

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 安全性生物試験研究センター病理部 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、まず、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した。

被験物質 24 剤について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施し、LD₅₀ の判定及び毒性影響の検討を行った。その結果、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 剤であり、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示された。各剤について TIPS 法の LD₅₀ に基づいた GHS 分類を行ったところ、吸入試験に比較して TIPS 法で強い有害性区分に分類された物質は、概ね強い細胞傷害性や刺激性を示す物質であり、病理組織学的検査において気管から肺に重度の壊死が認められたことから、TIPS 法における毒性の増強には呼吸器上皮に対する直接的な細胞傷害の強さが関連する可能性が示唆された。一方、細胞傷害性や刺激性がより軽度である物質は、概ね既報と同程度の有害性区分に分類され、呼吸器以外の臓器に対する影響も検出可能であった。以上より、TIPS 法による気管内投与急性毒性試験は、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。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相関し、急性毒性試験の投与濃度設定に用いる指標となりえると考えられた。

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。そこで、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、細胞毒性評価法として使用されているマウス線維芽細胞 3T3を用いたNeutral Red Uptake Cytotoxicity Assay (OECD GD 129)を一部改変し、吸入ばく露環境を模擬するため、使用細胞をヒト肺腺癌細胞株A549に変更した A549-NRUアッセイを構築・最適化した。A549-NRUアッセイの有用性を検証するため、49物質を対象にLC₅₀値を算出し、TIPS法への外挿が可能であることを確認した。なお、水溶性物質だけでなく、従来評価が困難であった有機溶剤についてもLC₅₀値を得ることができ、本アッセイの高い汎用性が示された。さらに、A549-NRUアッセイで得られた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値の予測値と、実際のLD₅₀値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アッセイの結果から、*in vivo*におけるLD₅₀値を推測できる可能性が示唆された。今後は、より多様な物質を対象とした検証と知見の蓄積を通じて、A549-NRUアッセイのさらなる汎用性の拡大と予測精度の向上を図る必要がある。

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。

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）

魏民（公立大学法人大阪大阪公立大学・准教授）

高須伸二（国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官）

赤根弘敏（国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官）

研究協力者

藤岡正喜（公立大学法人大阪大阪公立大学・特任講師）

David B. Alexander（名古屋市立大学大学院医学研究科 客員教授）

William T. Alexander（名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員）

Mohammed Mourad Saleh（名古屋市立大学大学院医学研究科 博士課程院生）

Omnia Hosny Mohamed Ahmed（名古屋市立大学大学院医学研究科 博士課程院生）

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に、被験物質 24 剤について TIPS 法による LD₅₀ の判定を実施し、得られた LD₅₀ を全身吸入暴露試験法及び *in vitro* Neutral red assay から求めた LD₅₀ と比較した。さらに、TIPS 法による LD₅₀ に基づいて GHS 分類し、既報の吸入暴露試験法による GHS 区分と比較して、本法の毒劇物判定のための急性吸入毒性試験の代替法として有用性を検証した。

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した。

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

B1. ラットを用いた TIPS 法

B1-1. 被験物質及び動物

被験物質 24 剤の一覧を Table 1-1 に示す。生理食塩液は株式会社大塚製薬工場から購入した。動物は 10 から 11 週齢の雄性 F344 ラット又は 7 週齢の SD ラットをジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社から購入し、1 週間以上の馴化後、実験に供した。動物の飼育は、温度 24±1℃、湿度 55±5%、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯の環境下でバリエーションシステムの動物室にて行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。

B1-2. TIPS 法による気管内投与急性毒性試験

津田らの先行研究と異なる実験施設及び器具で実施することから、被験物質を用いた本試験を実施するのに先立ち投与条件の確認を行った。12 から 14 週齢の F344 ラットを用いて、イソフルラン吸入麻酔下で生理食塩液を 1 日 4 回（1 時間間隔）投与した。投与は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）を用いて一回当たり 0.2～2.0 mL/kg 体重の容量で実施し、気管内の挿入はラット用喉頭鏡（夏目製作所）を用いて素早く実施した。投与後は呼吸異常等の有無など一般状態を確認した。

また、生理食塩液で希釈した墨汁を同様の方法で投与し、投与液の肺内の分散状態を目視で確認した。

次に、被験物質 24 剤について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施した。12 週齢の雄性 F344 ラット又は 8 週齢の雄性 SD ラットにイソフルラン吸入麻酔下で各被験物質投与液（媒体：生理食塩液）を 2.0 mL/kg の容量で 1 日 4 回（1 時間間隔）投与した。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。投与直後から投与後 14 日まで一般状態観察を行った。途中死亡・瀕死動物及び投与後 14 日の生存動物は全例とも解剖に供した。TIPS 法 19 試験について気管、気管支、肺、肝臓の病理組織学的検査を実施し、必要に応じて脾臓、腎臓、胃、小腸及び大腸の検査を追加した。

TIPS 法で求められた LD₅₀（LD₅₀（TIPS））は、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。

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。

（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

[被験物質及び細胞株]

本研究で検討した 49 被験物質及び培地を Table 2-1 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 を選択した。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有機溶剤 (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]

