

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

分担研究課題名：*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）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、23物質のLC₅₀値を取得してその有用性について検討してきた。本年度は新たに26物質について検討を行い、TIPS法の用量設定に応用可能なLC₅₀値を算出した。さらに、これまでの検討で得られた49物質のLC₅₀値とラット4時間吸入ばく露試験におけるLD₅₀値との相関解析を行った結果、水溶性物質、アルコール基やエーテル基、エポキシ基を有する化学物質では、LC₅₀値とLD₅₀値が正の相関を示し、類似する特性を有する化学物質では毒性応答が類似する可能性が示唆された。加えて、相関解析で得られた近似式によるLD₅₀の予測値と、これらの物質の実際のLD₅₀の報告値がある概ね一致することが示されたことから、A549-NRU assayの結果から、*in vivo*におけるLD₅₀値を推測できる可能性が示唆された。

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 値を推定し、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) 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 アッセイ) を構築し、23 種類の化学物質の LC₅₀ 値を取得して TIPS 法における LD₅₀ 値と良好な相関を確認していた。

本年度は A549-NRU アッセイの有用性をさらに検証するため、新たに 26 種類の化学物質の LC₅₀ 値を算出し、TIPS 法の用量設定への応用可能性を評価した。あわせて、これまで得られた 49 物質の LC₅₀ 値とラット 4 時間吸入曝露試験における LD₅₀ 値との相関解析を行った。

B. 研究方法

[被験物質]

本研究で使用した被験物質を Table 1 に示す。昨年度までに実施した 23 物質 (表中下線) に加えて、本年度は 26 物質で A549-NRU アッセイを実施した。また、これまで

に実施した合計 49 物質で得られた LC₅₀ 値を用いて、以降に記す解析を実施した。なお、培養細胞としてヒト肺腺癌細胞株 A549 を使用し、基本培地として 10%FBS 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S) 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。また、ポリスチレンを溶解する物質 (表中*を付記した物質) についてはガラス製 6 well プレートを使用し、その他の物質はポリスチレン製 6 well プレートを使用し、試験に供した。

[A549 NRU アッセイ]

Day 0 において、6 well プレートに A549 細胞を 2×10^5 cell 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および Table 1 に示す基礎培地を含む溶媒を加えて混合した。さらに調製した被験物質を vortex にて 5 秒程度強く振盪した。

事前に用意した A549 細胞に対して、培地を吸引後 PBS で 1 回洗浄し、事前に調製した被験物質混合培地を dish 内に添加した。その後、インキュベーター (37°C/5% CO₂) 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 (最終濃度 0.33%)。顕微鏡観察を実施後、培地を吸引し、PBS で 2 回洗浄後、Neutral red 含有 RPMI 溶液を dish 内に添加した。その後、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。新しく用意した 96 well プレートに、dish 内の酢酸-エタノール

ル溶液を 180 uL ずつ移し替え、吸光度計にて 540 nm 波長の計測を行った。

[LC₅₀ 値の算出および相関解析]

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 値を算出した。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 値を算出した。また、以降に記す LC₅₀ (A549-NRU) を用いた相関解析では、Pearson の相関分析を行い、得られた結果を散布図として作図した。

[LC₅₀ (A549-NRU) と被験物質の特性（分子量、水オクタノール分配係数）との相関分析]

LC₅₀ (A549-NRU) と、分子量や水への親和性など被験物質の特性との相関について、検討を行った。分子量との相関について、分子量が一定ではない Polyacrylic acid を除いた 48 物質で検討を行った。また水への親和性については水オクタノール分配係数 (log K_{ow}) を使用した。log K_{ow} は、化学物質が 2 つの非混和性相（通常はオクタノールと水）の間でどのように分散するかを説明する重要な因子である。log K_{ow} が高いほど親油性（脂溶性）であり、log K_{ow} が低いほど親水性（水溶性）であることを示す。log K_{ow} が判明している 46 の物質で検討を行った。

[LC₅₀ (A549-NRU) と LD₅₀ (ラット 4 時間吸入ばく露試験) との相関解析]

A549-NRU アッセイで得られた LC₅₀ (A549-NRU) の汎用性を確認するため、これまでに報告されているラット 4 時間吸入

ばく露試験における LD₅₀ (ラット 4 時間吸入ばく露試験) を用いて、相関解析を行った。なお、動物を用いた吸入ばく露試験における LD₅₀ 値は、以下の情報源から入手した。

- PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)
- 製品評価技術基盤機構 (NITE) (https://www.chem-info.nite.go.jp/chem/english/ghs/ghs_nite_all_fy_e.html)
- Haz-Map (<https://haz-map.com/>)
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (<https://www.cdc.gov/niosh/rtecs/default.html>)

