

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7年7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

事前にラットのばく露試験により、既報の確認実験を実施した。

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6年度の実施内容

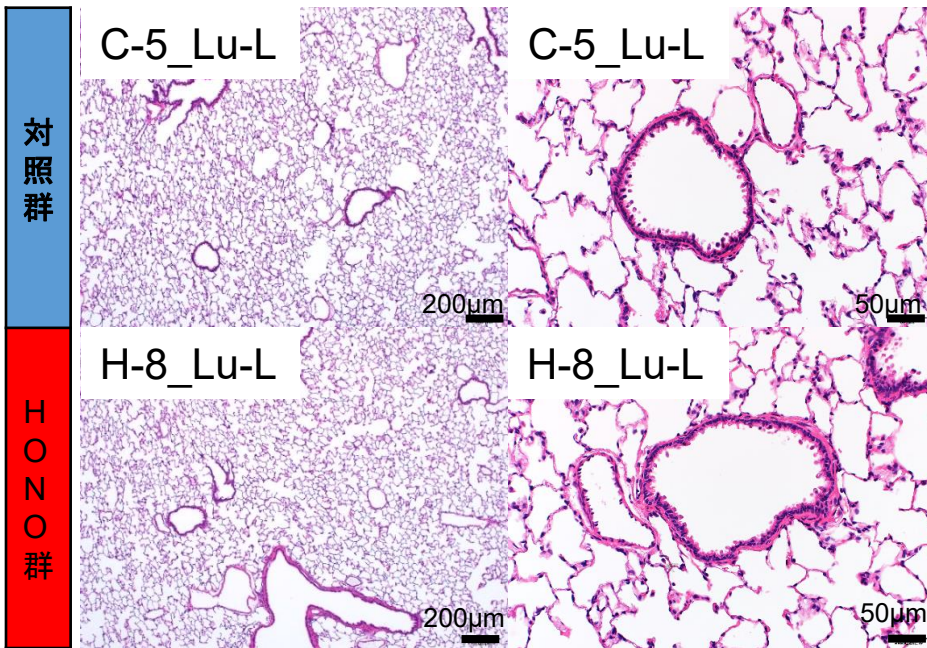
動物実験	主な内容
動物ばく露システムの作製	Ohyama <i>et al.</i> , 2013を参考にHONO発生装置を作製 ばく露濃度検討
ラット反復ばく露	ラットの既報(Ohyama <i>et al.</i> , 2018)と同程度のばく露負荷で実施
マウス単回ばく露	反復ばく露の予備検討として実施
マウスぜん息モデルの再検討	卵白アルブミン(OVA)吸入条件を再検討
<i>in vitro</i> 実験	主な内容
2D細胞・3D培養組織用のばく露システムの構築	動物ばく露システムと同じ発生装置を用いる バッチ式(多検体処理)のばく露チャンバーを構築
ヒト気道上皮3D培養組織の検討	MucilAir™の培養・ばく露条件等の再確認 細胞間結合力(TEER)、生化学的解析、分子生物学的解析

ラット反復ばく露 本試験の概要

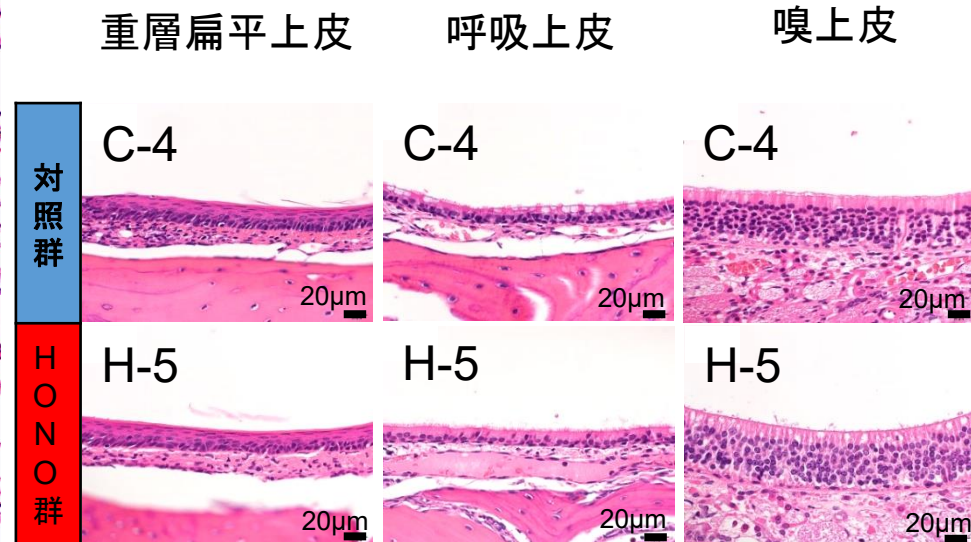
動物	雄性F344ラット 10週齢 各群8匹 1週間前から装置へ馴化
ばく露濃度	対照群 0 ppm (超純水を装置にセット) ばく露群 HONO: 14.21±2.8 ppm NO ₂ : 2.3±3.6 ppm (亜硝酸Na 180 mM + 乳酸 180 mM)
ばく露時間	1日6時間
ばく露期間	週7日、約7週間、合計45回ばく露
濃度測定	ばく露中に同時に1時間サンプリング (事前に1時間の安定化時間あり)
既報との総ばく露負荷量の比較	Ohyama <i>et al.</i> , 2018: 5.8 ppm x 24 hr x 42 d = 5846 ppm·hr 本試験: 14.21 ppm x 6 hr x 45 d = 3836.7 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】(各群4匹)、 qRT-PCR