A549-NRU アッセイの概要について、Figure 2-1 に示す。

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 2-1 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-エタノール溶液を 180 μ L 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 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 値 (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 2-2)、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) TIPS 法による気管内投与急性毒性試験

における投与条件の確認

気管内投与の技術及び投与条件確認のため、一回当たり 0.2~2.0 mL/kg 体重の生理食塩液を投与した結果、一般状態の異常及び死亡例は見られなかった。生理食塩液で希釈した墨汁を同様の方法で投与した結果、1.0 mL/kg 体重以上の投与群で投与液が肺全葉に拡散するのが確認された。

C1-2) TIPS 法による気管内投与急性毒性試験における呼吸器並びに全身諸臓器の毒性評価

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 1-2-1~1-2-4 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 1-3-1~1-3-5 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、マロノニトリルで振戦、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。

C1-3) TIPS 法における LD₅₀ 判定と全身吸入暴露試験法及び *in vitro* Neutral red assay における LD₅₀ の比較

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 1-4 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 1-5 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-1*H*-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

[播種細胞数の検討]

A549細胞を播種し、その24時間後のWST-8法で得られた吸光度と播種数の相関について検討した結果、 $0.25 \sim 2.0 \times 10^5$ 細胞で良好な線形近似($r^2 = 0.99$)が得られた。したがって、その最大値である 2.0×10^5 細胞が本試験における至適播種細胞数として設定できた。

[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]

A549-NRU アッセイで得られた LC₅₀ (A549-NRU) を Table 2-2 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 2-2 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 2-2A)。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 2-2B)。

[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 の LC_{50} 値と既報のラット 4 時間吸入ばく露試験における LD_{50} (ラット 4 時間吸入ばく露試験) 値の相関解析結果を Figure 2-2 に示す。水溶性物質の LC_{50} (A549-NRU) 値が LD_{50} (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 2-3A)。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 2-3B および 2-3C)。

相関解析で得られた近似式を用いて得られる LD_{50} 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 LD_{50} 値について比較した結果を Table 2-3 に示した。予測された LD_{50} 値と実際の吸入ばく露における LD_{50} 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 LC_{50} 値とラット 4 時間吸入ばく露試験における LD_{50} 値の相関分析を行った結果を Figure 2-4A 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 LC_{50} 値と水溶性化学物質のラット 4 時間吸入による LD_{50} 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 2-4B)、3T3-NRU の LC_{50} 値とでは、弱い正の相関 (r = 0.3768, p = 0.6232) に留まった (Figure 2-4C)。

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 (Table 3-1, 3-2)。早急に病理組織標本を作成し、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

TIPS 法による気管内投与急性毒性試験に先立ち、本法の技術及び投与条件、並びに施設間再現性を確認した。生理食塩液を最大 2.0 mL/kg 体重の容量での 4 回投与した結果、一般状態の異常及び死亡例は見られなかった。また、墨汁の投与により 0.5 mL/kg より少ない容量では投与液の肺への拡散に偏りがみられたことから、TIPS 法による急性吸入毒性試験は 2.0 mL/kg の容量で実施することとした。さらに、本条件で実施した N,N-ジメチルアセタミド及び N,N-ジメチルホルムアミドの検討結果と津田らの先行研究結果との間に差異は認められず²⁾、良好な施設間の再現性が確認された。

次に、上記の N,N-ジメチルアセタミド及び N,N-ジメチルホルムアミドを含む被験物質 24 剤について、毒性評価を行った。24 剤のうち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 1-2-1 及び 1-3-1 : 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 *N,N,N',N'*-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 : 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

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の傾向がみられた。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。

検討した被験物質 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示された。さらに、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結果、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。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、病理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 法における毒性の増強には呼吸器上皮に対する直接的な細胞傷害の強さが関連する可能性が示唆され、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、LD₅₀ (TIPS) が LD₅₀ (NRU assay) よりも低値を示した 7 剤では、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ており、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。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。

また、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。

D2. *in vitro* 試験の実施

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法 (TIPS 法) を行う際の *in vitro* 投与量設定法として、細胞毒性評価法として使用されているマウス線維芽細胞 3T3 を用いた Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay (OECD GD 129) を一部改変し、吸入ばく露環境を模擬するため、使用細胞をヒト肺腺癌細胞株 A549 変更した A549-NRU アッセイを構築・最適化した。その有用性について検討を行った。

A549-NRU アッセイの有用性を検証するため、49 物質を対象に LC₅₀ 値を算出し、TIPS 法への外挿が可能であることを確認した。さらに、従来評価が困難であったポリスチレンを溶解する有機溶剤についてもガラス製プレ

ートで検討することより、LC₅₀ 値を得ることができ、本アッセイの高い汎用性が示された。

得られた LC₅₀ 値と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結果、被験物質の分子量や log K_{ow} と LC₅₀ (A549-NRU) との間に、中程度の有意な負の相関を示すことが明らかとなった。すなわち、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。

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 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。

さらに、さらに、A549-NRU アッセイで得られた LC₅₀ 値に基づき実施した TIPS 法 (高須および赤根の報告書を参照) で得られた LD₅₀ 値とも概ね相関しており、本アッセイが TIPS 法における *in vitro* 代替投与量設定法として有用であることが示された。

