in vitro試験とラットにおける in vivo気管内投与試験を組み合わせた簡便急性毒性試験方法

名古屋市立大学　大学院医学研究科
津田特任教授研究室
特任教授　津田　洋幸

2022年10月25日

従来技術とその問題点

日本国の毒物及び劇物取締法（毒劇法）においては、約500化合物が指定されており、殆どの物質の評価には事業場を想定した吸入曝露試験が必要とされている。

しかし、化学物質の吸入曝露試験は高額な費用がかかることから世界的に施設が少なく（調べた範囲で5施設）、多くの化合物が未実施または経口・腹腔内投与試験にて代替されているが、実際の標的臓器と異なるため、正確な暴露データは得られていない。

また動物倫理の観点からも、実験において「動物数の削減」は必要であり、実験動物への負担を軽減し信頼度の高い吸入曝露試験の代替法が求められている。

新技術の特徴・従来技術との比較

本技術は、化学物質の急性毒性吸入曝露試験において、検体をin vitroにおける予備試験と、in vivoにおける気管内投与試験とを組み合わせることで、吸入暴露試験の LC50(4-6h)値またはその近似値を容易にして安価に得ることを可能としたものである。

この方法によって、ラットまたはマウスへの投与量が容易に得られ、従来の様に大規模な設備を使用することなく、狭い用量域を設定できるので、従来より少ない動物数でより正確なLD50値が得られるという特徴を持つ。

本技術の概要

試験法の構成：1）*In vitro* と 2）*In vivo* 結合試験）

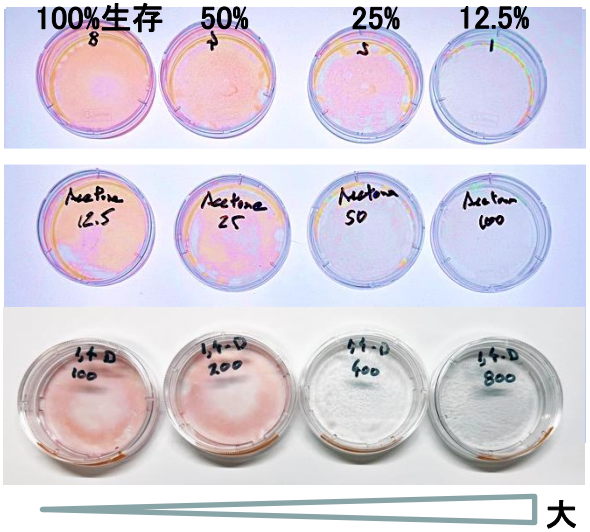
1）In vitro LD50 値を TIPS投与試験に応用する。

2）気管肺内噴霧投与（TIPS）試験

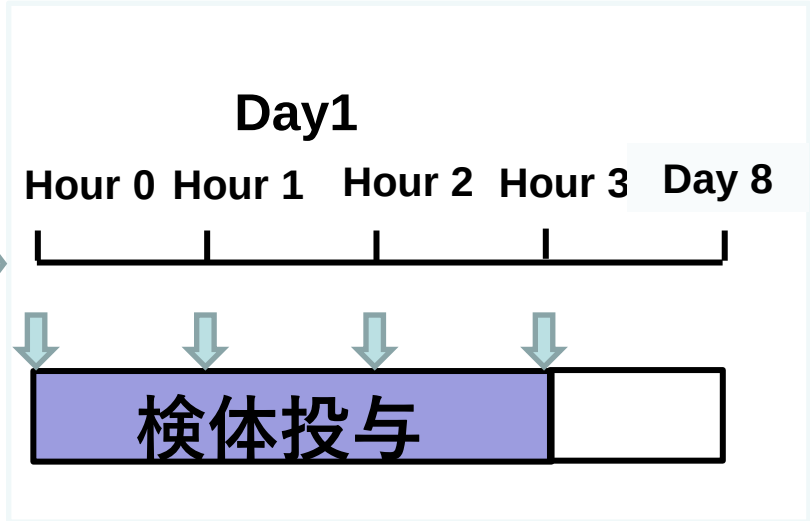
ラットにおいて、In vitro LD50 値に基づき短時間に3～4回のTIPS投与を行い、7日～2週後のLD50値を求める。下に7日後（8日）終了のモデルを示す。

1）*Neutral Red* 試験　2)ラットへの短期気管内投与

Relative A549 Cell Number
換算基準細胞数(モノサシ)



化合物の投与量



LD50値

Neutral red 試験の用量域の構築ととTIPS試験の用量

1,4-Dioxaneの例：Neutral Red LD50データ(μl/ml)をラットTIPS容量(mg/kg)へ換算する手順

Neutral Red試験（α μl/ml：予備試験使用量）

1）2 ml RPMI培養液中に検体を2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 μl にて加える。
この中にA549肺がん細胞を入れて 15 min 培養後に検体を除去する（培養液を捨てる）
Neutral Red （0.033mg/ml）を加えた培養液にてA549細胞 3 時間培養する

