

二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験報告書

試験番号 : 0904

APPENDICES

APPENDICES

APPENDIX 1-1 IDENTITY OF NITROGEN DIOXIDE

APPENDIX 1-2 STABILITY OF NITROGEN DIOXIDE

APPENDIX 2 ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER

APPENDIX 3 METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY
AND BIOCHEMISTRY

APPENDIX 1-1

IDENTITY OF NITROGEN DIOXIDE

IDENTITY OF NITROGEN DIOXIDE

Test Substance : Nitrogen dioxide (SUMITOMO SEIKA CHEMICALS Co., Ltd.)

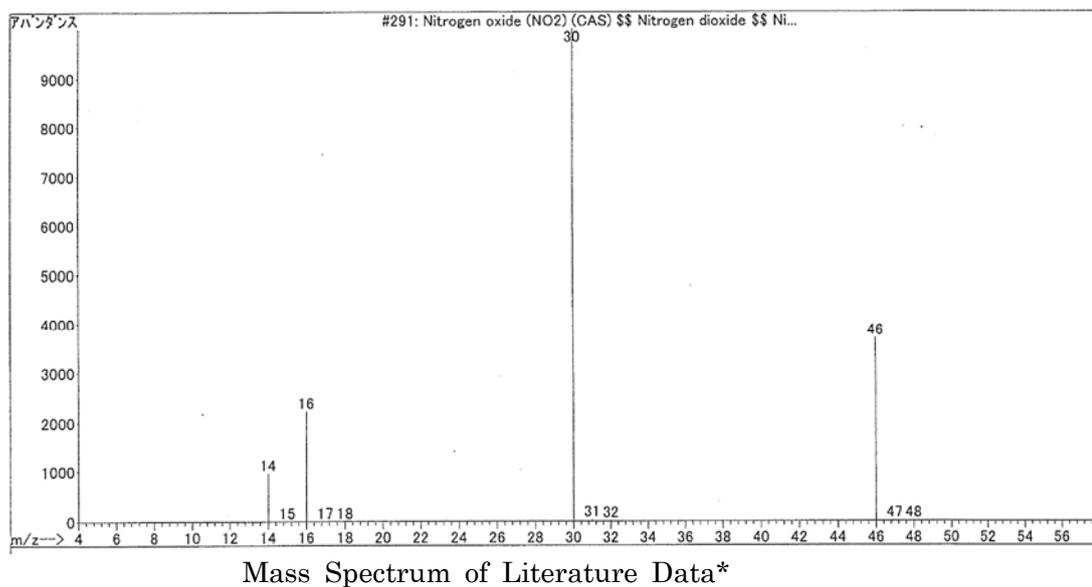
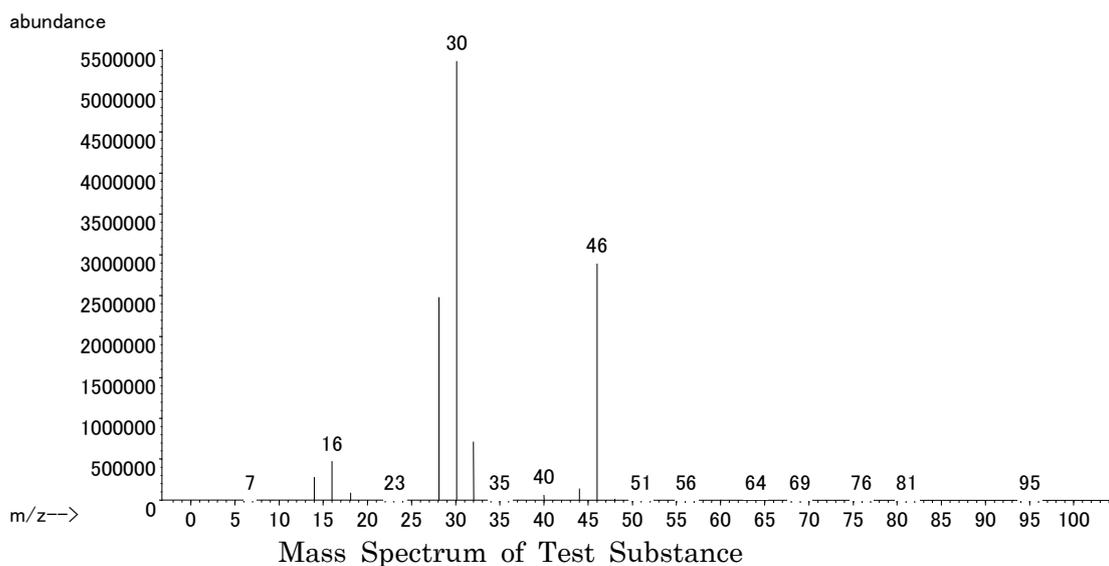
Lot No. : JTB 1748040

1. Mass Spectrometry

Instrument : Agilent Technologies 5973N Mass Spectrometer

Ionization : EI (Electron Ionization)

Ionization Voltage : 70eV



Result: The mass spectrum was consistent with literature spectrum.

(*McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. 6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.)

2. Conclusion: The test substance was identified as nitrogen dioxide by mass spectrum.

APPENDIX 1-2

STABILITY OF NITROGEN DIOXIDE

STABILITY OF NITROGEN DIOXIDE

Test Substance : Nitrogen dioxide (SUMITOMO SEIKA CHEMICALS Co., Ltd.)