なお LD₅₀ 値は、ラット 4 時間吸入による LD₅₀ 値が範囲濃度で記載報告されている場合、相関分析には記載されている低濃度値を使用した。

[LC₅₀ (A549-NRU) と官能基に基づいた被験物質の特性との相関分析]

被験物質について官能基ごとに群分けし (Table 2)、A549-NRU の LC₅₀ 値とラット 4 時間吸入ばく露試験における LD₅₀ 値を用いて、相関解析を行った。

[A549-NRU assay と 3T3-NRU assay の比較検討]

ラット 4 時間吸入ばく露試験における LD₅₀ 値を用いて、マウス線維芽細胞 3T3 細胞による NRU assay で LC₅₀ 値が得られていた水溶性物質 (acetonitrile, acetone, N,N-dimethylformamide, sodium arsenite) における LC₅₀ 値の相関分析を行い、その相関性を A549 細胞で得られた成果と比較検討した。

C. 研究結果

[LC₅₀ (A549-NRU) と被験物質の特性 (分子量、水オクタノール分配係数) との相関分析]

A549-NRU アッセイで得られた LC₅₀ (A549-NRU) 値を Table 2 に示す。水溶性、非水溶性いずれの被験物質においても、安定的に LC₅₀ (A549-NRU) 値が得られた。LC₅₀ (A549-NRU) と分子量や水への親和性などの被験物質の特性およびラット 4 時間吸入ばく露試験における LD₅₀ 値を Table 2 に示す。

被験物質の分子量と LC₅₀ (A549-NRU) との間で、中程度の有意な負の相関を示した (r 値 = -0.4206, $p = 0.0029$)

(Figure 1A)。また被験物質の log K_{ow} と LC₅₀ (A549-NRU) との間で、中程度の有意な負の相関を示した (r 値 = -0.6697, $p < 0.0001$) (Figure 1B)。

[LC₅₀ (A549-NRU) と親水性や官能基に基づいた被験物質の特性との相関分析]

A549-NRU アッセイの LC₅₀ 値と既報のラット 4 時間吸入ばく露試験における LD₅₀ (ラット 4 時間吸入ばく露試験) 値の相関解析結果を Figure 2 に示す。水溶性物質の LC₅₀ (A549-NRU) 値が LD₅₀ (ラット 4 時間吸入ばく露試験) 値と有意に正の相関 (r 値 = 0.4850, $p = 0.0140$) を示した

(Figure 2A)。A549-NRU アッセイで強い毒性を示す水溶性物質がラット 4 時間吸入ばく露試験でも強い毒性を示すことが示された。

官能基ごとに相関性を検討した結果、アルデヒド及びケトン基を有する物質で有意な正の相関 (r 値 = 0.8887, $p = 0.0032$)、アルコール基、エーテル基、エポキシ基を

有する物質で有意な正の相関 (r 値 = 0.7191, $p = 0.0290$) をそれぞれ示した (Figure 2 B および C)。

相関解析で得られた近似式を用いて得られる LD₅₀ の予測値と、実際のラット 4 時間吸入ばく露試験における LD₅₀ 値について比較した結果を Table 3 に示した。予測された LD₅₀ 値と実際の吸入ばく露における LD₅₀ 値の比が 0.5~2 倍であった物質が 25/42 物質; 0.2~0.5 倍あるいは 2~5 倍であった物質が 10/42 物質であり、5 倍~10 倍であった物質が 3 物質、10 倍以上は 2 物質であり、0.2~5 倍の物質は 83.3%であったことから、予測値は吸入ばく露試験結果に近似していることが示された。

[A549-NRU assay と 3T3-NRU assay の比較検討]

A549あるいは3T3細胞を用いて得られた LC₅₀値とラット4時間吸入ばく露試験における LD₅₀値の相関分析を行った結果を Figure 3Aに示す。いずれも解析物質数の制限で有意差がないものの、A549-NRUのLC₅₀値と水溶性化学物質のラット4時間吸入によるLD₅₀値との相関は、強い正の相関 ($r = 0.8698$, $p = 0.1302$) を示した一方で (Figure 3B)、3T3-NRUのLC₅₀値とでは、弱い正の相関 ($r = 0.3768$, $p = 0.6232$) に留まった (Figure 3C)。

D. 考察

本研究では昨年度に構築した A549-NRU アッセイを用いて、これまでに実施した 23 物質に加えて、本年度は 26 物質について、TIPS 法へ外挿可能な LC₅₀ 値が算出できた。また、得られた LC₅₀ 値の意義について、分子量や水オクタノール分配係

数 ($\log K_{ow}$) による親水性の程度、官能基などの化学的特性に基づいて、吸入ばく露試験における LD_{50} 値との相関について検討した。その結果、被験物質の分子量あるいは $\log K_{ow}$ と LC_{50} (A549-NRU) との間で、中程度の有意な負の相関を示すことが明らかとなった。分子量が高い化学物質ほど LC_{50} 値が低く、毒性が高いことを示している。同様に、 $\log K_{ow}$ が高い (親油性が高い) 化学物質ほど LC_{50} 値が低く、毒性が高いことを示している。

