyama H, Ogawa K. Effective method for early detection and mechanism estimation of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats : (64th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2025.3)
2. Ogawa K, Akane H, Takasu S, Gi M, Fujioka M, Ishii Y, Uneyama M, Morikawa T, Tsuda H, Toyoda T. Comparison of the intra-tracheal intrapulmonary spraying (TIPS) and the systemic inhalation methods in rats for the classification of hazardous chemicals based on the GHS acute inhalation toxicity : (64th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2025.3)
3. Yamagami Y, Ishii Y, Nakamura K, Takasu S, Toyoda T, Murakami T. Shibusaki M, Ogawa K. Investigation of the involvement of chromothripsis in the acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rats : (64th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2025.3)
4. Ishii Y, Nakamura K, Yamagami Y, Takasu S, Nohmi T, Toyoda T, Shibusaki M, Ogawa K. Investigations of the mechanism underlying acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rat : (64th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2025.3)
5. 赤根弘敏, 高須伸二, 魏民, 藤岡正喜, 豊田武士, 石井雄二, 畝山瑞穂, 森川朋美, 津田洋幸, 小川美子. 吸入による毒劇物の判定における経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法の有用性の検討 : (日本毒性病理学会第 41 回総会及び学術集会、令和 7 年 1 月、静岡)
6. 高須伸二, 赤根弘敏, 石井雄二, 豊田武

- 士, 津田洋幸, 小川美子. 経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法による急性毒性試験における投与液量および投与濃度の影響: (日本毒性病理学会第 41 回総会及び学術集会、令和 7 年 1 月、静岡)
7. 山上洋平, 石井雄二, 高須伸二, 相馬明玲, 笠松建吾, 豊田武士, 村上智亮, 小川久美子. アセトアミド誘発の大型小核による chromothripsis の発生機構: (日本毒性病理学会第 41 回総会及び学術集会、令和 7 年 1 月、静岡)
 8. 山上洋平, 石井雄二, 高須伸二, 笠松建吾, 相馬明玲, 豊田武士, 村上智亮, 小川久美子. ラット初代肝細胞を用いた acetamide が誘発する大型小核の形成機序に関する研究: (日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会、令和 6 年 12 月、岡山)
 9. 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 笠松建吾, 山上洋平, 豊田武士, 小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた 6-methoxyquinoline の *in vivo* 変異原性の評価: (日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会、令和 6 年 12 月、岡山)
 10. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いた二酸化チタンナノ粒子の反復経口曝露による生体影響の検討: (日本分子生物学会第 47 回年会 (令和 6 年 11 月、福岡))
 11. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標としたラット腎発がん物質の早期検出: 日本癌学会第 83 回学術総会 (令和 6 年 9 月、福岡)
 12. 赤根弘敏, 高須伸二, 石井雄二, 小川久美子, 豊田武士. 病理組織学的及び免疫組織化学的解析を用いた抗甲状腺物質の早期検出: 日本癌学会第 83 回学術総会 (令和 6 年 9 月、福岡)
 13. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 赤木純一, 森川朋美, 水田保子, 小川久美子. シスプラチン誘発ラット AKI to CKD モデルにおける CD44 の発現動態及び上皮間葉転換との関連: 日本獣医学会第 167 回学術集会 (令和 6 年 9 月、北海道)
 14. 山上洋平, 石井雄二, 鈴木孝昌, 中村賢志, 原島洋文, 笠松建吾, 高須伸二, 相馬明玲, 杉山圭一, 村上 智亮, 小川久美子. アセトアミドのラット肝発がん過程における染色体再構成の関与の検討: (日本毒性学会第 51 回学術年会 (令和 6 年 7 月、福岡))
 15. 赤根弘敏, 高須伸二, 魏民, 藤岡正喜, 豊田武士, 石井雄二, 畝山瑞穂, 森川朋美, 津田洋幸, 小川久美子. ラットを用いた化学物質の吸入による毒劇物の判定における経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法と全身吸入暴露法の比較: (日本毒性学会第 51 回学術年会 (令和 6 年 7 月、福岡))
 16. 豊田武士, 赤根弘敏, 高須伸二, 石井雄二, 松下幸平, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子. ラット 28 日間反復投与毒性試験における病理組織学的/免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の早期検出および機序推定: (日本毒性学会第 51 回学術年会 (令和 6 年 7 月、福岡))
 17. 畝山瑞穂, 豊田武士, 赤木純一, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX と幹細胞マーカーの免疫染色を用いたラット肝発がん物質早期検出法の検討: (日本毒性学会第 51 回学術年会 (令和 6 年 7 月、福岡))

