

令和 6 年度

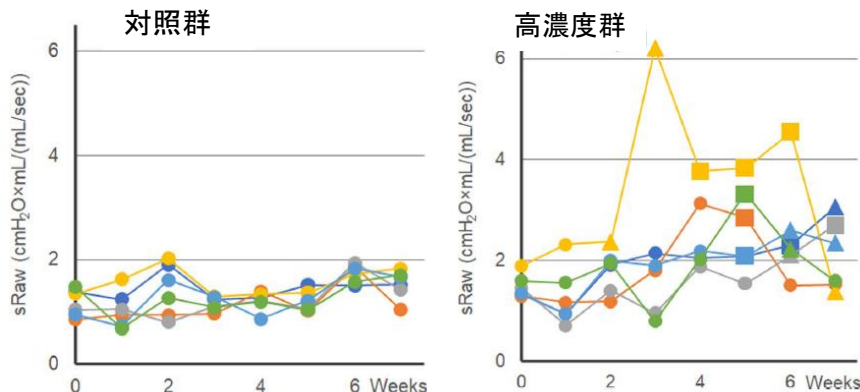
亜硝酸 (HONO) の生体影響試験

生体影響研究科
環境衛生研究科

令和 6 年 7 月

HONOの生体影響に関するこれまでの知見

- ◆ ヒト吸入ばく露：健常者へのばく露で特異的気道コンダクタンスの有意な減少。(Rasmussen *et al.*, 1995) 、軽度のぜん息患者へのばく露で、努力性肺活量(FVC)が有意に減少。10種の刺激症状について有意な変化あり (Beckett *et al.*, 1995)。
- ◆ 疫学調査：従来NO₂によるものとされていた呼吸機能低下が、HONOによることが示唆された(Jarvis *et al.*, 2005)。
- ◆ 動物実験：全身ばく露装置による連続ばく露実験により、呼吸抵抗の上昇、肺気腫様の変化が認められている。NO₂とは異なり、明確な炎症反応は惹起されず、わずかな上皮細胞の増生や、粘液の増加が認められた (Ohyama *et al.*, 2010, 2011, 2018, 2020, 2022)。



色の違いは個体の違いを示す (各群N=6)
グラフの各マーカー形状は呼吸曲線の波形を示す
●：正常、▲：影響あり、
■：強い影響あり



大安研のばく露チャンバー
(写真提供：大山正幸先生)

モルモット7週間ばく露の気道抵抗と呼吸曲線形状の経時変化 (Ohyama *et al.*, 2022)

本研究の目的

Ohyama *et al.* の動物実験で未解明な点

- ◆ 呼吸機能：ラット・モルモットで見られた呼吸抵抗上昇や肺気腫様変化の作用機序は不明。
- ◆ 粘液産生：Mucin-5ACの遺伝子発現上昇が認められたが、組織学的に粘液増加は不明瞭。
- ◆ その他のエンドポイント：炎症・線維化は起こらないことが示唆されたが、その他の現象について、分子レベルでの解析は不十分。
- ◆ ICRマウスへの毒性：マウスにおいてHONOの影響が弱かったのは種差が主原因と思われるが、系統差の可能性もあるため、別系統での再検討が必要。
- ◆ ぜん息モデル：正常動物を用いた試験のみであり、ぜん息増悪影響は不明。



目的：HONOの吸入毒性及びぜん息増悪影響の調査

- ①BALB/c系マウスにおける基礎的な吸入毒性データを取得する
ただし、事前にラットの予備的な実験により既報の再現性を確認する
- ②ぜん息モデルマウスにより増悪影響を評価する
- ③*in vitro*実験によりヒト呼吸器上皮細胞に及ぼす詳細な影響を検討する

研究計画

1年目

2年目

3年目

4年目

ばく露システム

発生装置

ばく露
チャンバー

ラット吸入ばく露実験：既報の再現性確認

反復
ばく露

マウス吸入ばく露実験：基礎的な吸入毒性の情報取得、ぜん息増悪の影響評価

単回
ばく露

ぜん息モデルマウスの再検討

反復ばく露

ぜん息増悪検討

in vitro 気相ばく露実験：細胞・分子レベルでの評価、動物実験の補完

ばく露条件の検討

A549細胞ばく露

Calu-3細胞ばく露

ヒト気道上皮3D培養モデルの導入

3D培養モデルばく露

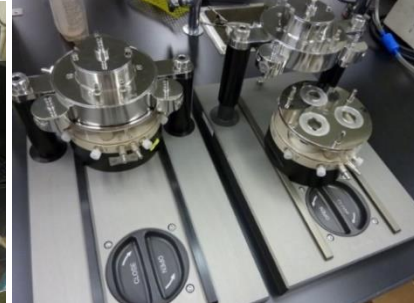
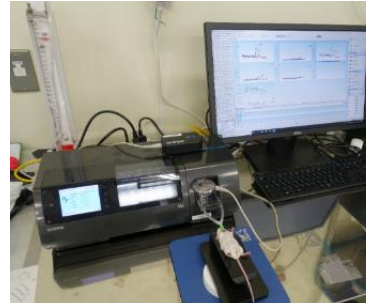
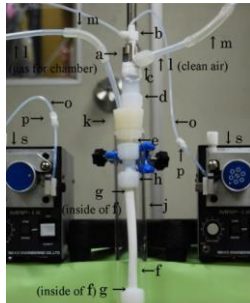
発生装置