また、既報のラット 4 時間吸入ばく露試験における LD_{50} 値との相関性を検討した結果、水溶性物質、アルコール基、エーテル基、エポキシ基を有する物質で正の相関をそれぞれ示したことから、同じ性質や官能基を有する化学物質は類似した毒性を有することが示唆された。さらに、相関解析で得られた近似式を用いた LC_{50} (A549-NRU) から得られた予測値は、ラット 4 時間吸入ばく露試験の報告値に近似していた。以上より、A549-NRU アッセイで得られた LC_{50} 値から、4 時間吸入ばく露試験における LD_{50} 値を推定可能であることが示唆された。一方で、予測値と報告値との乖離が大きな物質もみられており、予測精度を向上させるためには、様々な被験物質による検証が必要である。

A549-NRU と 3T3-NRU の LC_{50} 値とラット 4 時間吸入による LD_{50} 値の相関性を比較した結果、A549 細胞は 3T3 細胞よりもラット吸入毒性試験との相関性が強く、ラットの吸入毒性を予測する NRU アッセイでの使用に適していることが示唆された。

E. 結論

本研究により、A549 NRU アッセイで得られた LC_{50} 値は、ラットの吸入ばく露試験における LD_{50} 値と相関することが明らかとなり、特に水溶性化学物質やアルデヒド基、ケトン基、アルコール基、エーテル基、エポキシ基を有する化学物質において、高い相関性が認められた。これらの物質に対しては、A549 NRU アッセイの結果から LD_{50} 値を予測できる可能性が示唆された。今後は、さらなる物質を対象とした検証と知見の蓄積を通じて、A549 NRU アッセイの汎用性と予測精度の向上を図る必要がある。

F. 研究発表

F1. 論文発表

1. Suzuki, S., Gi, M., Yanagiba, Y., Yoneda, N., Uehara, S., Yokota, Y., Noura, I., Fujioka, M., Vachiraarunwong, A., Kakehashi, A., Koda, S., Suemizu, H., Wanibuchi, H. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J. Toxicol. Pathol.* 2025; 38: 59-67.
2. Praseatsook, K., Vachiraarunwong, A., Taya, S., Setthaya, P., Sato, K., Wanibuchi, H., Wongpoomchai, R., Dejkriengkraikul, P., Gi, M., Yodkeree, S. Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*). *Nutrients.* 2025; 17 : 645.
3. Noura, I., Suzuki, S., Gi, M., Fujioka, M., Matsue, T., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J. Toxicol.*

- Pathol. 2025; 38: 147-154.
4. Nakano, M., Gi, M., Toyooka, T., Suzuki, S., Wanibuchi, H., Takebayashi, T. Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. *J Occup Health*. 2025; 67: uiaf005.
 5. Fujioka, M., Suzuki, S., Gi, M., Noura, I., Vachiraarunwong, A., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 2025; 38: 161-165.
 6. 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 1-day, single-dose prediction model of genotoxic hepatocarcinogenicity in rats. *Arch Toxicol.* 2024; 98: 2711-2730.
 7. Zhang, Q. Y., Zhong, M. T., Gi, M., Chen, Y. K., Lai, M. Q., Liu, J. Y., Liu, Y. M., Wang, Q., Xie, X. L. Inulin alleviates perfluorooctanoic acid-induced intestinal injury in mice by modulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Environ Pollut.* 2024; 342: 123090.
 8. Zhang, Q. Y., Lai, M. Q., Chen, Y. K., Zhong, M. T., Gi, M., Wang, Q., Xie, X. L. Inulin alleviates GenX-induced intestinal injury in mice by modulating the MAPK pathway, cell cycle, and cell adhesion proteins. *Environ Pollut.* 2024; 362: 124974.
 9. Watanabe, K., Komiya, M., Obikane, A., Miyazaki, T., Ishino, K., Ikegami, K., Hashizume, H., Ishitsuka, Y., Fukui, T., Gi, M., Suzuki, S., Wanibuchi, H., Totsuka, Y. Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2024; 899: 503821.
 10. Vachiraarunwong, A., Gi, M., 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.* 2024; 98: 2065-2084.
 11. Suzuki, S., Gi, M., Kobayashi, T., Miyoshi, N., Yoneda, N., Uehara, S., Yokota, Y., Noura, I., Fujioka, M., Vachiraarunwong, A., Kakehashi, A., Suemizu, H., Wanibuchi, H. Urinary bladder carcinogenic potential of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) in humanized-liver mice. *Toxicol. Sci.* 2024; 202: 210-219.
 12. Parsons, B. L., Beal, M. A., Dearfield, K. L., Douglas, G. R., Gi, M., Gollapudi, B. B., Heflich, R. H., Horibata, K., Kenyon, M., Long, A. S., Lovell, D. P., Lynch, A. M., Myers, M. B., Pfulher, S., Vespa, A., Zeller, A., Johnson, G. E., White, P. A. Severity of effect considerations regarding the use of mutation as a toxicological endpoint for risk assessment: A report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environ Mol Mutagen.* 2024; 1-23.