ラット反復ばく露 病理組織学的解析

肺実質



鼻腔

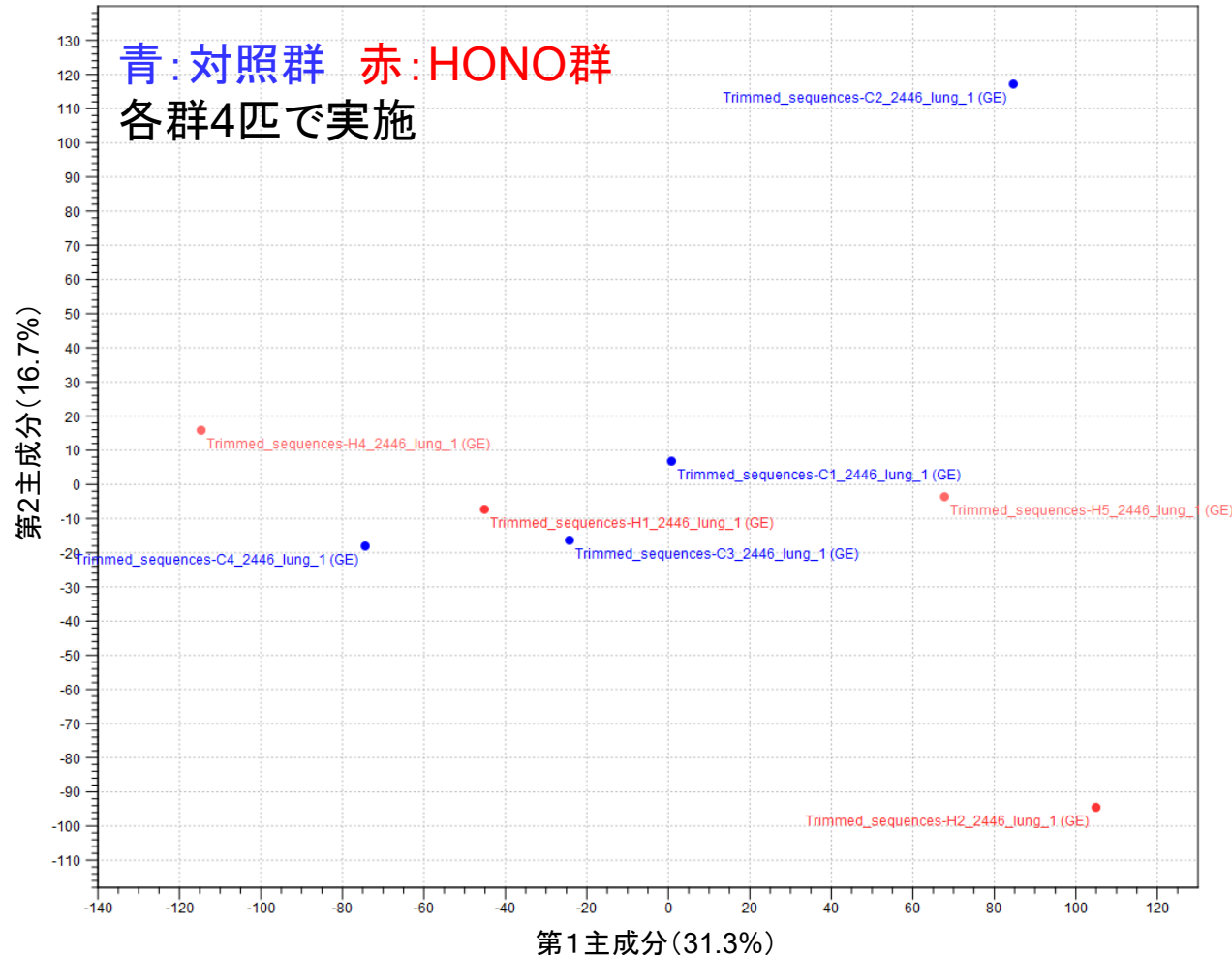


- 肺実質において、両群ともに著変は認められなかった。
- 杯細胞の増加や肺気腫様の変化は観察されなかった。
- 鼻腔においても変化は認められなかった。

ラット反復ばく露 肺組織の遺伝子網羅解析 (RNAseq) ①

RNAseq: 肺のtotal RNAを用い、PolyA選択法でライブラリを作製。NovaSeqにより次世代シーケンスを実施。データ量は、1サンプル当たり6G塩基(2000万リード)。