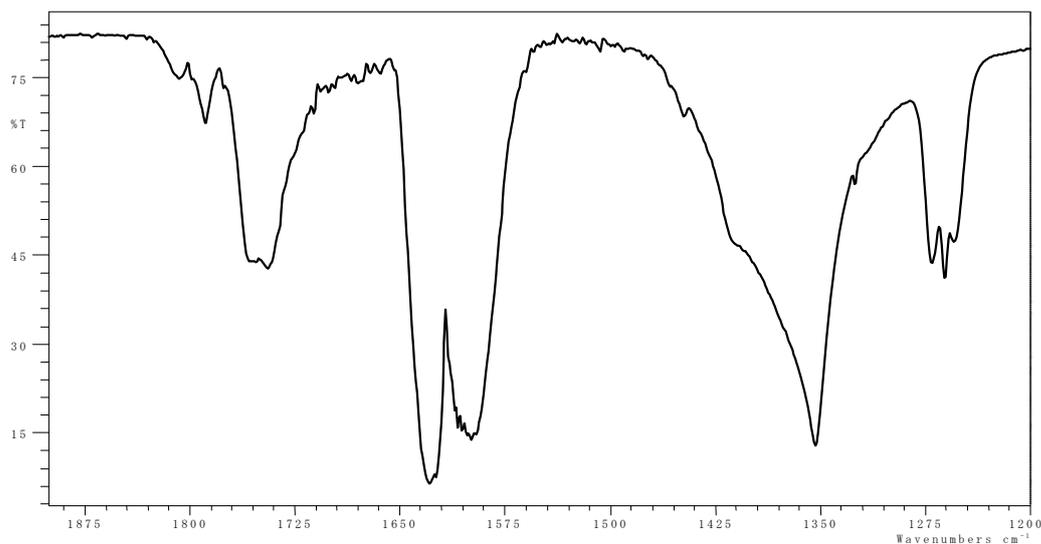
Lot No. : JTB 1748040

1. Infrared Spectrometry

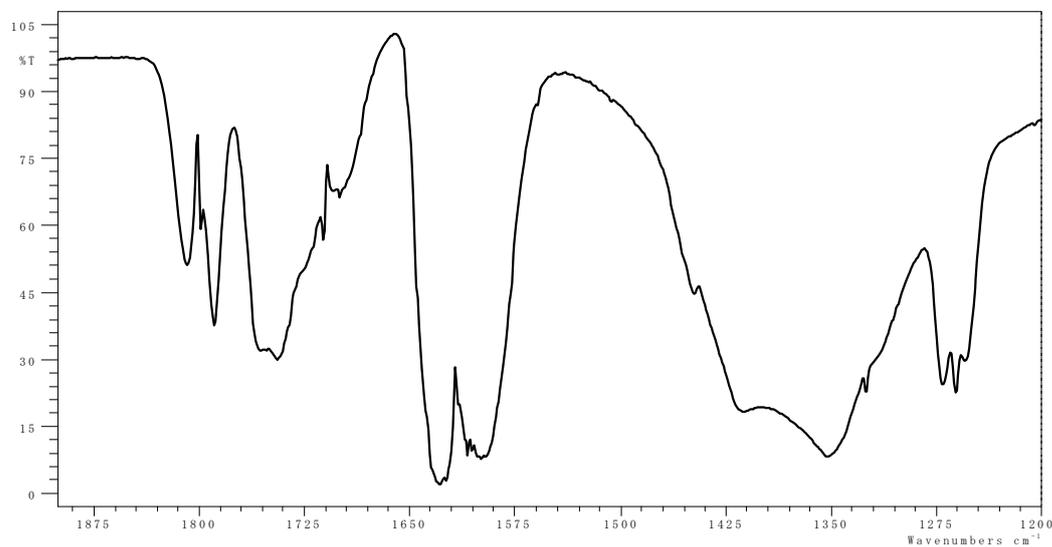
Instrument : Shimadzu IRAffinity-1

Cell : KBr Gas Cell

Resolution : 2 cm^{-1}



Infrared Spectrum of Test Substance (before use)



Infrared Spectrum of Test Substance (after use)

Result: The infrared spectra were not changed before used on 2018.2.26 and after used on 2018.9.3.

2. Conclusion: The test substance was stable for the period that the test substance had been used for the study.

APPENDIX 2

ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER

ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF INHALATION CHAMBER

Group Name	Temperature (°C) Mean ± S.D.	Humidity (%) Mean ± S.D.	Ventilation Rate (L/min) Mean ± S.D.	Air Change (time/h) Mean
Control	22.9 ± 0.1	58.0 ± 1.1	447.8 ± 0.9	12.1
10 ppm	22.9 ± 0.0	56.8 ± 1.8	447.3 ± 1.1	12.1
20 ppm	22.9 ± 0.0	57.7 ± 1.4	446.6 ± 1.0	12.1
40 ppm	23.0 ± 0.0	57.1 ± 1.6	446.0 ± 1.0	12.1