13. Hasegawa, S., Shoji, Y., Kato, M., Elzawahry, A., Nagai, M., Gi, M., Suzuki, S., Wanibuchi, H., Mimaki, S., Tsuchihara, K., Totsuka, Y. Whole Genome Sequencing Analysis of Model Organisms Elucidates the Association Between Environmental Factors and Human Cancer Development. *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 11192.
- Rat. (第 51 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、令和 6 年 7 月 3 日、福岡)
2. 藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐淵英機、魏民. 化学物質のラット経気管肺内噴霧投与方法の *in vitro* 投与量設定法の開発 (第 51 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、令和 6 年 12 月 8 日、東京)

F.2 学会発表

1. Masaki Fujioka, Min Gi, Arpamas Vachiraarunwong, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Development of an *in vitro* Assay for Dose Selection in Trans-Tracheal Intrapulmonary Spraying Administration in

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

Table 1. Test chemicals evaluated using A549-NRU assay

No.	Chemicals	CAS RN	MW	Density (g/cm ³)	Vehicle
1	1,1,2-Trichloroethane	79-00-5	133.4	1.4	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
<u>2</u>	<u>1,2-Dichloroethane</u>	107-06-2	98.96	1.245	2% DMSO in RPMI (FBS-)
<u>3</u>	<u>1,2-Dichloropropane *</u>	78-87-5	112.99	1.159	2% DMSO in RPMI (FBS-)
4	1,4-Dioxane	123-91-1	88.11	1.034	RPMI (FBS+)
<u>5</u>	<u>1-Chloro-2-propanol</u>	127-00-4	94.54	1.115	RPMI (FBS+)
6	1-Hexyl mercaptan	111-31-9	118.24	0.84	2% DMSO in RPMI (FBS-)
<u>7</u>	<u>1-Nitropropane</u>	108-03-2	89.09	0.996	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
<u>8</u>	<u>2,3-Butanedione</u>	431-03-8	86.09	0.99	RPMI (FBS+)
<u>9</u>	<u>2-Butoxyethanol</u>	111-76-2	118.17	0.902	RPMI (FBS+)
<u>10</u>	<u>2-Dimethylaminoethanol</u>	108-01-0	89.14	0.887	RPMI (FBS+)
11	2-Ethoxyethyl acetate	111-15-9	132.16	0.974	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
12	2-Methoxyethanol	109-86-4	76.09	0.96	RPMI (FBS+)
13	2-Nitropropane	79-46-9	89.09	0.982	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
14	3-(Methylthio)propanal	3268-49-3	104.17	1.04	RPMI (FBS+)
15	3,4-Dichloro-1-butene *	760-23-6	124.99	1.153	2% DMSO in RPMI (FBS-)
16	3-Methyl-2-butenal	107-86-8	84.12	0.88	RPMI (FBS+)
17	Acetone	67-64-1	58.08	0.785	RPMI (FBS+)
18	Acetonitrile	1975/5/8	41.05	0.787	RPMI (FBS+)
<u>19</u>	<u>Acetylacetone</u>	123-54-6	100.12	0.972	RPMI (FBS+)
<u>20</u>	<u>Acrylic acid</u>	1979/10/7	72.06	1.051	RPMI (FBS+)
<u>21</u>	<u>Allyl acetate</u>	591-87-7	100.12	0.928	1% Ethanol in RPMI (FBS-)
22	Allyl alcohol	107-18-6	58.08	0.9	RPMI (FBS+)
23	Aniline	62-53-3	93.13	1.02	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
24	Benzyl mercaptan	100-53-8	124.21	1.058	2% DMSO in RPMI (FBS-)
25	Bis(2-chloroethyl) ether *	111-44-4	143.01	1.22	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
<u>26</u>	<u>Carbon tetrachloride *</u>	56-23-5	153.82	1.594	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
<u>27</u>	<u>Chloroacetone</u>	78-95-5	92.52	1.15	RPMI (FBS+)
28	Chloroform *	67-66-3	119.38	1.479	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
<u>29</u>	<u>Cyclohexanone</u>	108-94-1	98.14	0.942	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
30	Dibromomethane	74-95-3	173.83	2.5	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
<u>31</u>	<u>Dichloromethane</u>	1975/9/2	84.93	1.326	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
32	Ethylene glycol monoisobutyl ether	4439-24-1	118.17	0.89	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
33	Formaldehyde	50-00-0	30.03	0.815	RPMI (FBS+)
<u>34</u>	<u>Glycidol</u>	556-52-5	74.08	1.143	RPMI (FBS+)
<u>35</u>	<u>Hexahydro-1H-azepine</u>	111-49-9	99.17	0.864	RPMI (FBS+)
36	Malononitrile	109-77-3	66.06	1.19	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
37	Methacrylonitrile	126-98-7	67.09	0.8	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
38	Methylhydrazine	60-34-4	46.07	0.87	RPMI (FBS+)
39	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	74.08	1.005	RPMI (FBS+)
<u>40</u>	<u>N,N-Dimethylacetamide</u>	127-19-5	87.12	0.937	RPMI (FBS+)
<u>41</u>	<u>N,N-Dimethylformamide</u>	1968/12/2	73.09	0.945	RPMI (FBS+)
<u>42</u>	<u>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</u>	110-18-9	116.2	0.777	RPMI (FBS+)
<u>43</u>	<u>o-Chlorophenol</u>	95-57-8	128.56	1.263	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
<u>44</u>	<u>Polyacrylic Acid 5000 (10%)</u>	9003/1/4	5000	0.1	RPMI (FBS+)
<u>45</u>	<u>Quinoline</u>	91-22-5	129.16	1.09	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
46	Sodium arsenite	7784-46-5	129.91	1.87	RPMI (FBS+)
47	tert-Butyl alcohol	75-65-0	74.12	0.789	RPMI (FBS+)
48	tert-Butylbenzene	1998/6/6	134.22	0.867	2% DMSO in RPMI (FBS-)
49	Xylene *	1330-20-7	106.17	0.87	2% Ethanol in RPMI (FBS-)