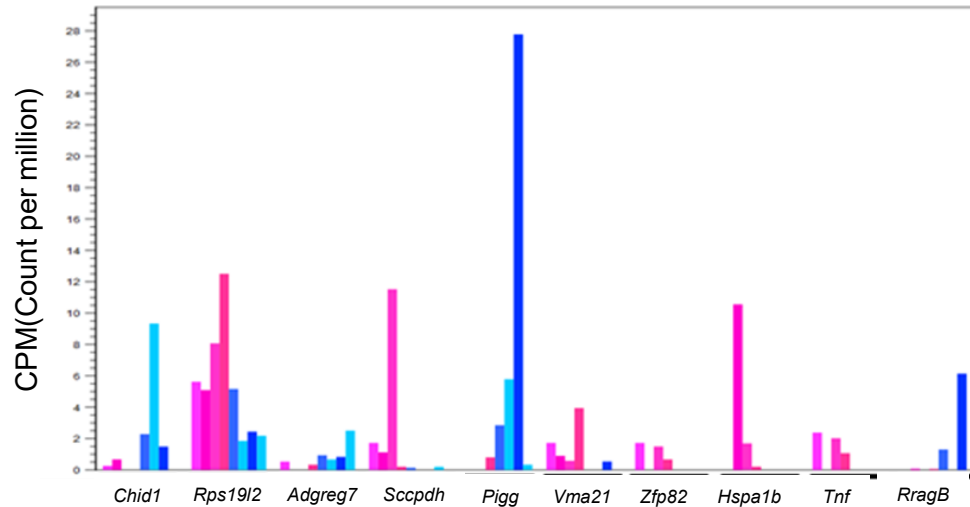
主成分分析



約2万の遺伝子発現の変化の情報をもとに行った主成分分析では、HONO群と対照群の群ごとにプロットが分離されず、ばく露による特有の遺伝子発現変動はほとんどなかったことを示唆している。

ラット反復ばく露 肺組織の遺伝子網羅解析 (RNAseq) ②

群間で発現の差異があった遺伝子Differentially Expressed Gene (DEG)



青:対照群 赤:HONO群
各群4匹で実施

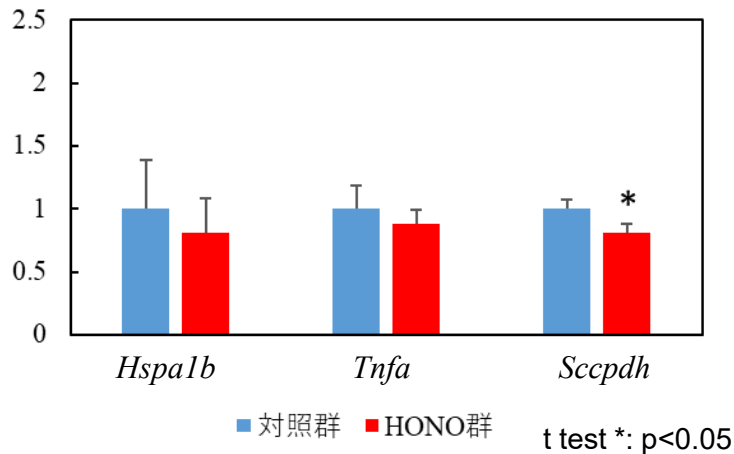
偽陽性の低い(FDR補正済p値<0.2)
遺伝子は10個あり、様々な機能を持つ
遺伝子であった。

Chid1	Chitinase domain containing 1: 生体内で幅広く発現し、炎症反応や病原体への応答に関与する可能性がある
Rps19l2	Ribosomal protein S19-like2: 機能不明だが、リボゾームの構成因子で、単球走化性や炎症反応に関わると考えられる
Adrg7	Adhesion G protein coupled receptor G7: Gタンパク質共役型受容体で機能はあまりわかっていないが、SARS-CoV-2感染で変動する報告がある。
Sccpdh	Saccharopine dehydrogenase: 糖脂質の生合成過程に関与する酵素。
Pigg	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class G: GPIアンカーの生合成過程に関与。
Vma21	Vacuolar ATPase assembly factor VMA21: 液胞型ATPアーゼ(プロトンポンプ)のシャペロンとして働く
Zfp82	Zinc finger protein 82: ジンクフィンガータイプの転写因子の一つで、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに関与。
Hspa1b	Heat shock protein family A member 1B: ヒートショックタンパク質の一種で、ストレスから細胞を保護する。
Tnf	Tumor necrosis factor: 炎症誘発性サイトカイン。マクロファージの遊走や活性化に不可欠。
RragB	Ras related GTP binding B: Ras相同GTPaseファミリーの一種。mTORC1シグナルにより細胞増殖などの細胞内シグナル伝達を制御する。

ラット反復ばく露 qRT-PCR

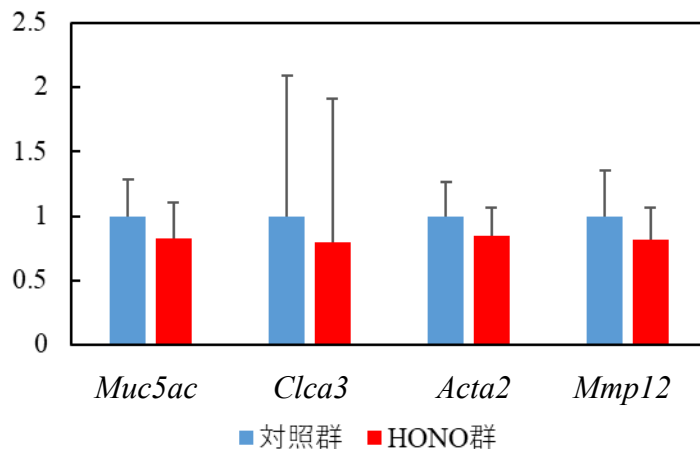
$\Delta\Delta Ct$ 法
(ハウスキーピング遺伝子はTbpを使用)

● RNAseqで得られたDEGの発現の確認



- 3つの遺伝子とも、RNAseqでは対照群より上昇していたが、qRT-PCRではその結果は再現されなかった。
- *Sccpdh*はHONO群で有意に減少していたが、RNAseqと逆の結果であり、現時点で生物学的な意味は低いと考えられる。

● 粘液産生や線維化に関わる遺伝子



- Ohyama *et al.*, 2018で影響がみられた遺伝子 (*Muc5ac*)に変化が認められなかった。
- その他の粘液産生及び線維化に関連する遺伝子においても変化は認められなかった。