APPENDIX 3

METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

METHODS, UNITS AND DECIMAL PLACE FOR HEMATOLOGY AND BIOCHEMISTRY

Item	Method	Unit	Decimal place
Hematology			
Red blood cell (RBC)	Hydrodynamically focussed DC detection method ¹⁾	$\times 10^6/\mu\text{L}$	2
Hemoglobin(Hgb)	SLS-Hemoglobin method ¹⁾	g/dL	1
Hematocrit(Hct)	Hydrodynamically focussed DC detection method ¹⁾	%	1
Mean corpuscular volume(MCV)	Calculated as $\text{Hct}/\text{RBC} \times 10^3$ ¹⁾	fL	1
Mean corpuscular hemoglobin(MCH)	Calculated as $\text{Hgb}/\text{RBC} \times 10^3$ ¹⁾	pg	1
Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	Calculated as $\text{Hgb}/\text{Hct} \times 100$ ¹⁾	g/dL	1
Platelet	Hydrodynamically focussed DC detection method ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0
Reticulocyte	Flow cytometry method using semiconductor laser ¹⁾	%	1
White blood cell(WBC)	Flow cytometry method using semiconductor laser ¹⁾	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2
Differential WBC	Flow cytometry method using semiconductor laser ¹⁾	%	1
Biochemistry			
Total protein(TP)	Biuret method ²⁾	g/dL	1
Albumin (Alb)	BCG method ²⁾	g/dL	1
A/G ratio	Calculated as $\text{Alb}/(\text{TP}-\text{Alb})$ ²⁾	—	1
T-bilirubin	BOD method ²⁾	mg/dL	2
Glucose	GlcK·G-6-PDH method ²⁾	mg/dL	0
T-cholesterol	CE·COD·POD method ²⁾	mg/dL	0
Triglyceride	MGLP·GK·GPO·POD method ²⁾	mg/dL	0
Phospholipid	PLD·ChOD·POD method ²⁾	mg/dL	0
Aspartate aminotransferase (AST)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Alanine aminotransferase (ALT)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Lactate dehydrogenase (LDH)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Alkaline phosphatase (ALP)	JSCC method ²⁾	U/L	0
γ -Glutamyl transpeptidase (γ -GTP)	JSCC method ²⁾	U/L	1
Creatine kinase (CK)	JSCC method ²⁾	U/L	0
Urea nitrogen	Urease·GLDH method ²⁾	mg/dL	1
Sodium	Ion selective electrode method ²⁾	mEq/L	0
Potassium	Ion selective electrode method ²⁾	mEq/L	1
Chloride	Ion selective electrode method ²⁾	mEq/L	0
Calcium	OCPC method ²⁾	mg/dL	1
Inorganic phosphorus	PNP·XOD·POD method ²⁾	mg/dL	1

1) Automated Hematology Analyzer (XN-2000V : Sysmex Corporation)

2) Automatic analyzer (Hitachi 7080 : Hitachi,Ltd.)

二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による中期がん原性試験結果概要

日本バイオアッセイ研究センター

1 被験物質

1-1 名称等

名 称：二酸化窒素 (Nitrogen dioxide)
別 名：過酸化窒素 (Nitrogen peroxide)
CAS 番号：10102-44-0

1-2 化学式及び分子量 (文献 1)

化 学 式：NO₂
分 子 量：46.0

1-3 物理化学的性状等 (文献 1)

性 状：刺激臭のある帯赤褐色気体または茶色もしくは黄色の液体
相対蒸気密度：1.58 (空気=1)
蒸 気 圧：96 kPa (20℃)
沸 点：21.2 °C
溶 解 性：水と反応して硝酸と一酸化窒素を生じる
保 管 条 件：室温、暗所

1-4 製造量等 (文献 2)

製造・輸入数量：酸化窒素として合計で1,000～2,000トン未満
(平成29年度実績)

1-5 用途 (文献 3)

合成ゴム原料

1-6 許容濃度等

管理濃度：未設定
日本産業衛生学会：未設定
米国産業衛生専門家会議 (ACGIH)：0.2ppm (TLV-TWA)、A4 (ヒトに対して発がん性物質として分類できない物質) (文献4)
国際がん研究機関 (IARC)：未設定

1-7 遺伝毒性

in vitro

エームス試験：陽性 (文献5)
チャイニーズハムスター染色体異常試験：陽性 (文献6)

チャイニーズハムスターDNA鎖切断試験：陽性（文献7）

in vivo

染色体異常試験（マウス白血球及び精母細胞）：陰性（文献8）

小核試験（マウス骨髄細胞）：陰性（文献9）

ショウジョウバエ変異原性試験：陰性（文献9、10）

2 目的

二酸化窒素を遺伝子改変マウス（p53KO マウス）に 26 週間全身吸入暴露（経気道投与）し、そのがん原性を検索した。

3 方法

投与群 3 群、対照群 1 群の計 4 群（各群：雌雄とも 25 匹）を設け、二酸化窒素の濃度は、0（対照群）、10、20 及び 40 ppm とし、1 日 6 時間、1 週 5 日間、26 週間暴露した。観察・検査項目として、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、解剖時の肉眼的観察、臓器重量測定及び病理組織学的検査を行った。