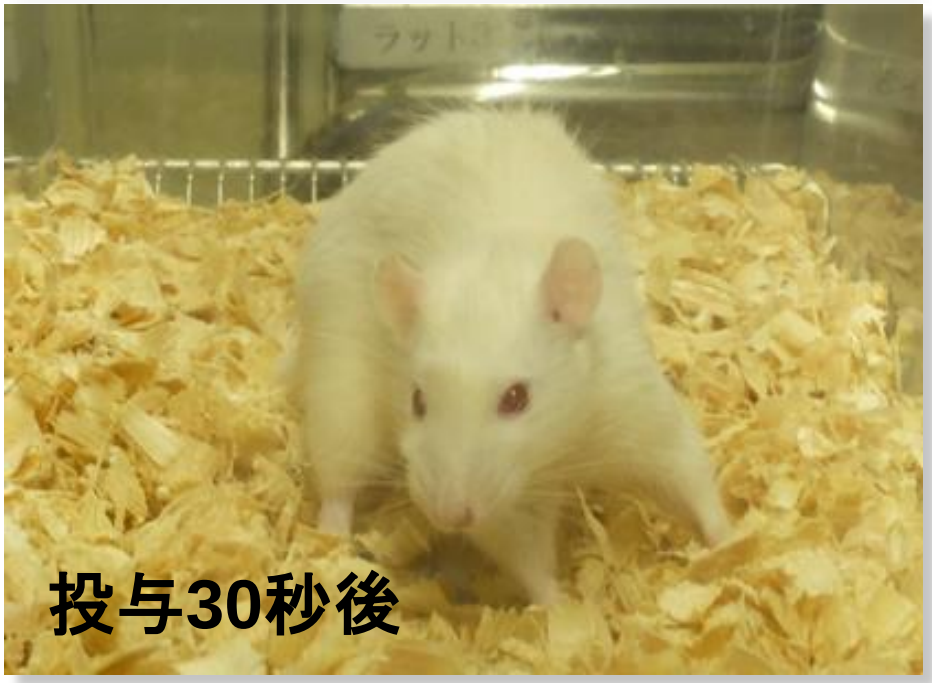
2）A549細胞数の計測（Neutral Red の濃度による1,4-DioxaneのLD50=150 μl/mlを得る）
倍数による高低 5用量を決める
Neutral Red LD50 ÷ 4 ＝低用量側： 37.5 μl/ml（α）
Neutral Red LD50 x 4 ＝高用量側： 600 μl/ml(α)
例：検体 A の Neutral Red LD50 ＝ 150 μl/ml
TIPSの最低用量 ＝ 150 ÷ 4 ＝ 37.5 μl/ml；最高用量 ＝ 150 x 4 ＝ 600 μl/ml
よって、TIPS全用量域 ＝ 37.5, 75, 150, 300, 600μl/ml

TIPS予備試験（β mg/kg ：総投与量）

検体A のTIPS（dose mg/kg 換算）量
＝ A (容器に記載されている購入検体の濃度は１.034)
x B (＝ α：Neutral Red 試験における検体の濃度は37.5～600μl/ml)
x C (検体のTIPS投与量2μl/g)
=1.034/μl x α（例600) μl/ml x 2μl/体重g
＝ 1240 mg/kg x 4 回投与（0, 1, 2, 3時）（結果的に最高用量に近かった）