* Using glass plate. Chemicals without underlines were evaluated in 2024, whereas those with underlines were assessed before 2024

Table 2. Physicochemical properties, LC₅₀ values from A549-NRU assays, and LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation studies of tested chemicals

No.	Chemicals	MW	Density (g/ml)	Log K _{ow}	Water soluble	Functional group of chemicals	LC ₅₀ from	LC ₅₀ for 4-hour rat inhalation		LD ₅₀ from 4-hour
							15 min-A549 (mg/ml)	ppm	mg/L	rat inhalation (mg/kg)
1	1,1,2-Trichloroethane	133.4	1.4	2.35	No	Alkyl halide	2.46	2000	10.91	1637
2	1,2-Dichloroethane	98.96	1.245	1.48	No	Alkyl halide	7.84	1000	4.05	607
3*	1,2-Dichloropropane	112.99	1.159	1.98	No	Alkyl halide	3.33	2000	9.24	1386
4	1,4-Dioxane	88.11	1.034	-0.42	Yes	Ether	117.58	9158	33	4950
5	1-Chloro-2-propanol	94.54	1.115	0.53	Yes	Alcohol	38.97	1000	3.87	580
6	1-Hexyl mercaptan	118.24	0.84	5.35	No	Thiol	0.43	1080	5.22	783
7	1-Nitropropane	89.09	0.996	0.87	No	Nitro	11.14	1512	5.51	827
8	2,3-Butanedione	86.09	0.99	-1.34	Yes	Ketone	10.09	2250 - 5200	7.92 - 18.31	1188 - 2746
9	2-Butoxyethanol	118.17	0.902	0.83	Yes	Glycol ether	21.03	450	2.17	326
10	2-Dimethylaminoethanol	89.14	0.887	-0.55	Yes	Nitro	2.59	1641	5.98	897
11	2-Ethoxyethyl acetate	132.16	0.974	0.24	No	Ester	39.76	2119-3166	11.45-17.11	1718 - 2567
12	2-Methoxyethanol	76.09	0.96	-0.77	Yes	Glycol ether	210.53	5141	16	2400
13	2-Nitropropane	89.09	0.982	0.93	No	Nitro	13.02	490	1.79	268
14	3-(Methylthio)propanal	104.17	1.04	0.41	Yes	Aldehyde	2.98	1036-1105	4.42-4.71	663-707
15*	3,4-Dichloro-1-butene	124.99	1.153	2.37	No	Alkyl halide	1.53	2100	10.7	1610
16	3-Methyl-2-butenal	84.12	0.88	0.53	Yes	Aldehyde	3.9	1076	3.7	555
17	Acetone	58.08	0.785	-0.24	Yes	Ketone	111.87	32000	76	11400
18	Acetonitrile	41.05	0.787	-0.54	Yes	Nitrile	83.82	10679	17.93	2689
19	Acetylacetone	100.12	0.972	0.4	Yes	Ketone	15.62	1224	5.01	752
20	Acrylic acid	72.06	1.051	0.35	Yes	Carboxylic acid	1.88	1221	3.6	540
21	Allyl acetate	100.12	0.928	0.97	No	Ester	14.83	500	2.05	307
22	Allyl alcohol	58.08	0.9	0.17	Yes	Alcohol	39.56	165	0.39	59
23	Aniline	93.13	1.02	0.94	No	Aromatic	6.94	250	0.95	143
24	Benzyl mercaptan	124.21	1.058	2.48	No	Thiol	0.55	178	0.9	211
25*	Bis(2-chloroethyl) ether	143.01	1.22	1.29	No	Ether	7.48	56	0.33	50
26*	Carbon tetrachloride	153.82	1.594	2.64	No	Alkyl halide	3.58	8000	50.3	7549
27	Chloroacetone	92.52	1.15	0.28	Yes	Ketone	0.12	121	0.46	69
28*	Chloroform	119.38	1.479	1.97	No	Alkyl halide	5.65	2310	11.3	1695
29	Cyclohexanone	98.14	0.942	0.81	No	Ketone	15.88	2450	9.83	1475