4 26 週間試験の投与濃度設定理由

投与濃度は、雌雄の C57BL/6J マウス（8 週齢）を用いた 4 週間の予備試験結果をもとに決定した。0（対照群）、5、10、20 及び 40 ppm の濃度で暴露した結果、動物の死亡は認められなかった。一般状態、体重及び摂餌量は 40 ppm 群で影響がみられた。一般状態の観察では、暴露開始日と 2 日目の暴露後の観察で雌雄全匹に自発運動量の減少と不整呼吸がみられた。体重は 1 週目と 4 週目に雄で低値がみられ、摂餌量は雄では 1 週目と 4 週目に、雌では 1 週目に低値がみられた。臓器重量では、肺重量の高値が雌の 20 ppm 以上の群と雄の 40 ppm 群にみられた。病理組織学的検査では、鼻腔と肺に影響がみられた。鼻腔では、滲出液の貯留が 40 ppm の雌雄にみられ、また、呼吸上皮のエオジン好性変化と、鼻腺の呼吸上皮化生が全ての投与群の雌雄にみられた。肺では、炎症性細胞浸潤が 40 ppm 群の雌雄にみられた。なお、病理組織学的検査でみられた所見の程度はすべてが軽度であった。

以上のように、二酸化窒素の 4 週間吸入暴露の結果、雌雄のマウスの一般状態、体重（雄のみ）、摂餌量、肺重量及び病理組織学的検査結果に影響が認められた。しかし、毒性の程度はいずれも重篤なものではなく、40 ppm の濃度で 26 週間に亘って動物に暴露しても、毒性兆候は示されるものの死亡を増加させることはないと考えられた。したがって、本試験の投与濃度は 4 週間の予備試験と同じく、40 ppm を最高濃度とし、以下 20 ppm 及び 10 ppm を設定した。

5 結果

雌雄とも生存率、一般状態に、投与の影響はみられなかった。体重は、雄の 40 ppm 群で投与期間を通して体重増加の抑制がみられた。摂餌量は、雌雄の 40 ppm 群で投与 1 週目に低値、2 週目には高値がみられたが、各群とも投与期間を通しての平均摂餌量に差はみられなかった。臓器重量測定では、雌雄の 20 ppm 以上の群で肺重量が増加した。
(生存率：図 1、体重：図 2、摂餌量：図 3)

病理組織学的検査の結果

—雄—

① 腫瘍性病変 (表 1)

<肺>

細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は、対照群 0 匹 (0%)、10 ppm 群 0 匹 (0%)、20 ppm 群 0 匹 (0%)、40 ppm 群 2 匹 (8%) に認められ、Peto 検定 (有病率法) と Cochran-Armitage 検定で有意な増加を示した。細気管支-肺胞上皮腺腫の発生は、文献によるヒストリカルコントロールデータ (文献 11) では発生が認められず (0/433 匹、0%)、本試験の 40 ppm 群の発生率 (2/25 匹、8%) はこの値を超えていた。しかしながら、対照群との 2 群間検定 (Fisher 検定) では有意な増加は示されず、細気管支-肺胞上皮過形成等の腫瘍に関連する非腫瘍性病変の発生も認められていないことから、がん原性を示唆する証拠 (some evidence of carcinogenic activity) と判断するには不十分と考えられた。

② 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮では、エオジン好性変化及び萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

嗅部では、滲出液の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

<鼻咽頭>

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

<肺>

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度から中等度、40 ppm 群が軽度であった。

—雌—

① 腫瘍性病変 (表 2)

被験物質投与による腫瘍の発生増加は認められなかった。

② 非腫瘍性病変

<鼻腔>

嗅上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。また、萎縮の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加と程度の増強が 20 ppm 以上の群で認められ、その程度は 20 ppm 群が軽度、40 ppm 群が軽度から中等度であった。

移行上皮では、炎症の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

嗅部では滲出液の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

<鼻咽頭>

呼吸上皮では、エオジン好性変化の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度から中等度であった。

<肺>

巣状の炎症性細胞浸潤の発生匹数の増加が 40 ppm 群で認められ、その程度は軽度であった。

6 まとめ

遺伝子改変マウス (p53KO マウス) を用いて、二酸化窒素の 26 週間の吸入による中期がん原性試験を行った結果、

- 1) 雄 p53KO マウスに対するがん原性を示す不確実な証拠が得られた (equivocal evidence of carcinogenic activity) と結論された。
- 2) 雌 p53KO マウスに対するがん原性を示す証拠は得られなかった (no evidence of carcinogenic activity) と結論された。

表 1 二酸化窒素の中期がん原性試験における腫瘍発生 (p53KO マウス 雄)

投 与 濃 度 (ppm)		0	10	20	40	Peto検定	Cochran-Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	0	0	0	2	↑	↑
胃 (前胃)	扁平上皮乳頭腫	0	0	0	1		

↑ : $p \leq 0.05$ で有意増加 (Peto, Cochran-Armitage 検定)

