

令和7年度

亜硝酸(HONO)の生体影響試験

東京都健康安全研究センター
生体影響研究科
環境衛生研究科

令和8年2月

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。
- 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。

令和7年度の実施内容 (赤字:今回報告する内容)

動物実験	主な内容
正常マウス反復ばく露・呼吸機能解析(予備試験)	対照群、HONO群の2群の雌マウスに20 ppmで反復ばく露呼吸機能解析を実施
正常マウス反復ばく露(予備試験)	対照群、低濃度群(15 ppm)、高濃度群(30 ppm)の3群の雌雄マウスに反復ばく露 体重、臓器重量、病理組織学的解析、BALFの解析、肺組織のqPCR等
<i>in vitro</i> 実験	主な内容
細胞ばく露システムの条件検討	A549細胞を用いて、流量・湿度等を検討
A549細胞へのHONOばく露	HONO濃度約8 ppm、単回4時間ばく露 細胞傷害作用、炎症関連因子、酸化ストレス、遺伝子発現等
A549細胞へのNO ₂ ばく露	NO ₂ 濃度約3 ppm、単回4時間ばく露 令和6年度のラット本試験やOhyama <i>et al.</i> , 2011と同程度 細胞傷害作用、炎症関連因子、酸化ストレス、遺伝子発現等
ヒト気道上皮3D培養MucilAir HONO反復ばく露(予備試験)	2D細胞の結果を参考に、適切なばく露濃度を設定して実施予定 細胞間結合力(TEER)測定、生化学的解析、分子生物学的解析

正常マウス反復ばく露・呼吸機能解析(予備試験)

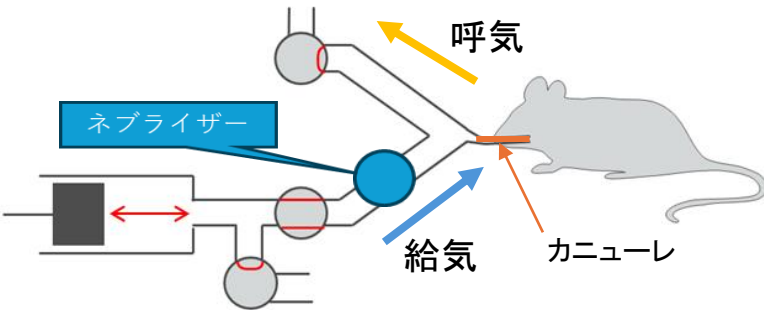
実験概要

ばく露条件	動物	雌性BALB/cJマウス、8週齢、合計12匹(各群6匹×2群) 1週間前から装置へ馴化
	ばく露濃度(目標)	対照群:0 ppm HONO群:約20 ppm (亜硝酸Na 180 mM + 乳酸 180 mM)
	ばく露条件	鼻部ばく露、1日4時間 週7日、2週間、合計14日間
	濃度測定	マウスばく露と並行して1時間サンプリング
	ガス発生のモニター	検知管(酸性ガス用、NO・NO ₂ 分離定量用)
呼吸機能解析	測定機器	フレキシベント呼吸機能解析装置(オレンジサイエンス社、FV-FX1)
	測定プログラム	Deep Inflation × 2回 → (Snap shot → Quick prime) × 12回 ・Deep Inflation: 肺を膨らませる ・Snap shot: 呼吸器全体の抵抗値などを測定 ・Quick prime: Snap shotにより得られた上昇値が、中枢気道か肺組織によるものかを区別する。
	測定項目	呼吸抵抗、中枢気道抵抗、ティッシュダンピング、 ティッシュエラスタンス、エラスタンス
	気管支収縮剤濃度	Methacholine (0, 3.125, 12.5, 50 mg/mL)

呼吸機能解析装置



フレキシベント呼吸機能解析装置

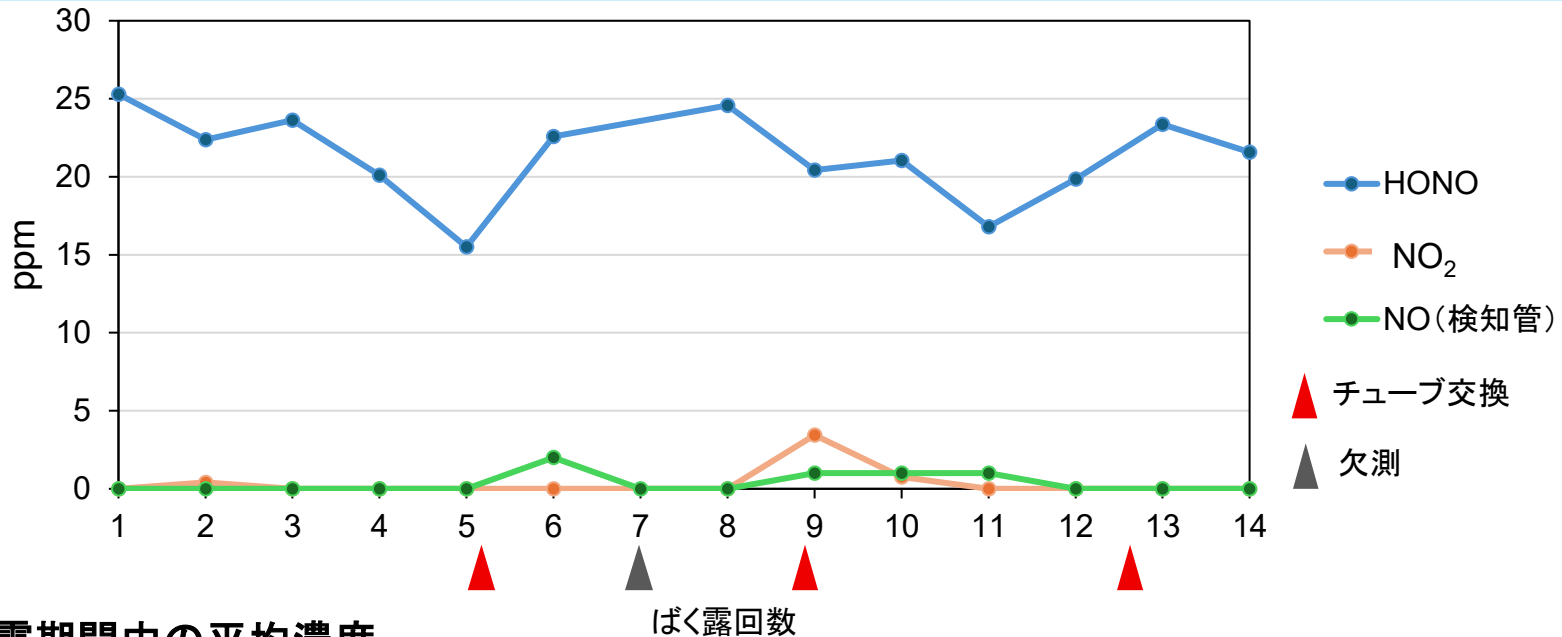


- 自発呼吸を抑制したマウスの気管にカニューレを挿管
- ↓
- コンピュータ制御のピストンポンプを用いた機械的換気・容積・圧力制御により呼吸機能を解析
- 気管支収縮剤をネブライザー噴霧し、気道過敏性を評価

