

令和6年度以降の研究計画

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

主な窒素酸化物の生体影響

二酸化窒素に比べて、一酸化窒素・亜硝酸の毒性研究は少なく、亜硝酸については、2010年代になってようやくデータが得られ始めた

	二酸化窒素 NO ₂	一酸化窒素 NO	亜硝酸 HONO
ガスとしての性質	<ul style="list-style-type: none"> 強力な酸化剤 水と反応し、硝酸を生じる 	<ul style="list-style-type: none"> 不安定 NO₂への転換 $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{NO}_2$ 	<ul style="list-style-type: none"> 弱酸性のガス 水に溶けやすい 不安定 NO、NO₂との平衡関係 $\text{HONO} \rightleftharpoons \text{NO} + \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
ヒトへの毒性	<ul style="list-style-type: none"> 従来から強い毒性が報告されている 粘膜への刺激性 咳、呼吸困難、チアノーゼ、肺水腫 	<ul style="list-style-type: none"> 毒性は弱いと考えられている 高濃度では中枢神経等への影響あり 血管拡張: 肺高血圧症で治療目的で使用される 	呼吸機能へのわずかな影響が疑われる
動物実験	<ul style="list-style-type: none"> 肺気腫 炎症、線維化、上皮細胞の増生 アレルギー反応の増加 	80ppm以下ではほとんど毒性が認められない	肺気腫、気道抵抗の上昇
大気環境基準	1時間値の1日平均値が 0.04-0.06ppm	—	—
作業環境許容濃度 (米国)	0.2 ppm	25ppm	—
その他	WHOガイドラインの改正 4分の1の値に引き下げ	メトヘモグロビン生成	三次喫煙 (THS) として室内で発がん物質生成に関与する

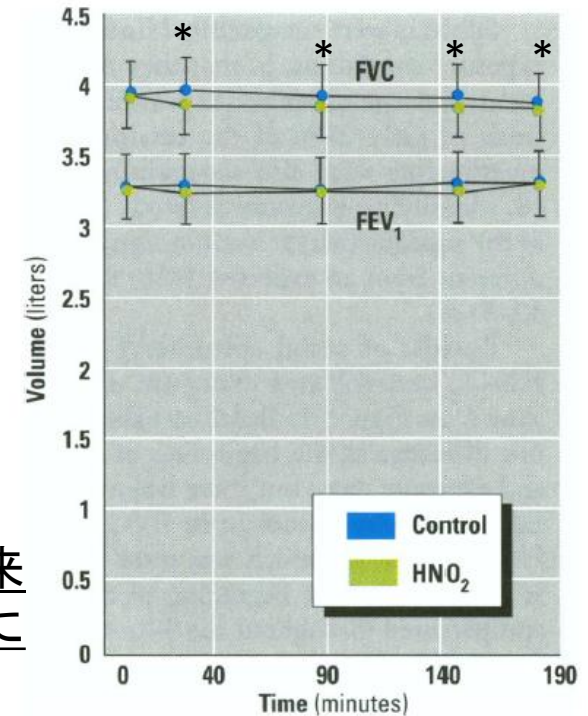
HONOの疫学研究及びヒト吸入ばく露実験

- ◆ 健常者への3.5時間の395ppbばく露で特異的気道コンダクタンスの有意な減少が起こった。 (Rasmussenら、1995)
※コンダクタンス：気道抵抗の逆数

- ◆ 軽度のぜん息患者への3時間の650ppbばく露によって努力性肺活量(FVC)が有意に減少した。 10種の刺激症状について有意な変化あり。息切れ（呼吸困難）、ぜい鳴、咳など。 (Beckettら、1995)

- ◆ NO₂とHONOの濃度を分離測定した疫学調査では、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ら、2005)

- ◆ 小児ぜん息を対象とした予備的な疫学調査で、HONOとぜん息発作との関連が示唆された。 (Ohyamaら、2019)



(Beckettら、1995)

報告数は少ないが、HONOの呼吸機能への影響が示唆されており、更なる疫学研究や、生体影響試験が必要と考えられる。

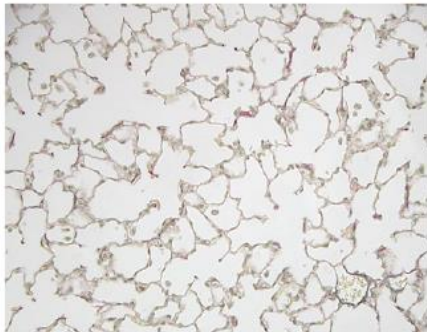
げっ歯類を用いたHONO吸入ばく露実験

全身ばく露装置による反復ばく露実験（24時間/日、3週間～7週間）
（Ohyamaら、2010、2011、2018、2020、2022）

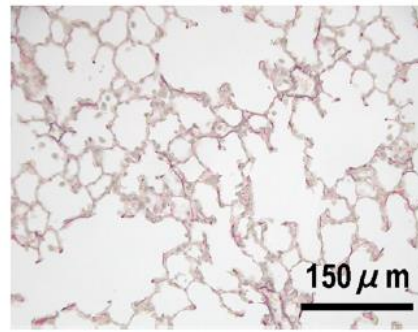
- ◆ モルモット（0.1～3.6 ppm）：気道抵抗の上昇、肺気腫様の変化、呼吸困難、気管支肺胞上皮の増生、平滑筋の増生
- ◆ ラット（4.1～5.8 ppm）：肺抵抗の上昇、肺気腫様の変化、MUC5ACの発現上昇、平滑筋の肥大
- ◆ マウス※（8.4 ppm）：気管支上皮の過形成
※ICRマウスを使用



