

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7年2月

本研究の目的

過去のHONO生体影響に関する知見

- ヒト吸入ばく露試験や疫学調査の情報は少ないが、呼吸機能に影響を及ぼすという報告もある（Rasmussen *et al.*, 1995、Jarvis *et al.*, 2005）。
- モルモット・ラットへの全身ばく露実験では、呼吸抵抗の上昇・肺気腫様の変化が見られた（Ohyama *et al.*）。

Ohyama *et al.* の動物実験で未解明な点

- 作用機序は不明：ラット・モルモット認められた呼吸抵抗上昇や肺気腫様変化はなぜ起こるのか。炎症・線維化は起こらないことが示されている。
- 粘液産生：MUC5ACの遺伝子発現上昇が認められたが、組織学的に粘液産生の増加は不明瞭。
- マウス系統差：ICRマウスにおいてHONOの影響がほとんど認められな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。
- ぜん息への影響：ぜん息モデルを用いた試験は行われていない。



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
事前にラットのばく露試験により、ある程度の既報の再現性を確認
- 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

今年度の実施内容

動物実験	主な内容
動物ばく露システムの作製	Ohyama <i>et al</i> , 2013を参考にHONO発生装置を作製 ばく露濃度検討
ラット反復ばく露	ラットの既報(Ohyama <i>et al</i> , 2018)と同程度のばく露負荷で実施 予備試験: 19回曝露 本試験: 45回曝露
マウス単回ばく露	次年度の反復ばく露の予備検討として実施する
マウスぜん息モデルの再検討	卵白アルブミン(OVA)吸入条件を再検討した

<i>in vitro</i> 実験	主な内容
2D細胞・3D培養用のばく露システムの設計	動物ばく露システムと同じ発生装置を用いる バッチ式(多検体処理)のばく露チャンバーを設計
ヒト気道上皮3D培養の検討	MucilAir™の培養・ばく露条件等の再確認 細胞膜間結合力(TEER)、生化学的解析、分子生物学的解析