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

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ことが示され、TIPS 法における毒性の増強には呼吸器上皮に対する直接的な細胞傷害の強さが関連する可能性が示唆された。一方、細胞傷害性や刺激性がより軽度である物質は概ね既報と同程度の有害性区分に分類され、呼吸器以外の臓器に対する影響も検出可能であった。以上より、TIPS 法による気管内投与急性毒性試験は、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。

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相関し、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。

E2. *in vitro* 試験の実施

本研究により、TIPS 法における *in vitro* 投与量設定試験として、A549-NRU アッセイを構築することができた。また、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、より多様な物質を対象とした検証と知見の蓄積を通じて、A549-NRU アッセイのさらなる汎用性の拡大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. Akane H., Toyoda T., Mizuta Y., Cho YM., Ide T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. J Appl Toxicol. 2022, 42, 1603-17.
2. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Matsushita K., Kijima A., Nohmi T., Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt* delta rats. Food Chem. Toxicol. 2022, 168.
3. Ishii Y., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Namiki M., Takasu S., Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging, Food Chem. Toxicol. 2022, 161.
4. Toyoda T., Kobayashi T., Miyoshi N., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. J Toxicol Sci. 2022, 47, 457-66.
5. Yamada T., Toyoda T., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Cho YM., Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. Toxicol Sci. 2022, 189, 51-61.
6. Toyoda T., Kobayashi T., Miyoshi N., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to o-toluidine and o-anisidine. Arch Toxicol. 2023, 97: 3197-

- 207.
7. Toyoda T., Sone M., Matsushita K., Akane H., Akagi J., Morikawa T., Mizuta Y., Cho Y.M., Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. *J Toxicol Sci.* 2023, 48: 323-32.
8. Takasu S., Ishii Y., Namiki M., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Nohmi T., Ogawa K. Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acethyl-2,5-dimethylfuran in male *gpt* delta rats. *Food Chem. Toxicol.* 2023, 172.
9. Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Nohmi T., Umemura T., Ogawa K. Site-specific genotoxicity of rubiadin: localization and histopathological changes in the kidneys of rats. *Arch. Toxicol.* 2023, 97 (12), 3273-3283.
10. Ishii Y., Liang Shi, Takasu S., Ogawa K., Umemura T. A 13-week comprehensive toxicity study with adductome analysis demonstrates the toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of the natural flavoring agent elemicin, *Food Chem. Toxicol.* 2023, 179, 113965.
11. Ishii Y., Namiki M., Takasu S., Nakamura K., Takimoto N., Mitsumoto T., Ogawa K. Lack of genotoxic mechanisms in isoeugenol-induced hepatocellular tumorigenesis in male mice. *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2023, 30 (1), 9-22.
12. Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol.* 2023, 175: 113702.
13. Akagi J., Mizuta Y., Akane H., Toyoda T., Ogawa K. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. Part Fibre Toxicol. 2023, 20: 13.
14. Takimoto N., Ishii Y., Mitsumoto T., Takasu S., Namiki M., Shibutani M., Ogawa K. Formation of hepatocyte cytoplasmic inclusions and their contribution to methylcarbamate-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Toxicol. Sci.* 2024, 198 (1), 40-49.
15. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Kijima A., Matsushita K., Masumura K., Nohmi T., Umemura T. Possible contribution of 8-hydroxydeoxyguanosine to gene mutations in the kidney DNA of *gpt* delta rats following potassium bromate treatment. *Mutat. Res.* 2024, 894, 503729.
16. 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(7), 1084-1103.
17. 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: 455-69.
18. Matsushita K., Toyoda T., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Expression of CD44 in renal tubular epithelial cells in fibrotic lesions in the kidney of rat model of chronic kidney disease induced by cyclosporine. *J Toxicol Pathol.* 2024, 37: 55-67.
19. 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 S., 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
 24. 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; 25:3.
 25. 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(12), 1976-1985.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.
 35. 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.
36. 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.
 37. 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.
 38. 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.
 39. 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., Pfuhler, 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. Yamamoto, T., Gi, M., 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.
 43. Yamamoto, S., Kato, M., Takeyama, Y., Azuma, Y., Yukimatsu, N., Hirayama, Y., Otsoshi, 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: 2197-2205.
 44. Yamaguchi, T., Gi, M., 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.
 45. 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: 36.
 46. 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.
 47. 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. *Toxicol. Sci.* 2023; 195: 202-212.
 48. Beal, M. A., Chen, G., Dearfield, K. L., Gi, M., Gollapudi, B., Heflich, R. H., Horibata, K., Long, A. S., Lovell, D. P., Parsons, B. L., Pfuhler, S., Wills, J., Zeller, A., Johnson, G., White, P. A. 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; 1-20.