対照群

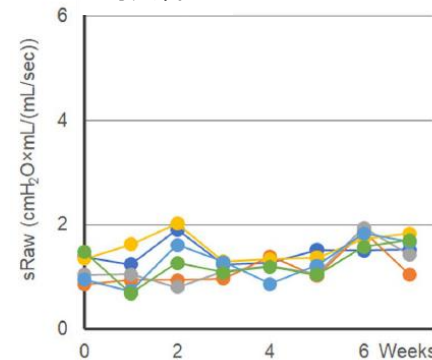


高濃度群

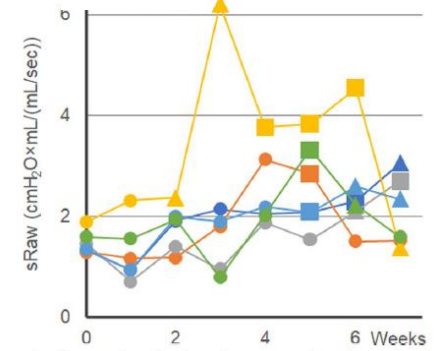


肺気腫様のモルモット肺組織像（エラスチカワーギンソン染色）
（Ohyamaら、2020）

対照群



高濃度群



モルモットの気道抵抗と呼吸曲線形状の経時変化
（Ohyamaら、2022）

- 肺気腫様の変化・呼吸抵抗の上昇について再現性良く認められている。
- 炎症・線維化が認められず、HONO毒性はNO₂とは質的に異なる可能性がある

本研究の目的

Ohyamaらの研究で未解明な点

- ◆ 作用機序: 肺気腫様の症状・呼吸抵抗の上昇が何に起因するか。
炎症・線維化は伴わないが、分子レベルでの解析は不十分。
MUC5ACの遺伝子発現上昇が認められたが、粘液産生の増多・杯細胞の増生は不明瞭。
- ◆ ICRマウスへの毒性: HONOの影響が弱かったのは種差が主原因と思われるが、系統差も検討すべき。
- ◆ 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

- ① BALB/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

反復ばく露

ぜん息増悪検討

ぜん息モデルマウスの再検討

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

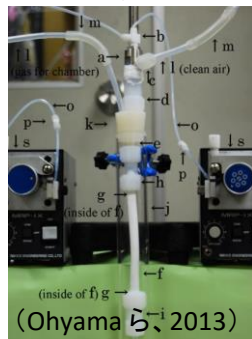
A549細胞ばく露

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

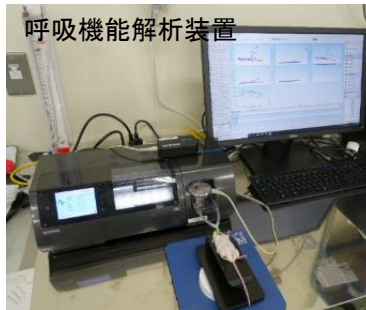
発生装置



鼻部ばく露チャンバー



呼吸機能解析装置

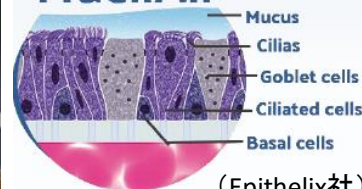


気相ばく露チャンバー



ヒト気道上皮3D培養

Nasal, Tracheal, Bronchial
MucilAir™



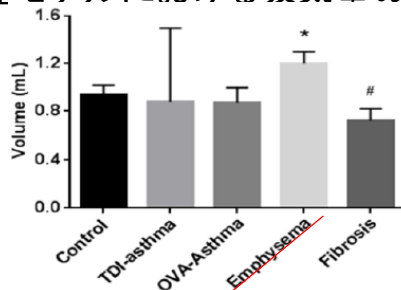
(Epithelix社)

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 et al,2018)と同程度のばく露負荷で実施 (5 ppm前後で1か月から3か月)
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)
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: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T細胞の集団解析)

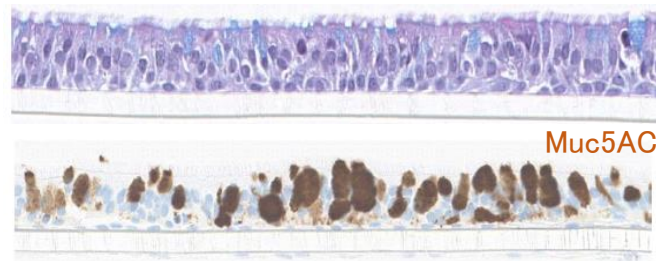
<i>in vitro</i> 実験	分析項目
A549細胞及びCalu-3細胞	細胞増殖、細胞傷害性、炎症、酸化ストレス
ヒト気道上皮3D培養	細胞傷害性、炎症、酸化ストレス、細胞膜間結合力(TEER)、粘液産生

肺気腫モデルにおける吸気量の変化



(オレンジサイエンス社)

3D組織培養切片における杯細胞の検出



(MucilAir™ ; Epithelix社)