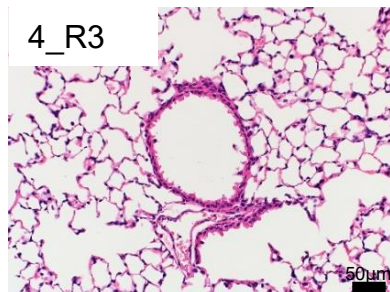
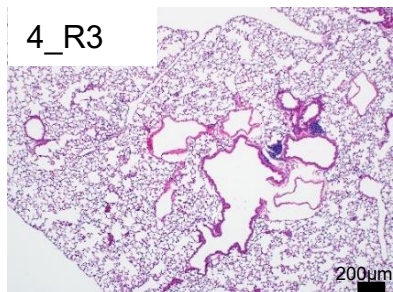
マウス単回ばく露

反復ばく露試験の予備試験として、高濃度のHONOを単回ばく露した。

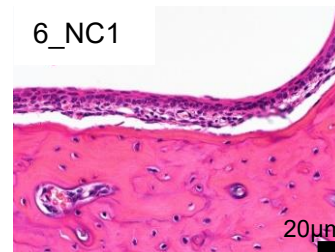
動物	雌性BALB/cJマウス
動物数	HONOばく露群のみ 6匹
週齢(ばく露開始時)	8週齢
ばく露時間 (1日あたり)	4時間
ばく露濃度	低濃度:7.38 ppm (NO ₂ 、NOは0 ppm) 高濃度:21.54 ppm (NO ₂ は0 ppm、NOは2 ppm)
ばく露期間	低濃度で単回ばく露した2日後に 高濃度を単回ばく露した。
主な評価項目	BALF解析 病理組織学的解析

- いずれの濃度についても、急性毒性は観察されなかったため、反復ばく露試験は実施可能である。
- BALF解析や病理組織学的解析においても影響は認められなかった。
- 今回は、適度につぶした新しい送液チューブを使用したため20 ppm程度まで濃度を高めることができた。

肺実質

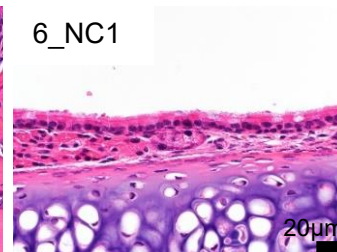


扁平上皮

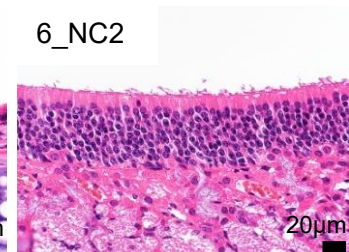


鼻腔

呼吸上皮



嗅上皮

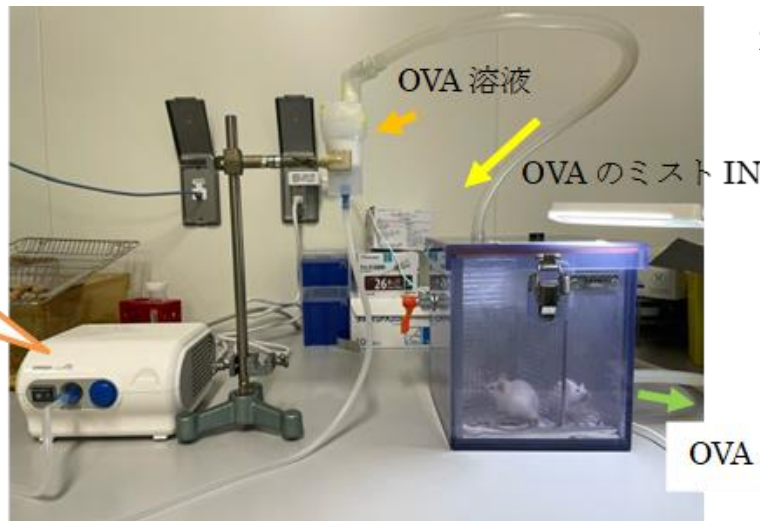


マウスぜん息モデルマウスの再検討

- これまで、アジュバンドやチャレンジの手法・回数及びOVA溶液濃度等の検討を行ってきたが、実験ごとの再現性に乏しく、ぜん息症状の個体差が大きかった。
- 特にチャレンジ方法については、以前の超音波式ネブライザーではOVA溶液中のタンパク質が変性するためか粘性が高くなり、霧化のばらつきが多いように見受けられた。