49. Suzuki, S., Asai, K., Gi, M., Kojima, K., Kakehashi, A., Oishi, Y., Matsue, T., Yukimatsu, N., Hirata, K., Kawaguchi, T., Wanibuchi, H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J. Toxicol. Pathol.* 2022; 35: 247-254.
50. Oikawa, D., Gi, M., Kosako, H., Shimizu, K., Takahashi, H., Shiota, M., Hosomi, S., Komakura, K., Wanibuchi, H., Tsuruta, D., Sawasaki, T., Tokunaga, F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis.* 2022; 13: 694.
51. Matsue, T., Gi, M., Shiota, M., Tachibana, H., Suzuki, S., Fujioka, M., Kakehashi, A., Yamamoto, T., Kato, M., Uchida, J., Wanibuchi, H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer science.* 2022; 113: 2642-2653.
52. Aoyama Y., Naiki-Ito A., Xiaochen K., Komura M., Kato H., Nagayasu Y., Inaguma S., Tsuda H., Tomita M., Matsuo Y., Takiguchi S., Takahashi S. Lactoferrin Prevents Hepatic Injury and Fibrosis via the Inhibition of NF- B Signaling in a Rat Non-Alcoholic Steatohepatitis Model *Nutrients* 14, 42, 2022.
53. Saleh D., Luo S., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Gunasekaran S., El-gazzar AM., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Randa Hussein Abd el Hady, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Jiegou Xu, Suzuki S., Naiki-ito A., Takashi S., Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Particle and Fibre Toxicology*, 19:30, 2022.
54. Sultana N, Fukamachi K, Jiegou Xu, Tsuda H., Suzui M. mRNA expression profile of cytokines in rat primary alveolar macrophages treated with multiwalled carbon nanotube (MWCNT). *Fundam Toxicol Sci.* 10:27-30, 2023.
55. Sultana N, Fukamachi K, Roy DC, Jiegou Xu, Tsuda H., Suzui M. mRNA expression levels of CCL4, IL6, and CXCL2 in multiwalled carbon nanotube induced lung tumors in rats. *Fundam Toxicol Sci.* 10:137-141, 2023.
56. 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.
57. 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.

F.2 学会発表

1. 森川朋美, 豊田武士, 赤根弘敏, 松下幸平, 小川久美子, ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験, 日本食品化学学会第28回総会・学術大会 2022年5月, 東京
2. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子: 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較: 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
3. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: γ-H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発: 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
4. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いたCD44の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証: 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
5. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子: ナノサイズ酸化チタン (IV) の毒性研究: 第49回日本毒性学会学術集会

- 2022年6月, 札幌
6. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: AKIからCKDへの移行におけるCD44の役割とバイオマーカーとしての応用: 第65回日本腎臓学会学術総会 2022年6月, 神戸
 7. 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子: Acetamideの肝発がん機序に関する検討: 血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較: 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
 8. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之: 細胞毒性を有するo-Toluidineとo-anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する: 第29回日本がん予防学会総会 2022年7月, 京都
 9. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索: 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2022年8月, 東京
 10. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介: コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価: 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2022年8月, 東京
 11. 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子: ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出: 第81回日本癌学会学術総会 2022年9月, 横浜
 12. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子: 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における γ -H2AXの役割: 第81回日本癌学会学術総会 2022年9月, 横浜
 13. 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子: Acetamideが誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序: 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
 14. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介: コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価: 第44回日本バイオマテリアル学会, 2022年11月, 東京都
 15. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子: ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性: 第59回全国衛生化学技術協議会年会 2022年11月, 川崎
 16. 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子: 全ゲノム解析から明らかになったacetamideのラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子c-Mycの関与: 第51回日本環境変異原ゲノム学会 2022年11月, 広島
 17. 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子: ラット肝細胞におけるAcetamideの大型小核誘発機序に関する研究: 第51回日本環境変異原ゲノム学会 2022年11月, 広島
 18. 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 並木萌香, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子: アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序: 第51回日本環境変異原ゲノム学会 2022年11月, 広島
 19. 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志: フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価: 第51回日本環境変異原ゲノム学会 2022年11月, 広島
 20. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: 薬剤性腎障害の慢性化病変におけるCD44陽性尿細管の病態生理学的意義: 第5回医薬品毒性機序研究会 2022年12月, 東京
 21. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子: ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較: 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京

22. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: γ -H2AX免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発: 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
23. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割とCD44との関連: 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
24. 瀧本憲史, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 満元達也, 渋谷 淳, 小川久美子: アセトアミドのラット肝発がん機序におけるchromoanagenesisの関与の可能性: 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
25. 高須伸二, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 相馬明玲, 能美健彦, 小川久美子: *gpt delta* ラットを用いた肝中期試験法による6-methoxyquinolineの*in vivo*遺伝毒性・発がん性の評価: 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
26. 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子: *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験による2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutylamide (ITB)の評価: 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
27. 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子: Acetamide投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序: 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
28. Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
29. Toyoda T., Yamada T., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
30. Ogawa K., Akagi J., Mizuta Y., Akane H., Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
31. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子: 結晶子径6 nmの超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性: 日本薬学会第143年会 2023年3月, 札幌
32. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 渡邊正悟, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之: 単環芳香族アミンの新規尿中代謝物はラット膀胱上皮におけるALDH1A1の発現を誘導する: 日本農芸化学会2023年度大会 2023年3月, Web開催
33. 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 相馬明玲, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子: 齧歯類に見られるacetamideの肝発がん性の種差に関する研究: 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
34. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂 忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子: 脱ヨウ素酵素阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較: 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
35. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: シクロスポリン誘発慢性腎障害におけるCD44の役割及びバイオマーカーとしての可能性: 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川
36. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: γ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発: 第50回日本毒性学会学術年会 2023年6月, 神奈川

37. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 豊田武士, 小川久美子: 結晶子径 6 nm の二酸化チタンナノ粒子のラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験: 第 50 回日本毒性学会学術年会 2023 年 6 月, 神奈川
38. 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 高須伸二, 並木萌香, 能美健彦, 小川久美子: 2-Isopropyl-N-2,3-trimethyl butylamide の包括的毒性評価: 日本食品化学学会 第29回総会・学術大会 2023年6月, 富山
39. 赤根弘敏, 豊田武士, 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子: ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出: 第82回日本癌学会学術総会2023年8月, 神奈川
40. 石井雄二, 高須伸二, 小川久美子: アセトアミド誘発ラット肝腫瘍におけるクロモスリプシス様染色体再構成の関与: 第82回日本癌学会学術総会2023年8月, 神奈川
41. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子: 腎発がん物質の28 日間反復経口投与はラット腎臓に γ -H2AX 形成を誘導する: 第82回日本癌学会学術総会2023年8月, 神奈川
42. 石井雄二, 瀧本憲史, 田原麻衣子, 河上強志, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子: アセトアミドの大型小核誘発機序に関わる代謝物の検索: 第52回日本環境変異原ゲノム学会2023年11月, 福岡
43. 石井雄二, 山上洋平, 田原麻衣子, 河上強志, 瀧本憲史, 笠松健吾, 相馬明玲, 高須伸二, 小川久美子: Acetamide のラット肝臓における代謝物と核の形態異常への関与: 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
44. 笠松健吾, 石井雄二, 山上洋平, 高須伸二, 相馬明玲, 小澤俊介, 渋谷淳, 小川久美子: 免疫組織化学染色による小核化肝細胞の検出: 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
45. 高須伸二, 石井雄二, 相馬明玲, 松本真理子, 小川久美子: SDラットを用いた decyltrimethoxysilane の13週間反復投与試験: 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
46. 赤根弘敏, 豊田武士, 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: TSH産生阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出における病理学的解析と血中ホルモン値の比較: 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
47. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子: シクロスポリン誘発ラット腎線維化モデルにおける尿細管の形態とCD44発現: 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
48. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小川久美子: γ -H2AX免疫染色によるラット腎発がん物質の早期検出: 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
49. 畝山瑞穂, 豊田武士, 赤木純一, 赤根弘敏, 水田保子, 森川朋美, 小川久美子: ラット肝発がん物質の早期検出における ALDH3A1 と γ -H2AX免疫染色の有用性評価: 第40回日本毒性病理学会 2024年1月, 東京
50. 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 満元達也, 相馬明玲, 小川久美子: Acetamide の肝発がんに関与する肝細胞質内封入体の形成機序: 日本薬学会第144年会 2024年3月, 神奈川
51. Ogawa K., Akagi J., Mizuta Y., Uneyama M., Akane H., Toyoda T. Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30, and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
52. Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Uneyama M., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Effective method for early detection of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
53. Toyoda T., Matsushita K., Akane H., Uneyama M., Morikawa T., Ogawa K. Early

- detection of renal carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2024.3, Salt Lake City
54. 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 2024年6月, 青森
 55. 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 2024年7月, 福岡
 56. 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 2024年7月、福岡
 57. 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 2024年7月、福岡
 58. 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 2024年7月、福岡
 59. 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 2024年7月、福岡
 60. 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 2024年9月, 福岡
 61. 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 2024年9月, 福岡
 62. 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 2024年9月, 北海道
 63. 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 2024年11月, 福岡
 64. 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 2024年12月, 岡山
 65. 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
 66. 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 2025年1月, 静岡
 67. 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 2025年1月, 静岡
68. 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 2025年1月, 静岡
 69. 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.
 70. 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.
 71. 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.
 72. 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
 73. 藤岡正喜, 魏民, 芝野佳奈、邱桂鈺、Vachiraarunwong Arpamas、郭潤傑、鈴木周五、鰐渕英機. 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)
 74. 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)
 75. 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)
 76. 藤岡正喜、Vachiraarunwon Arpamas、邱桂鈺、郭潤傑、鈴木周五、鰐渕英機、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)
 77. 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、鰐渕英機. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法 (第81回日本癌学会学術総会、令和5年9月30日、横浜)
 78. 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、鰐渕英機. ヒ素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常の関与 (第27回ヒ素シンポジウム、令和5年12月3日、今治)
 79. Saleh D., Alexander TW., Alexander DB., Abdelgied M., El-gazzar AM., Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S., Takase H., Naiki-Ito A., Suzuki S., Gi M., Taquahashi, Y., Hirose A., Kanno J., Tsuruoka S., Tsuda H. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY、オランダ 2022.9.18-22
 80. Tsuda H. Carbon nanotubes (CNT), innovative materials of the 21st century: carcinogenicity evaluation of CNT with different wall structures, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)
 81. 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)

82. 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)

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.