NAME	DESCRIPTION	SAMPLE
Deep Inflation	肺を深く膨らませる	
SnapShot	単一周波数 (2.5 Hz) の FOT (強制オシレーション) 測定 【測定項目】 Rrs (呼吸抵抗) Ers (エラストランス)	
Primewave (QuickPrime)	広帯域 (1-20.5 Hz) の FOT 測定 【測定項目】 Rn (中枢気道抵抗) G (ティッシュダンピング) H (ティッシュエラストランス)	

(オレンジサイエンス社HPより)

結果①ばく露濃度



ばく露期間中の平均濃度

HONO : 21.3 ± 2.9 ppm、NO₂ : 0.4 ± 0.95 ppm

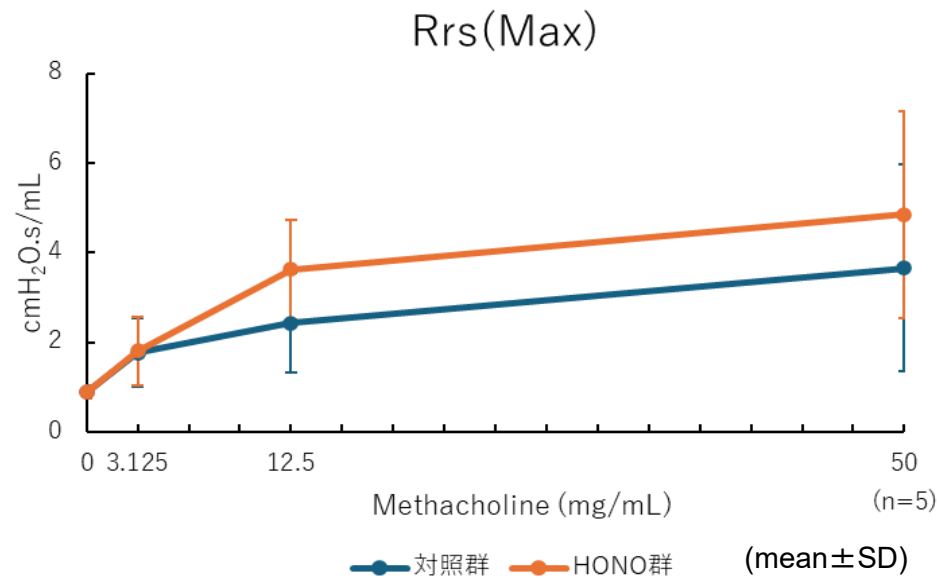
総ばく露負荷量の比較

$21.3 \text{ ppm} \times 4 \text{ hr} \times 14 \text{ d} = \underline{1192.8 \text{ ppm} \cdot \text{hr}}$ ← 1/4程度
Ohyama et al., 2011 : $8.4 \text{ ppm} \times 24 \text{ hr} \times 21 \text{ d} = \underline{4233.6 \text{ ppm} \cdot \text{hr}}$

- HONO濃度を目標値程度(20 ppm)でばく露することができた。
- 送液チューブを定期的に交換することで、極端な副生成物の発生を抑えることができた。

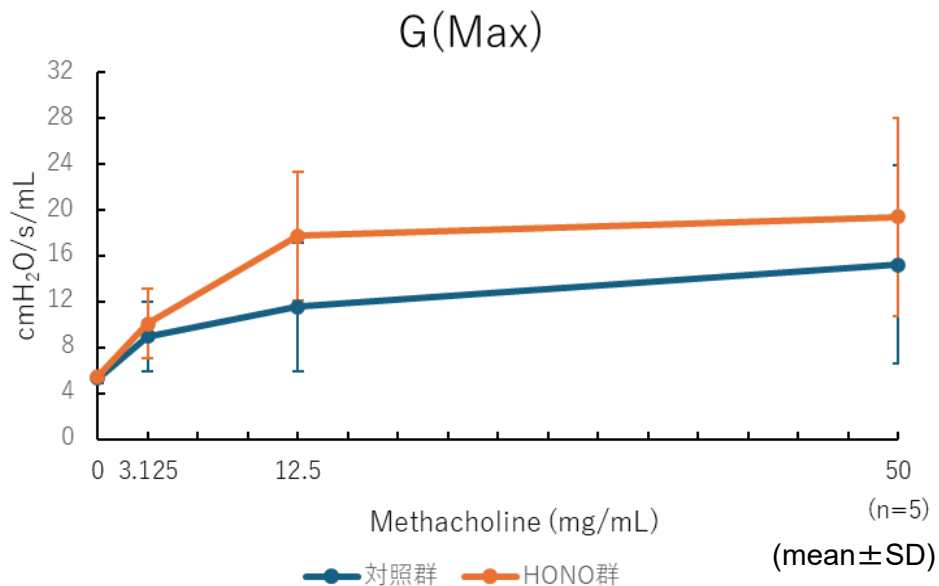
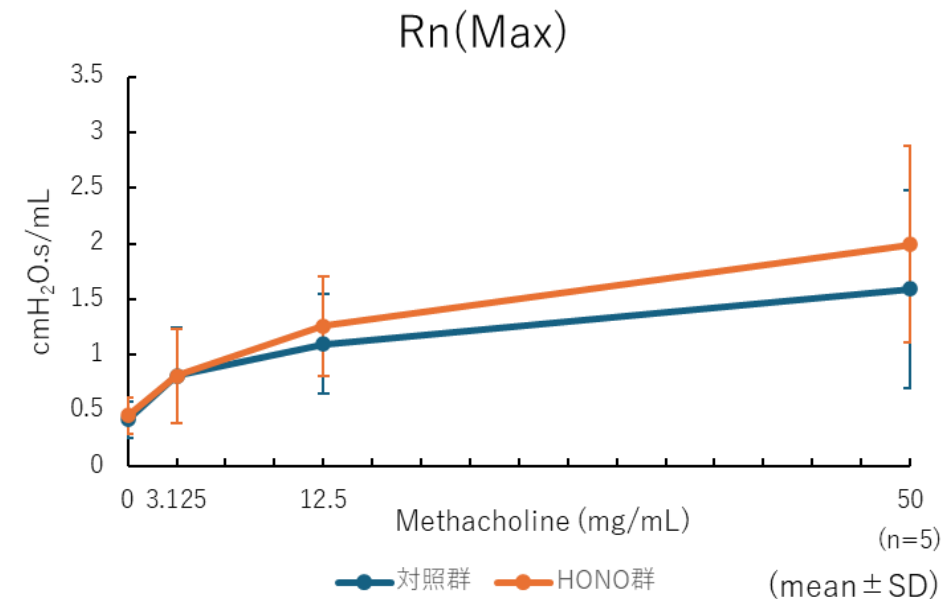
正常マウス反復ばく露・呼吸機能解析(予備試験)