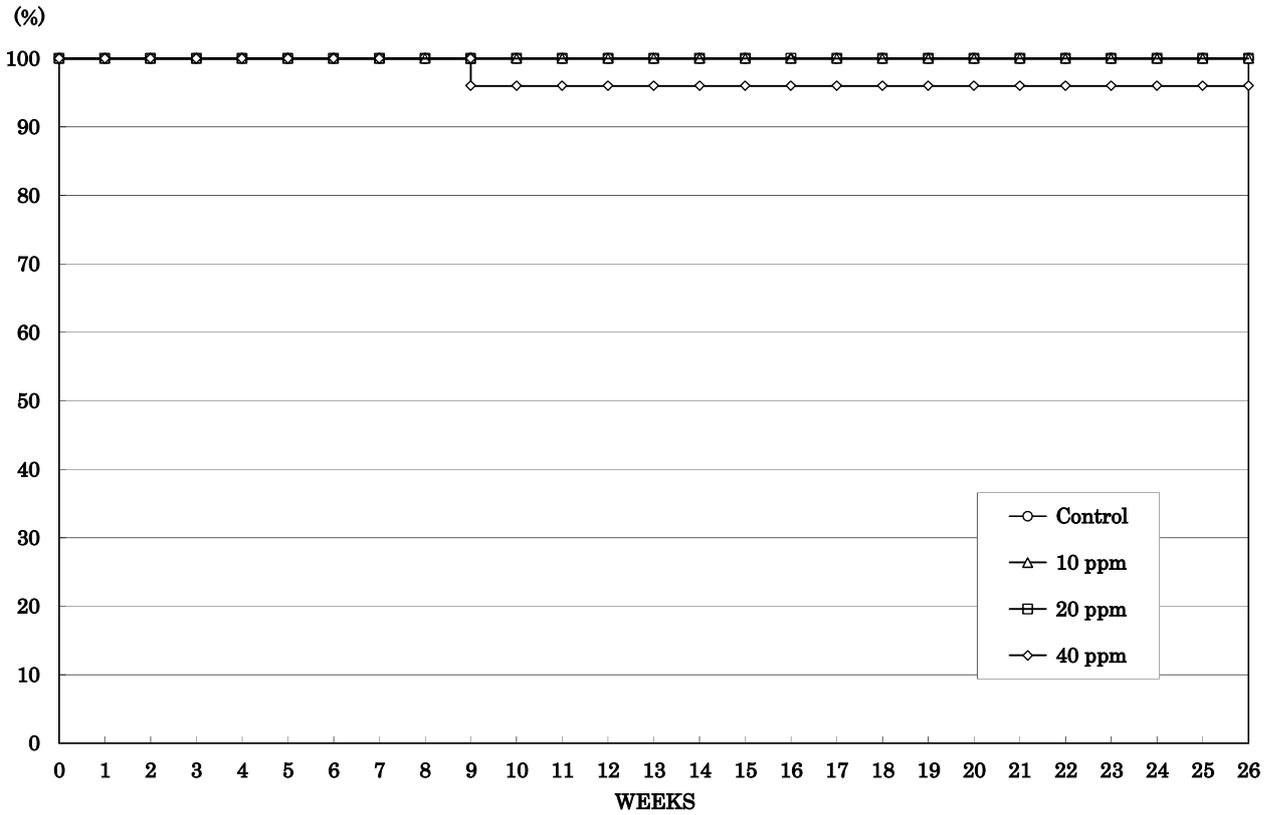
表 2 二酸化窒素の中期がん原性試験における腫瘍発生 (p53KO マウス 雌)

投 与 濃 度 (ppm)		0	10	20	40	Peto検定	Cochran-Armitage 検定
検査動物数		25	25	25	25		
肺	細気管支-肺胞上皮腺腫	1	0	0	1		
皮下組織	血管腫	0	0	1	0		
肝臓	組織球性肉腫#	0	1	0	0		
脾臓	血管腫	0	0	1	0		

上段：上皮系腫瘍 下段：非上皮系腫瘍

#：悪性腫瘍

(雄)



(雌)