動物ばく露システム

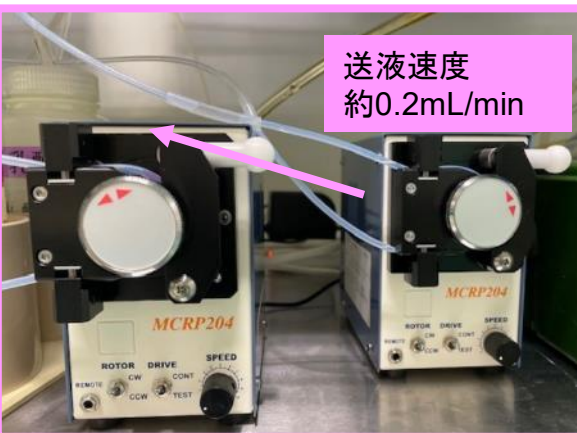
発生装置



亜硝酸Naと乳酸を混合してミストを噴射し、発生したHONOガスをチャンバーへ送る

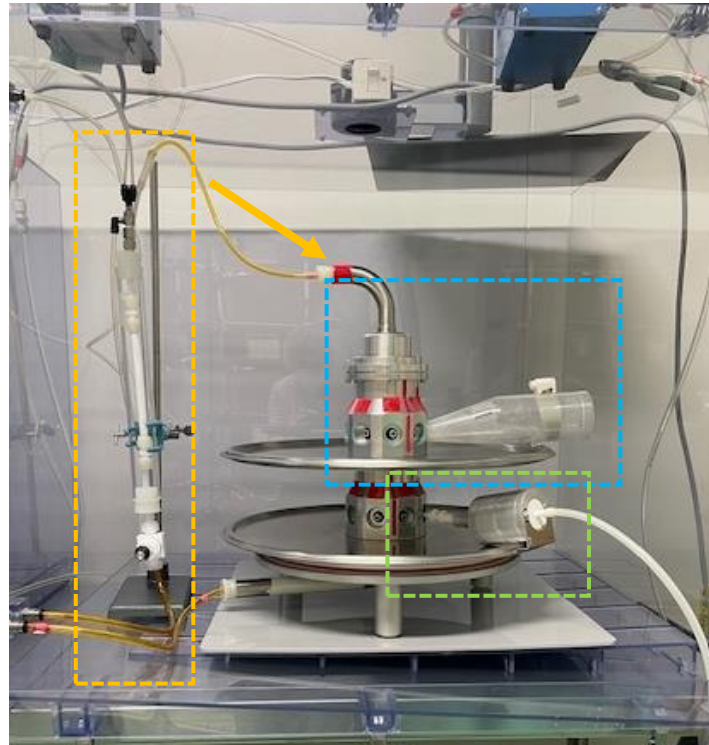
ばく露チャンバーへ
5L/min

メタロールポンプ

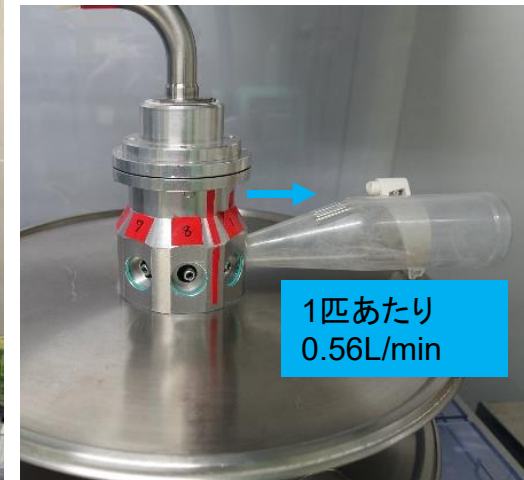


送液速度
約0.2mL/min

亜硝酸Naと乳酸をそれぞれ発生装置に少量ずつ送液

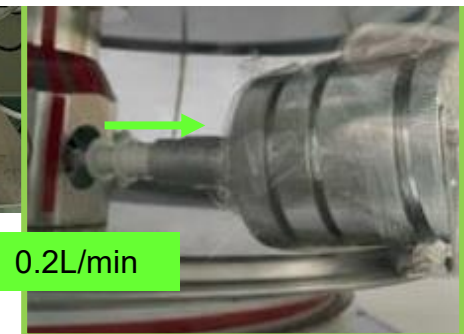


鼻部吸入ばく露チャンバー



1匹あたり
0.56L/min

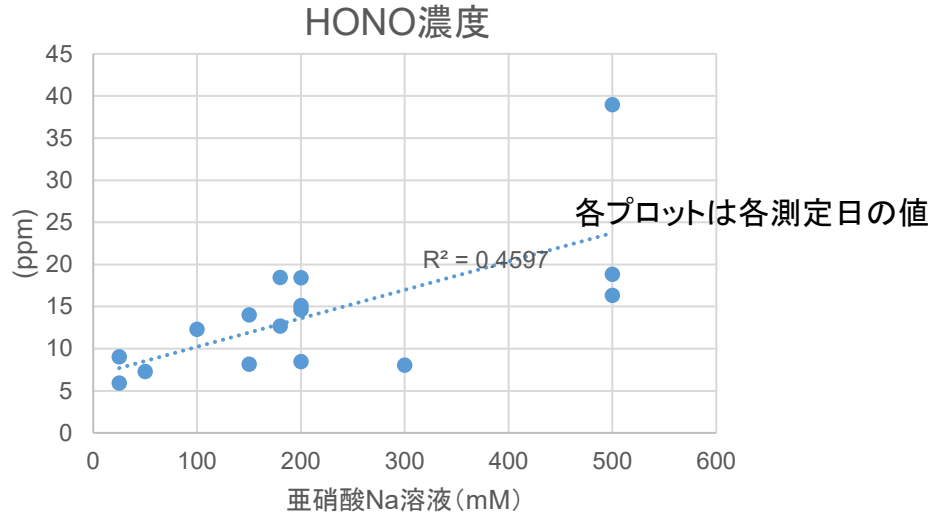
HONO測定用: フィルターパック



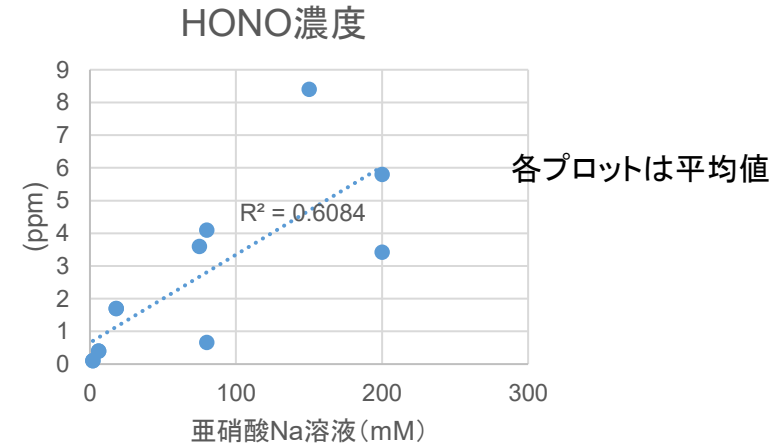
0.2L/min

ばく露濃度の設定

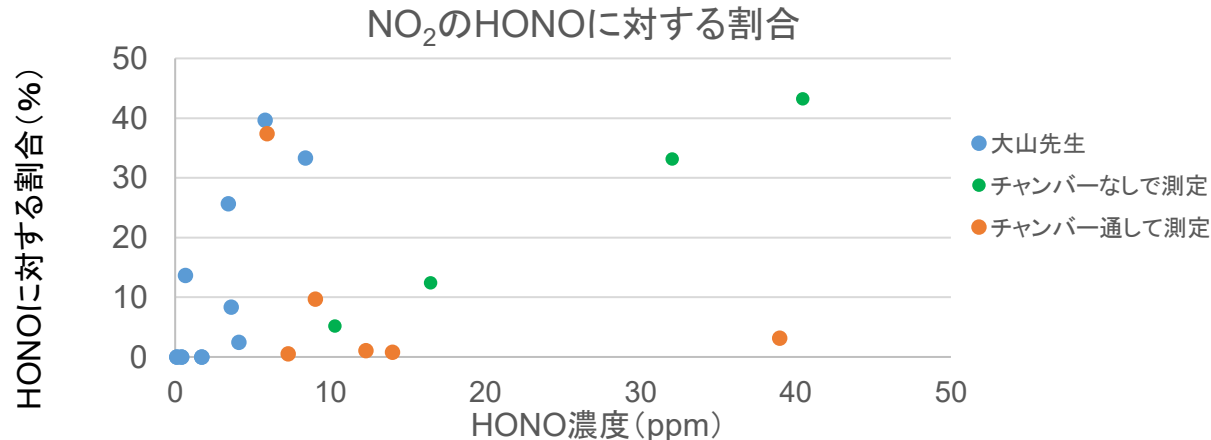
- 既報と同様に、亜硝酸Na溶液濃度に応じて、ガス濃度が上がる傾向は確認できた
- 亜硝酸Naの濃度を高くしても、必ずしも高いガス濃度が得られないこともあった