結果②呼吸抵抗



パラメーター	
Rrs	呼吸器全体(気道+肺)の呼吸抵抗
Rn	中枢気道抵抗 中枢気道(ガス交換に関与しない気道)の抵抗値。
G	ティッシュダンピング 末梢気道における空気の流れに対する抵抗値。肺胞組織の抵抗を示す。

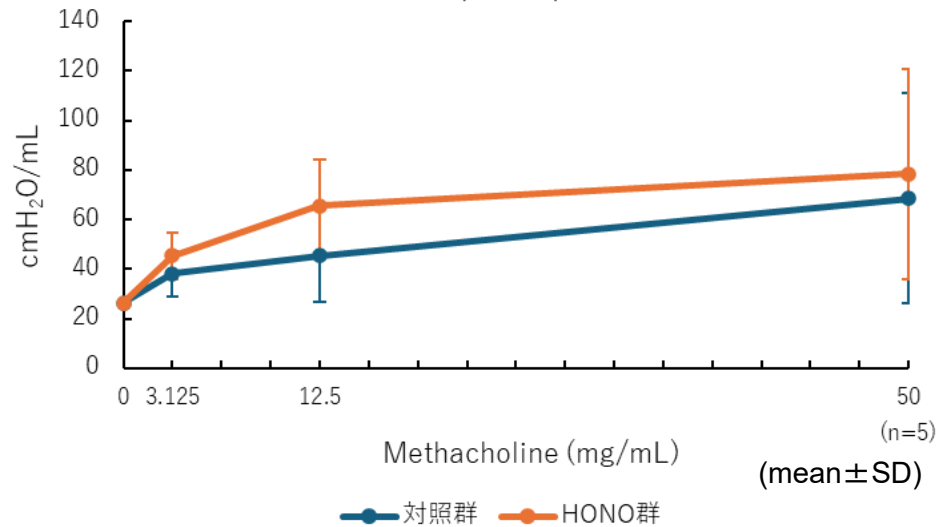
各濃度のMethacholineを噴霧後、連続12回自動測定し、そのうちの最大値を取得した。



正常マウス反復ばく露・呼吸機能解析(予備試験)

結果③エラスタンス

Ers(Max)



パラメーター

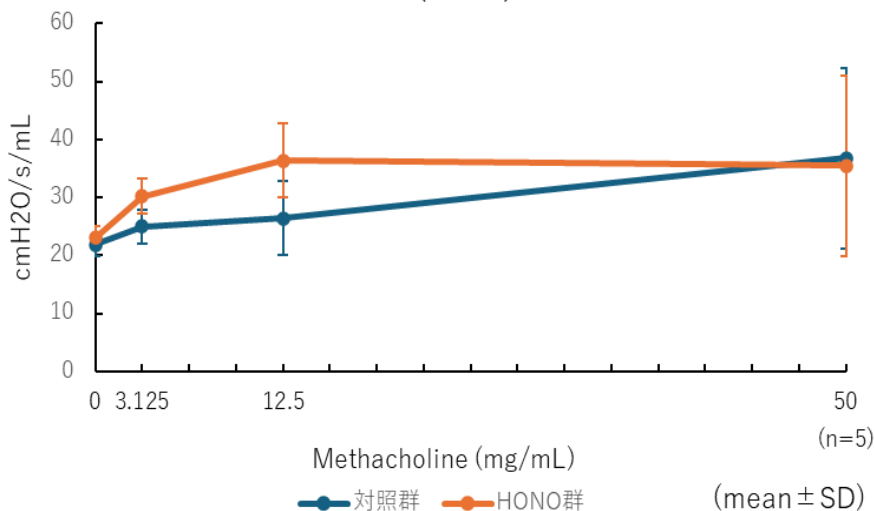
Ers

呼吸器全体のエラスタンス(弾性抵抗)
肺胞・胸隔の縮まろうとする力に対するの抵抗値を示す。

H

ティッシュエラスタンス
組織が収縮して元の形状に戻る能力を示す。組織の硬さの指標

H(Max)