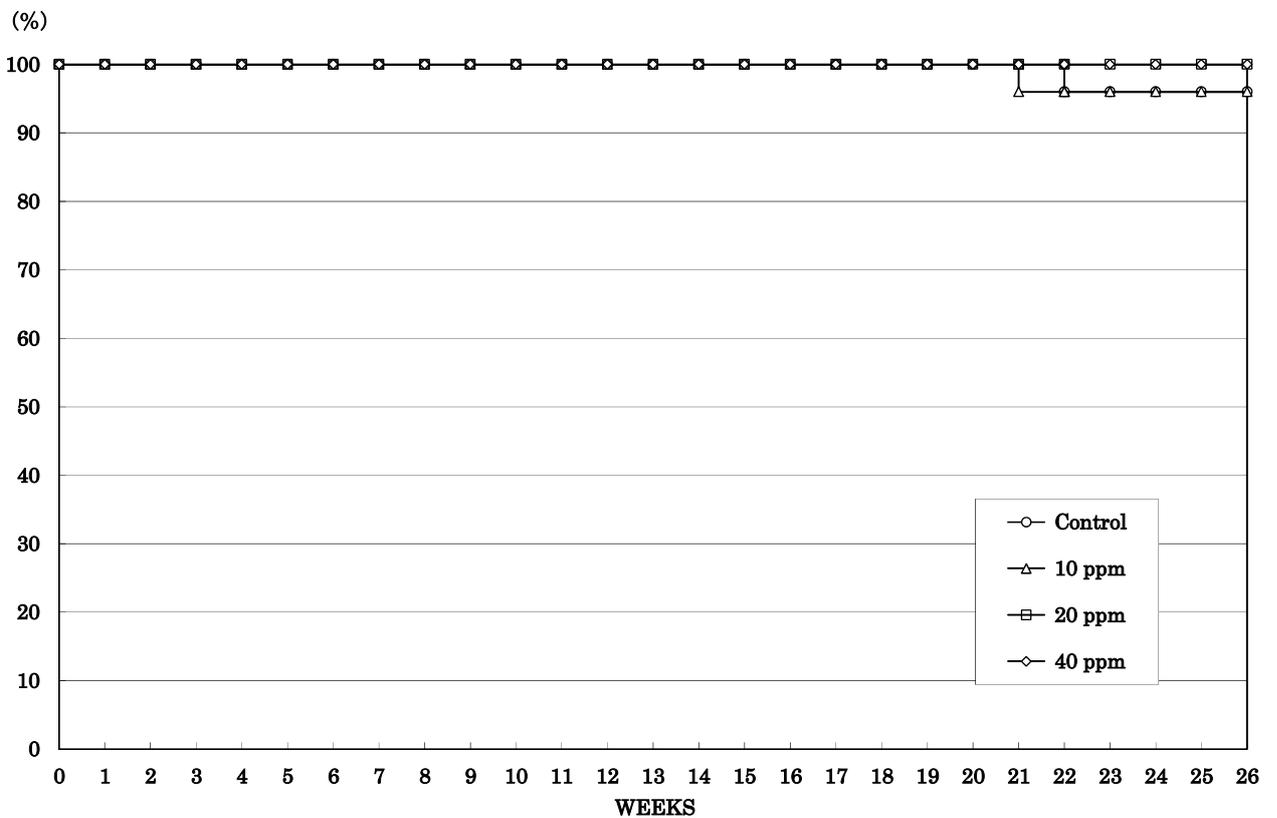
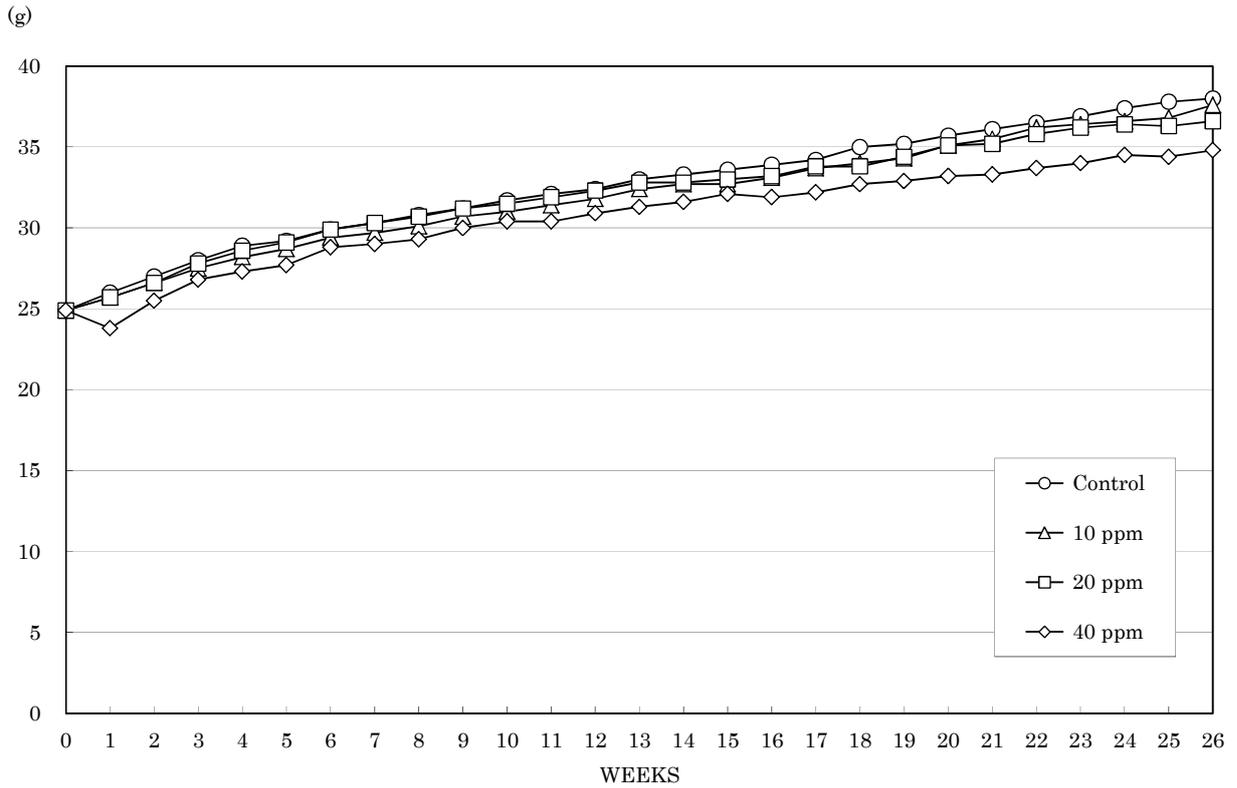


図1 二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における生存率

(雄)



(雌)