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

Table 1-1. List of test substances.

No.	Test substance	CAS Number	Supplier	Purity (%)
1	1-Chloro-2-propanol	127-00-4	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	98.4
2	1-Nitropropane	108-03-2	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.8
3	2,3-Butanedione	431-03-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100.0
4	2-Butoxyethanol	111-76-2	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.8
5	2-Dimethylaminoethanol	108-01-0	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100.0
6	2-Isobutoxyethanol	4439-24-1	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	99.8
7	2-Methoxyethanol	109-86-4	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
8	2-Nitropropane	79-46-9	Nacalai Tesque, Inc.	100.0
9	Acetonitrile	75-05-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100.0
10	Acrylic acid	79-10-7	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.8
11	Allyl acetate	591-87-7	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	98.3
12	Allyl alcohol	107-18-6	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100.0
13	Aniline	62-53-3	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.4
14	Chloroacetone	78-95-5	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	95.2
15	Cyclohexanone	108-94-1	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100.0
16	Malononitrile	109-77-3	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.7
17	Hexahydro-1H-azepine	111-49-9	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
18	Methacrylonitrile	126-98-7	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
19	Methylhydrazine	60-34-4	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
20	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	110-18-9	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.8
21	N,N-Dimethylacetamide	127-19-5	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
22	N,N-Dimethylformamide	68-12-2	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100.0
23	o-Chlorophenol	95-57-8	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.3
24	t-Butyl alcohol	75-65-0	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100.0

Table 1-2-1. Clinical signs in rats.

	chloroacetone	<i>o</i> -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 1-2-2. Clinical signs in rats.

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

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

Table 1-3-1. Histopathological findings in rats.

		chloroacetone	<i>o</i> -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 1-3-2. Histopathological findings in rats.

		2,3-butanedione	cyclohexanone	tert -Butyl alcohol	<i>N,N</i> -dimethyl formamide		<i>N,N</i> -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		0	0	0	5(0, 0, 0, 5)	0	0

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

/, not examined

Table 1-3-3. 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	6	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)
	Hemorrhage	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)
	Hemorrhage (±, +)	1(0, 1)	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)
	Inflammation, acute alveolar/interstitial (±, +, ++)	6(0, 6, 0)	1(0, 1, 0)	2(0, 2, 0)	3(0, 3, 0)	5(2, 3, 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)
	Edema (±, +, ++)	6(2, 4, 0)	1(1, 0, 0)	2(0, 2, 0)	3(1, 2, 0)	3(3, 0, 0)
	Hemorrhage (±, +, ++)	6(1, 4, 1)	1(1, 0, 0)	1(1, 0, 0)	3(2, 1, 0)	4(3, 1, 0)
Liver		0	1(0, 0, 1, 0)	0	0	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		0	1(0, 0, 1)	0	0	6(1, 5, 0)

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

/, not examined

Table 1-3-4. Histopathological findings in rats.

		methacrylonitrile		allyl acetate		allyl alcohol	
Dose (mg/kg)		100		100	200	120	240
Necropsy day		1	0	1	0	0	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 1-3-5. 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		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 1-4. 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 1-5. 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.

Table 2-1. 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-)
2	<u>1,2-Dichloroethane</u>	107-06-2	98.96	1.245	2% DMSO in RPMI (FBS-)
3	<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+)
5	<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-)
7	<u>1-Nitropropane</u>	108-03-2	89.09	0.996	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
8	<u>2,3-Butanedione</u>	431-03-8	86.09	0.99	RPMI (FBS+)
9	<u>2-Butoxyethanol</u>	111-76-2	118.17	0.902	RPMI (FBS+)
10	<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+)
19	<u>Acetylacetone</u>	123-54-6	100.12	0.972	RPMI (FBS+)
20	<u>Acrylic acid</u>	1979/10/7	72.06	1.051	RPMI (FBS+)
21	<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-)
26	<u>Carbon tetrachloride</u> *	56-23-5	153.82	1.594	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
27	<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-)
29	<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-)
31	<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+)
34	<u>Glycidol</u>	556-52-5	74.08	1.143	RPMI (FBS+)
35	<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+)
40	<u>N,N-Dimethylacetamide</u>	127-19-5	87.12	0.937	RPMI (FBS+)
41	<u>N,N-Dimethylformamide</u>	1968/12/2	73.09	0.945	RPMI (FBS+)
42	<u>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</u>	110-18-9	116.2	0.777	RPMI (FBS+)
43	<u>o-Chlorophenol</u>	95-57-8	128.56	1.263	2% Ethanol in RPMI (FBS-)
44	<u>Polyacrylic Acid 5000 (10%)</u>	9003/1/4	5000	0.1	RPMI (FBS+)
45	<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 2-2. 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 2-2. 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 15 min-A549 (mg/ml)	LC ₅₀ for 4-hour rat inhalation		LD ₅₀ from 4- hour rat inhalation (mg/kg)
								ppm	mg/L	
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 2-3. 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
Hexahyro-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

