

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281034

研究課題名(和文)動物曝露実験による亜硝酸ガスの生体影響評価に関する研究

研究課題名(英文)Effects of nitrous acid exposure on base line pulmonary resistance and inflammation in rats

研究代表者

大山 正幸(Ohyama, Masayuki)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：40175253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの疫学調査により二酸化窒素(NO<sub>2</sub>)と喘息の関連は認められている。しかし、NO<sub>2</sub>の測定では亜硝酸もNO<sub>2</sub>として検出される。我々は亜硝酸の喘息に対する影響を検討するため、ラットに対する亜硝酸の曝露実験で喘息への影響の指標である肺抵抗などを調べることを目的とした。

実験の結果、亜硝酸曝露によりベースライン肺抵抗や肺気腫用変化の指標のLmは有意に増加した。しかし、炎症マーカーのTNF- $\alpha$ などは増加せず、組織学的検索でも炎症性の変化は認められなかった。

今回の結果は亜硝酸は喘息に強い影響を与えること、及び、疫学調査によるNO<sub>2</sub>と喘息の関連は亜硝酸が原因であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The relationship between nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) and asthma has been studied in many epidemiological studies; however, conventional assays of NO<sub>2</sub> measure nitrous acid (HONO) as NO<sub>2</sub>. We investigated the effects of HONO on base line pulmonary resistance (RLung), dynamic lung compliance (Cdyn), cytokine induction, and histopathological changes in rats.

Our results demonstrated that HONO exposure significantly induced an increase in RLung and Muc5ac expression but did not affect Cdyn or expression of Cxcl-1 and TNF- $\alpha$ , and that the Lm of HONO exposure groups was significantly longer than that of control group. We found hypertrophy of the bronchial smooth muscle, pulmonary emphysema-like alterations in the alveolar duct centriacinar regions, and increased mucous secretion in goblets cells in HONO-exposed rats.

The present results suggest that HONO have a strong effect on asthma, and that HONO is the cause of the relationship between NO<sub>2</sub> and asthma by epidemiological studies.

研究分野：公衆衛生

キーワード：大気汚染 喘息 亜硝酸 二酸化窒素 肺抵抗 ラット 肺気腫 モルモット

### 1. 研究開始当初の背景

大気中の窒素酸化物では二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) が疫学調査などで喘息との関連性が示されており、大気汚染防止法で規制されている。但し、以前から幾つかの矛盾が指摘されている。例えば、疫学調査では  $\text{NO}_2$  の喘息影響が認められているのに対し、動物曝露実験では  $\text{NO}_2$  の気道抵抗影響 (喘息影響指標) は、モルモットでは認められてもラットでは認められず、さほど強くないと考えられている。また、 $\text{NO}_2$  の日変動濃度は昼間に高いことが多いが、昼間は  $\text{NO}_2$  濃度と喘息症状との関連が認められず、早朝や夜にピークフロー値や喘息発作と  $\text{NO}_2$  濃度の関連が認められることなどがある。一方、亜硝酸 ( $\text{HONO}$ ) が大気中に存在することは  $\text{NO}_2$  規制後に Platt らにより報告されている (Nature (1980) 285:312-314)。  $\text{NO}_2$  の測定法では  $\text{HONO}$  を  $\text{NO}_2$  として誤検出することや、環境中の  $\text{HONO}$  濃度と  $\text{NO}_2$  濃度が相関することは知られている。また、 $\text{HONO}$  は昼間には太陽光線で分解される。

従って、 $\text{NO}_2$  の喘息影響の本当の原因物質は  $\text{HONO}$  である可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、複数の  $\text{HONO}$  濃度の動物曝露実験で、肺組織変化や気道抵抗等を指標として量-反応関係を調べ、 $\text{HONO}$  規制の必要性や  $\text{NO}_2$  規制に関する修正の必要性の検討材料とすることである。

### 3. 研究の方法

動物曝露実験により生体影響における  $\text{HONO}$  の量反応関係を調べるため、3 濃度用の  $\text{HONO}$  の動物曝露チェンバーを用い  $\text{HONO}$  動物曝露を実施する。指標は肺組織変化や気道抵抗などとしベンチマークドーズ法などで NOAEL を推計する。先ず、気道抵抗に影響が出やすいモルモットで  $\text{HONO}$  の曝露実験を実施し NOAEL を求め、次に、同影響が出にくいラットでも同様に実験する。