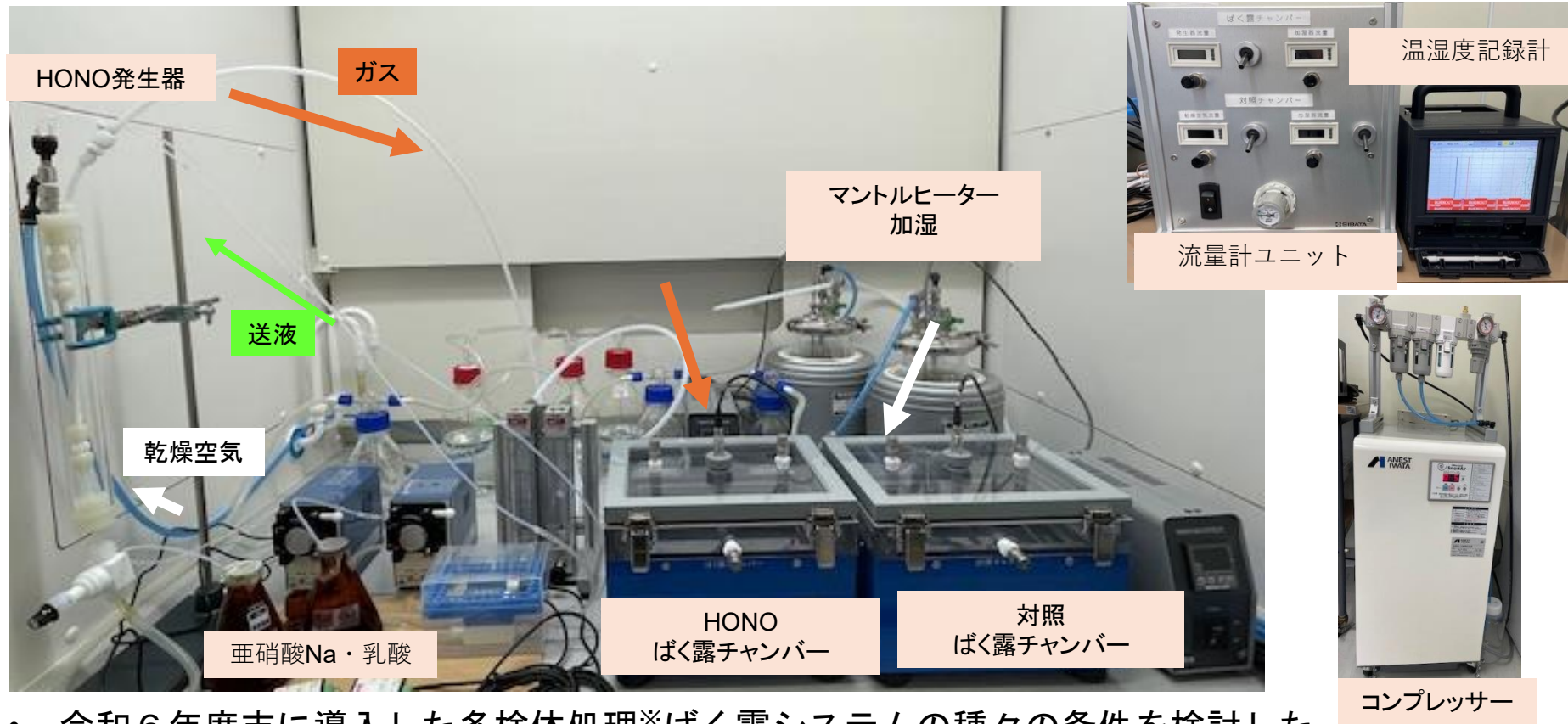
HONOばく露による呼吸抵抗値やエラスタンスの有意な変化は認められなかったが、ばく露群では対照群と比較してやや増加傾向にあった。

正常マウス反復ばく露の予備試験 実験概要

動物	雌雄BALB/cJマウス、13週齢、合計36匹(各群6匹×3群×雌雄)
ばく露濃度(目標)	対照群:0 ppm HONO 低濃度群:約15 ppm HONO 高濃度群:約30 ppm 流量計を用いて溶液の送液速度をモニタリングする。
ばく露条件	鼻部ばく露、1日4時間 週7日、2週間、合計14日ばく露
濃度測定	マウスばく露と並行して1時間サンプリング
ガス発生のモニター	検知管(酸性ガス用、NO・NO ₂ 分離定量用)
解析項目	最終ばく露翌日に剖検 体重、臓器重量、病理組織学的解析、BALFの解析、肺組織のqPCR

- 現在、ばく露実験を実施中である。
- 微小流量計の導入により、亜硝酸Naと乳酸の送液流量を安定させることができた。

2D細胞・3D培養組織用のばく露システムの条件検討



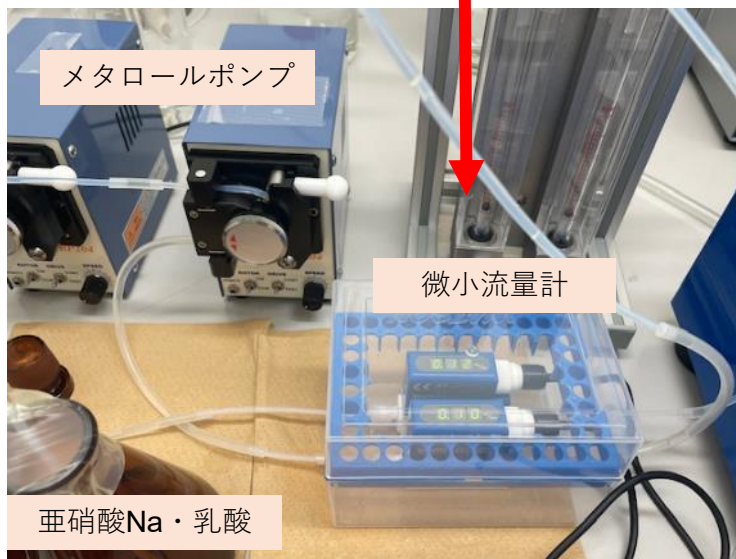
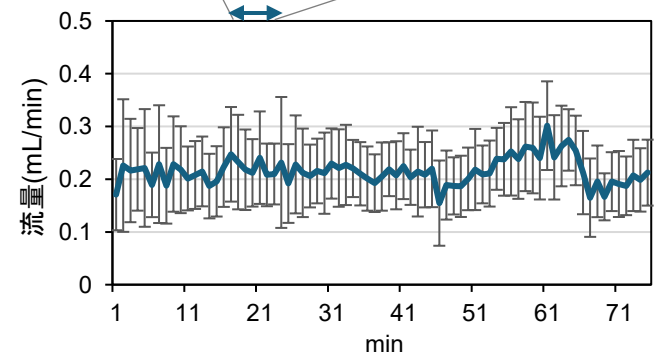
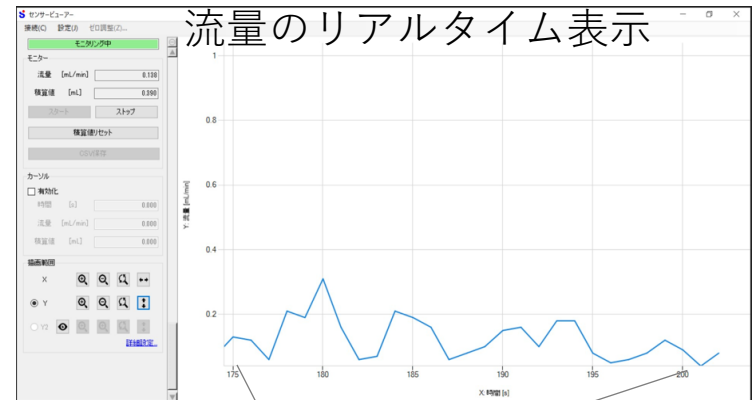
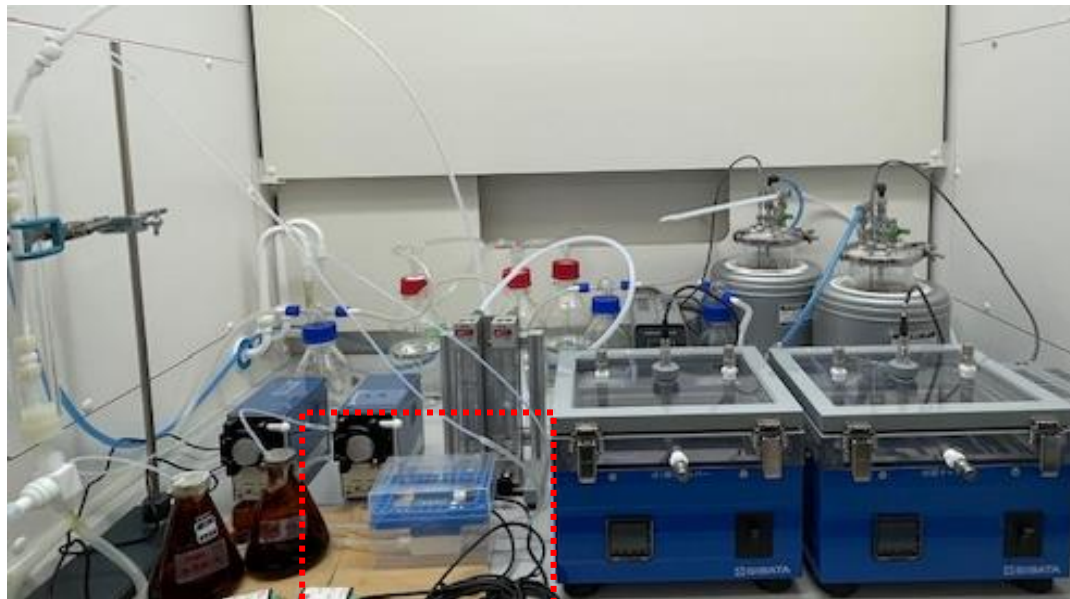
- 令和6年度末に導入した多検体処理※ばく露システムの種々の条件を検討した。