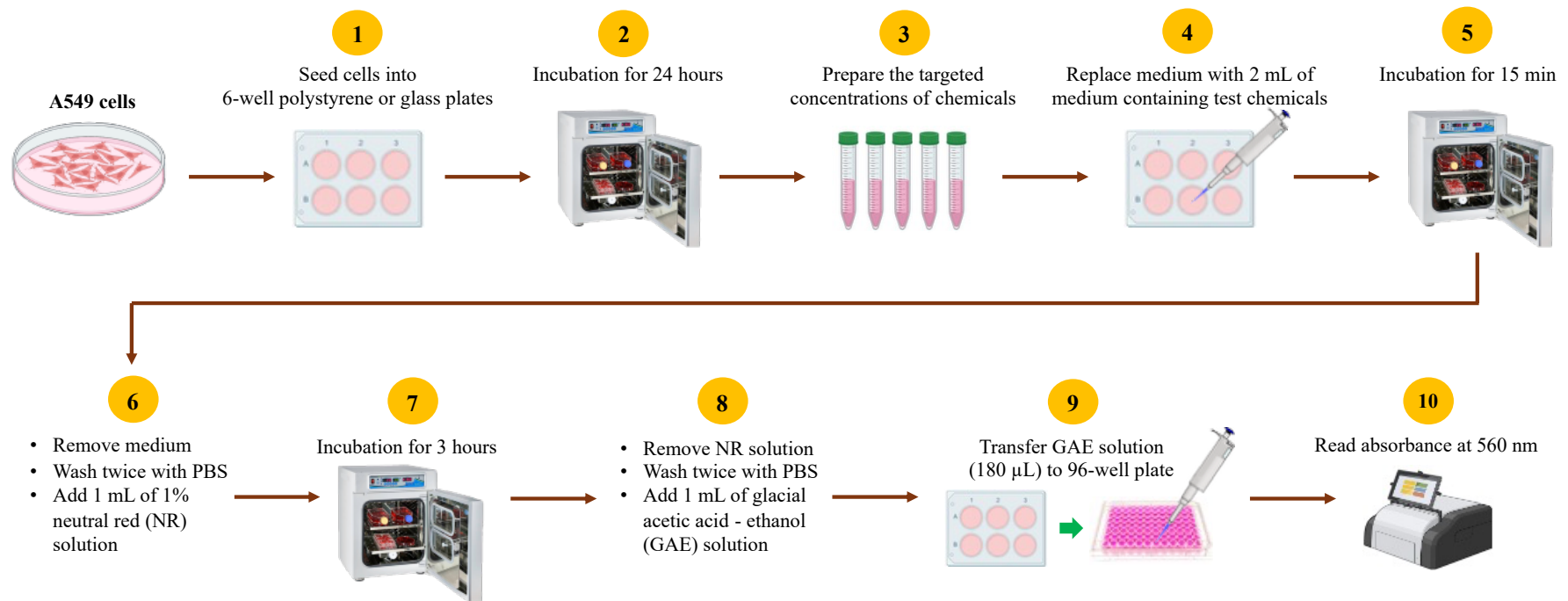


Figure 2-1. Workflow of A549-NRU assay

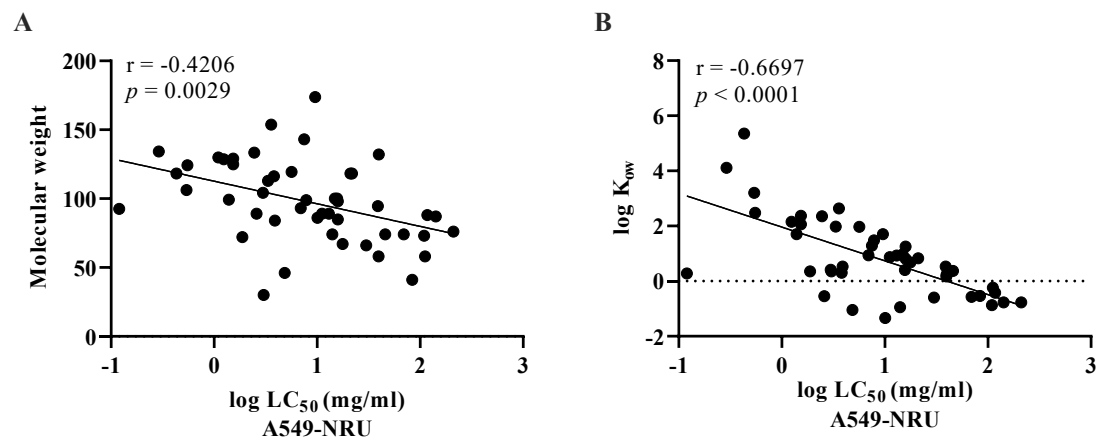


Figure 2-2. The correlation between log LC₅₀ values form A549-NRU assay and MW (A), and log K_{ow} (B) for all tested chemicals.