#### モルモット曝露実験：

実験動物：モルモット (Slc:Hartley SPF 5 週令オス) 18 匹を購入し、3 個のチェンバーで各 6 匹を清浄空気で 4 週間ならし飼育した後、曝露群の 2 チェンバーには濃度の異なる  $\text{HONO}$  を 7 週間連続的に供給し、対照群 (C 群) は清浄空気で飼育した。実験は 2 回実施した。

$\text{HONO}$  曝露： $\text{HONO}$  発生法 (J Clin Toxicol 2013.3:165) に従い、亜硝酸ナトリウム水溶液 (200mM, 80mM) と乳酸水溶液 (250mM, 100mM) を約 0.4 ml/min の流速で混合しながら、清浄空気 (流速 15l/min) で多孔性ポリテトラフルオロエチレンチューブ内に噴霧し、チューブ外に透過する気体を曝露群のチェンバーに供給した。

窒素酸化物測定：各チェンバー内の空気は

炭酸ナトリウム環状デニューダーを経由した後に  $\text{NO}_x$  計 (サーモ製 model42i) で  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_x$  を測定した。デニューダーに捕集された  $\text{HONO}$  はイオンクロマトグラフ (メトローム製 IC700 シリーズ) で測定した。

sRaw 測定：MIPS 社製の PULMPS システムによるダブルフロープレスチモグラフ法で測定。慣らし飼育時は毎週 2 回測定し、 $\text{HONO}$  曝露開始後は毎週 1 回測定した。1 回の測定における sRaw 値は測定開始後 10 回目の呼吸から 100 回の呼吸の各 sRaw の平均値とした。但し、モルモットが暴れた場合の sRaw は除き、100 呼吸の平均値を sRaw 値とした。

#### ラット曝露実験：

実験動物：ラット (Slc:F344 SPF 5 週令オス) 27 匹を購入し、3 基のチェンバーで各 9 匹を清浄空気で 6 週間ならし飼育した後、チェンバー 2 基では  $\text{HONO}$  曝露を 6 週間行い、1 基は清浄空気飼育を継続した。

$\text{HONO}$  曝露： $\text{HONO}$  発生法 (J Clin Toxicol 2013.3:165) に従い、亜硝酸ナトリウム水溶液 (200mM, 80mM) と乳酸水溶液 (250mM, 100mM) を約 0.4 ml/min の流速で混合しながら、清浄空気 (流速 15 l/min) で多孔性ポリテトラフルオロエチレンチューブ内に噴霧し、チューブ外に透過する気体を曝露群のチェンバーに供給した。

窒素酸化物測定：各チェンバー内の空気は炭酸ナトリウム環状デニューダーを経由した後に  $\text{NO}_x$  計 (サーモ製 model42i) で  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_x$  を測定した。デニューダーに捕集された  $\text{HONO}$  はイオンクロマトグラフ (メトローム製 IC700 シリーズ) で測定した。

肺抵抗 (RLung)、動肺コンプライアンス (Cdyn) 測定：MIPS 社製の PULMOS-II システムによる気管挿管法で測定した。1 日に各群 3 匹測定し、3 日連続で測定した。ラットはウレタン麻酔 (1g/kg) 後、気管挿管し、人工呼吸 (70 呼吸/分、Tidal volume 7ml/kg) 状態で、圧力センサー (-) 側を食道挿管し測定した。測定中に、食道挿管から胃への約 0.5ml の水投与を行った。測定器の校正は全体の測定の開始前と終了後に行い、校正のズレは 5% 以下だった。

Real-time RT-PCR：総 RNA は右肺ホモジネートから抽出し、RT-PCR は SYBR PCR Kit を用い Rotor-Gene 6000 で行った。

肺の組織学的観察：20 cm 水柱圧で左肺をホルマリン固定し、定法に従い HE や PAS 染色で標本観察した。

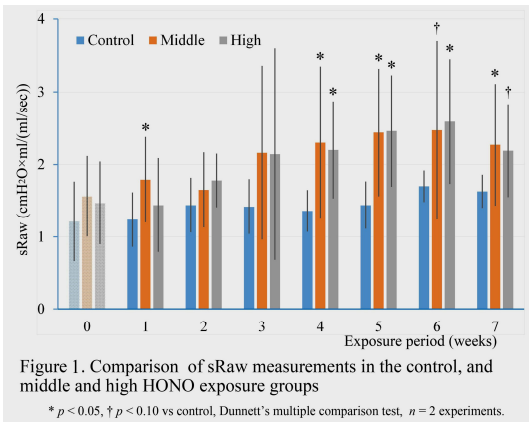
### 4. 研究成果

#### モルモット実験結果：

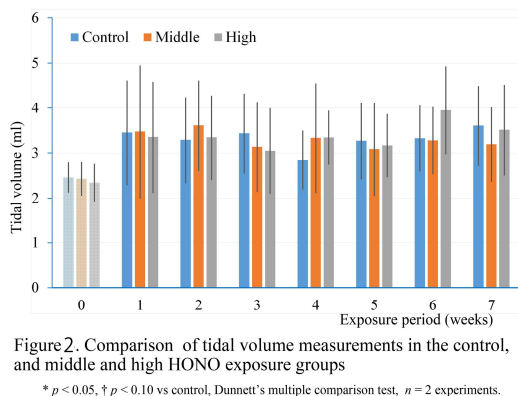
窒素酸化物濃度の測定結果を Table 1 に示す。 $\text{NO}_2$  の副生成も認められるが、sRaw には影響が出ない濃度である。

	First experiment (ppm)		
	Control	Middle	High
NO	0.028 ± 0.060	1.027 ± 0.499	3.882 ± 1.564
NO <sub>2</sub>	0.050 ± 0.065	0.148 ± 0.270	1.214 ± 1.090
HONO	0.005	0.775	4.179
	Second experiment (ppm)		
	Control	Middle	High
NO	0.087 ± 0.118	0.702 ± 0.212	2.595 ± 0.525
NO <sub>2</sub>	0 ± 0.032	0 ± 0.038	0.352 ± 0.210
HONO	0.03	0.542	2.67
	Average (ppm)		
	Control	Middle	High
NO	0.058	0.865	3.239
NO <sub>2</sub>	0.025	0.074	0.783
HONO	0.018	0.659	3.425

sRaw 測定結果：2回の測定結果を合わせて検定した結果を Figure 1 に示す。曝露4週目から HONO 曝露群で Control 群と比べて持続的な sRaw の有意な増加が認められた。



TV 測定結果：2回の測定結果を合わせて検定した結果を Figure 2 に示す。呼吸機能の TV では2回の実験とも測定値は安定しており、有意差は認められなかった。



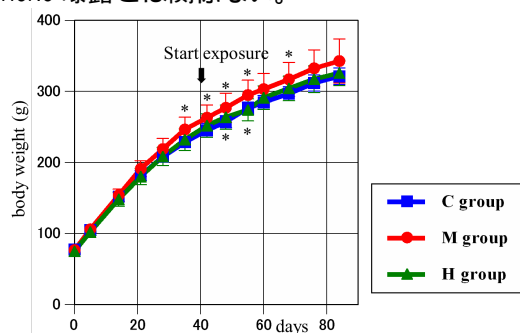
考察：今回の実験結果は、HONO は呼吸機能には影響を与えないが、喘息の影響指標の気道抵抗を有意に更新することが示唆する。また、LOAEL は 0.66ppm となるが、我々の以前の疫学的トライアル調査では室内中の HONO

の最高濃度は 0.01ppm あり、HONO は規制されるべき物質であると考えられる。

ラット実験結果：  
窒素酸化物濃度の測定結果を Table 1 に示す。NO<sub>2</sub> などの副生成はモルモット曝露実験のときより少なかった。

	Control	Middle	High
NO	0.006 ± 0.006	0.548 ± 0.159	2.277 ± 0.748
NO <sub>2</sub>	0.006 ± 0.003	0.099 ± 0.048	0.722 ± 0.262
HONO	0.002	4.098	5.757

体重の推移を Figure 1 に示す。M 群の体重の有意な増加は HONO 曝露前からであり、HONO 曝露は成長曲線に影響を与えなかった。H 群の HONO 曝露後の有意な変化は C 群のエサの枯渇による一過性の体重低下が原因であり、HONO 曝露とは関係ない。



肺重量体重比を Table に示す。各群同様の値で有意差はなかった。

Exposure group	Control		Middle exposure		High exposure		ANOVA	
	n	Mean±SD	n	Mean±SD	p value*	n	Mean±SD	p value*
Lung/body weight ratio	9	0.210±0.028	9	0.211±0.011	0.620	9	0.213±0.009	0.498

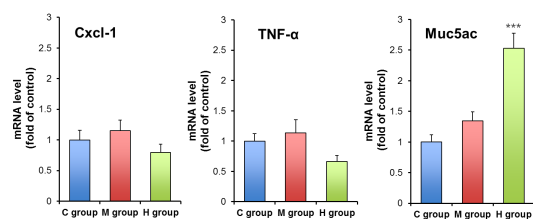
Dunnett's multiple comparison (one-tailed) was applied for comparison with the control following ANOVA. \* P value for comparison with the control. † P value for ANOVA.

RLng と Cdyn の測定結果を Table に示す。RLung では C 群と H 群の間と ANOVA で有意差が認められた。Cdyn では有意差は認められなかった。

6 weeks of exposure	C group		M group		H group		ANOVA	
	n	Mean±SD	n	Mean±SD	p value*	n	Mean±SD	p value*
RLung	8	0.101±0.009	8	0.104±0.023	0.930	8	0.135±0.024	0.004
Cdyn	8	0.302±0.017	8	0.280±0.030	0.257	8	0.310±0.039	0.794

Dunnett's multiple comparison was applied for comparison with the control following ANOVA. \* P value for comparison with the control. † P value for ANOVA.

mRNA の測定結果を Figure に示す。



炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  や Cxcl-1 の亢進は認められなかったが、気管支上皮細胞の粘液分泌に関わる Muc5ac は増加しており、特に H 群では C 群との間に有意差が認められた。

肺の組織学的検索結果では、肺気腫様変化が観察され、Lm を測定した結果、H 群と C 群の間に有意差が認められた。また、気管支平滑筋の肥厚が HONO 曝露群で観察された。なお、PAS 染色により気管支上皮細胞の粘液分泌亢進が観察された。

考察：肺抵抗に影響が出にくいラットでも HONO 曝露により肺抵抗亢進が認められた今回の実験結果は、HONO は強い喘息影響を持つことを示唆する。また、疫学調査による NO<sub>2</sub> と喘息との関連は NO<sub>2</sub> 測定値に混入する HONO が原因であることを示唆する。また、感作など行わないでラットで肺抵抗を亢進させる大気汚染物質は SO<sub>2</sub> しか報告されていないが、その SO<sub>2</sub> でも 250ppm の濃度で曝露実験が行われており、しかも肺抵抗測定時に気管支平滑筋収縮剤を投与しないと対照群との差が認められない。従って、6ppm 以下の HONO 曝露で有意なベースライン肺抵抗の亢進が認められた今回の実験結果は、HONO は SO<sub>2</sub> よりも喘息への影響が強いことを示唆する。

肺抵抗の測定結果と組織学的検索による肺気腫様変化の数値化との結果とは矛盾しない結果であり、それらの影響には気管支平滑筋の肥厚や粘液分泌亢進の関与が考えられる。

今回の実験結果は、肺抵抗に影響を与える HONO 濃度でも体重や肺重量には影響しないことを示唆する。この結果は NO<sub>2</sub> の動物曝露実験の肺重量体重比は増加するが、肺抵抗は亢進しない結果と明らかに異なり、HONO と NO<sub>2</sub> とは生体影響が異なることが示唆された。

また、肺抵抗における HONO の LOAEL は 5.8ppm となり、環境中の HONO 濃度からすると千倍程度高い値である。しかし、四日市喘息で有名な SO<sub>2</sub> と比較すると、HONO 規制の検討はされるべきであると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

峰島 知芳、中根 令以、島田 幸治郎、利谷 翔平、佐藤 啓市、大山 正幸、細見 正明、水田 土壤からの亜硝酸ガス(HONO)直接発生フラックスの測定および大気濃度への寄与評価、大気環境学会誌、査読有、50:249-256 (2015)

Masayuki Ohyama, Hideki Tachi, Chika Minejima, Takayuki Kameda. Comparing the role of silica particle size with mineral fiber geometry in the release of superoxide from rat alveolar macrophages.

The Journal of Toxicological Sciences, 査読有、34(4):551-559 (2014).

Masayuki Ohyama, Hideki Tachi, Chika Minejima, Takayuki Kameda. Comparing heat-treated silica particle with silica particles for the ability to induce superoxide release from rat alveolar macrophages. Journal of Clinical Toxicology, 査読有、4(3):199. doi: 10.4172/2161-0495.1000199 (2014).

Masayuki Ohyama. Effects of nitrous acid exposure to guinea pigs. International Journal of Clinical & Medical Imaging. 査読有 1(5):193. Doi: 10.4172/ijcmi.1000193 (2014).

〔学会発表〕(計 16 件)

大山正幸(代表)ラット肺抵抗に対する亜硝酸曝露の影響、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

Masayuki Ohyama(代表)Effects of nitrous acid exposure on pulmonary resistance of rats. 第 90 回日本薬理学会、2017 年 3 月 25 日、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

大山正幸(代表)ラット呼吸機能に対する亜硝酸曝露の影響、第 57 回大気環境学会、2016 年 9 月 7 日、北海道大学工学部(北海道札幌市)

大山正幸(代表)モルモット特異的気道抵抗に対する亜硝酸曝露の影響(2)、第 57 回大気環境学会、2016 年 9 月 7 日、北海道大学工学部(北海道札幌市)

大山正幸、硫酸アンモニウムの人体吸入実験の論文紹介、大気環境学会近畿支部人体影響部会 2016 年度セミナー、2016 年 8 月 30 日、大阪府立環境農林水産総合研究所(大阪府大阪市)

大山正幸(代表)モルモット曝露実験における特異的気道抵抗と亜硝酸との関係、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Masayuki Ohyama(代表)Effects of Nitrous Acid Exposure on Specific Airway Resistance of Guinea Pigs. 第 89 回日本薬理学会、2016 年 3 月 11 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

大山正幸(代表)亜硝酸ガスのモルモット曝露による特異的気道抵抗への影響、第 43 回建築物環境衛生管理全国大会 2016 年 1 月 22 日、(一財)日本教育会館一ツ橋ホール(東京都千代田区)

Masayuki Ohyama(代表)Nitrous Acid induces Pulmonary Emphysema-like Alterations in Guinea Pigs. 13th Atmospheric Sciences and Application to Air Quality (ASAAQ13). November 11-13, 2015 Kobe International Conference Center (Hyogo. Kobe)

大山正幸(代表)モルモット特異的気道抵

抗に対する亜硝酸曝露の影響、第 56 回大気環境学会、2015 年 9 月 16 日、早稲田大学西早稲田キャンパス（東京都新宿区）

—大山正幸、大気粉塵などにおけるマクロファージの活性酸素反応の亢進因子、および、亜硝酸ガスの喘息への影響、第 44 回大気汚染公害認定研究会、2015 年 2 月 22 日、シェラトン都ホテル大阪（大阪府大阪市）招待講演

C. Minejima, Y. Tohjima, M. Kubo, H. Mukai, H. Yamagishi, K. Kita, Y. Koyama, S. Maksyutov, R. Nakane, K. Shimada, S. Riya, K. Sato, M. Ohyama, M. Hosomi. Guessing the fossil fuel mix used at emission sources from a downwind location. 14th Japanese-American Frontiers of Science Symposium. December 4-7, 2014 Hotel New Otani (Tokyo Chiyoda)

C. Minejima, Y. Tohjima, M. Kubo, H. Mukai, H. Yamagishi, K. Kita, Y. Koyama, S. Maksyutov, R. Nakane, K. Shimada, S. Riya, K. Sato, M. Ohyama, M. Hosomi. Where is HONO from? 14th Japanese-American Frontiers of Science Symposium. December 4-7, 2014 Hotel New Otani (Tokyo Chiyoda)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大山 正幸 (Masayuki Ohyama) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：40175253

### (2) 研究分担者

竹中 規訓 (Norimichi Takenaka) 大阪府立大学・人間社会システム科学研究科・教授  
研究者番号：70236488

東 賢一 (Kenichi Azuma) 近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：80469246

磯濱 洋一郎 (Youichiro Isohama) 東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：10240920