気管肺内噴霧投与（TIPS）試験

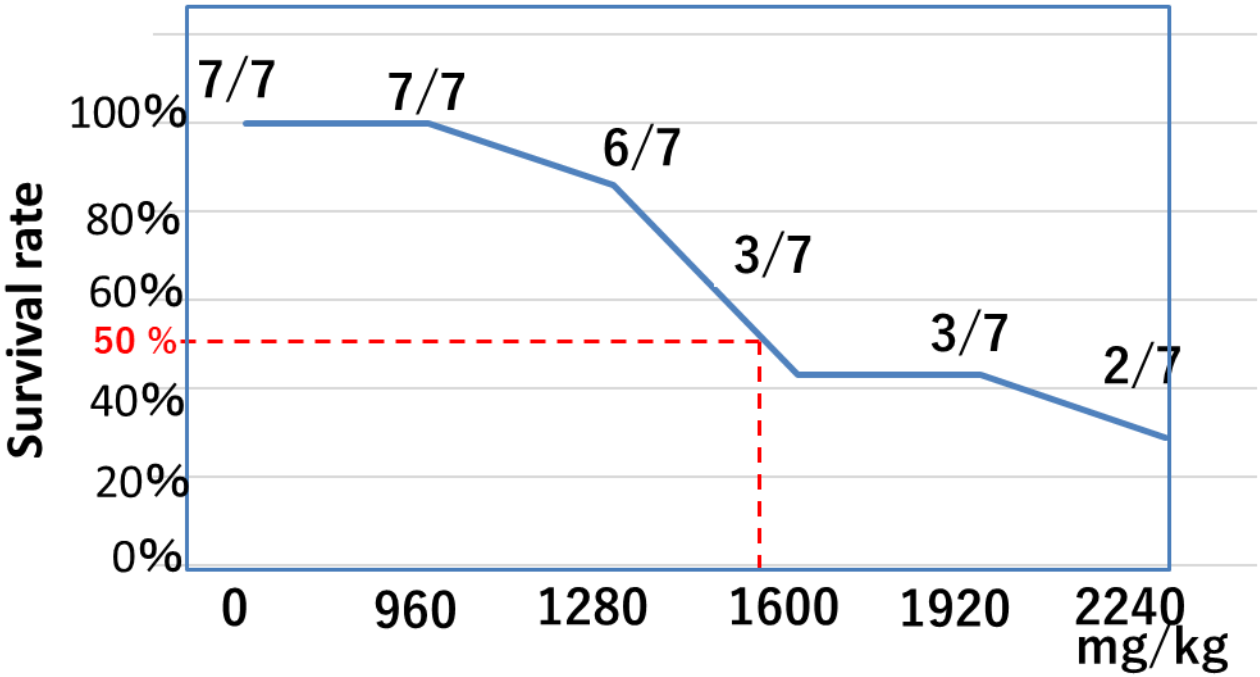
喉頭鏡による気管の視認（矢印）



Vehicle　MWCNT投与肺

TIPS投与による試験値の導出1：検証1,4-ジオキサン

1）1,4-ジオキサン（IARC G2B）



各総投与量の試験動物の生存率をプロットしたグラフから、LD50値を得た。既知の吸入暴露から得られた値と近似した。

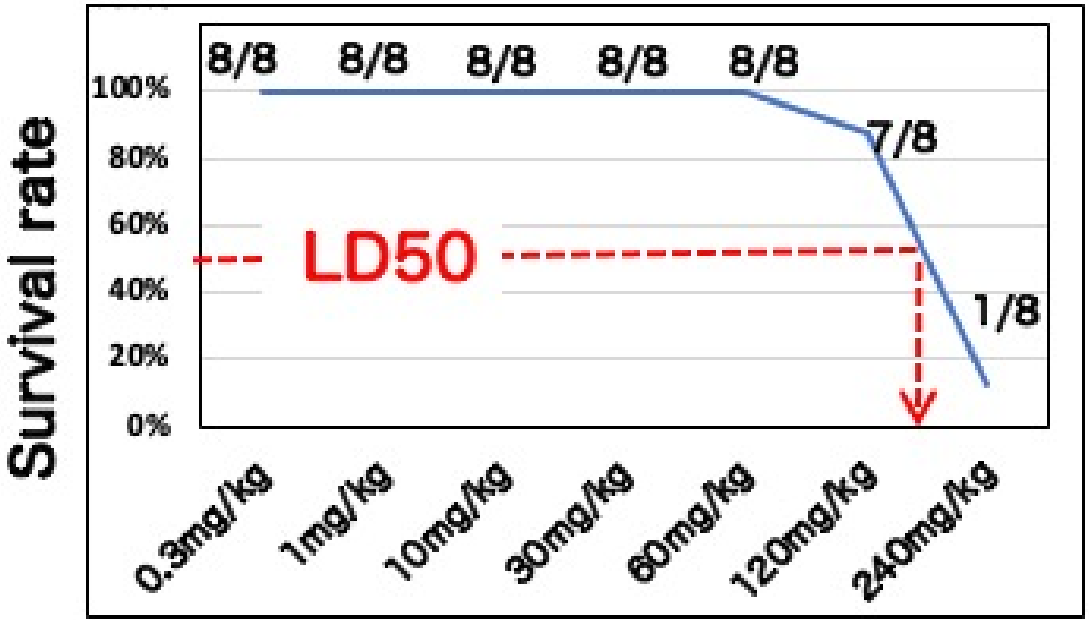
1,4-ジオキサンの国際がん研究機関（IARC）による発がん性の分類は、G2B（ヒトに対して発がん性がある可能性がある。）である。

参考：吸入曝露からのLC計算値
=1920=480x4mg/kg

TIPS投与による試験値（用量）の導出2（他の化学物質）

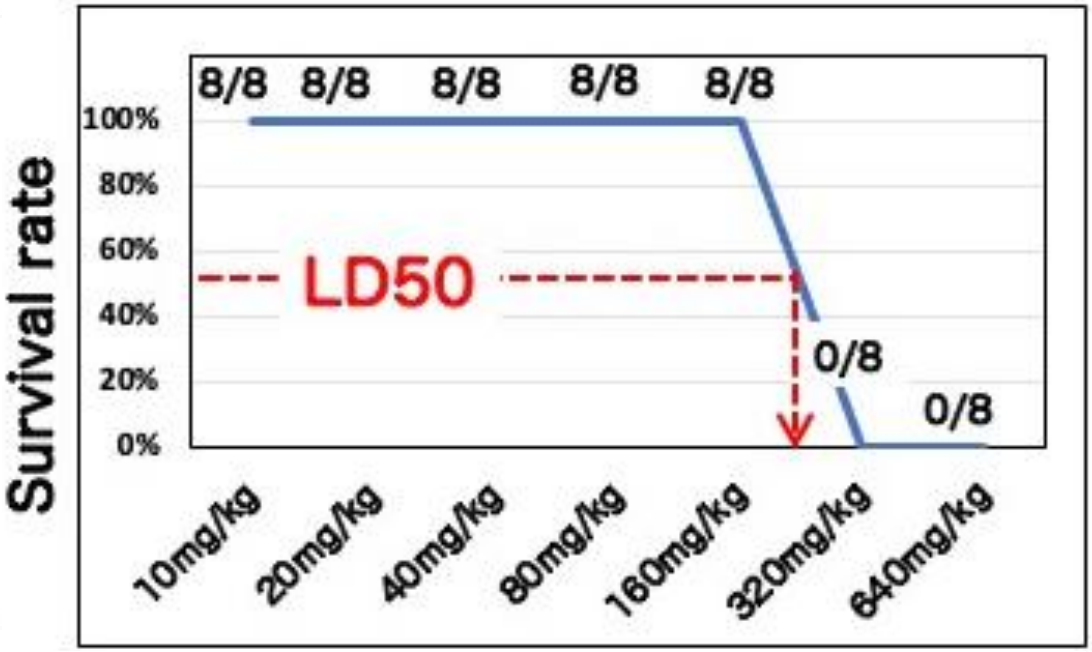
10～12週齢のラットを用い、初回の投与から、1時間後、2時間後、3時間後の計4回にわたって、各回の投与量をβ／4としてTIPS投与を実施した。その後、試験物質を投与せずに2週間観察し、投与終了後2週までに半数のラットが死亡する投与量、すなわち、LD50値として試験値（用量）を求めた。