6年7月、福岡)

18. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 赤木純一, 森川朋美, 水田保子, 小川久美子.
アロプリノール誘発ラット AKI to CKD モデルにおける CD44 の発現: (日本毒性学会第 51 回学術年会(令和 6 年 7 月、福岡)
19. 吉田彩夏, 橋本由弥, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, 齋藤嘉朗, 花尻(木倉)瑠理, 荒川憲昭. 急性肺傷害ラットモデルを用いた新規間質性肺炎バイオマーカーの発現機序解析: (日本プロテオーム学会 2024 年大会 (令和 6 年 6 月、青森)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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

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.
- 4) 中原広道. 新規人工調製肺サーファクタントの研究と高機能性特化への応用展開. *YAKUGAKU ZASSHI* 132(7):817-822. 2012.

Table 1-1. Clinical signs in rats

	chloroacetone	o-chlorophenol	hexahydro-1H-azepine	acrylic acid	2-dimethyl aminoethanol		tetramethyl ethylenediamine
Dose (mg/kg)	64	40	31	63	150	300	240
Necropsy day	1	0	0	0	1	0	0
No. of animals examined	5	6	3	6	3	6	6
Irregular respiration	5	5	0	0	0	0	0
Dyspnea	0	1	3	6	1	6	6

Table 1-2. Clinical signs in rats

	2,3-butanedione	cyclohexanone	tert-Butyl alcohol	acetonitrile		N,N-dimethyl formamide		N,N-dimethyl acetamide	2-methoxyethanol	
Dose (mg/kg)	1280	320	1600	1200	2400	2000	4000	2560	3000	
Necropsy day	0	0	0	2	0	0	3	0	1	0
No. of animals examined	3	2	3	2	1	3	5	6	4	2
Irregular respiration	0	0	0	2	1	0	6	0	6	2
Dyspnea	3	2	3	0	0	3	0	6	1	0

Table 1-3. Clinical signs in rats

	aniline	2-butoxyethanol		2-isobutoxyethanol		1-nitropropane	2-nitropropane	1-chloro-2-propanol
Dose (mg/kg)	240	400		400	800	480	100	300
Necropsy day	0	2	0	0	0	0	1	1
No. of animals examined	6	1	2	2	3	3	6	6
Irregular respiration	6	1	2	2	0	3	6	6
Dyspnea	0	0	0	0	3	0	0	0
Cyanosis	6	0	0	0	0	0	0	0
Reddish urine	0	1	0	2	0	0	0	0
Paleness	0	1	2	0	0	0	6	0
Hypothermia	0	0	0	0	0	0	6	0
Hypolocomotion	0	0	0	0	0	3	6	6
Drowsiness	0	0	0	0	0	3	0	6
Staggering gait	0	0	0	0	0	2	0	0

Table 1-4. Clinical signs in rats

	methylhydrazine	malononitrile		methacrylonitrile		allyl acetate		allyl alcohol	
Dose (mg/kg)	30	30	60	100		100	200	120	240
Necropsy day	0	0	0	1	0	1	0	0	0
No. of animals examined	5	1	5	3	2	2	6	6	6
Irregular respiration	5	1	5	0	0	6	6	6	6
Hypolocomotion	0	0	0	0	0	0	0	6	6
Prone/Side position	0	0	1	3	2	6	6	0	0
Prostration	0	0	0	0	0	2	6	6	6
Tremor	0	1	2	0	0	0	0	0	0
Clonic convulsion	0	0	3	3	2	0	0	0	0
Tonic convulsion	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Muddy stool	0	0	0	0	0	6	6	6	6