Oyama et al., 2013他、すべての論文のまとめ



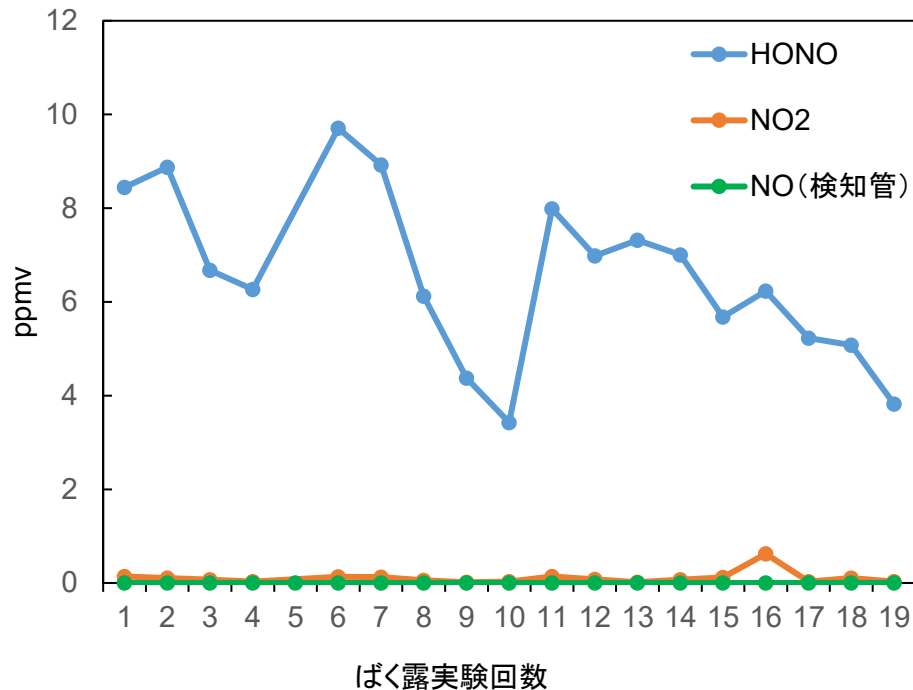
- HONOガス濃度を高くすると、 NO_2 の発生割合が高くなる傾向があり、Ohyamaらの報告でも同様の傾向があったため、最高濃度は15 ppm程度とした



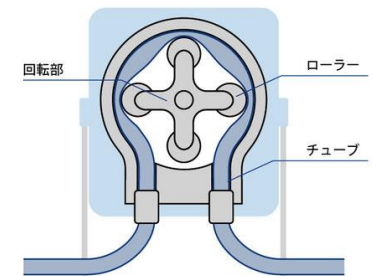
ラットHONOばく露 予備試験の概要

動物	雄性F344ラット 10週齢 各群4匹 1週間前から装置へ馴化した
ばく露目標濃度	対照群 0 ppm (超純水を装置にセットした) ばく露群 6-8 ppm (亜硝酸Na 25mM + 乳酸 150mM)
ばく露時間	1日4時間
実験期間	週5日、4週間、合計19回ばく露
濃度測定	ばく露と同時に4時間サンプリング (事前に1時間の安定化時間あり)
ガス発生モニター	検知管、簡易NO _x 計
解析項目	最終ばく露翌日に剖検、 体重・臓器重量、呼吸器・主要臓器の病理組織学的解析、 BALFの解析、肺組織のqRT-PCR