2) アクリル酸ポリマー



→ TIPSのLD50は120mg/kgと240mg/kgの間にある

4)グリシドール

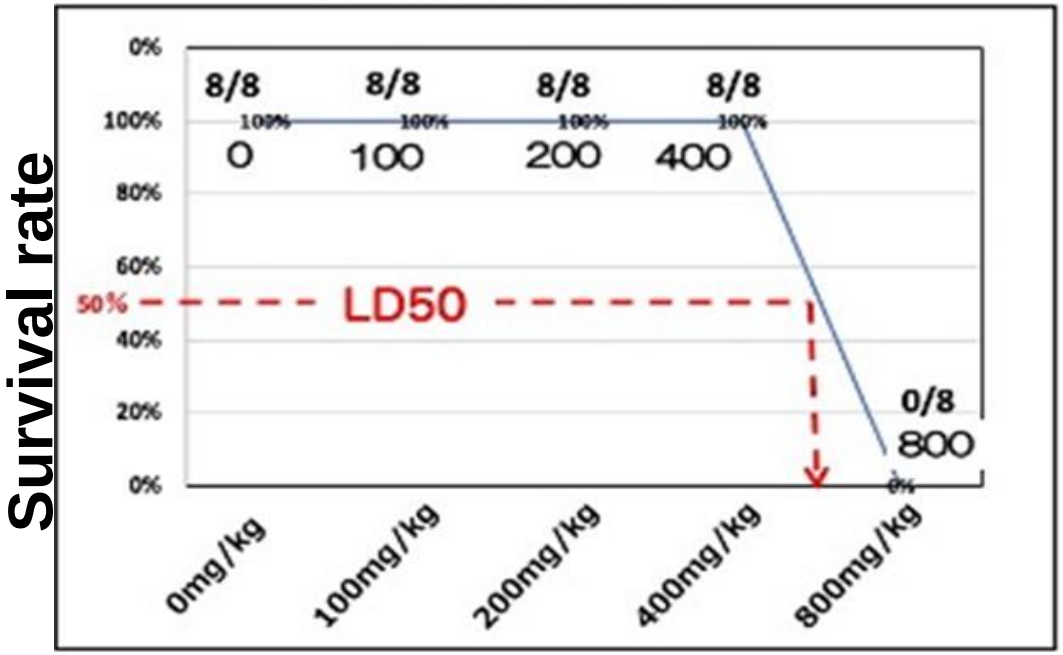


→ TIPSのLD50は160mg/kgと320mg/kgの間にある

TIPS投与による試験値（用量）の導出3（他の化学物質）

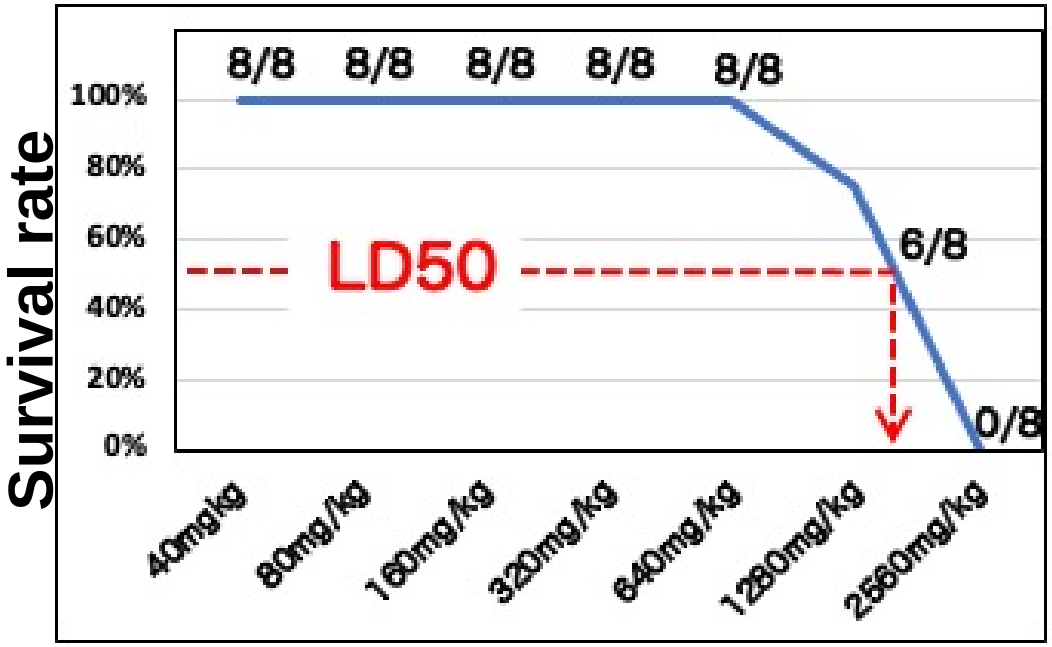
TIPS投与による試験値（用量）の導出（他の化学物質）

5) アセチルアセトン



→ TIPSのLD50は400mg/kgと800mg/kgの間にある

7) *N,N*-ジメチルホルムアミド



→ TIPSのLD50は1280mg/kgと2560mg/kgの間にある

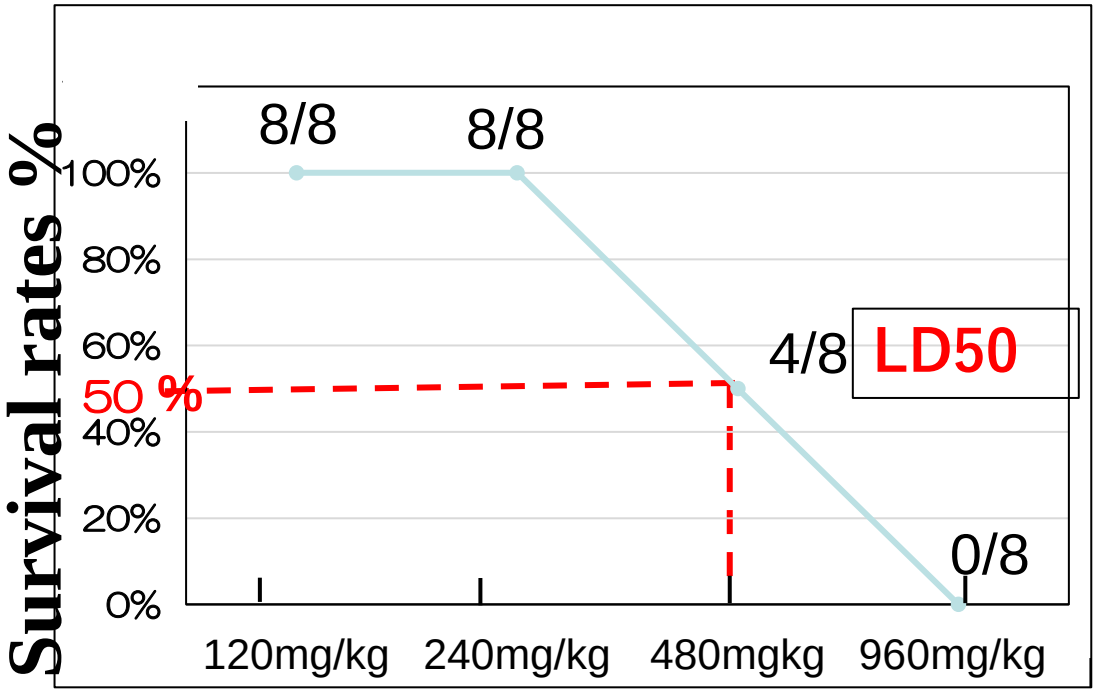
吸入暴露のLC50 (4時間暴露値)と得られたTIPS LD50の比較1

検体	吸入暴露のLC50 (4時間暴露値) mg/kg*	TIPS LD50 mg/kg**	吸入暴露LC50 : TIPS LD50 (上限値の比較)
1) 1-4 ジオキサン (G2B)	1492~2216	1280~1920	1 ： 1 (吸入暴露値閾内)
2) アクリル酸ポリマー	93.7~2466	120~240	1 ： 1 (吸入暴露値閾内)
3) エチレングリコールモノエチルエーテルアセテート(G3)	522~1041	800~1000	1 ： 1 (吸入暴露値閾内)
4) グリシドール (G2A)	92.4~130.7	160~320	1 ： 1.7 ~ 2.4
5) アセチルアセトン	220	400~800	1 ： 2.0 ~ 3.6
6) N,N-ジメチルアセトアミド (G2B)	96.12~671	1280~2560	1 ： 1.9 ~ 3.8
7) N,N-ジメチルホルムアミド (G2A)	328~651 または > 254	1280~ 2560	1 ： 3.0 ~ 3.9