新たにコンプレッサー式ネブライザーを用いた吸入によるチャレンジ方法を検討した。



オムロン コンプレッサー式ネブライザー NE-C28
霧粒子径: 約5 μm

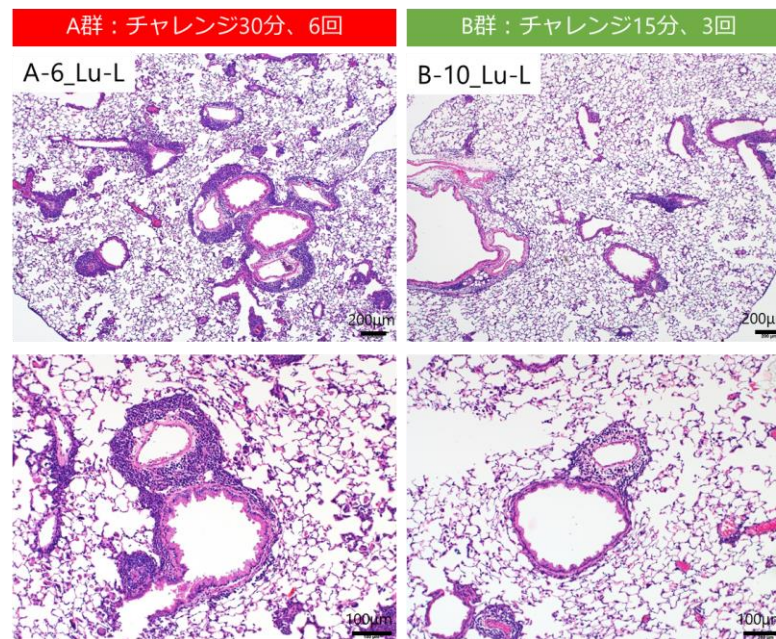
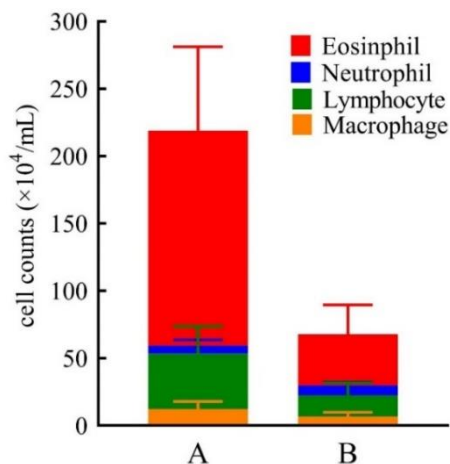
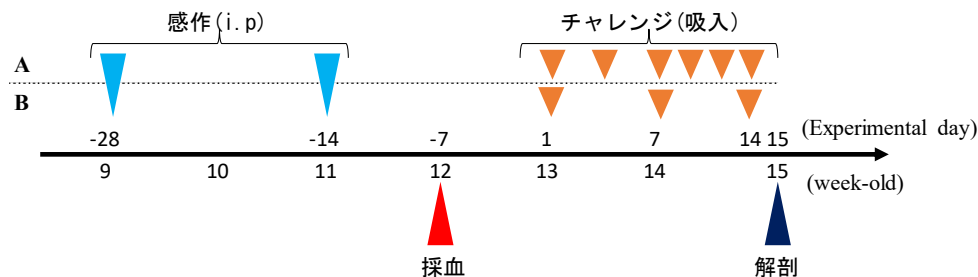


マウスぜん息モデルマウスの再検討

検討 I (チャレンジ時間及び回数の検討)

コンプレッサー式ネブライザーを導入するため、チャレンジの時間及び回数を検討した。

		A群 (n=10)	B群 (n=10)
感作		OVA 2 µgと硫酸カリウムアルミニウム 20 mg/mLの懸濁液 0.3 mL × 2回	
チャレンジ	OVA溶液濃度	2%	
	時間・回数	30分×6回	15分×3回



- 両群とも、肺実質では典型的なぜん息様の気道炎症像が観察された。
- チャレンジ回数に応じて、強い症状が誘発された。
- A群では炎症細胞の浸潤が結節状になるほど強かった。

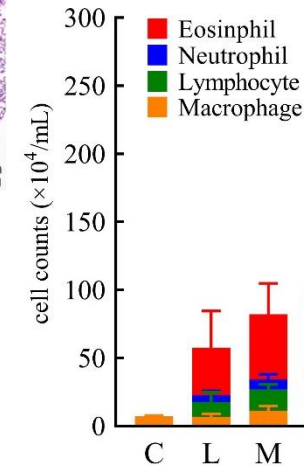
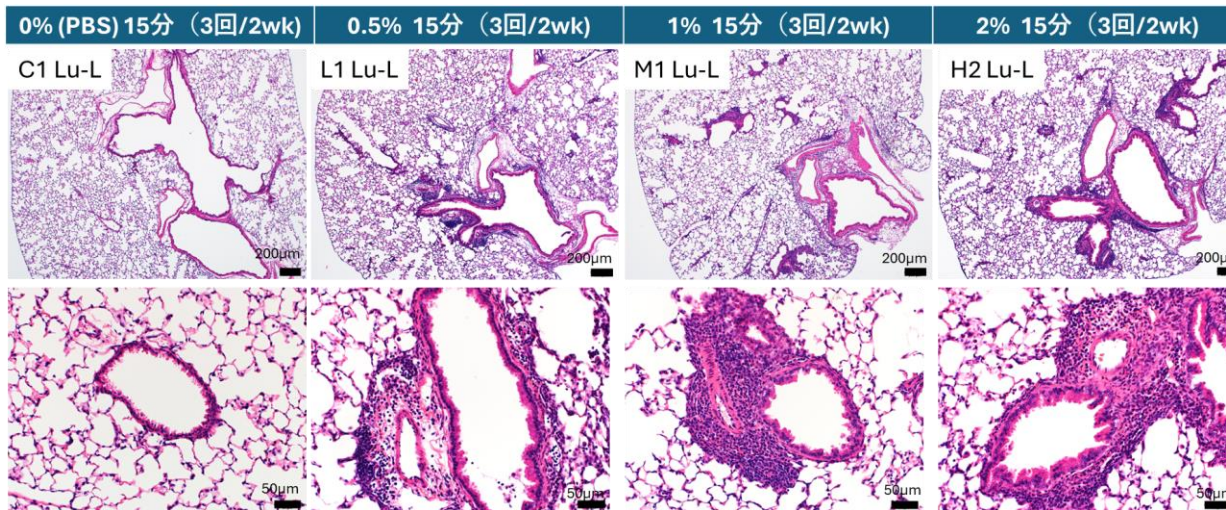
マウスぜん息モデルマウスの再検討

