

研究課題名：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 試験による用量設定と in vivo への外挿性検討

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

研究要旨

本研究は、ラットにおける4時間吸入毒性データ（LD50 4時間値）の用量について、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ることにより、経気管肺内噴霧投与（TIPS）による簡便な急性吸入毒性試験を開発しよ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。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 におけるヒトに対する発がん物質（要因）分類が 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。

A.研究目的

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。

B.研究方法

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。

C.研究結果

現在の所、13物質の2年間の観察期間を終了している。屠殺時の所見は、各群各用量群の加算32匹～54匹における肉眼的にはほぼ腫瘍病変と考えられる結節病変について、腫瘍の発生頻度について IARC Monograph に掲載されているデータと、今回の腫瘍発生データとについて、13物質について肉眼的所見を整理した（組織標本作成中）。これらの物質のうち4物質は IARC Monograph 分類で4物質が G2A, 3物質が G2B, 2物質が G3, 残りの4物質が未評価であった。これらのうち、F344 雄ラットの多い白血病を除外すると、Glycidol(G2A) において、乳腺・肝・睪丸腫瘍 N,N-Dimethylformamide(G2A) において、肝腫瘍の発生において、IARC の報告による腫瘍発生臓器との一致を見た。臓器に拘らない腫瘍発生では更に多くの臓器において一致をみた。早急に病理組織標本作成し、詳細に検索する予定である。

Table 1 : Summary of tumor site and LD 50 and our TIPS method (1)

Compound name	Existing Data			Macroscopic Tumor Incidence by TIPS at Week 107 (Sum of all doses)					
	LD-50 at day 14	Route	Target Organ (IARC)	Leukemia	Mammary Gland Tumors	Lung Tumors	Liver Tumors	Kidney Tumors	Others
Glycidol (G2A)	100-320 mg/kg	Oral	Mammary gland, Testes, liver	12.5% (1/40)	25% (10/40)	2.5% (1/40)	7.5% (3/40)	5% (2/40)	*Testicular mesothelioma 5% (2/40) *Adrenal tumor 2.5% (1/40) *Thyroid tumor 2.5% (1/40)
N,N-Dimethylformamide (G2A)	1280-2560 mg/kg	Inhalation	Liver	10.9% (5/46)	4.3% (2/46)	0	6.5% (3/46)	4.3% (2/46)	*Testicular mesothelioma 4.3% (2/46) *Thyroid tumor 9% (4/46) *Mediastinal mass 2% (1/46)
Poly Acrylic Acid (G3)	120-240 mg/kg	-	No data	24% (13/54)	30% (16/54)	0	3.7% (2/54)	2% (1/54)	*Thyroid tumor 9% (5/54) *Mediastinal mass 3.7% (2/54)
Acetyl-Acetone (IARC-)	400-800 mg/kg	-	No data	21% (5/24)	12.5% (3/24)	0	0	0	*Leydig tumor 4% (1/24) *Thyroid tumor 8% (2/24) *Mediastinal mass 4% (1/24)
Ethylene Glycol (IARC-)	ND	-	No data	26% (8/31)	6.5% (2/31)	0	0	0	*Leydig tumor 10% (3/31) *Thyroid tumor 13% (4/31)
N,N-dimethylacetamide (G2B)	1280-2560 mg/kg	Inhalation	Liver	13% (3/23)	0	0	0	0	0

Table 2 : Summary of tumor site and LD 50 and our TIPS method (1)

Compound name	Existing data			Macroscopic tumor Incidence by TIPS at week 107 (Sum of all doses)					
	LD-50 at day 14	Route	Target Organ (IARC)	Leukemia	Mammary Gland Tumors	Lung Tumors	Liver Tumors	Kidney Tumors	Others
Glycidyl Methacrylate (G2A)	480-960 mg/kg	Inhalation	Nasal cavity, Lung, Uterus	29.4% (5/17)	12% (2/17)	0	0	0	*Leydig tumor 35% (6/17)
Acrolein (G2A)	1-2 mg/kg	Inhalation	Nasal Cavity	20% (2/10)	20% (2/10)	10% (1/10)	0	0	*Leydig tumor 60% (6/10)
Xylene (G3)	ND	-	No data	28% (5/18)	22% (4/18)	5% (1/18)	0	0	*Leydig tumor 40% (7/18) *Adrenal tumor 5% (1/18) *Thyroid tumor 11% (2/18)
Dichloro-Ethan (G2B)	120-240 mg/kg	Oral	Liver, kidney	28.5% (2/7)	28.5% (2/7)	0	0	0	*Leydig tumor 43% (3/7)
Formaldehyde (G1)	ND	-	Nasal cavity, Leukemia	14% (1/7)	14% (1/7)	28.5% (2/7)	0	0	*Leydig tumor 71.4% (5/7)
Quinoline (G2B)	ND	-	Liver	43% (3/7)	0	0	0	0	*Leydig tumor 28.5% (2/7) *Adrenal tumor 14% (1/7) *Thyroid tumor 14% (1/7)
T-Butanol (IARC-)	ND	-	No data	31.9% (6/19)	16% (3/19)	0	0	5% (1/19)	*Leydig tumor 68% (13/19) *Thyroid tumor 10.5% (2/19)

D. 考察

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腫瘍を疑う結節性病変の発生を2種の検体にて観察し得たが、早急に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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sheema A.N., Naiki-Ito A., Kakehashi A., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Numano T., Kato H., Goto Y., Takase H.,

Hirose A., Wakahara T., Miyazawa K., Takahashi S., **Tsuda H.** Fullerene and fullerene whisker are not carcinogenic to the lungs and pleura in rat long-term study after 2-week intra-tracheal intrapulmonary administration Genotoxicity and Carcinogenicity 9:4143-4158 (2024)

<https://doi.org/10.1007/s00204-024-03863-7>

2. Ahmed HM Omnia, Naiki-Ito A., Takahashi S., Alexander TW., Alexander DB., **Tsuda H.** A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung, Nanomaterials 15, 168 (2025) <https://doi.org/10.3390/nano15030168>

2. 学会発表

1. Ahmed HM Omnia, Dina M. Saleh, Alexander DB., Alexander TW., Takase H., Takahashi S., Yudasaka M., Yuge R., **Tsuda H.** Assessment of Pulmonary Toxicity and Carcinogenicity of Carbon Nano-Horns (CNH) and Carbon Nano-Brushes (CNB) Using Intra Tracheal Instillation in the Rats (第51回日本毒性学会学術年会 令和6年7月3-5日福岡)

2. Ahmed HM Omnia, Dina M. Saleh, Alexander DB., Alexander TW., Takase H., Hirose A., Kanno J., Naiki-Ito A., Takahashi S., Yudasaka M., Yuge R., **Tsuda H.** Administration of Carbon Nano-Brushes (CNB) and Carbon Nano-Horns (CNH) into the rat lung does not induce lung cancer or pleural mesothelioma Carbon Nano-Horns (CNH) and Carbon Nano-Brushes (CNB) do not induce lung cancer or pleural mesothelioma in the rat lung (第41回日本毒性病理学会学術集会 令和7年1月30-31日静岡)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし