

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6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 主任研究官）

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、吸入試験と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。

また、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。

一方、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なってきた。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。

キーワード: 吸入、急性毒生、経気管肺内噴霧投与法、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：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

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。

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

A2. *in vitro* 試験の実施

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。

A3. 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曝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

B1. ラットを用いた TIPS 法

B1-1) 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曝露法の 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。

B1-2) 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。

B1-3) 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。

B2. *in vitro* 試験の実施

[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6wellプレートを使用し、その他の物質はポリスチレン製6well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、6well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96wellプレートに、dish内の酢酸-エタノール溶液を180 µL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。

(倫理面への配慮)

動物及びヒトサンプルは使用していないため、倫理面の問題はないと判断された。

B3. 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

C1. ラットを用いた TIPS 法

C1-1) 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)、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)を取りまとめた。

[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(ο-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-イソブトキシエタノール、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-イソブ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、髓外造血亢進、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。

C1-2) 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)を比較した。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区分を比較した。

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、ο-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。

C2. *in vitro* 試験の実施

[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) 値については、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 値を検討したところ、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, $p < 0.0001$)。

[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) 値の相関解析結果については、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。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。

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は、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、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。

C3. 用量設定と外挿性検討

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・睾丸腫瘍 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。

D. 考察

D1. ラットを用いた TIPS 法

D1-1) 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。

D1-2) TIPS 法における LD₅₀ と全身吸入曝露試験法における 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 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 法では全身吸入曝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。

D2. *in vitro* 試験の実施

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 LD₅₀ 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 LC₅₀ (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 LC₅₀ 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 LC₅₀ 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 LD₅₀ 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 LC₅₀ (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 LC₅₀ 値から、4 時間吸入ばく露試験における LD₅₀ 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 LC₅₀ 値とラット 4 時間吸入による LD₅₀ 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。

D3. 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

E1. ラットを用いた TIPS 法

E1-1) 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。

E1-2) 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関連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。

E2. *in vitro* 試験の実施

本研究により、A549 NRU アッセイで得られた LC₅₀ 値は、ラットの吸入ばく露試験における LD₅₀ 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 LD₅₀ 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。

E3. 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。

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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Sheema1A.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>

26. 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>
- 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, Shibutani 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, Shibutani 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）
 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）
 20. 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 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）
 21. 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）
 22. 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）
 23. 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

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.