

令和7年度

亜硝酸（HONO）の生体影響試験計画

生体影響研究科
環境衛生研究科

令和7年2月

令和7年度の研究計画

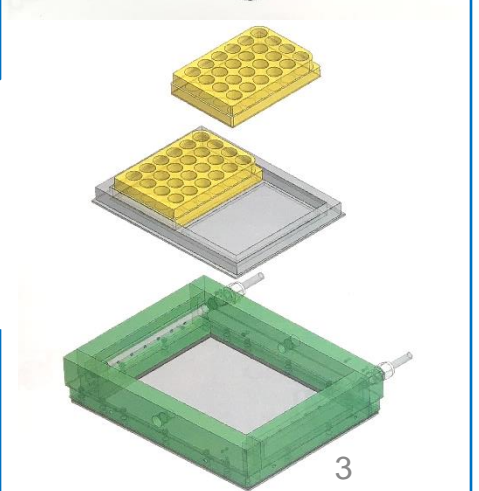
動物実験	主な内容
ラット反復ばく露実験の解析(継続)	特に分子レベルでの影響に注目 RNAseqによる網羅解析とqRT-PCRによる確証実験等
マウス反復ばく露の予備試験	15 ppmで反復ばく露を予定(2週間から1か月程度) 一般毒性・呼吸器毒性:体重・臓器重量、病理組織学的解析、 生化学的解析、分子生物学的解析 呼吸機能解析:最大吸気量、呼吸抵抗等
ぜん息モデルマウスの再検討	令和6年度の条件を基に最終的なプロトコールを決定

<i>in vitro</i> 実験	主な内容
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 (動物実験でNO ₂ 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™への反復ばく露	2D細胞の結果等を参考に、適切な濃度で実施 細胞膜間結合力(TEER)、生化学的解析、分子生物学的解析

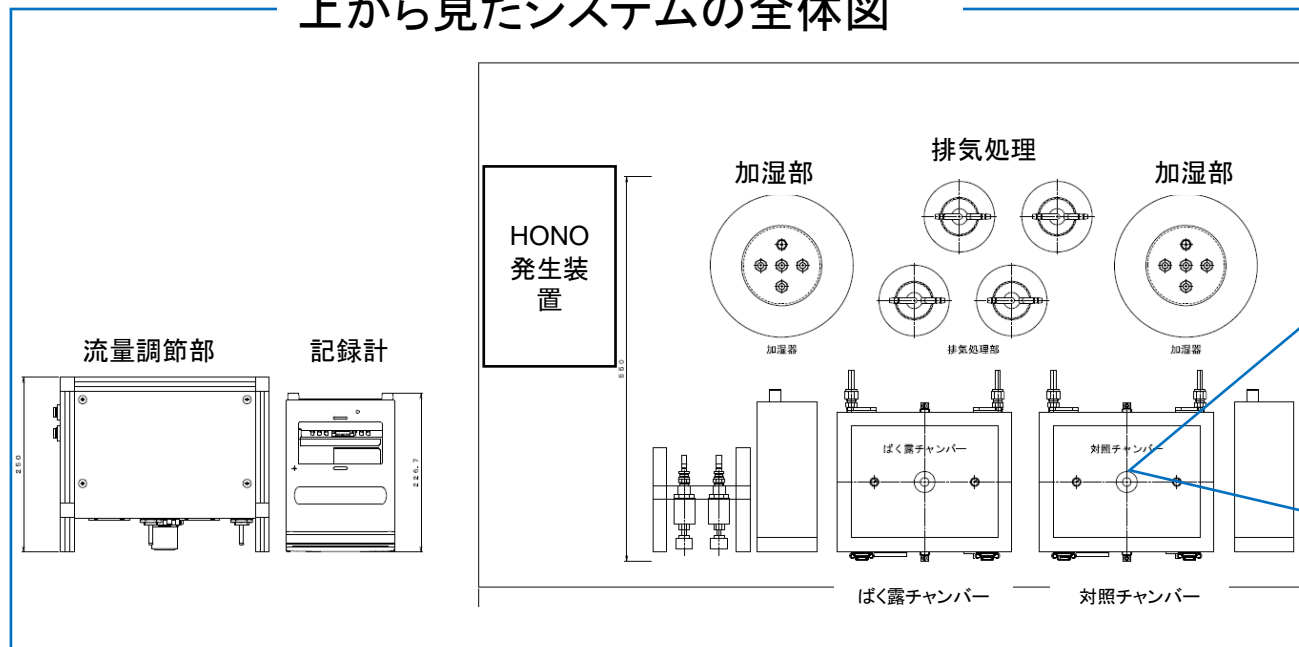
*in vitro*ばく露システム

- 一度に多くのインサートにばく露できる(2D細胞、3D組織培養)
- ガスであることから、独立流路式ではなくバッチ式で対応(シンプル・低コスト)
- 加湿がどの程度まで可能か検討する