※各チャンバー2プレートずつ処理可能

- HONO濃度を約8 ppm(ラット予備試験で副生成物が低かった濃度)まで上げることを目標とした。
- 動物用と同じHONO発生器を採用したが、ばく露システム全体が動物実験と異なるため、培養細胞のばく露に適した条件を検討する必要があった。

2D細胞・3D培養のばく露システムの条件検討

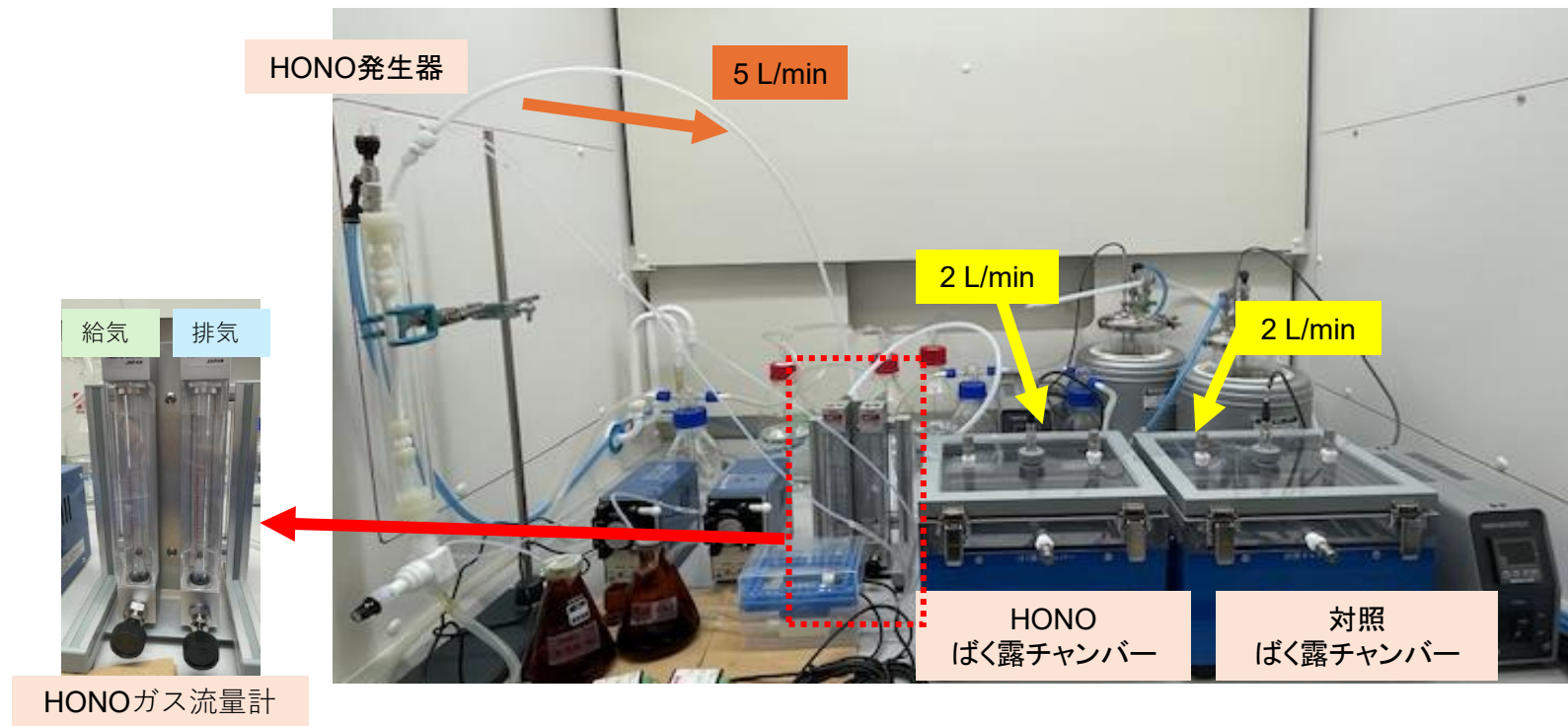
(1) 送液流量の制御



- 微小流量計をメタロールポンプの下流に設置し、2液の送液流量をリアルタイムでモニタリングし、流量の変動を確認できるようになった。
- 流量は0.2から0.3mL/min程度で維持することとした。