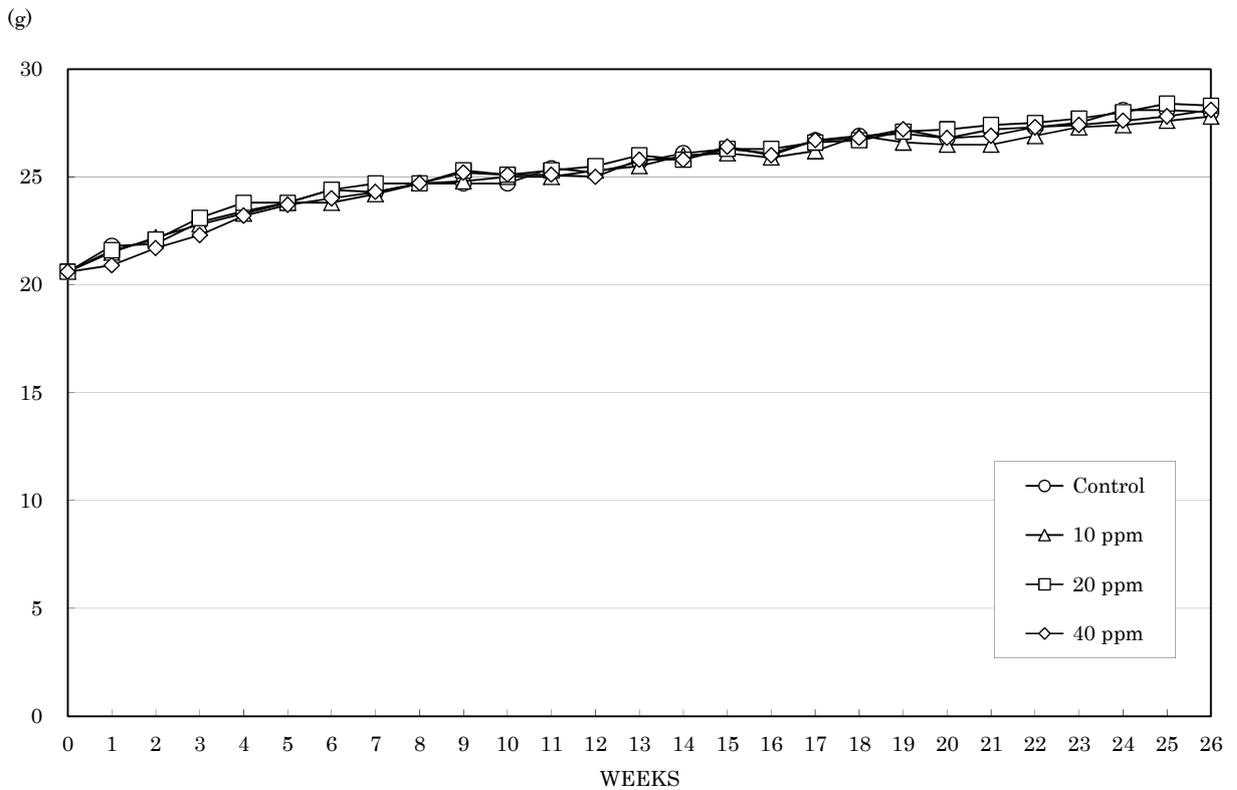
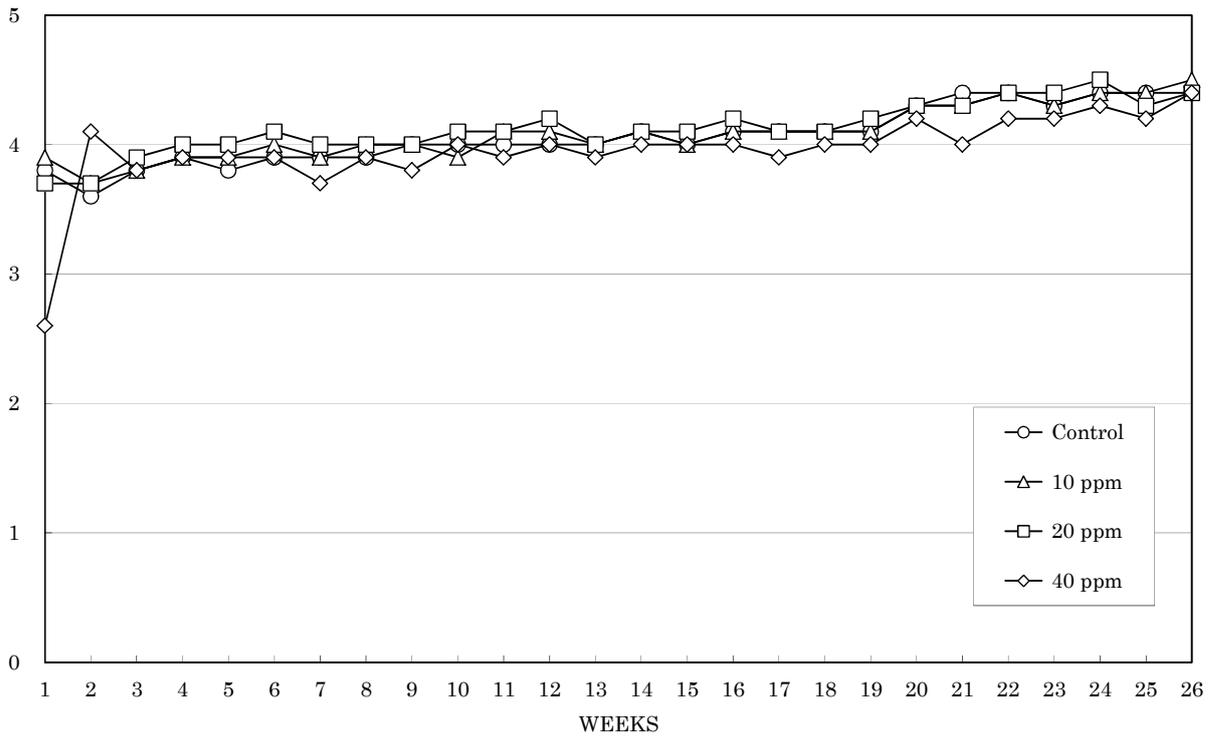