検討Ⅱ（OVA溶液濃度の検討）

検討ⅠのB群の再現性を確認するとともに、さらにやや弱い条件を検討した。

		C群 (n=5)	L群 (n=5)	M群 (n=5)	H群 (n=5)
感作		OVA 2 μ gと硫酸カリウムアルミニウム 20 mg/mLの懸濁液を1匹あたり0.3 mLずつ腹腔投与			
チャレンジ	OVA濃度	0%(PBS)	0.5%	1%	2%
	時間・回数	15分×3回			

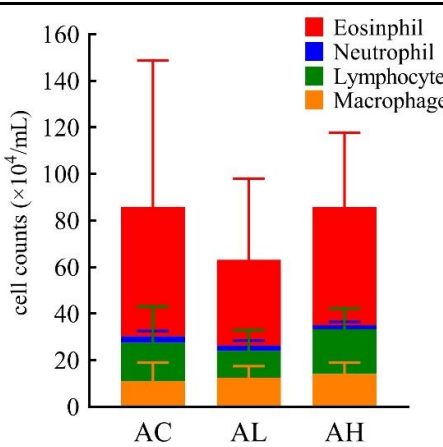
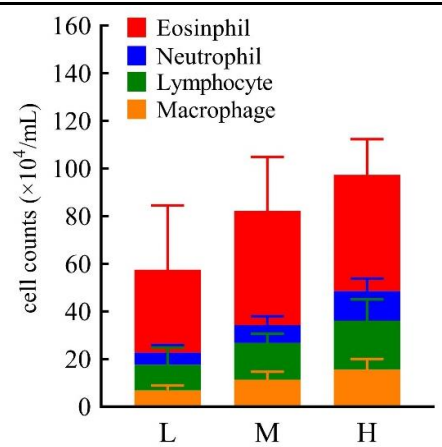
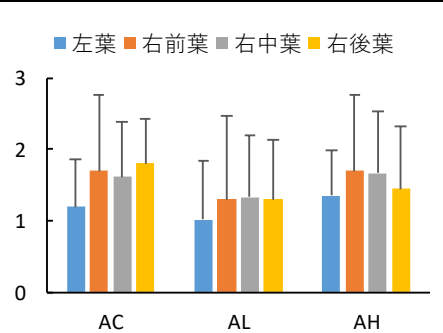
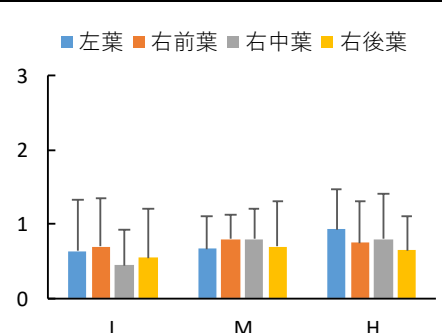
検討ⅠのB群と同じ条件



検討Ⅰ

- OVA溶液濃度に応じて、強いぜん息様症状が誘発された。
- 検討ⅠのB群よりも条件を弱めたが、BALFはL群の結果がB群とほぼ同じであった。これは動物のロットの違いなどのばらつきによるものと考えられる。
- 病理の結果もふまえて、比較的症状の弱いL群の条件が一番良いと思われた。