2D細胞・3D培養組織用のばく露システムの条件検討

(2) HONOガスの流量調整



- HONO発生器の流量は、動物のばく露試験と同様に5 L/minとした。
 - ウェル表面の乾燥が懸念されたため、チャンバー導入流量は2 L/minになるよう調整した。
 - 対照チャンバーには2 L/minの加湿空気を導入した。
- HONOばく露チャンバーを用いて、A549細胞に濃度0 ppmで4時間ばく露し、顕微鏡下観察と、トリパンブルー染色による生存率(97%)の計測により、異常が無いことを確認した。
- 今後の2D細胞・3D培養組織のばく露はこれらの条件で行う。

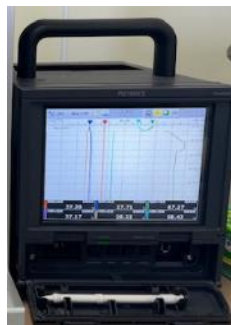
2D細胞・3D培養のばく露システムの条件検討

(3) 湿度の調整

- 3D培養組織は特に乾燥に弱いため、チャンバー内湿度を80%程度にすることを目標とした。
- HONOは水に溶けやすいため、チャンバー内が結露しないように注意が必要である。



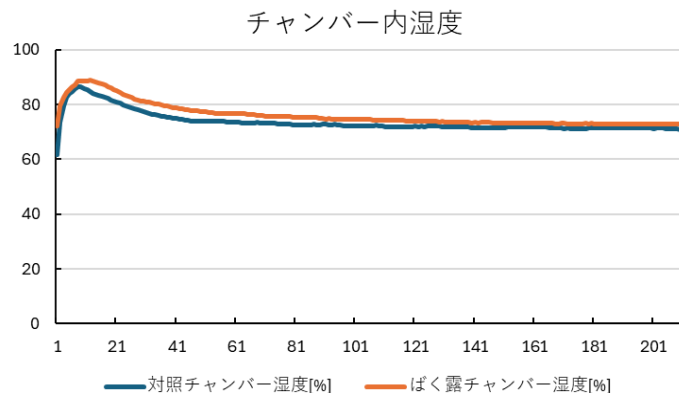
温湿度センサー



温湿度記録計



マントルヒーター



- 培養液の有無がチャンバー内の湿度に影響するため、空のウェルには蒸留水を容れた。
- 対照ばく露チャンバーは、乾燥空気とマントルヒーターの加湿空気を1:1の割合で混合した。
- HONOばく露チャンバーは、HONO発生器出口の湿度が40%程度であったため、マントルヒーターは使用しない。(チャンバー内部の水分蒸発を加えると湿度70~80%程度になった)

両チャンバーで湿度70~80%を維持することができるようになった。

A549細胞へのHONOばく露実験 実験概要

実験条件	
培養細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞 約 3.0×10^5 cells/mL
ばく露濃度(目標)	対照 0 ppm (加湿清浄空気・湿度80%程度) HONO 8 ppm程度(亜硝酸Na 50 mM + 乳酸 150 mM)
ばく露時間	4時間
ばく露方式	多検体処理(バッチ式)ばく露システム 導入流量: 2 L/min
試料採取	ばく露直後、培地又は細胞を回収し、解析に供する。

測定項目	
細胞傷害作用	細胞増殖率、 細胞傷害性(乳酸脱水素酵素(LDH))
炎症関連因子	IL-8、IL-6
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)
遺伝子発現	<i>IL8</i> 、 <i>MUC5AC</i> 、 <i>HMOX1</i> 、 <i>SOD2</i> 等

A549細胞へのHONOばく露実験 結果①

- ばく露濃度(2回実施時の平均値)

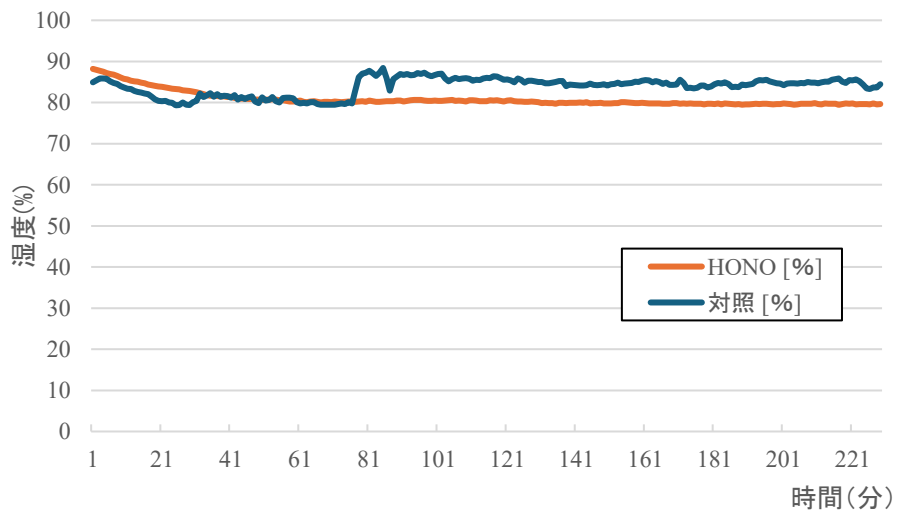
HONO: 8.3 ppm

NO₂: 0.5 ppm

NO: 0 ppm(検知管)

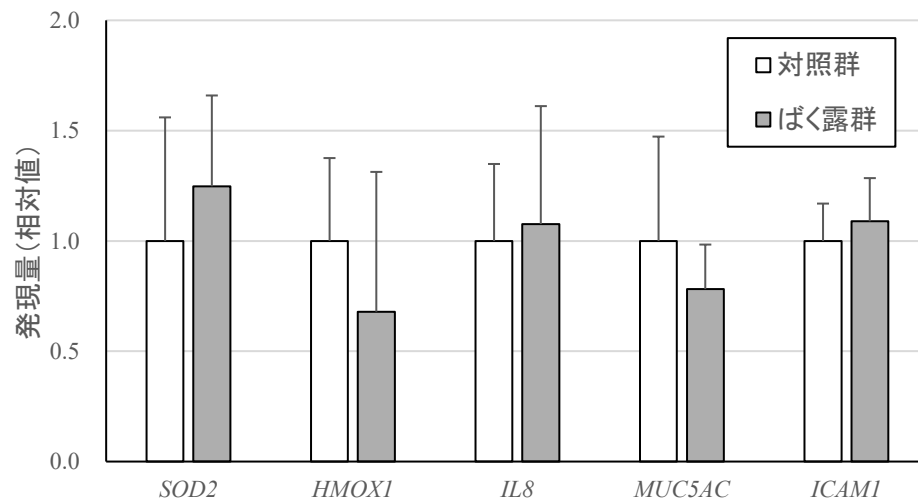
- 湿度

4時間のばく露中、概ね80%で推移した。



A549細胞へのHONOばく露実験 結果②

- qPCR



- n=9
- ばく露群は、対照群の結果を1としたときの相対値を算出
- 結果はmean±SD
- 統計学的有意差なし(t検定)