図2 二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における体重推移

(雄)

(g)



(雌)

(g)

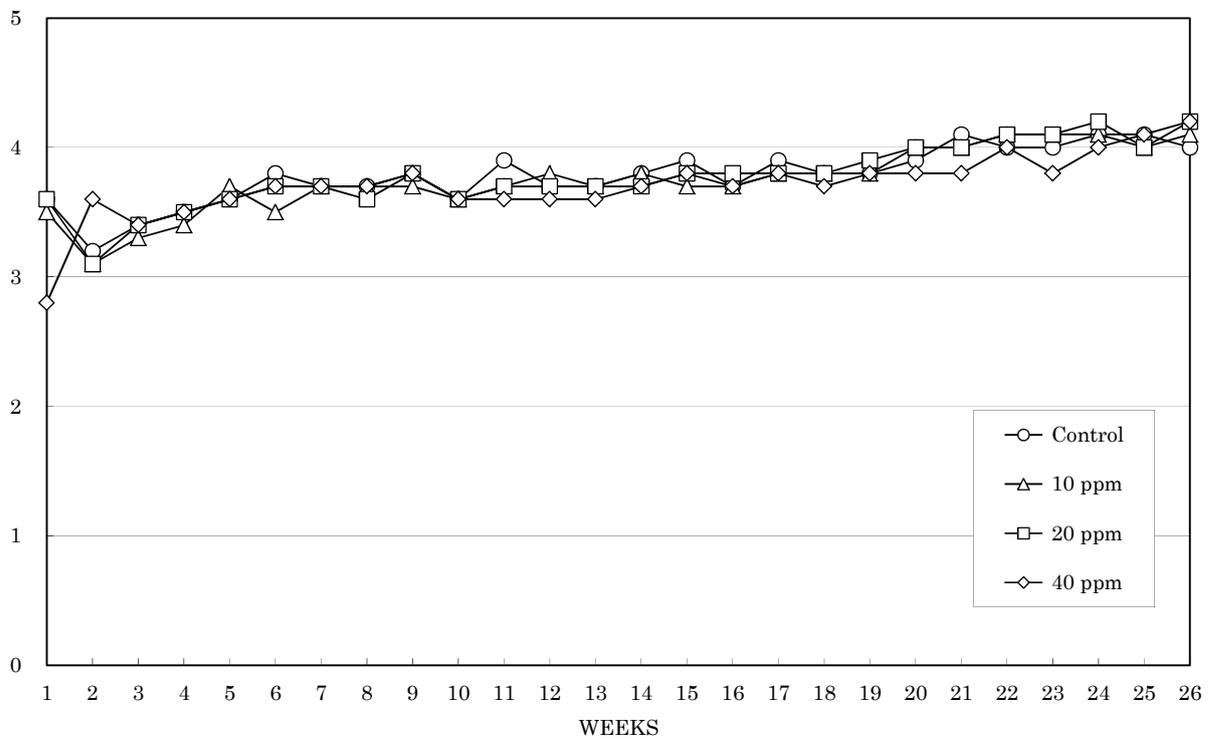


図3 二酸化窒素の p53KO マウスを用いた吸入による
中期がん原性試験における摂餌量

文献

- 1) International Programme on Chemical Safety. 2013. ICSC: 0930. NITROGEN DIOXIDE. International Chemical Safety Cards
- 2) 経済産業省、一般化学物質等の製造・輸入数量（平成 29 年度実績）
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構、NITE 化学物質総合情報提供システム（NITE-CHRIP）
- 4) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2012. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Nitrogen dioxide.
- 5) Biggart NW, Rinehart RR (1987). Comparison between aqueous-phase and gas-phase exposure protocols for determining the mutagenic potential of nitrogen dioxide and the gas fraction of welding fumes. *Mutat Res* 188:175-184.
- 6) Tsuda H, Kushi A, Yoshida D, Goto F (1981). Chromosomal aberrations and sisterchromatid exchanges induced by gaseous nitrogen dioxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 89:303-309.
- 7) Görsdorf S, Appel KE, Engholm C, Obe G (1990). Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 11:37-41.
- 8) Gooch PC, Luippold HE, Creasia DA, Brewen HG (1977). Observations on mouse chromosomes following nitrogen dioxide inhalation. *Mutat Res* 48:117-120.
- 9) Victorin K, Busk L, Cederbeg H, Magnusson J, (1990). Genotoxic Activity of 1,3-butadiene and Nitrogen Dioxide and Their Photochemical Reaction Products in *Drosophila* and in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay. *Mutat Res* 228:203-209.
- 10) Inoue H, Fukunaga A, Okubo S, (1981). Mutagenic effects of nitrogen dioxide combined with methylurea and ethylurea in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 88:281-290.

- 11) Storer RD, French JE, Haseman J, Hajian G, LeGrand EK, Long GG, Mixson LA, Ochoa R, Sagartz JE, Soper KA. 2001. P53^{+/-} hemizygous knockout mouse: overview of available data. *Toxicol Pathol.*;29 Suppl:30-50. Review.