Table 2-1. Histopathological findings in rats

		chloroacetone	o-chlorophenol	hexahydro-1H-azepine	acrylic acid	2-dimethyl aminoethanol		tetramethyl ethylenediamine
Dose (mg/kg)		64	40	31	63	150	300	240
Necropsy day		1	0	0	0	1	0	0
No. of animals examined		5	6	3	6	3	6	6
Trachea	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	5(0, 0, 0, 5)	6(0, 0, 6, 0)	3(0, 0, 0, 3)	6(0, 0, 4, 2)	3(0, 0, 0, 3)	6(0, 0, 0, 6)	6(1, 0, 3, 2)
	Hemorrhage (±, +)	0	0	0	0	0	5(5, 0)	3(1, 2)
Bronchi	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	5(0, 1, 4, 0)	6(0, 0, 5, 1)	3(0, 0, 0, 3)	6(0, 0, 0, 6)	3(0, 0, 0, 3)	6(0, 0, 0, 6)	6(1, 1, 2, 2)
	Hemorrhage (±, +)	0	0	0	0	3(2, 1)	3(2, 1)	4(0, 4)
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse (±, +, ++, +++)	5(0, 0, 5, 0)	6(0, 0, 5, 1)	3(0, 0, 2, 1)	6(0, 0, 0, 6)	3(0, 0, 0, 3)	6(0, 1, 0, 5)	6(1, 0, 5, 0)
	Inflammation, acute alveolar/interstitial (±, +, ++)	5(0, 5, 0)	6(0, 6, 0)	3(0, 3, 0)	6(6, 0, 0)	3(0, 0, 3)	6(1, 5, 0)	6(3, 3, 0)
	Congestion (±, +, ++, +++)	5(0, 0, 0, 5)	6(1, 5, 0, 0)	3(1, 1, 1, 0)	6(1, 1, 2, 2)	3(1, 0, 1, 1)	6(3, 3, 0, 0)	6(2, 3, 1, 0)
	Edema (±, +, ++)	1(1, 0, 0)	6(6, 0, 0)	3(0, 3, 0)	6(0, 6, 0)	3(0, 1, 2)	6(1, 5, 0)	6(3, 3, 0)
	Hemorrhage (±, +, ++)	5(5, 0, 0)	6(0, 4, 2)	3(1, 0, 2)	6(4, 2, 0)	3(1, 2, 0)	6(1, 5, 0)	6(6, 0, 0)
Liver		0	0	0	0	0	0	0

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe
/, not examined

Table 2-2. Histopathological findings in rats

		2,3-butanedione	cyclohexanone	tert-Butyl alcohol	N,N-dimethyl formamide		N,N-dimethyl acetamide
Dose (mg/kg)		1280	320	1600	2000	4000	2560
Necropsy day		0	0	0	3	0	0
No. of animals examined		3	2	3	5	6	6
Trachea	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	3(0, 3, 0, 0)	2(0, 2, 0, 0)	3(0, 1, 2, 0)	0	6(1, 4, 1, 0)	6(2, 4, 0, 0)
	Hemorrhage	0	0	0	0	0	0
Bronchi	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	3(0, 2, 1, 0)	2(0, 0, 2, 0)	3(0, 0, 3, 0)	0	6(0, 0, 6, 0)	6(1, 2, 3, 0)
	Hemorrhage	0	0	0	0	0	0
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse (±, +, ++, +++)	3(0, 1, 2, 0)	2(0, 2, 0, 0)	3(0, 3, 0, 0)	4(3, 1, 0, 0)	6(0, 0, 1, 5)	6(0, 0, 4, 2)
	Inflammation, acute alveolar/interstitial (±, +, ++)	3(1, 2, 0)	2(1, 1, 0)	3(3, 0, 0)	5(1, 2, 2)	6(6, 0, 0)	6(6, 0, 0)
	Congestion (±, +, ++, +++)	3(0, 3, 0, 0)	2(1, 1, 0, 0)	3(0, 3, 0, 0)	4(0, 1, 3, 0)	6(0, 2, 2, 2)	6(0, 6, 0, 0)
	Edema (±, +, ++)	3(2, 1, 0)	2(0, 2, 0)	3(0, 3, 0)	4(0, 3, 1)	6(0, 5, 1)	6(1, 5, 0)
	Hemorrhage (±, +, ++)	3(3, 0, 0)	2(1, 1, 0)	3(2, 1, 0)	4(1, 3, 0)	6(1, 4, 1)	6(3, 3, 0)
Liver	Necrosis, hepatocyte (±, +, ++, +++)	0	0	0	5(0, 0, 0, 5)	0	0

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe
/, not examined

Table 2-3. Histopathological findings in rats

		aniline	2-butoxyethanol	1-nitropropane	2-nitropropane	1-chloro-2-propanol	
Dose (mg/kg)		240	400	480	100	300	
Necropsy day		0	2	0	1	1	
No. of animals examined		6	1	2	3	6	
Trachea	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	6(0, 3, 3, 0)	0	2(2, 0, 0, 0)	3(3, 0, 0, 0)	2(1, 1, 0, 0)	6(0, 6, 0, 0)
	Hemorrhage	0	0	0	0	0	0
Bronchi	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	6(0, 0, 6, 0)	0	2(2, 0, 0, 0)	3(2, 1, 0, 0)	2(2, 0, 0, 0)	6(0, 6, 0, 0)
	Hemorrhage (±, +)	1(0, 1)	0	0	0	0	0
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse (±, +, ++, +++)	6(0, 0, 6, 0)	1(0, 1, 0, 0)	2(0, 2, 0, 0)	3(0, 3, 0, 0)	3(0, 1, 2, 0)	6(0, 5, 1, 0)
	Inflammation, acute alveolar/interstitial (±, +, ++)	6(0, 6, 0)	1(0, 1, 0)	2(0, 2, 0)	3(0, 3, 0)	5(2, 3, 0)	6(0, 6, 0)
	Congestion (±, +, ++, +++)	6(1, 5, 0, 0)	1(1, 0, 0, 0)	2(0, 2, 0, 0)	3(1, 2, 0, 0)	3(3, 0, 0, 0)	6(0, 0, 2, 4)
	Edema (±, +, ++)	6(2, 4, 0)	1(1, 0, 0)	2(0, 2, 0)	3(1, 2, 0)	3(3, 0, 0)	4(4, 0, 0)
	Hemorrhage (±, +, ++)	6(1, 4, 1)	1(1, 0, 0)	1(1, 0, 0)	3(2, 1, 0)	4(3, 1, 0)	6(4, 2, 0)
Liver	Necrosis, hepatocyte, centrilobular (±, +, ++, +++)	0	1(0, 0, 1, 0)	0	0	6(0, 0, 0, 6)	6(0, 0, 0, 6)
Spleen	Congestion (±, +, ++, +++)	0	0	2(0, 0, 0, 2)	0	0	/
	Pigment, macrophage (±, +, ++)	0	1(0, 0, 1)	0	0	0	/
	Extramedullary hematopoiesis, increased (±, +)	0	1(0, 1)	0	0	0	/
Kidney	Cast, hemoglobin/red blood cell (±, +, ++)	0	1(0, 0, 1)	0	0	6(1, 5, 0)	/

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe
/, not examined

Table 2-4. Histopathological findings in rats

		methacrylonitrile		allyl acetate		allyl alcohol		
		Dose (mg/kg)		100	100	200	120	240
		Necropsy day		1	0	1	0	0
No. of animals examined		3	2	2	6	6	6	
Trachea	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	3(3, 0, 0, 0)	2(2, 0, 0, 0)	2(0, 2, 0, 0)	6(1, 5, 0, 0)	6(4, 2, 0, 0)	6(4, 2, 0, 0)	
	Hemorrhage (±)	0	0	2	2	0	0	
Bronchi	Necrosis, epithelium (±, +, ++, +++)	3(3, 0, 0, 0)	2(2, 0, 0, 0)	2(0, 1, 1, 0)	6(2, 3, 1, 0)	4(4, 0, 0, 0)	5(5, 0, 0, 0)	
	Hemorrhage (±)	0	0	0	3	0	0	
Lung	Necrosis, bronchioles/alveoli, diffuse (±, +, ++, +++)	3(3, 0, 0, 0)	2(2, 0, 0, 0)	2(0, 2, 0, 0)	6(2, 4, 0, 0)	6(3, 3, 0, 0)	6(0, 4, 2, 0)	
	Inflammation, acute alveolar/interstitial (±, +, ++)	3(3, 0, 0)	1(1, 0, 0)	2(0, 2, 0)	6(1, 5, 0)	6(0, 6, 0)	6(0, 6, 0)	
	Congestion (±, +, ++, +++)	3(0, 0, 0, 3)	0	2(0, 0, 2, 0)	5(5, 0, 0, 0)	3(3, 0, 0, 0)	5(3, 0, 2, 0)	
	Edema (±, +, ++)	1(1, 0, 0)	2(2, 0, 0)	0	6(4, 2, 0)	4(4, 0, 0)	6(5, 1, 0)	
	Hemorrhage (±, +, ++)	2(2, 0, 0)	0	0	1(1, 0, 0)	2(2, 0, 0)	6(6, 0, 0)	
Liver	Necrosis, hepatocyte, periportal (±, +, ++, +++)	0	0	0	6(3, 3, 0, 0)	6(0, 0, 6, 0)	6(0, 0, 1, 5)	
Spleen	Congestion (±, +)	3(0, 3)	0	/	/	0	0	
	Pigment, macrophage (±, +)	3(0, 3)	0	/	/	0	0	
Kidney		/	/	0	0	0	0	