TaqMan法を用いて遺伝子増幅を行った。

HMOX1が減少傾向を示したが、5つの対象遺伝子について有意差は認められなかった。

- 今回の解析結果では、HONOの影響が認められなかった。
- 他の項目については実施及び解析中
- 今後、ばく露回数を増やす等、総ばく露負荷を上げて再実験を実施する必要がある。

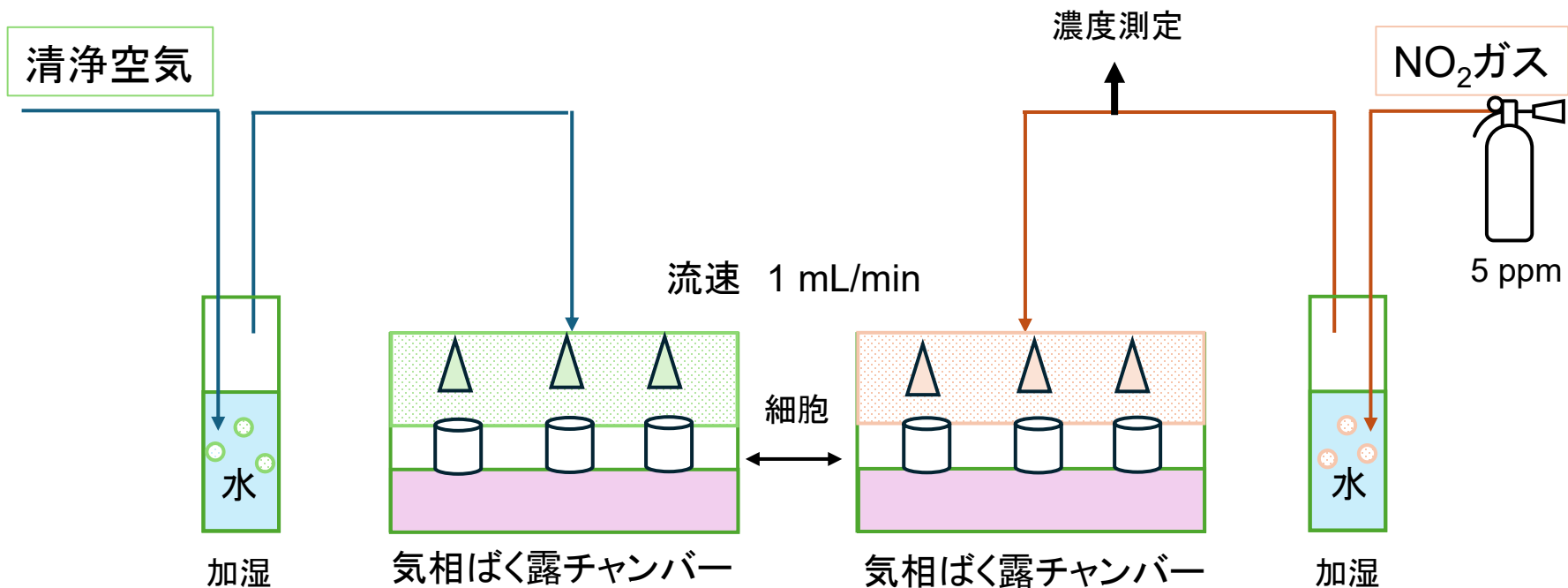
A549細胞へのNO₂ばく露実験

実験条件	
培養細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞 約 3.0×10^5 cells/mL
ばく露濃度(目標)	対照 0 ppm (加湿清浄空気・湿度80%程度) NO ₂ 3 ppm以上
ばく露時間	4時間
ばく露方式	個別流路式ばく露システム 導入流量: 1 mL/min
試料採取	ばく露後、培地又は細胞を回収し、解析に供する。

測定項目	
細胞傷害作用	細胞増殖率、 細胞傷害性(乳酸脱水素酵素(LDH))
炎症関連因子	IL-8、IL-6
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)
遺伝子発現	IL8、MUC5AC、HMOX1、SOD2 等

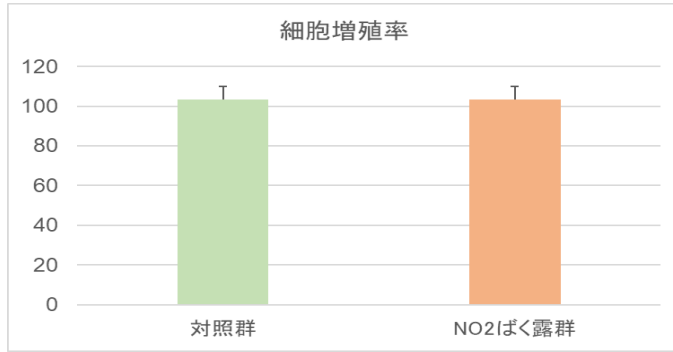
A549細胞へのNO₂ばく露実験 ばく露システム・ばく露濃度

- 既存の個別流路式のばく露システム (Cultex GC) を利用した。
- NO₂ばく露濃度※: 4.1 ppm
※HONO測定用フィルターパックで測定

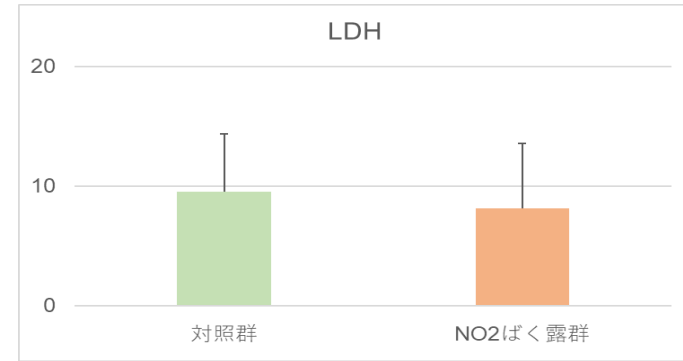


A549細胞へのNO₂ばく露実験 結果①

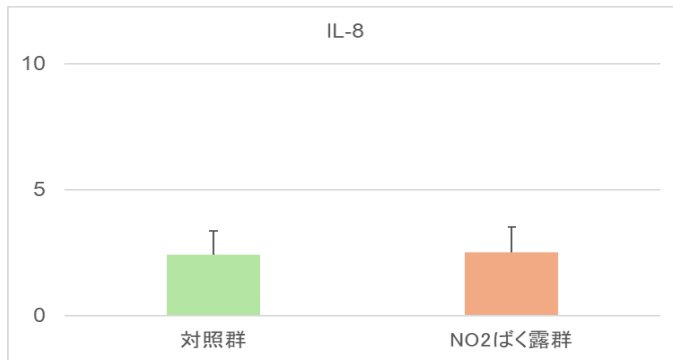
細胞増殖率(%)