*Using glass plate.

Table 2. Physicochemical properties, LC₅₀ values from A549-NRU assays, and LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation studies of tested chemicals (Continued)

No.	Chemicals	MW	Density (g/ml)	Log K _{ow}	Water soluble	Functional group of chemicals	LC ₅₀ from	LC ₅₀ for 4-hour rat inhalation		LD ₅₀ from 4-hour rat inhalation
							15 min-A549 (mg/ml)	ppm	mg/L	(mg/kg)
30	Dibromomethane	173.83	2.5	1.7	No	Alkyl halide	9.56	3978	28.3	4245
31	Dichloromethane	84.93	1.326	1.25	No	Alkyl halide	15.9	18371	63.8	9572
32	Ethylene glycol monoisobutyleter	118.17	0.89	N/A	No	Ether	21.77	707-1000	3.41-4.83	512-725
33	Formaldehyde	30.03	0.815	0.35	Yes	Aldehyde	3.03	480	0.59	88
34	Glycidol	74.08	1.143	-0.95	Yes	Epoxide	14.02	820	2.48	373
35	Hexahydro-1H-azepine	99.17	0.864	1.7	Yes	Cyclic amine	1.39	604	2.45	368
36	Malononitrile	66.06	1.19	-0.6	No	Nitrile	30	52.3-78.6	0.14-0.21	21-32
37	Methacrylonitrile	67.09	0.8	0.68	No	Nitrile	17.71	328	0.9	135
38	Methylhydrazine	46.07	0.87	-1.05	Yes	Nitro	4.86	78	0.15	22
39	N-Nitrosodimethylamine	74.08	1.005	-0.57	Yes	Nitro	69.53	78	0.24	35
40	N,N-Dimethylacetamide	87.12	0.937	-0.77	Yes	Amide	141.89	1238	4.41	662
41	N,N-Dimethylformamide	73.09	0.945	-0.87	Yes	Amide	109.18	1948	5.82	873
42	N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine	116.2	0.777	0.3	Yes	Amine	3.81	1318	6.26	940
43	o-Chlorophenol	128.56	1.263	2.15	No	Aromatic	1.24	390	2.05	308
44	Polyacrylic acid 5000 (10%)	5000	0.1	N/A	Yes	Carboxylic acid	10.53	8	1.71	257
45	Quinoline	129.16	1.09	2.06	No	Aromatic	1.53	N/A	N/A	N/A
46	Sodium arsenite	129.91	1.87	N/A	Yes	Inorganic	1.1	96	0.51	77
47	tert-Butyl alcohol	74.12	0.789	0.37	Yes	Alcohol	45.9	>10000	>30.3	>4547
48	tert-Butylbenzene	134.22	0.867	4.11	No	Aromatic	0.29	838	4.6	690
49*	Xylene	106.17	0.87	3.2	No	Aromatic	0.54	5000	21.7	3257

*Using glass plate.

Table 3. Comparison of predicted LD₅₀ values with reported LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation toxicity study for water-soluble chemicals, chemicals containing aldehydes and ketones groups, and chemical containing alcohols, ethers, and epoxides groups