予備試験結果 (1) ばく露濃度推移



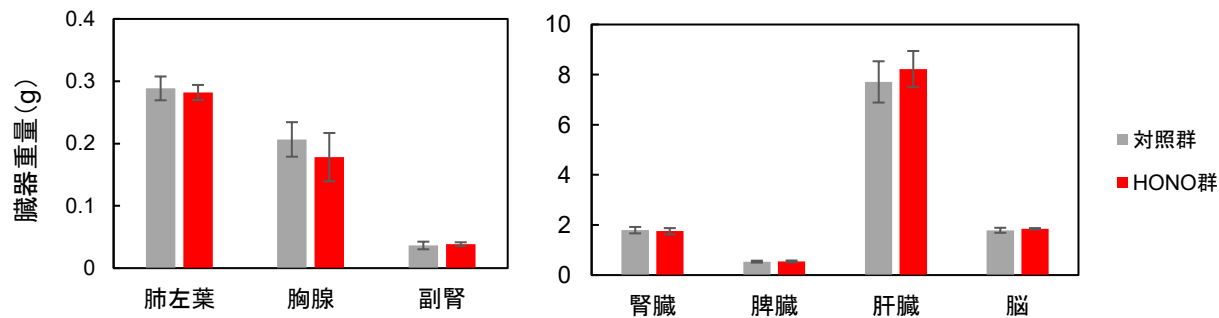
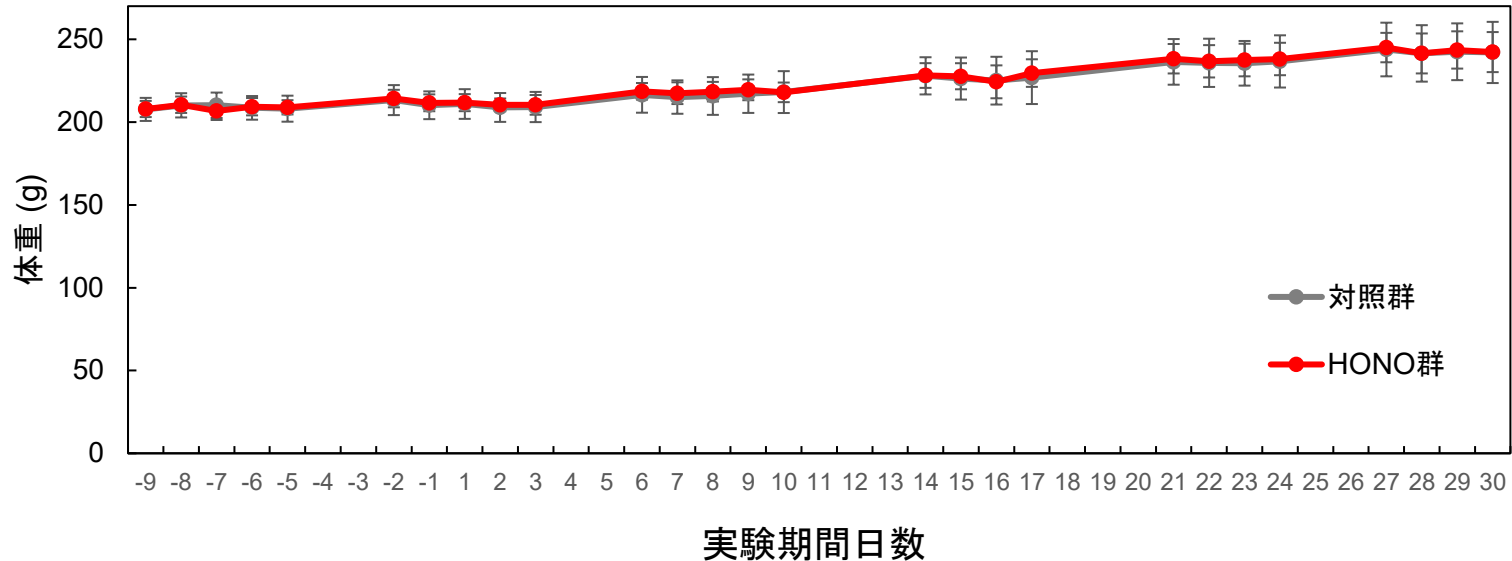
HONO 平均値 $6.6 \pm 1.8 \text{ ppm}$
NO₂ 平均値 $0.11 \pm 0.13 \text{ ppm}$



(サーパス工業HPより)

- HONO濃度のばらつきが多く、特に10回目ばく露付近にかけて濃度が低下したのは、メタロールポンプのチューブ劣化と推察された
- NO₂の割合は低く、Ohyama *et al.* 2018のラット試験よりもNO₂の影響については良好な結果と思われた

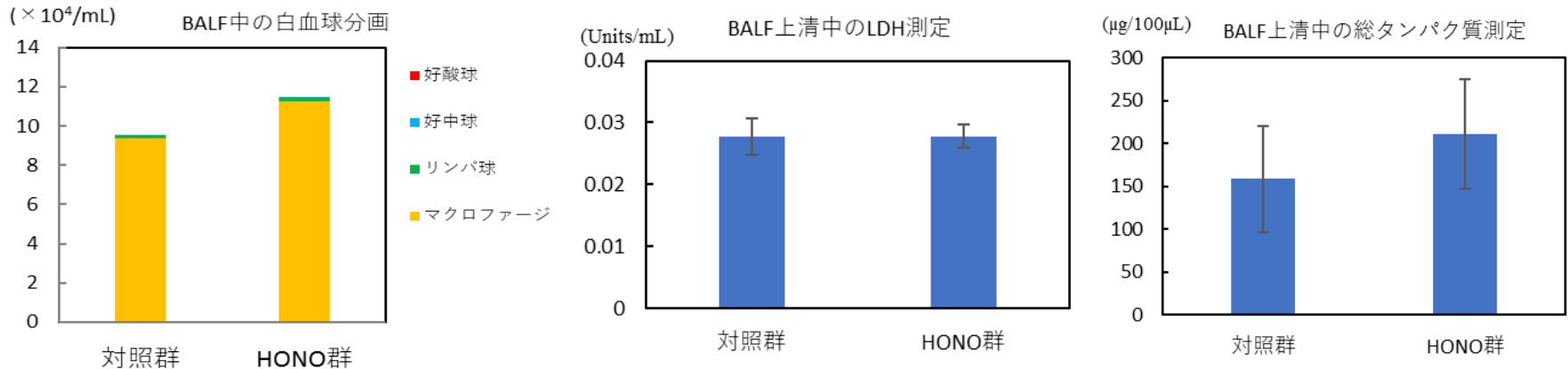
(2) 体重推移および剖検時の体重・臓器重量



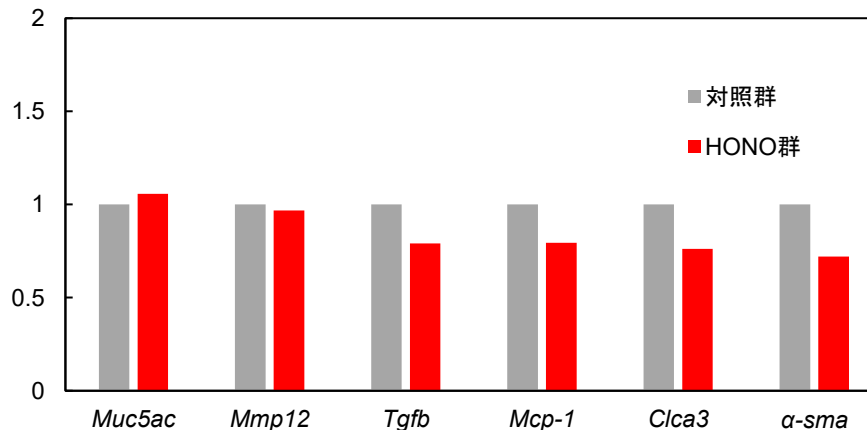
- 保定のない週末に体重増加が大きかった
- いずれの項目も群間で差異は認められなかった

(3) 生化学的解析・分子生物学的解析

気管支肺胞洗浄液(BALF)の細胞学的解析・生化学的解析



肺組織における分子生物学的解析 qRT-PCR



$\Delta\Delta$ 法で実施
*Muc5ac*は、Ohyama *et al.*, 2018
と同一のプライマーを使用

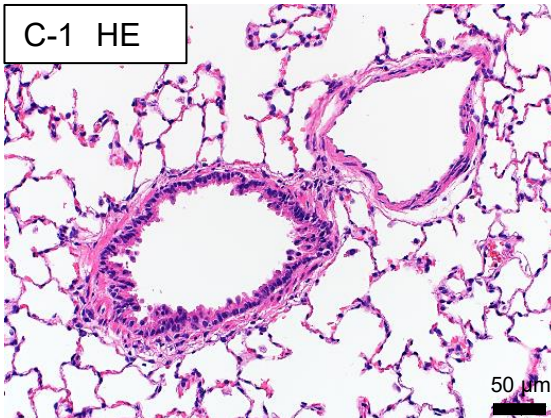
ばく露による影響は認められず、*Muc5ac*の発現上昇は観察されなかった

(4) 病理組織学的解析

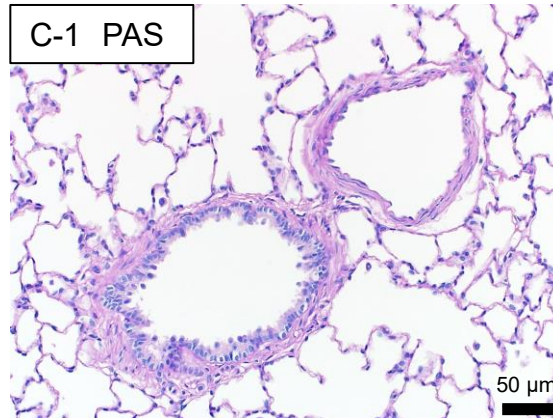
終末気管支～肺泡領域 (HE染色、PAS染色)

対照群

C-1 HE



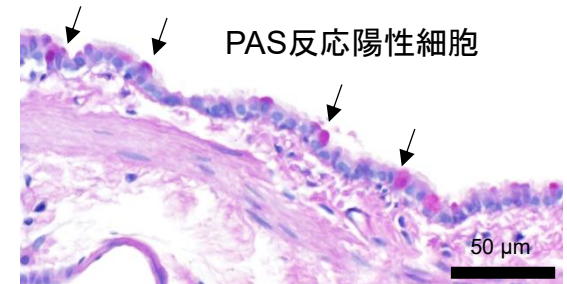
C-1 PAS



気管 (PAS染色)

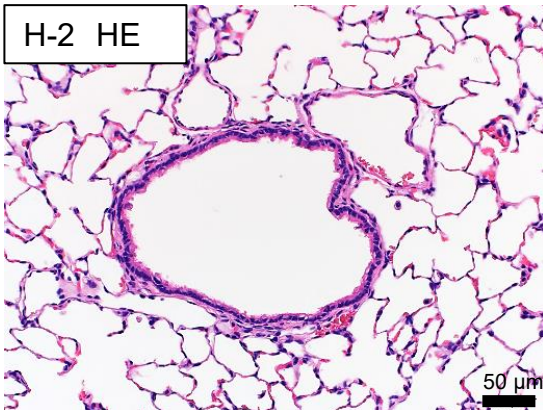
対照群

C-4 PAS

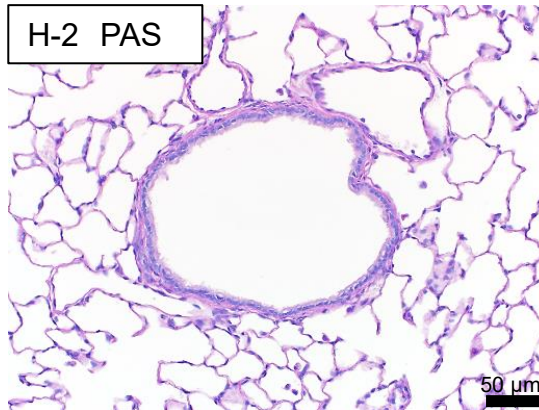


HONO群

H-2 HE

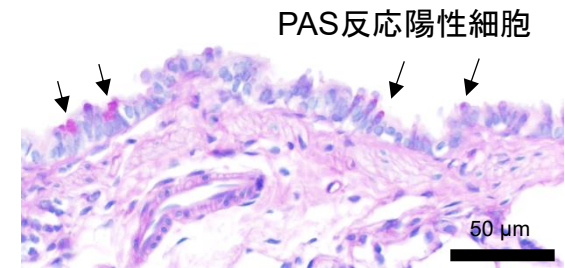


H-2 PAS



HONO群

H-4 PAS



- ばく露による影響は見られなかった
- 粘液産生の増加や肺気腫様の変化は見られなかった

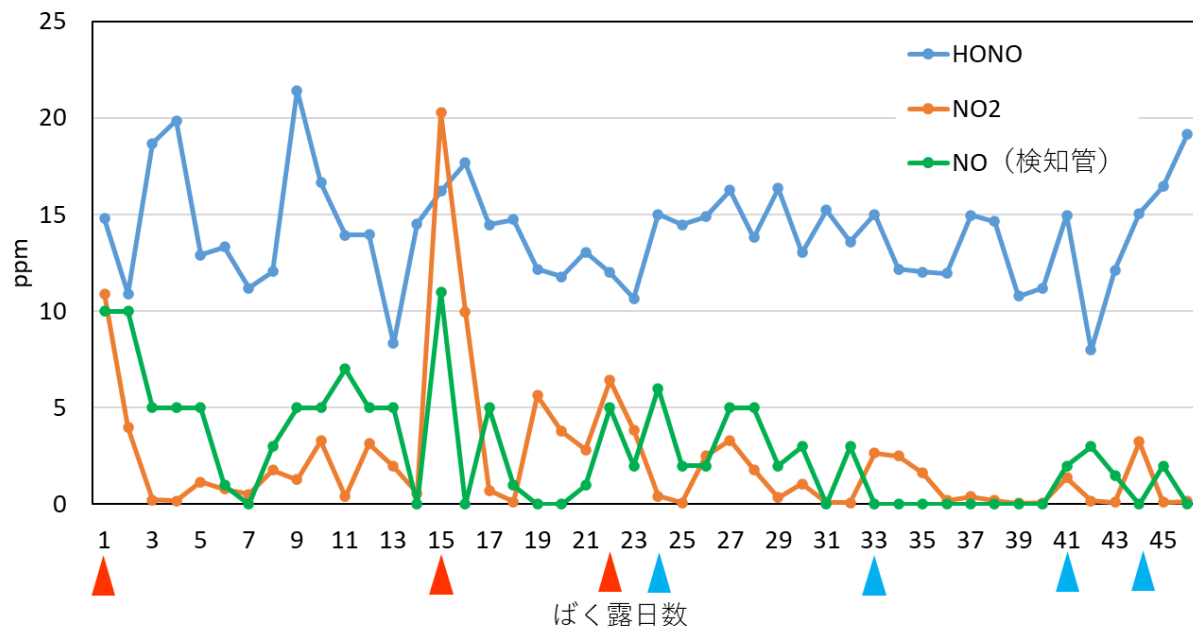
ラットHONOばく露 本試験の概要

赤字は予備試験からの主な変更点

動物	雄性F344ラット 10週齢 各群8匹 1週間前から装置へ馴化
ばく露目標濃度	対照群 0 ppm (超純水を装置にセットした) ばく露群 15-20 ppm (亜硝酸Na 180mM + 乳酸 180mM)
ばく露時間	1日6時間
実験期間	週7日、約7週間、合計45回ばく露
濃度測定	ばく露中に同時に1時間サンプリング (事前に1時間の安定化時間あり)
既報との総曝露 負荷量の比較	Ohyama et al.2018: 5.8 ppm x 24 hr x 42 d = 5846 ppm・hr 本試験: 15 ppm x 6 hr x 45 d = 4050 ppm・hr (20 ppm x 6 hr x 45d = 5400 ppm・hr)
ガス発生モニター	検知管、簡易NO _x 計
解析項目	最終ばく露翌日に剖検、 体重、摂餌量、臓器重量、病理組織学的解析、 BALFの解析、肺組織の遺伝子網羅解析(RNAseq) + qRT-PCR

本試験結果

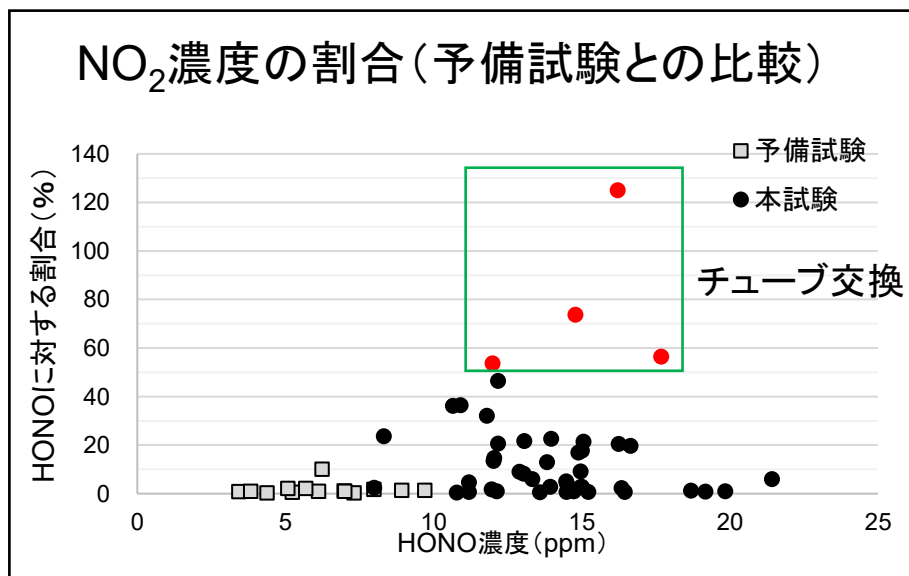
(1) ばく露濃度推移



HONO 平均値
 14.1 ± 2.8 ppm

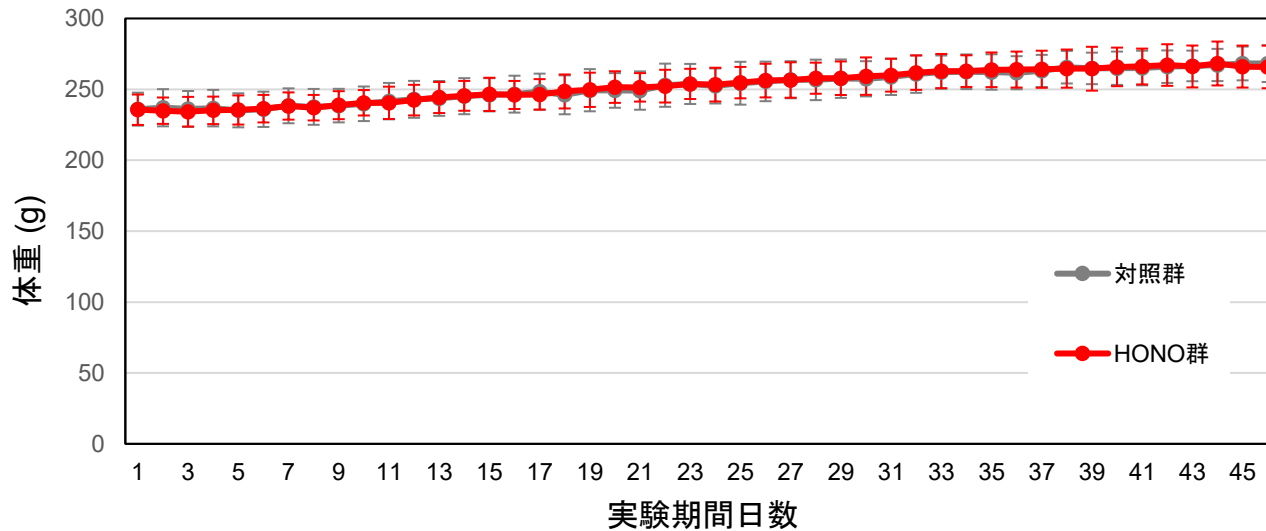
NO₂ 平均値
 2.31 ± 3.6 ppm

- HONO濃度のばらつきが大きく、NO₂濃度が異常に高くなる時があった
 - メタロールポンプのチューブ交換による送液量の変化が問題と思われる
- ▲ メタロールポンプのチューブ交換
 ▲ 2日間、チューブを使用して(潰して)から交換