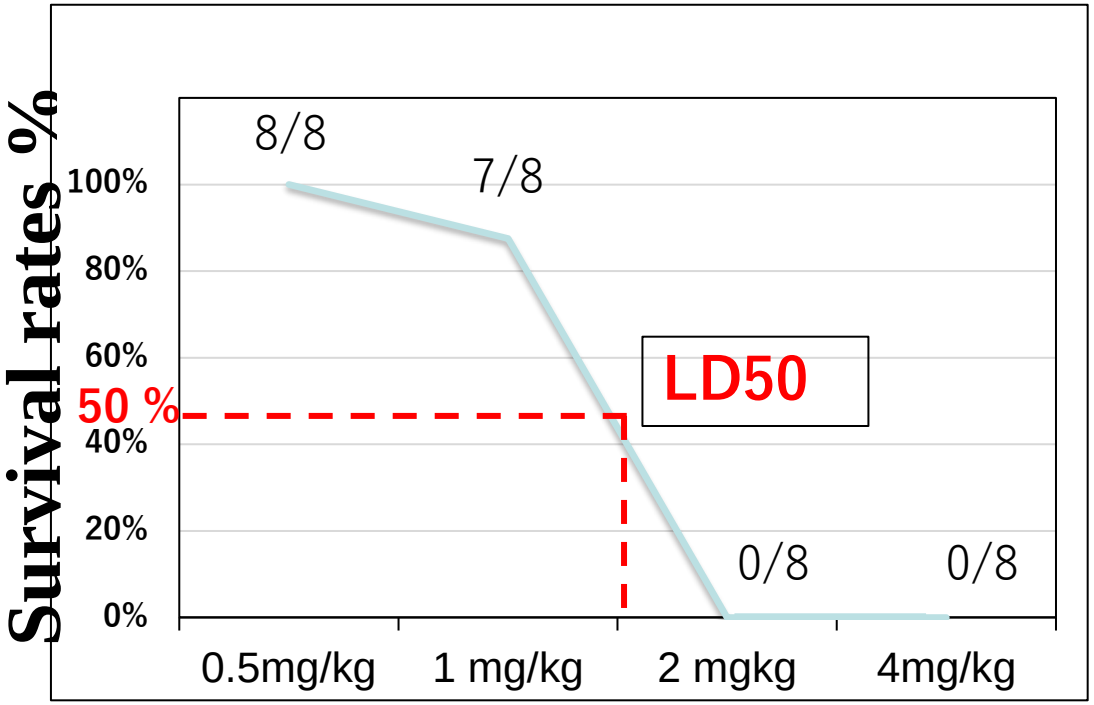
OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、TIPS LD50**の値が 吸入暴露 LC50* の表示最大値の4倍(LC値の施設間の差異の上限)以内入れば TIPSの結果は妥当と考える。