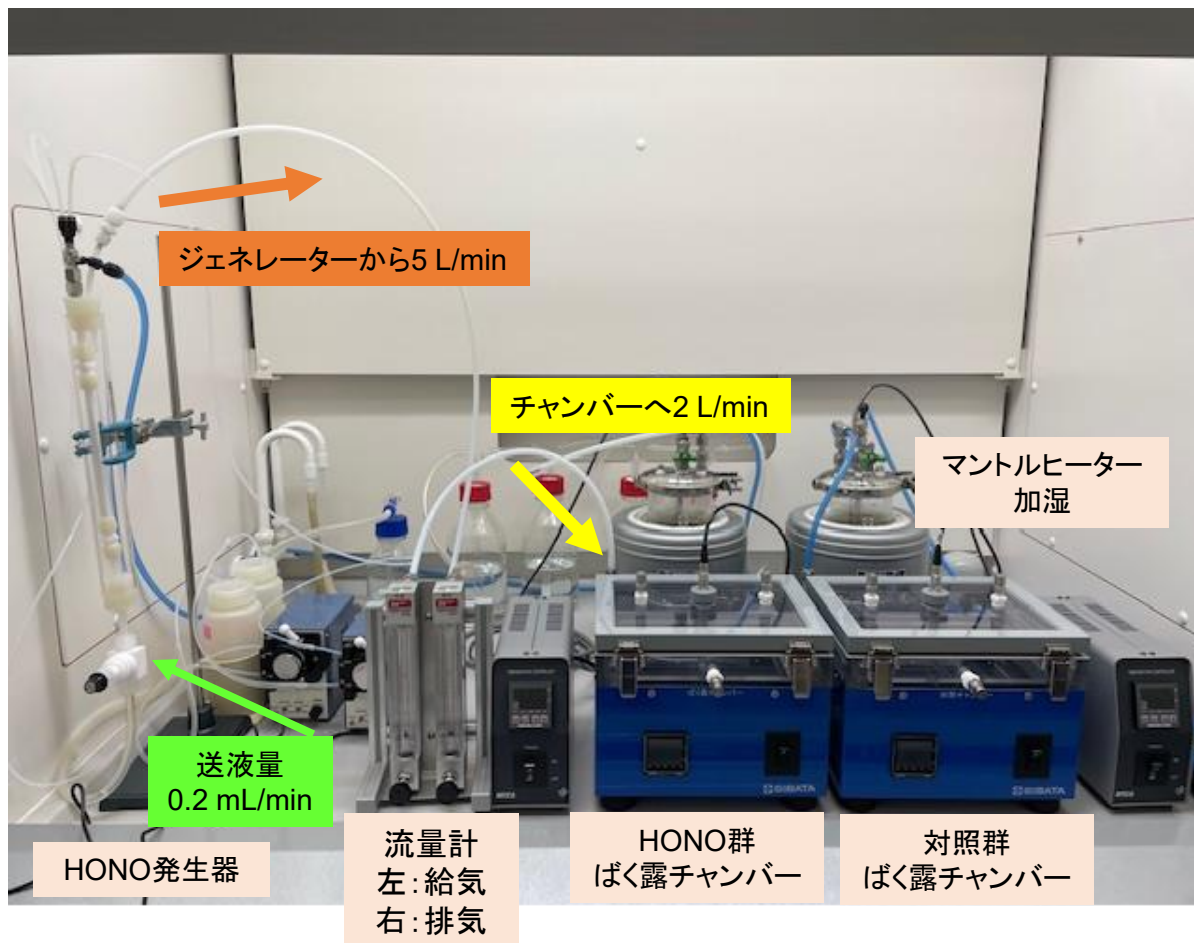
マウスぜん息モデルマウスの再検討 超音波式とコンプレッサー式の比較

		超音波式(n=10)※	コンプレッサー式(n=5)
感作		OVA 2 μ gと硫酸カリウムアルミニウム 20 mg/mLの懸濁液を 1匹あたり0.3 mLずつ腹腔内投与	
チャレンジ	OVA濃度	1.5% OVA	C : 0%(PBS) L : 0.5% OVA M : 1% OVA H : 2% OVA
	時間・回数	30分間 6回/2週間	15分間 3回/2週間
BALF			
気管支周囲 炎症細胞浸潤			

種々の条件が異なるが、コンプレッサー式のほうが個体差が少なかったと考えられる。

※チャレンジと共に、超純水又は硫酸アンモニウムの吸入ばく露を実施
AC: 超純水
AL: 硫酸アンモニウム(低濃度)
AH: 硫酸アンモニウム(高濃度)

2D細胞・3D培養組織用のばく露システムの構築

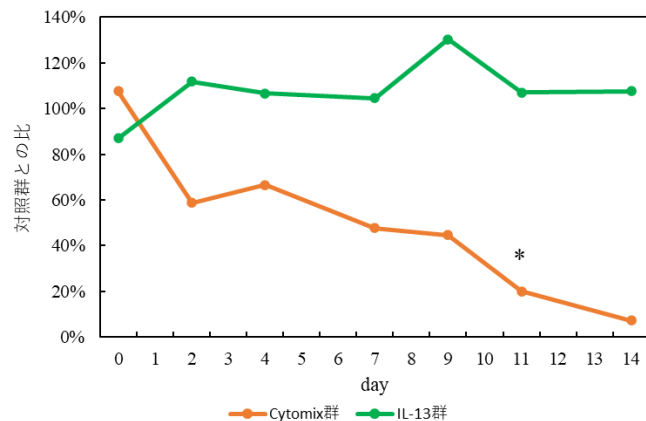


- 湿度70～80 %程度を目指して、チャンバー内に入れる風量や加湿のために入れる超純水の量を調整中。
- HONO濃度目標値: 6～7 ppm(ラット予備試験で副生成物が低かったため)
- 動物と細胞ではシステムが異なり、亜硝酸ナトリウムと乳酸の溶液濃度が同じ条件でもHONOの発生濃度が異なる可能性があるので、再検討を行う。

ヒト気道上皮3D培養組織の検討①

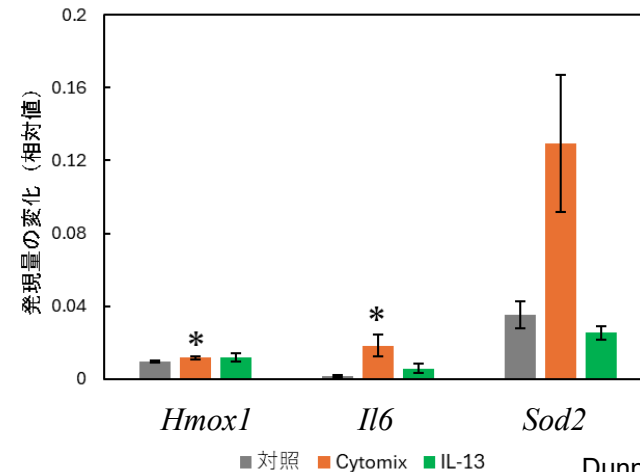
	陰性対照群	陽性対照群	
投与物質	専用培養液	Cytomix (0.5 μ g/mL TNFa, 0.2 mg/mL LPS, 1 % FBS)	IL-13 (10 ng/mL IL-13, 1%FBS)
3D培養組織	MucilAir (ヒト気管支由来)		
インサート数	4	4	4
投与回数	6 回 (day0、2、4、7、9、11)		
主な評価項目	細胞間結合力の測定、qRT-PCR、病理組織学的解析		

● 細胞間結合力 (TEER)



