

# 令和 4 年度

## 正常マウス及びぜん息モデルマウスへの 硫酸水素アンモニウムばく露実験

健康安全研究センター

薬事環境科学部 生体影響研究科

令和 5 年 2 月

# 令和4年度の研究計画

## 目標

マウス呼吸機能への即時影響を調べる

最終年度に行うぜん息マウスへの反復ばく露実験の予備的結果を得る

## ■ 硫酸水素アンモニウムの呼吸機能への即時影響

- ・昨年度は非常に高濃度のばく露で影響が見られたため、低濃度の領域を検討する。  
→10分の1程度の濃度でも影響が見られた。
- ・他の関連物質と比較する。
- ・ぜん息モデルマウスに対する影響を調べる。

## ■ ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露（予備実験）

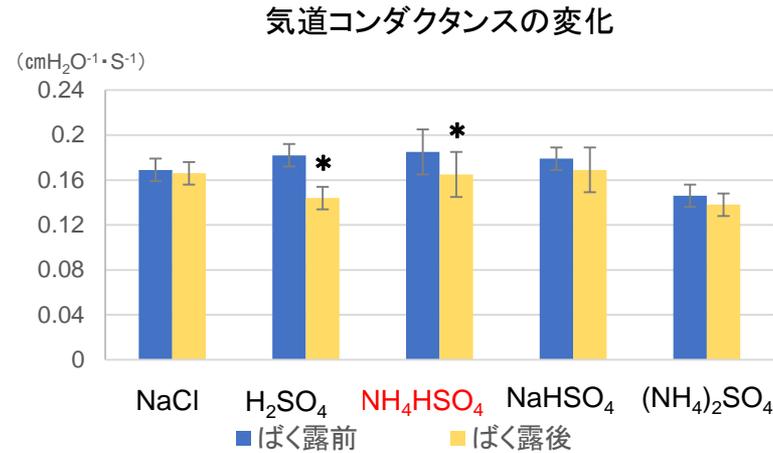
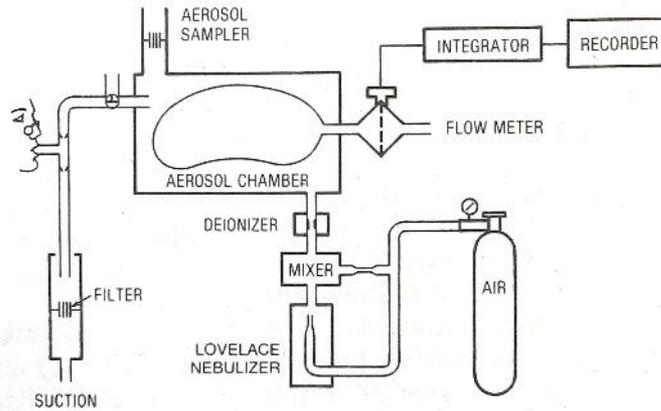
- ・卵白アルブミン（OVA）ぜん息モデル作出方法の検討  
肺炎症の再現性や病変の個体差に関して懸念があったため、経鼻投与による感作方法を再検討する。  
→自作のアジュバントの腹腔内投与＋経鼻投与による感作で弱い症状のモデルを確立できた。
- ・硫酸水素アンモニウムによる増悪影響の予備実験  
ぜん息モデルマウスに2週間の連続ばく露実験を小規模に行う。

# (1) 硫酸水素アンモニウムの呼吸機能への即時影響

## ■背景

酸性エアロゾルの即時影響が報告されているが、実験により、相反する結果も多かった。また、マウスでの研究は行われてこなかった。

人体吸入実験（ぜん息患者への $1 \text{ mg/m}^3$  16分間ばく露）



(Utell *et al.*, 1983 グラフ改変)