温湿度を維持しながらばく露
24ウェルプレート(2枚)を設置

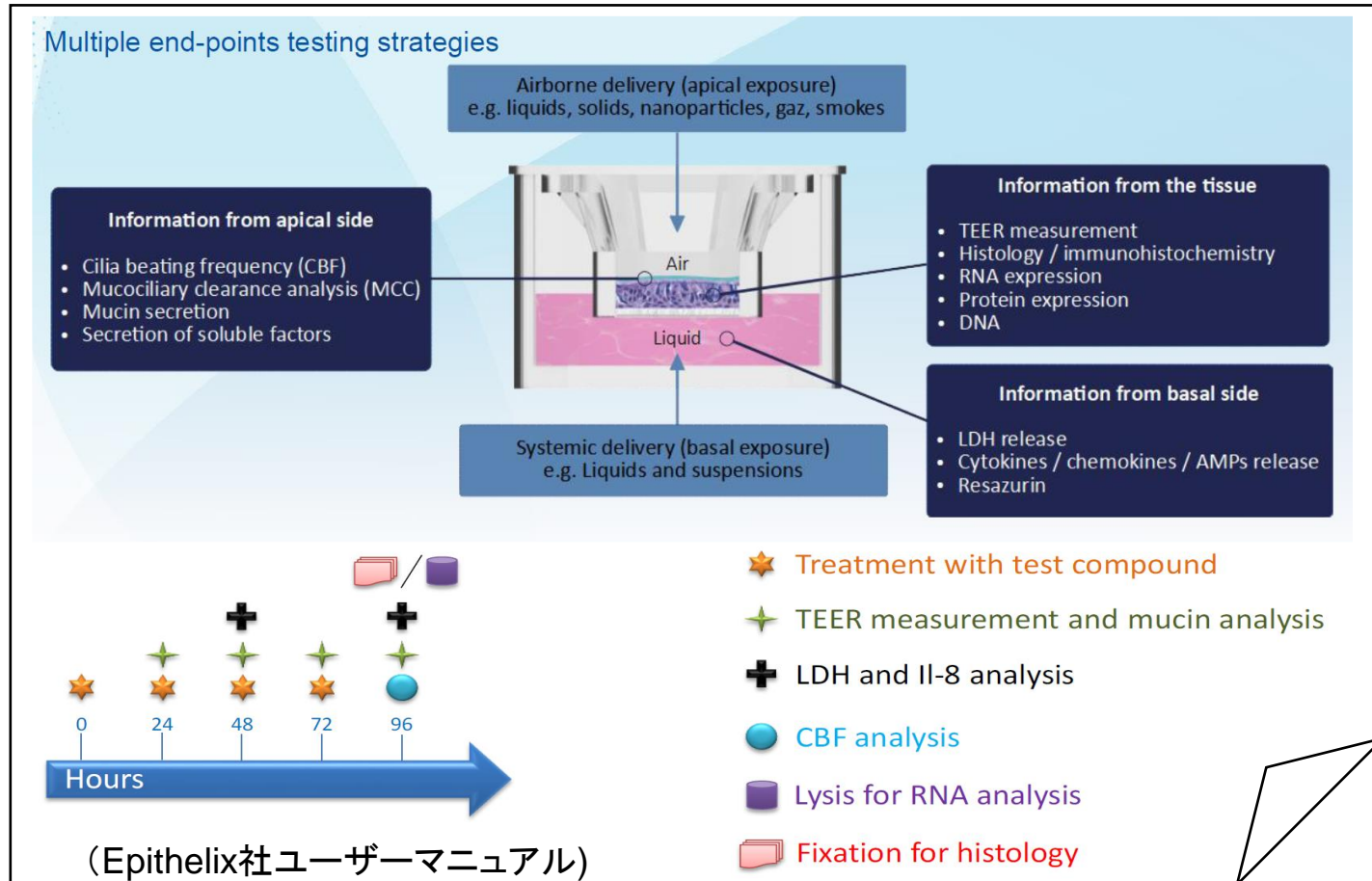


上から見たシステムの全体図



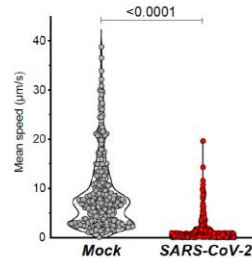
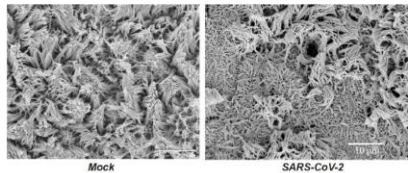
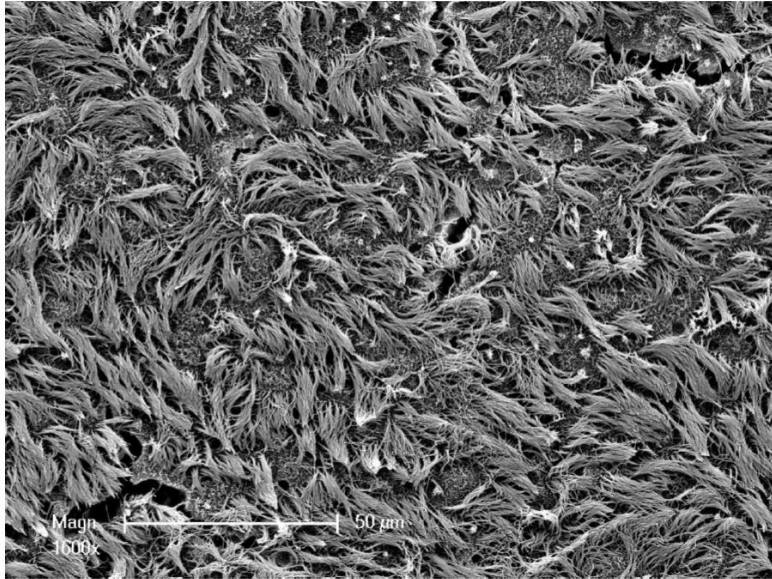
3D組織培養のプロトコールの検討

MucilAir™を用いた試験の多様なエンドポイント

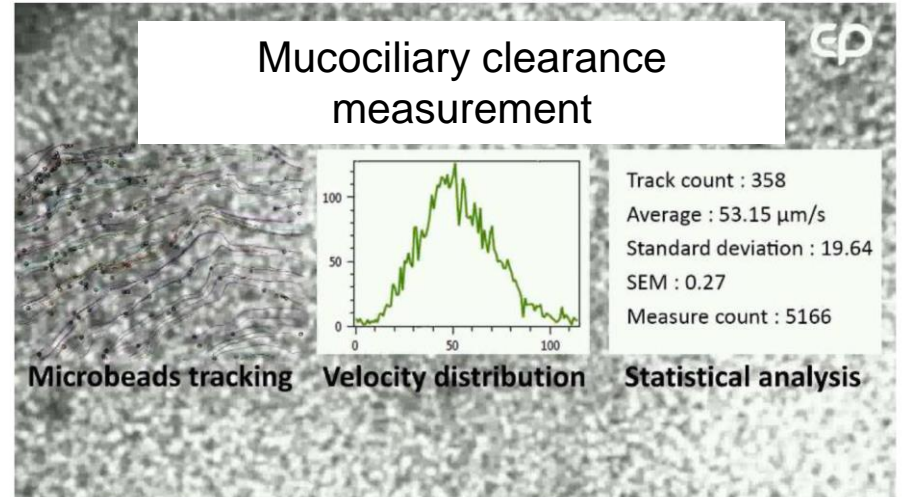
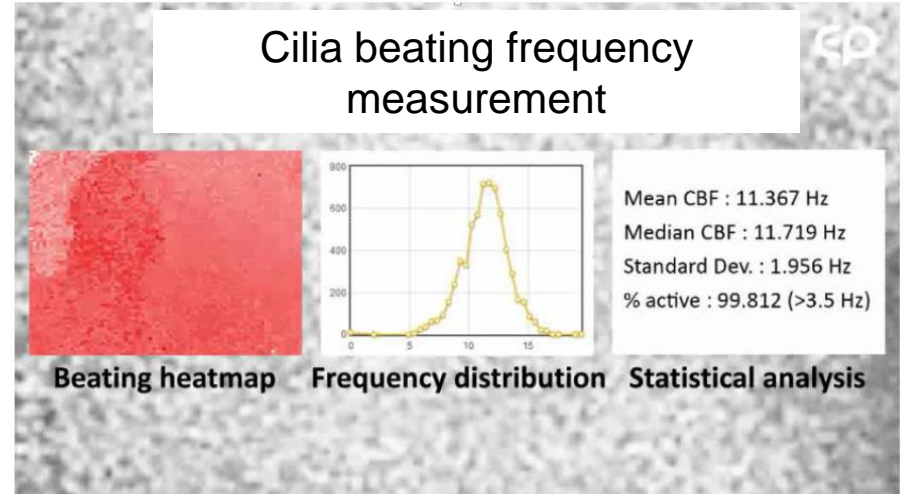


- 一般的なMucilAir™のばく露プロトコールや2D細胞の試験結果を参考にHONOばく露プロトコールを決定する
- 現在、Cytomix(炎症惹起)やIL13等の陽性対照物質液相ばく露により検討中

(参考) 線毛運動・クリアランス



SARS-CoV-2 impairs mucociliary clearance on MucilAir



MucilAir healthy apical top view (phase contrast 5X real time)

(Epithelix社 資料より)

- ハイスピードカメラは比較的高額だが、今後の試験に有用と思われる
- これまで専用解析ソフトが使用できないことが課題であったが、今後公開が予定されている