TIPS投与による試験値（用量）の導出4（他の化学物質）

8）グリシジルメタクリレート（G2A） 9）アクロレイン（G2A）



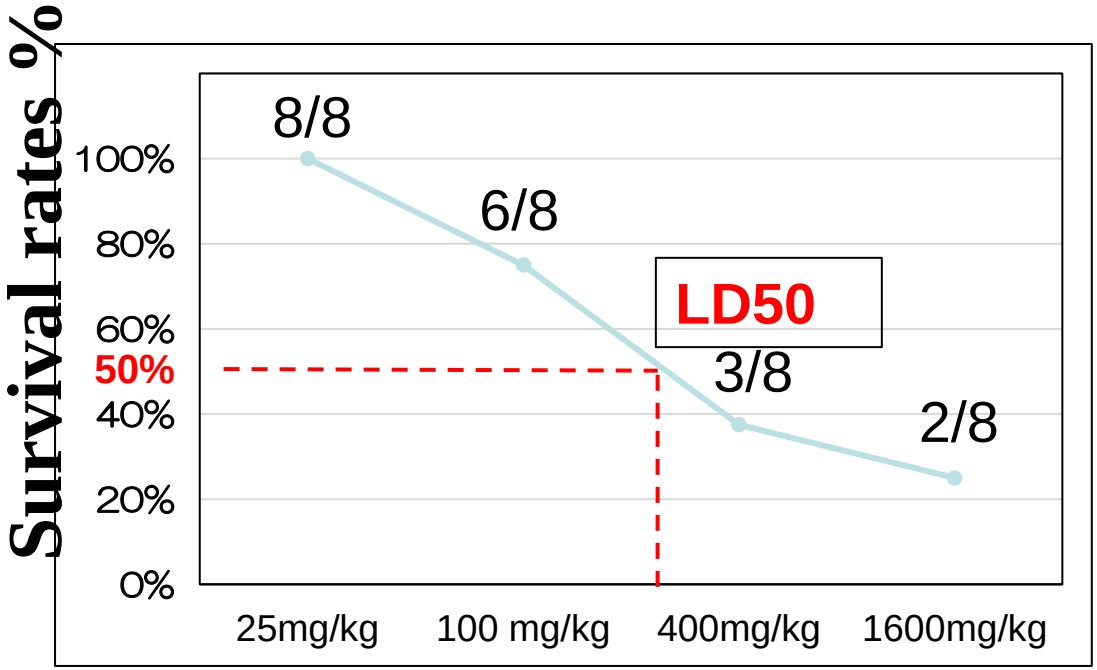
→ TIPSのLD50は240mg/kgと960mg/kgの間にある



→ TIPSのLD50は1mg/kgと2mg/kgの間にある

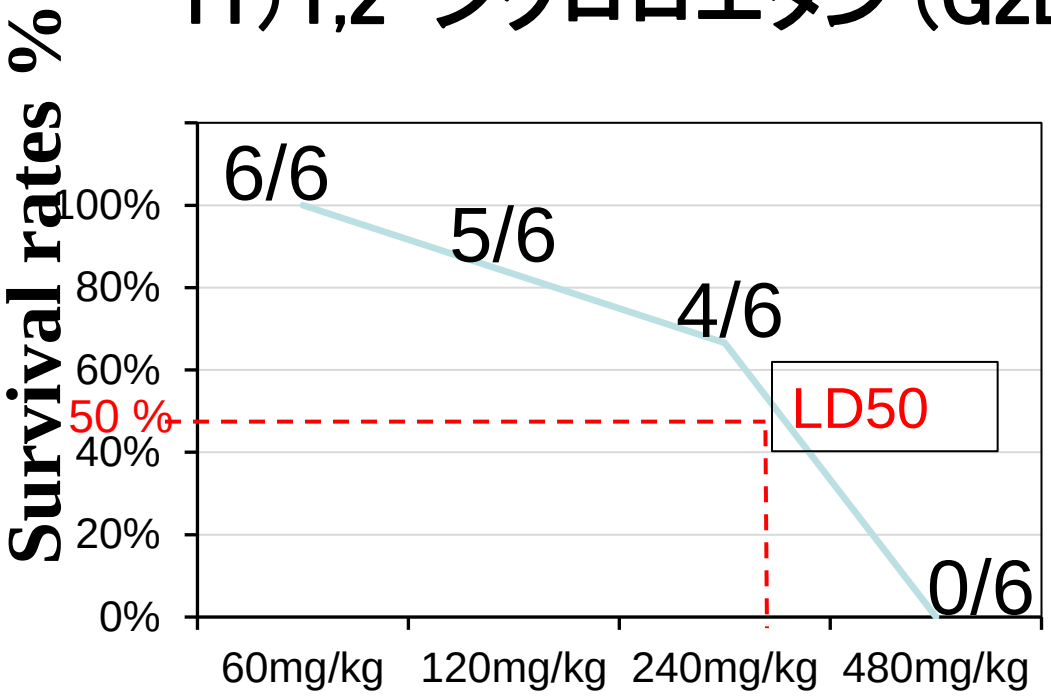
TIPS投与による試験値（用量）の導出5（他の化学物質）

10）キシレン（G3）



→ TIPSのLD50は100mg/kgと400mg/kgの間にある

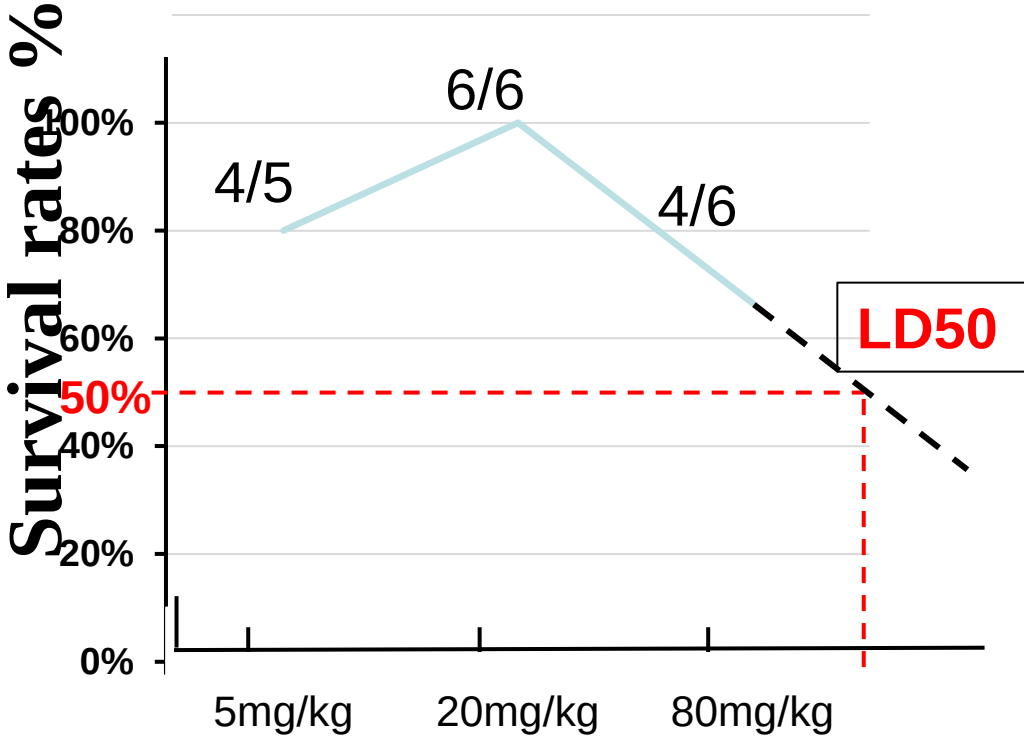
11）1,2-ジクロロエタン（G2B）



→ TIPSのLD50は240mg/kgと480mg/kgの間にある

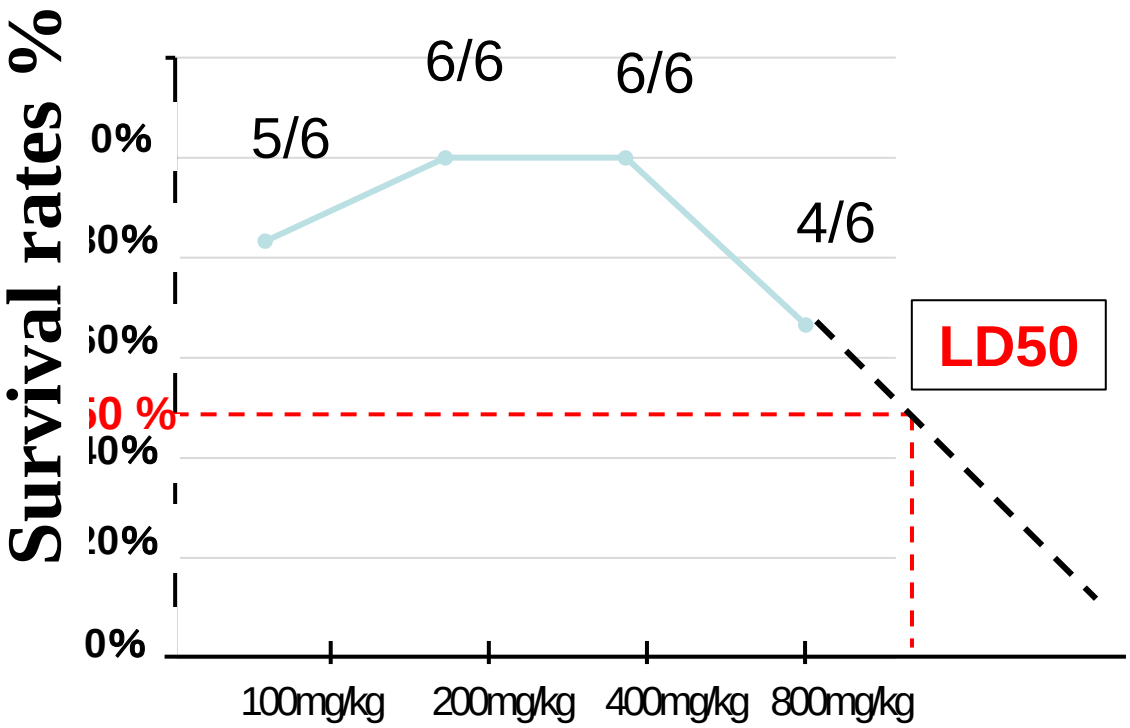
TIPS投与による試験値（用量）の導出6（他の化学物質）

12）キノリン（G2B）



→ TIPSのLD50は80mg/kg以上にある

13）t−ブチルアルコール



→ TIPSのLD50は800mg/kg以上にある

吸入暴露のLC50 (4時間暴露値)と得られたTIPS LD50の比較2

検体	吸入暴露のLC50 (4時間暴露値) mg/kg*	TIPS LD50 mg/kg**	吸入暴露LC50 : TIPS LD50 (上限値の比較)
8) グリシジルメサクリレート (G2A)	112	480	1 : 4
9) アクロレイン (G2A)	0.9	1~2	1 : 1 (吸入暴露値閾内)
10) キシレン (G3)	522~1041	100 ~400	1 : 2
11) 1,2-ジクロロエタン (G2B)	345	240～480	1 : 1(吸入暴露値閾内)
12) キノリン (G2B)	25	80より大きい	1 : ?
13) t-ブチルアルコール	1280～1860	800より大きい	1 : ?

OECD等の資料のLC50値をラットに換算して、TIPS LD50** の値が 吸入暴露 LC50* の表示最大値の4倍(LC値の施設間の差異の上限)以内入れば TIPSの結果は妥当と考える。