Chemicals	LC ₅₀ from 15 min A549-NRU (mg/ml)	4-hour rat inhalation (mg/kg)		Ratio of predicted LD ₅₀ to reported LD ₅₀
		Predicted LD ₅₀	Reported LD ₅₀	
Water-soluble chemicals				
Formula: Predicted log LD ₅₀ = 0.4056*log LC ₅₀ + 2.243				
1,4-Dioxane	117.58	1210	4950	0.24
1-Chloro-2-propanol	38.97	773	580	1.33
2,3-Butanedione	10.09	447	1188	0.38
2-Butoxyethanol	21.03	602	326	1.84
2-Dimethylaminoethanol	2.59	257	897	0.29
2-Methoxyethanol	210.53	1532	2400	0.64
3-(Methylthio)propanal	2.98	272	663	0.41
3-Methyl-2-butenal	3.9	304	555	0.55
Acetone	111.87	1186	11400	0.1
Acetonitrile	83.82	1055	2689	0.39
Acetylacetone	15.62	533	752	0.71
Acrylic acid	1.88	226	540	0.42
Allyl alcohol	39.56	778	59	13.23
Chloroacetone	0.12	73	69	1.06
Formaldehyde	3.03	274	88	3.1
Glycidol	14.02	511	373	1.37
Hexahydro-1H-azepine	1.39	200	368	0.54
Methylhydrazine	4.86	332	22	15.08
N-Nitrosodimethylamine	69.53	978	940	1.04
N,N-Dimethylacetamide	141.89	1306	662	1.97
N,N-Dimethylformamide	109.18	1174	873	1.34
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	3.81	301	35	8.49
Polyacrylic Acid 5000	10.53	455	257	1.77
Sodium arsenite	1.1	182	77	2.37
t-Butyl alcohol	45.9	826	4547	0.18
Chemicals containing aldehydes and ketones groups				
Formula: Predicted log LD ₅₀ = 0.7268* log LC ₅₀ + 2.265				
2,3-Butanedione	10.09	988	1188	0.83
3-(Methylthio)propanal	2.98	407	663	0.61
3-Methyl-2-butenal	3.9	495	555	0.89
Acetone	111.87	5676	11400	0.5
Acetylacetone	15.62	1357	752	1.8
Chloroacetone	0.12	38	69	0.56
Cyclohexanone	15.88	1373	1475	0.93
Formaldehyde	3.03	412	88	4.68
Chemicals containing alcohols, ethers and epoxides groups				
Formula: Predicted log LD ₅₀ = 1.174*log LC ₅₀ + 0.9352				
1,4-Dioxane	117.58	2322	4950	0.47
1-Chloro-2-propanol	38.97	635	580	1.09
2-Butoxyethanol	21.03	308	326	0.94
2-Methoxyethanol	210.53	4600	2400	1.92
Allyl alcohol	39.56	646	59	10.99
Bis(2-chloroethyl) Ether	7.48	92	50	1.85
Ethylene Glycol Monoisobutyl Ether	21.77	321	512	0.63
Glycidol	14.02	191	373	0.51
tert- Butyl alcohol	45.9	769	4547	0.17

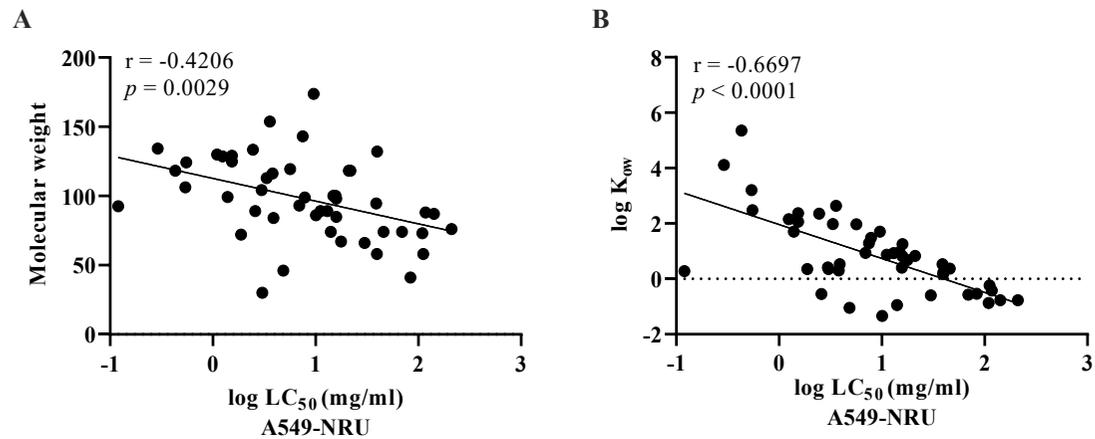


Figure 1. The correlation between log LC₅₀ values from A549-NRU assay and MW (A), and log K_{ow} (B) for all tested chemicals.