鼻部ばく露チャンバー

呼吸機能解析装置

気相ばく露チャンバー

ヒト気道上皮3D培養



(Ohyama ら、2013)

実験概要(予定)

動物実験	条件・分析項目
ラット反復ばく露	既報(Ohayama <i>et al</i> , 2018)と同程度のばく露負荷で実施 10 ppm前後で1か月から2か月程度
マウス単回ばく露	急性吸入毒性、主に反復ばく露の予備検討としての位置づけ 発生装置の可能な濃度帯によるが、10 ppm以上を目標とする
マウス反復ばく露	1か月から3か月程度の実験 0.01 ppmから10 ppmまでの間で3濃度を設定 一般毒性・呼吸器毒性:体重・臓器重量、病理組織学的解析、生化学的解析、分子生物学的解析(qRT-PCR等) 呼吸機能解析:最大吸気量、呼吸抵抗、(PV曲線)
ぜん息モデルマウス増悪検討	上記に加え、免疫学的解析(肺組織におけるフローサイトメリーによるT細胞の集団解析)

<i>in vitro</i> 実験	条件・分析項目
A549細胞及びCalu-3細胞	基本的には動物ばく露の濃度と同一の濃度で実施 副生成物(NO ₂ ,NO)単体でのばく露も予定 細胞増殖、細胞傷害性、細胞膜間結合力(TEER)、生化学的解析、分子生物学的解析
ヒト気道上皮3D培養MucilAir™	2D細胞の結果を参考に、適切な複数濃度での反復ばく露を実施 細胞傷害性、細胞膜間結合力(TEER)、生化学的解析、分子生物学的解析

実験準備の進捗：HONO発生装置

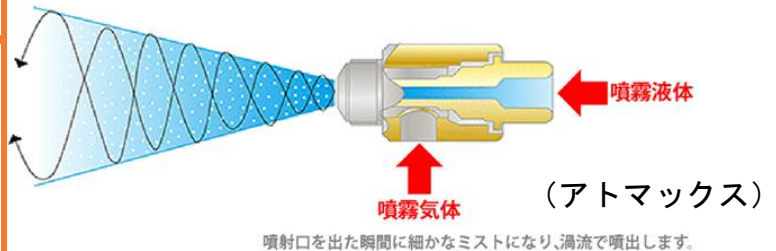


既報 (Ohyama *et al.*, 2013) をもとに、発生装置を作製中。

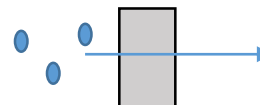
ガスのみ多孔質膜を通す際に圧力を要するため、圧力の微調整が重要であり、流路接続部の溶液や空気漏れの恐れが懸念される。