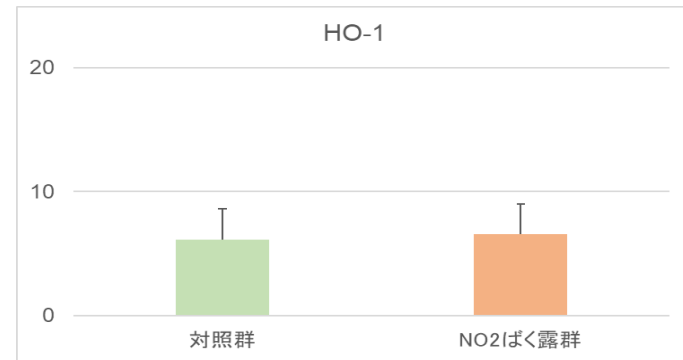
細胞傷害性(%)



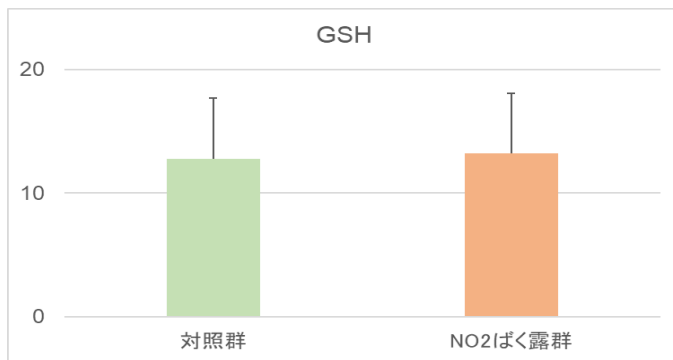
IL-8 (pg/μg タンパク質)



HO-1 (pg/μg タンパク質)



GSH (nmol/試料)

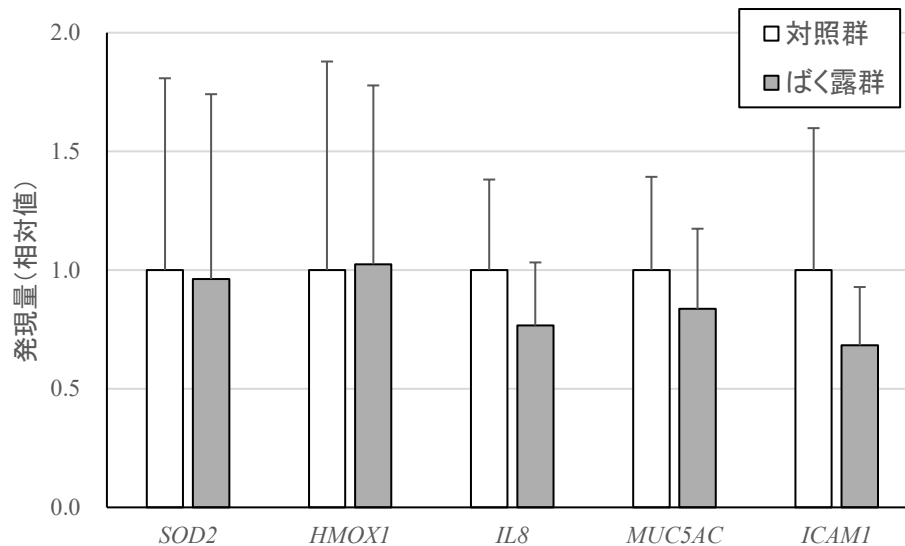


- n=6
- IL-6は検出されず
- 結果はmean±SD
- 統計学的有意差なし(t検定)

A549細胞へのNO₂ばく露実験 結果②

qPCR

HONOばく露と同様にTaqMan法を用いた。



- ・n=9
- ・ばく露群は、対照群の結果を1としたときの相対値を算出
- ・結果はmean±SD
- ・統計学的有意差なし(t検定)

IL8、MUC5AC及びICAM1が減少傾向を示したが、5つの対象遺伝子について有意差は認められなかった。

- ・ 今回のばく露条件では、ばく露の影響は認められなかった。
- ・ 既報(Ito *et al.*, 2019)では、2.5 ppm 6時間及び5 ppm 3時間ばく露でIL8遺伝子の発現が増加
⇒今回の実験条件では再現されなかったため、次年度は濃度を高くして既報を再現する。

まとめ

- **正常マウスへのHONO 2週間(14日間)反復ばく露・呼吸機能解析**
20 ppm程度で14日間ばく露後、呼吸機能解析を行った。呼吸抵抗やエラスタンスについてはばく露群でやや増加傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。
⇒本試験では総ばく露負荷を上げ、n数を増やして評価する予定
- **正常マウスへのHONO 2週間(14日間)反復ばく露(予備試験)**
最高30 ppm程度で14日間、雌雄マウスにばく露し、一般毒性を評価(年度末)
⇒次年度に本試験を実施する。
- **2D細胞・3D培養組織用のばく露システムの条件検討**
HONO発生の安定化・湿度の維持方法等を検討し、条件を確立することができた。
- **HONOばく露実験**
A549細胞の8 ppmの単回ばく露の結果、現在著変は認められていない(継続解析中)。
⇒次年度の初めに追加試験として総ばく露負荷を上げた実験を行う。
⇒ヒト気道上皮3D培養(MucilAir)へのばく露を行う(年度末に予備試験)。
- **NO₂ばく露実験**
HONO発生装置で生成し得る3 ppm程度でNO₂をA549細胞にばく露したが、顕著な毒性は認められなかった。
⇒しかし、既報の再現性を確認するため、次年度に高濃度のばく露実験を行う。