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

/, not examined

Table 2-5. Histopathological findings in rats

		allyl acetate	allyl alcohol
		Dose (mg/kg)	
		200	120
Necropsy day		0	0
No. of animals examined		6	6
Stomach		0	0
Duodenum	Necrosis, mucosa (±, +, ++, +++)	6(0,0,0,6)	6(0,0,0,6)
Jejunum		0	0
Ileum		0	0
Cecum	Edema, lamina propria (±, +, ++)	5(1,3,1)	6(1,5,0)
Colon	Necrosis, mucosa (±, +, ++)	4(1,1,2)	4(1,1,2)
	Edema, submucosa (±, +, ++)	6(0,4,2)	6(0,3,3)
Rectum	Necrosis, mucosa (±, +, ++)	3(1,0,2)	3(1,0,2)
	Edema, submucosa (±, +, ++)	5(1,3,1)	6(4,2,0)

±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, severe

Table 3. Comparison of LD₅₀ in TIPS with those in inhalation study and in vitro Neutral red assay

No.	Test substance	TIPS Dose (mg/kg)	Mortality (No. Dead /No. Treated)	TIPS LD ₅₀ (mg/kg)	LD ₅₀ (TIPS) / LD ₅₀ (Inhalation)* ¹	LD ₅₀ (TIPS) / LD ₅₀ (NRU assay)* ²
1	1-Chloro-2-propanol	38, 75, 150, 300	0/6, 0/6, 0/6, 6/6	150-300	0.26-0.52	0.48-1.0
2	1-Nitropropane	60, 120, 240, 480	0/6, 0/6, 0/6, 3/3	240-480	0.29-0.58	2.7-5.4
3	2,3-Butanedione	160, 320, 640, 1280	0/6, 0/6, 3/6, 3/3	320-640	0.12-0.23	4.0-7.9
4	2-Butoxyethanol	100, 200, 400, 800	0/6, 0/6, 3/6, 3/3	200-400	0.61-1.2	1.2-2.4
5	2-Dimethylaminoethanol	19, 75, 150, 300	0/6, 0/6, 6/6, 6/6	75-150	0.08-0.17	3.6-7.2
6	2-Isobutoxyethanol	100, 200, 400, 800	0/6, 0/6, 2/6, 3/3	400-800	0.55-1.1	2.3-4.6
7	2-Methoxyethanol	1500, 3000	0/6, 6/6	1500-3000	0.63-1.3	0.89-1.8
8	2-Nitropropane	50, 100	0/6, 6/6	50-100	0.19-0.37	0.48-1.0
9	Acetonitrile	300, 600, 1200, 2400	0/6, 0/6, 3/6, 3/3	600-1200	0.22-0.45	0.89-1.8
10	Acrylic acid	16, 31, 63, 125, 250	0/6, 3/6, 6/6, 6/6, 3/3	16-31	0.03-0.06	1.1-2.1
11	Allyl acetate	25, 50, 100, 200	0/6, 0/6, 6/6, 6/6	50-100	0.16-0.33	0.42-0.84
12	Allyl alcohol	30, 60, 120, 240	0/6, 1/6, 6/6, 6/6	60-120	1.0-2.0	0.19-0.38
13	Aniline	40, 80, 160, 240	0/6, 0/6, 0/6, 6/6	160-240	1.1-1.7	2.9-4.3
14	Chloroacetone	4, 16, 32, 64	0/6, 0/6, 0/6, 6/6	32-64	0.47-0.93	34-69
15	Cyclohexanone	80, 160, 320	0/6, 1/6, 3/6	160-320	0.11-0.22	1.3-2.5
16	Hexahydro-1H-azepine	8, 16, 31, 63, 125	2/6, 0/6, 6/6, 6/6, 6/6	16-31	0.04-0.08	1.4-2.8
17	Malononitrile	15, 30, 60	0/6, 1/6, 5/6	30-60	0.94-1.88	0.13-0.25
18	Methacrylonitrile	25, 50, 100	0/6, 0/6, 6/6	50-100	0.37-0.74	0.35-0.71
19	Methylhydrazine	15, 30	0/6, 5/6	15-30	0.68-1.36	0.39-0.77
20	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	30, 60, 120, 240	0/6, 0/6, 2/6, 6/6	120-240	0.13-0.26	3.9-7.9
21	N,N-Dimethylacetamide	320, 640, 1280, 2560	0/6, 0/6, 0/6, 6/6	1280-2560	1.9-3.9	1.1-2.3
22	N,N-Dimethylformamide	500, 1000, 2000, 4000	1/6, 0/6, 6/6, 6/6	1000-2000	1.1-2.3	1.1-2.3
23	o-Chlorophenol	5, 10, 20, 40	0/6, 0/6, 0/6, 6/6	20-40	0.07-0.13	2.0-4.0
24	t-Butyl alcohol	200, 400, 800, 1600	0/6, 1/6, 1/6, 3/3	800-1600	0.18-0.35	2.2-4.4