溶液とガス濃度の関係性は既報で十分には調査されていないため、多点データを取り、目的濃度のHONOを発生できるように調整していく。

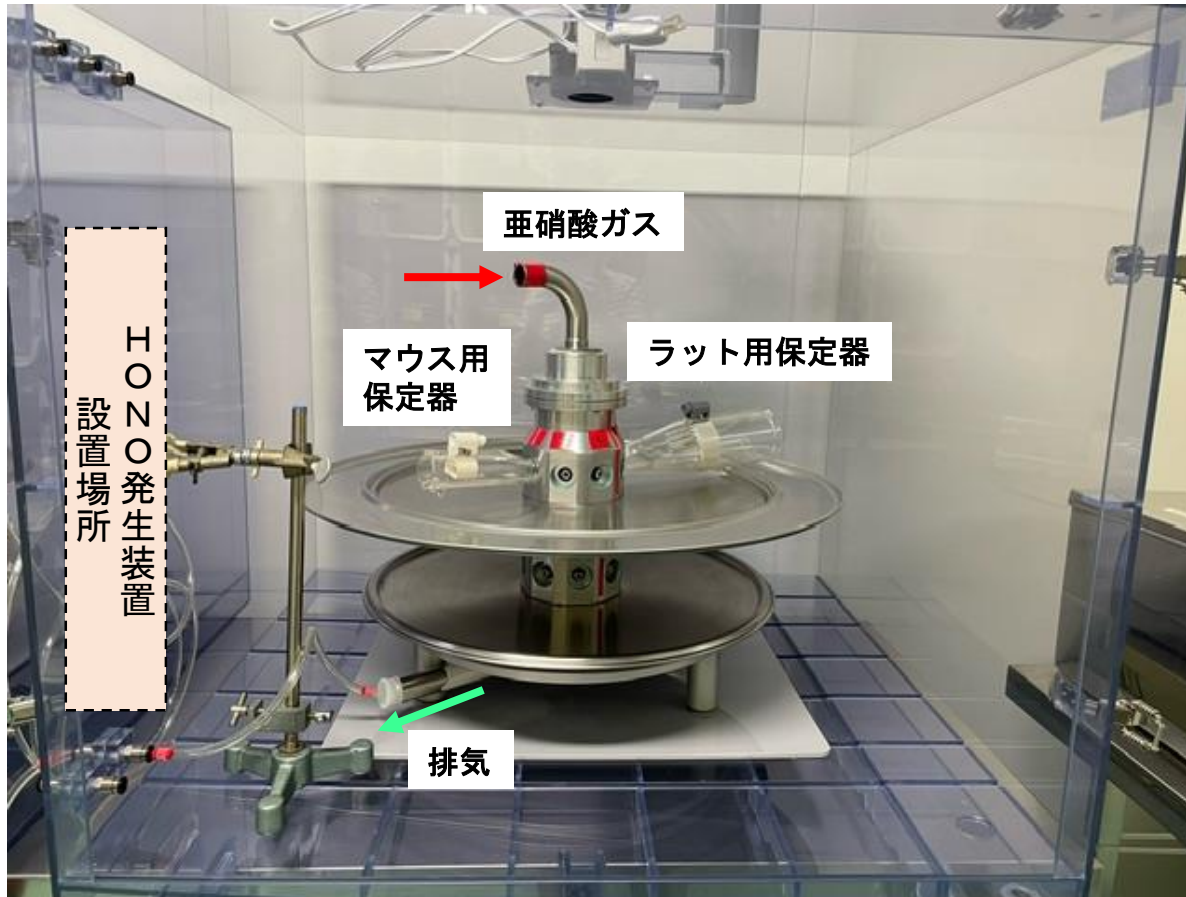
ノズル：混合液を素早くミストにする



多孔質の膜：PTFE（四フッ化エチレン樹脂）の膜を通すことで、ミストからHONOガスのみを得る



実験準備の進捗:HONOラットばく露システム



新たに、HONOに対応するカバーボックスを購入・設置済み。

ボックス内部にHONO発生装置を設置可能。

ばく露終了後にボックス内を水で洗浄可能。

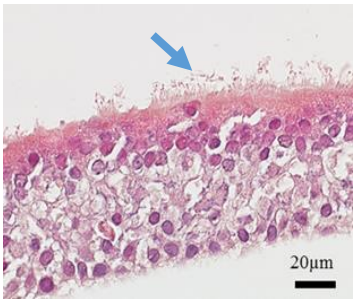
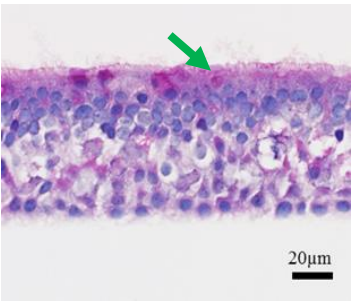
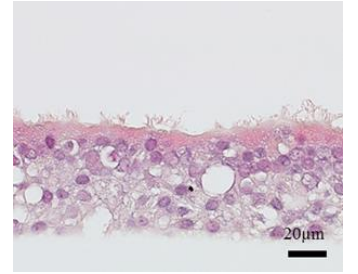
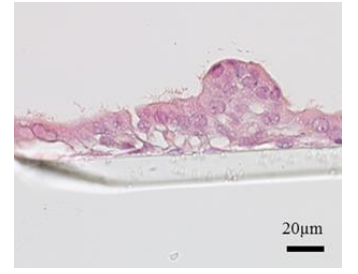
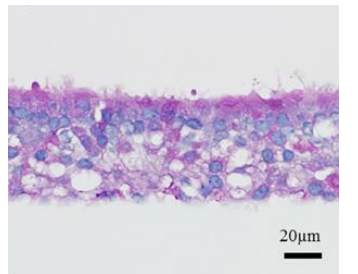
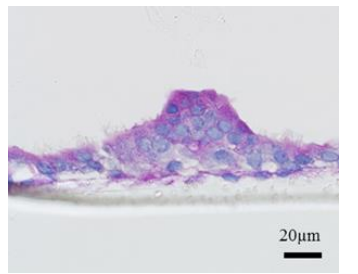
ラット用に、鼻部ばく露チャンバーの床リングのサイズを拡大。

実験準備の進捗: ヒト気道上皮3D培養MucilAir™の導入

予備的な検討として、液相ばく露ベースで、培養や分析方法の手技を確認

2週間の組織の安定期間をおき、5日間、毎日30μlの薬剤を頂端部側に添加した。

陰性対照には培地、陽性対照には10% TritonX-100とCytomix (TNF-αとLPSの混合) を投与した。

	HE染色	PAS染色	主な所見
陰性対照 (培地)			線毛が確認できた (→)。 PAS陽性シグナルは背景レベルの粘液産生と思われるが (→)、今後、粘液産生を亢進させる陽性物質との比較が必要。
10% TritonX-100	/		細胞が傷害を受け、ほぼメンブレン上に細胞が残らなかった。
Cytomix (TNFα, LPS)	 	 	<ul style="list-style-type: none"> 一部で3Dの重層が薄くなったり、形が歪になっていた。 粘液産生に関して顕著な変化は見られなかった。 炎症や酸化ストレスのマーカーの発現の増加傾向もあるが、要再検討。 