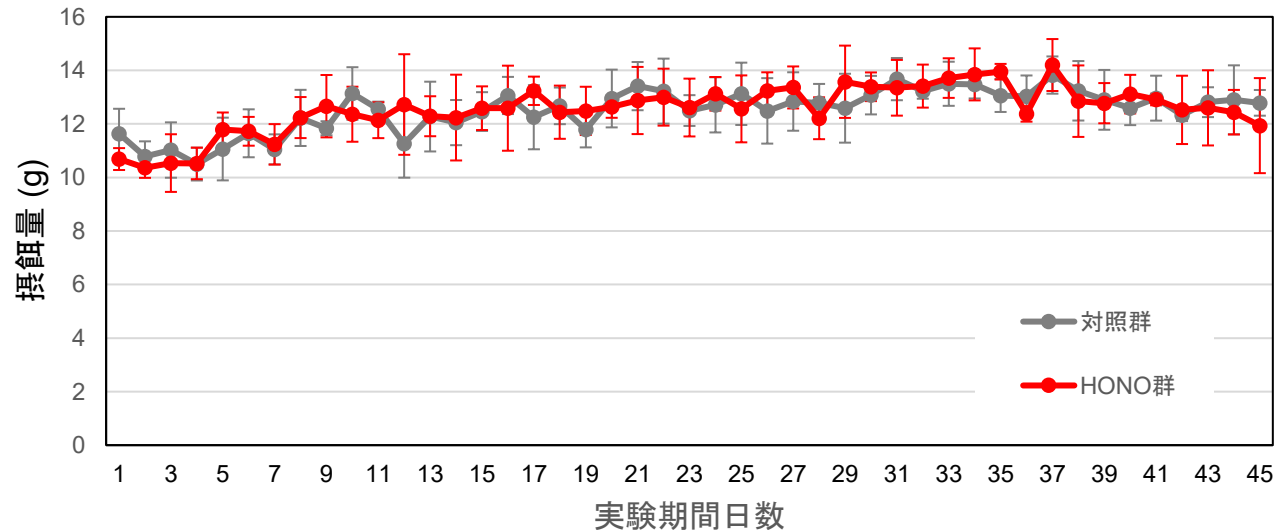


(2) ばく露期間中の体重・摂餌量の推移

体重



摂餌量



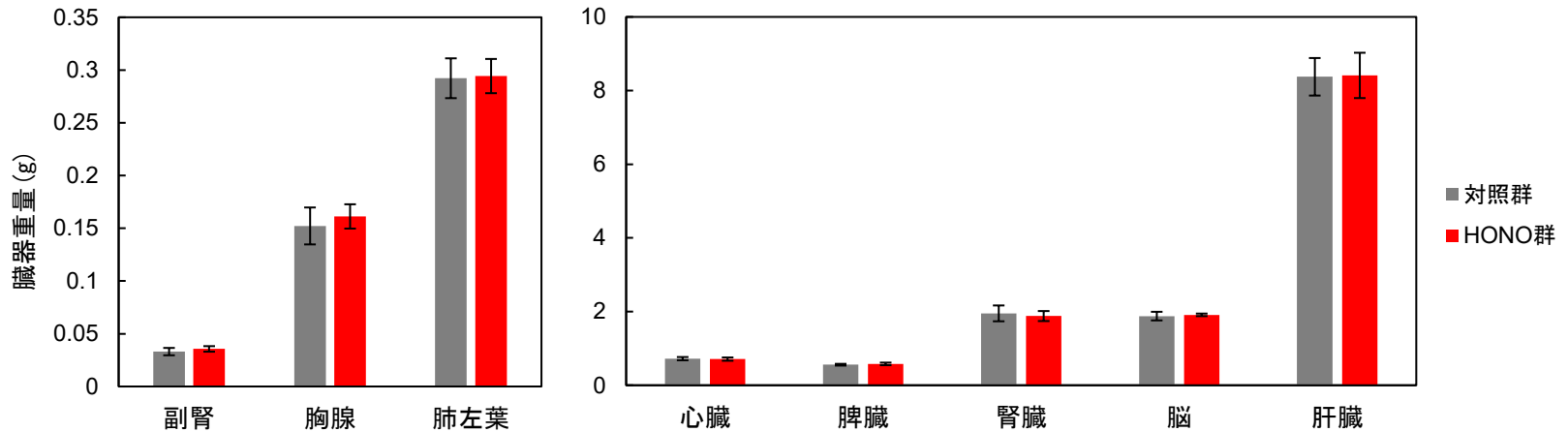
いずれも、ばく露による影響は認められなかった

(3) 肉眼観察：被毛の着色

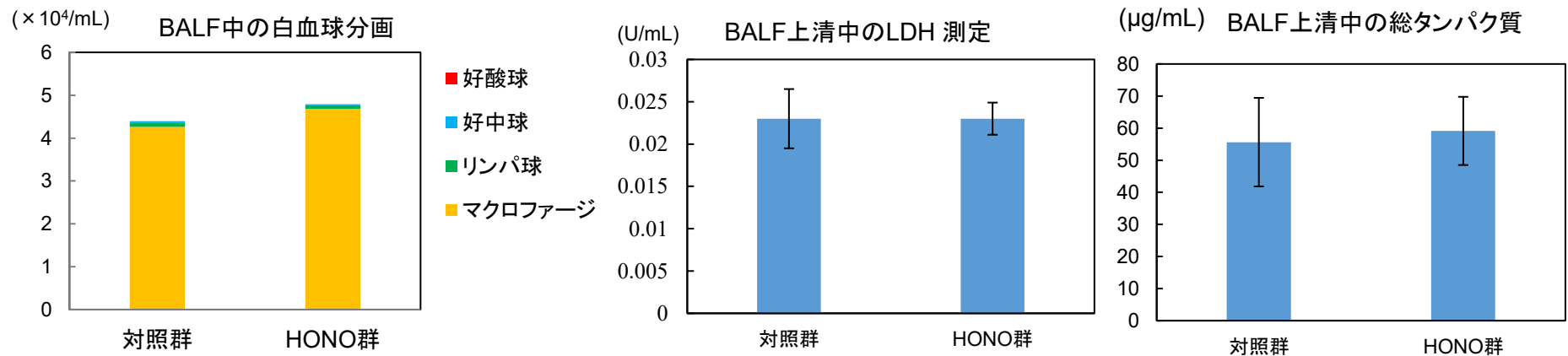
- 鼻部のみに色素沈着が観察された
- 過去の全身ばく露試験との再現性あり
- ニトロソ化反応あるいはキサントプロテイン反応と考えられる

(4) 臓器重量ほか

臓器重量



BALFの解析



- いずれの項目についても著変は認められなかった
- その他の項目については現在解析中

まとめ

ばく露システム

- 既報と同レベル以上の濃度のHONOガスを発生させることができた
- 比較的NO₂の発生割合は低いが、濃度の不安定性が課題
→メタロールポンプの送液法を検討

ラット反復ばく露実験

- 予備試験では一般的な項目において、ばく露の影響が見られなかった
- ばく露負荷を重くした本試験では、被毛の着色があり、既報をある程度再現できたことが期待される
- しかし、着色の程度を見る限り、Ohyama et al., 2018より影響が弱いことも考えられる
→ばく露負荷量を上げるには期間を延長するしかないが、24時間連続ばく露でないこと(休息时间があること)のほうが問題かもしれない
→引き続き、本試験の解析を進める。既報のエンドポイントにとらわれず肺組織における分子レベルでの影響を検討する(RNAseqを実施中)

その他

- ぜん息モデルマウスについてはOVA吸入に使用するネブライザーを変更し、以前より症状の個体差が少ないことが確認できた
- *in vitro*ばく露装置は年度末に納品される予定→ばく露条件の検討
- BALB/cマウスへの予備的なばく露試験を実施する予定