12) 13)については更に高用量での検討が必要であるが、いずれも近似値にある。

想定される用途

化学物質への暴露障害の殆どは事業場で発生している。平成28年度より製造・輸入業者による640物質の化学物質の危険性・有害性に関する情報の把握と公開は従来の「努力義務」から「義務」になった。

本技術は、従来の吸入曝露試験に代替出来る試験法で、検体をin vitroにおける容量設定試験と、in vivoにおける気管内投与試験とを組み合わせることによって、吸入暴露試験の LC50(4-6h)値または近似値を容易・安価（吸入暴露試験の1/10以下に得ることを可能としたものである。

この方法によって、大規模な吸入暴露設備を使用することなく、従来より少ない動物数でより正確なLD50値が得られるという特徴を持つ。

実用化に向けた課題1

- 現在、Neutral redについて基本手技は開発できているが、そのキット化に対応できる手技の開発が必要である。
- 今後、実験データを重ねて取得し、多種の化合物に対応できるための条件設定を行っていく必要がある。

実用化に向けた課題2

- 実用化に向けて、50種の化合物について実証を重ねて精度を向上させる必要がある。これについて、津田班を引き継いだ国立医薬品食品衛生研究所病理部長の小川久美子先生（本学実験病態病理学分野出身）が実施している。

企業への期待

- Neutral red試験のキットの開発について、専門企業との連携が必要である。
- 動物試験受託企業や理化学機器メーカーには、本技術の活用が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 :毒性試験方法
- 出願番号 :特願2021-146197
- 出願人 :公立大学法人名古屋市立大学
- 発明者 :津田洋幸、デビット ビー アレクサンダー、ディナ モハメッド マラード サリ

お問い合わせ先

名古屋市立大学
産学官共創イノベーションセンター

ＴＥＬ　052－853 － 8309
ＦＡＸ　052－841 － 0261
e-mail　ncu-innovation@sec.nagoya-cu.ac.jp