*¹: Converted from the previously reported LC₅₀ (mg/L) of the acute inhalation toxicity study in rats or mice using the respiratory volume of rats (45 L/4hr, 300 g BW) or mice (7 L/4hr, 30 g BW). LD₅₀ (mg/kg)=45 (L)*LC₅₀ (mg/L)/0.30 (kg) or 7 (L)*LC₅₀ (mg/L)/0.03 (kg)

*²: The estimated doses calculated based on the LC₅₀ of neutral red assay. LD₅₀ (mg/kg) =LC₅₀ (mg/mL)*2 (mL/kg)*4 (doses)

Table 4 GHS classes based on TIPS, inhalation, skin and eye irritation

No.	Test substance	TIPS LD ₅₀ (mg/kg)	TIPS LC ₅₀ (ppm) * ¹	TIPS GHS class* ²	Inhalation GHS class* ³	Skin irritation GHS class	Eye irritation GHS class	NRU assay LD ₅₀ (mg/kg)* ⁴
14	Chloroacetone	32-64	56-113	1-2	2	1	1	1
23	o-Chlorophenol	20-40	25-51	1	2	1	1	10
16	Hexahydro-1H-azepine	16-31	26-51	1	3	1	1	11
10	Acrylic acid	16-31	36-70	1	3	1	1	15
	5 2-Dimethylaminoethanol	75-150	137-274	2	3	1	1	21
20	N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine	120-240	168-337	2	3	1	1	31
19	Methylhydrazine	15-30	53-106	1-2	1	2	2	39
13	Aniline	160-240	280-420	2	2	3	2	55
	3 2,3-Butanedione	320-640	606-1212	3	3	2	1	81
	2 1-Nitropropane	240-480	439-878	2-3	3	—* ⁵	2	89
	8 2-Nitropropane	50-100	91-183	1-2	2	—* ⁵	2	104
11	Allyl acetate	50-100	81-163	1-2	2	2	2	119
15	Cyclohexanone	160-320	266-531	2-3	3	2	2	127
18	Methacrylonitrile	50-100	121-243	2	2	3	2	142
	4 2-Butoxyethanol	200-400	276-552	2-3	2	2	2	168
	6 2-Isobutoxyethanol	400-800	552-1103	3	3	—* ⁵	2	174
17	Malononitrile	30-60	74-148	1-2	1	—* ⁵	2	240
	1 1-Chloro-2-propanol	150-300	259-517	2-3	3	—* ⁵	—* ⁵	312
12	Allyl alcohol	60-120	168-337	2	2	2	2	316
24	t-Butyl alcohol	800-1600	1759-3519	3-4	—* ⁵ (>4)	3	2	367
	9 Acetonitrile	600-1200	2382-4765	3-4	4	not classified	2	671
22	N,N-Dimethylformamide	1000-2000	2230-4460	3-4	3	2	2	873
21	N,N-Dimethylacetamide	1280-2560	2395-4790	3-4	3	not classified	2	1135
	7 2-Methoxyethanol	1500-3000	3213-6427	4	4	not classified	not classified	1684

*¹: Converted from the LD₅₀ (mg/kg) by the TIPS method using the respiratory volume of rats.

*²: Classified based on the LC₅₀ (ppm) by the TIPS method according to the classification criteria for gas.

*³: Determined by previously reported LC₅₀ (ppm) by the acute inhalation toxicity study.

*⁴: The estimated doses calculated based on the LC₅₀ of neutral red assay. LD₅₀ (mg/kg) = LC₅₀ (mg/mL) * 2 (mL/kg) * 4 (doses)

*⁵ Classification not possible due to lack of sufficient data.