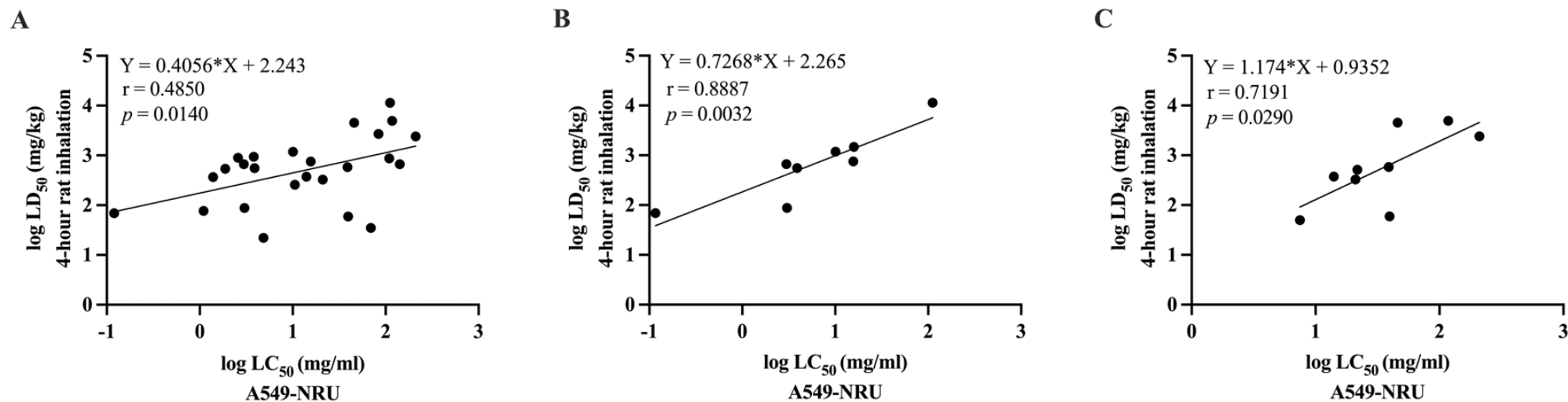


Figure 2-3. The significant correlation between LC₅₀ values from A549-NRU and LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation, grouped by water-soluble (A), chemicals containing aldehydes and ketones groups (B), and chemicals containing alcohols, ethers, and epoxides groups (C).

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

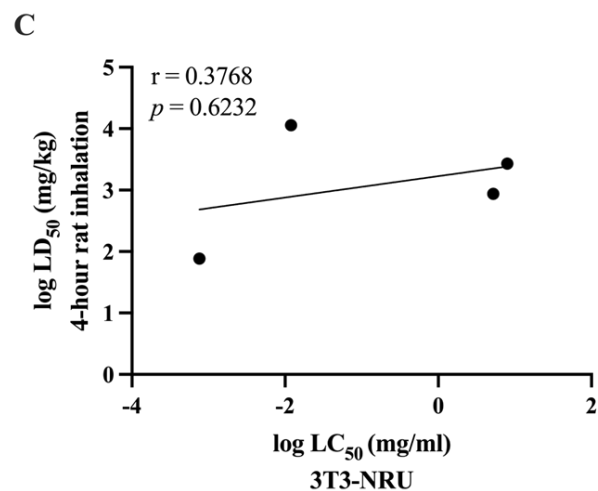
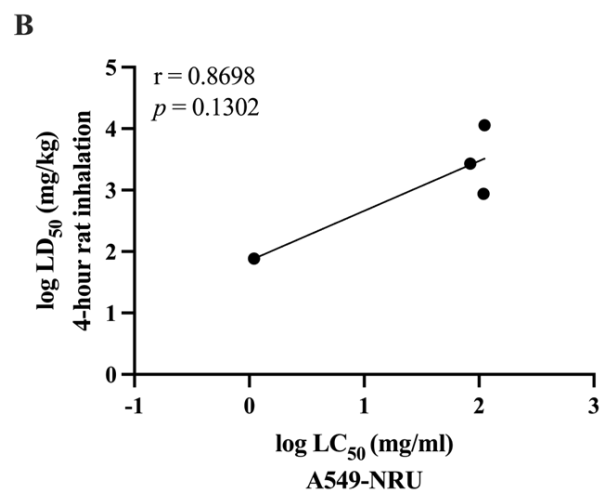


Figure 2-4. LC₅₀ values from A549-NRU and 3T3-NRU assays, and LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation studies (A), correlation between LD₅₀ values from 4-hour rat inhalation and LC₅₀ values from A549-NRU (B) and LC₅₀ values from 3T3-NRU (C). LC₅₀ values in 3T3-NRU assay were obtained from Mannerström et al. (2017) and OECD (2010).

Table 3-1 : 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)	160-320 mg/kg	Oral	Mammary gland, Testes, liver	12.5% (14/40)	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 7.4% (3/40)
N,N-Dimethyl formamide (G2A)	1280-2560 mg/kg	Inhalation	Liver	10.8% (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) *Adrenal tumor 3% (1/31) *Thyroid tumor 13% (4/31)
N.N. dimethyl Acetamide (G2B)	1280-2560 mg/kg	Inhalation	Liver	13% (3/23)	0	0	0	0	0

Table 3-2 : 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)