Dunnett test*: $p < 0.05$

● qRT-PCR

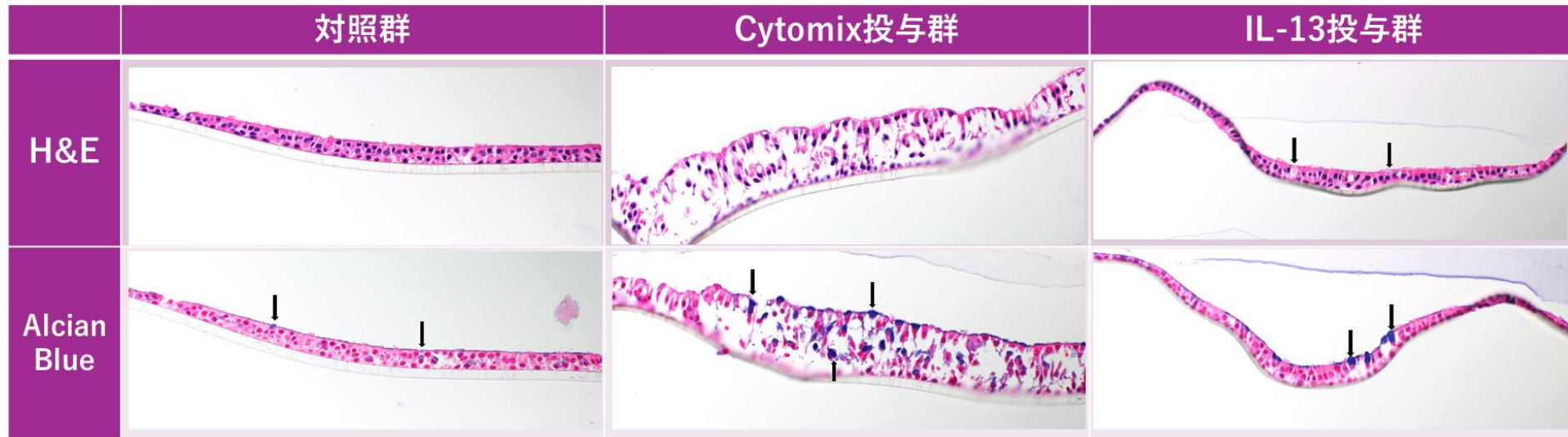


Dunnett test*: $p < 0.05$

- 対照群に比べて、Cytomix投与群では細胞間結合力の値が有意に低下した。
- 対照群に比べて、Cytomix投与群では*Hmox1*及び*Il6*の発現が有意に上昇した。
- 対照群に比べて、Cytomix投与群では*Sod2*の発現が上昇傾向ではあるが有意差は認められなかった。

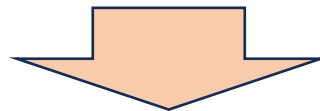
ヒト気道上皮3D培養組織の検討②

■ 病理組織学的解析



Cytomix投与群では、細胞の丈が高く、隙間が多くなった。IL-13投与群では杯細胞の増加は認められなかった。

メンブレンから培養組織が広範囲で剥がれたり、杯細胞が脱離したと思われるアーティファクトが多数観察された。



- 標本作製の工程に問題があったと考えられるため、固定液や包埋方法などを検討する。
- Cytomix投与群は投与物質による何らかの影響が示唆されたが、IL-13投与群は杯細胞の増加が明確でなかったため、さらに高濃度で検討する必要がある。

まとめ

■ ラット本試験

本試験では被毛がオレンジ色に変化したことから、Ohyama *et al.*, 2018をある程度再現できたと考えられるが、各種解析において著変は認められなかった。Ohyama *et al.*, 2018よりもC×t(総ばく露負荷)が不足していたことや、休息時間があったことが、既報を再現できなかった一因と考えられる。

■ マウス単回ばく露

20 ppmの高濃度でも急性影響が認められず、反復ばく露が可能であることが確認できた。

■ ぜん息モデルマウス作出の条件検討

コンプレッサー式ネブライザーを用いたチャレンジ方法により、過去の超音波式ネブライザーよりも良好な結果を得ることができた。チャレンジの条件は検討ⅡのL群の程度(0.5%OVA, 15分3回)が良いと考えられた。

■ ヒト気道上皮3D培養組織の検討

一連の実験及び分析手技を習得することができたが、病理標本の作製方法については検討が必要である。IL-13投与群は杯細胞の増加などのアレルギー性の反応の惹起が明確でなかったため、さらに高濃度で検討する必要がある。

令和7年度の予定

動物実験	主な内容
マウス反復ばく露の予備試験	15～20 ppmで反復ばく露を予定(2週間) 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 呼吸機能解析: 最大吸気量、呼吸抵抗等
<i>in vitro</i> 実験	主な内容
細胞ばく露装置の条件検討	A549細胞を用い、細胞にダメージを与えない風量及び湿度を 検討
A549細胞へのばく露	単回4時間ばく露 HONO濃度は6 ppm程度までを予定 (令和6年度の動物実験で副生成物の濃度が低かったため) 細胞増殖、細胞傷害性、生化学的解析、分子生物学的解析
A549細胞へのNO ₂ ばく露	3 ppm程度までを予定 令和6年度のラット本試験やOhyama <i>et al.</i> , 2011と同程度 (既報における最高レベル)
ヒト気道上皮3D培養MucilAirへの HONO反復ばく露(予備検討)	2D細胞の結果等を参考に、適切な濃度で実施 細胞間結合力(TEER)、生化学的解析、分子生物学的解析