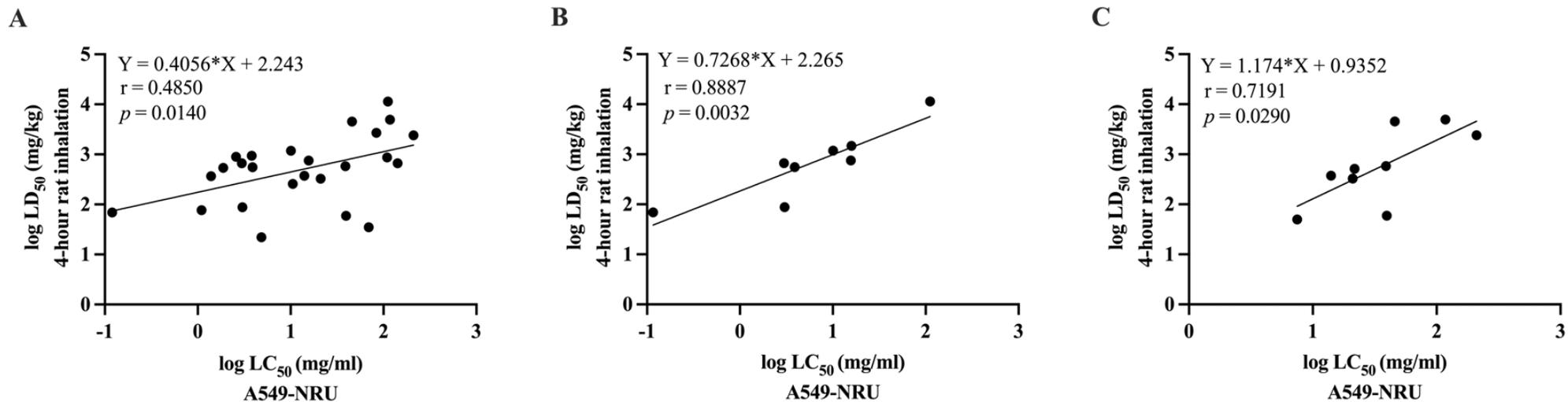


Figure 2. The significant correlation between LC₅₀ values from A549-NRU and LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation, grouped by water-soluble (A), chemicals containing aldehydes and ketones groups (B), and chemicals containing alcohols, ethers, and epoxides groups (C).

A

Chemicals	Water soluble	LC ₅₀ (mg/ml)		LD ₅₀ from 4-hour rat inhalation (mg/kg)
		A549-NRU (15 min)	3T3-NRU (48 hour)	
Acetone	Yes	111.87	0.012 ^a	11400
Acetonitrile	Yes	83.82	7.951 ^b	2689
N,N-Dimethylformamide	Yes	109.18	5.224 ^b	873
Sodium arsenite	Yes	1.10	0.000759 ^b	77
Xylene	No	0.54	0.721 ^b	3257

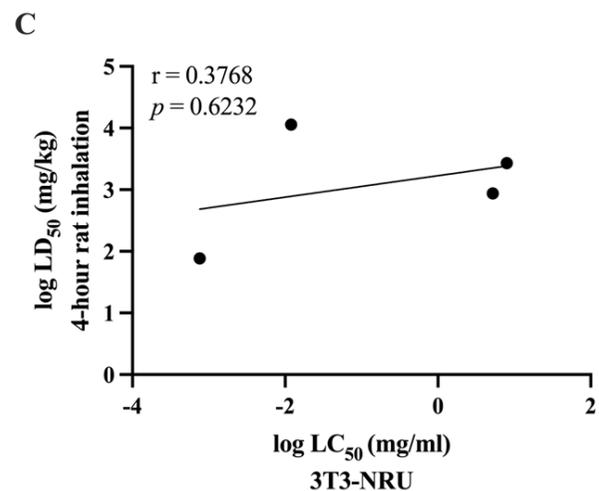
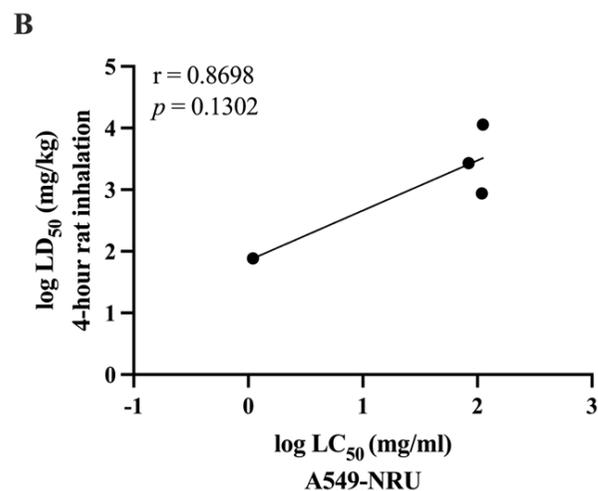


Figure 3. LC₅₀ values from A549-NRU and 3T3-NRU assays, and LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation studies (A), correlation between LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation and LC₅₀ values from A549-NRU (B) and LC₅₀ values from 3T3-NRU (C). LC₅₀ values in 3T3-NRU assay were obtained from Mannerström et al. (2017) and OECD (2010).