ヒト沈着量の推計(約 $240 \mu\text{g/lung}$ )から、マウスに相当する量に換算(約1000分の1)\*

\* 気管及び肺胞の面積比 ...EPAのRfC(参照濃度)算出手順書等

小型動物用の呼吸機能解析装置を利用し、マウスへの即時影響を検討した。

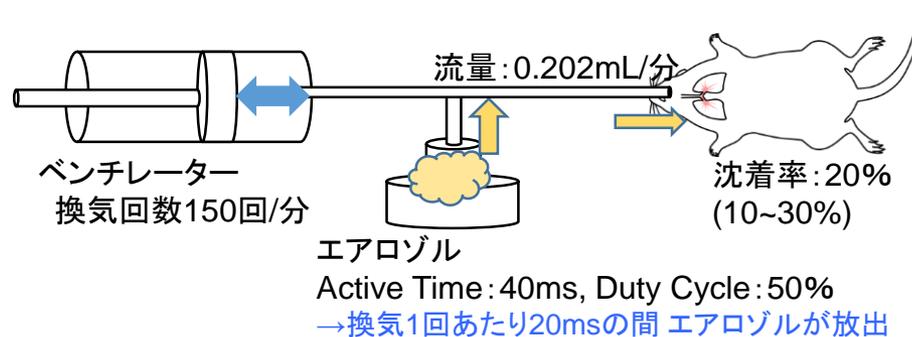
# 実験概要 正常マウスへのばく露

## ■方法

被験物質	硫酸水素アンモニウム $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ 硫酸アンモニウム $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 塩化ナトリウム $\text{NaCl}$
動物	BALB/c 雌マウス、9週齢
測定機器	emka technologies社 フレキシベント呼吸機能解析装置 FV-FX1
測定条件 (Script)	Deep Inflation x2回 → (Snap Shot → Quick Prime) × 3回 ※ばく露の前後に同じ条件で測定を実施
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、エラスタンス等
ばく露時間	3分間

## ■群構成

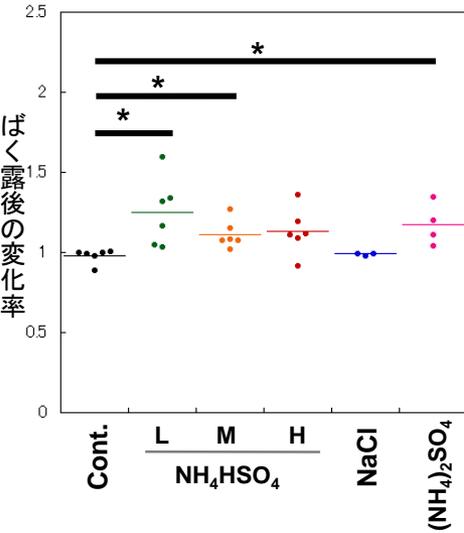
群	水溶液濃度 (mg/mL)	推定沈着量 ( $\mu\text{g}/\text{lung}$ )	動物数
対照 (Cont) 群	0	0	6
低用量 (L) 群	0.05	0.303	6
中用量 (M) 群	0.5	3.03	6
高用量 (H) 群	5	30.3	6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 群	5	30.3	4
NaCl 群	4.5	27.27	3



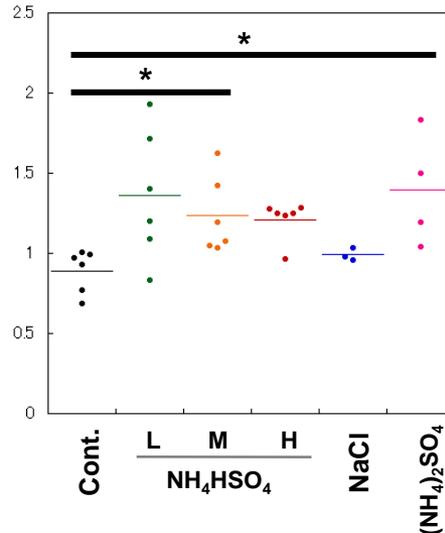
# 呼吸機能解析結果 (1)

バーは平均値； Steel's Test \* $p < 0.05$  vs 対照群

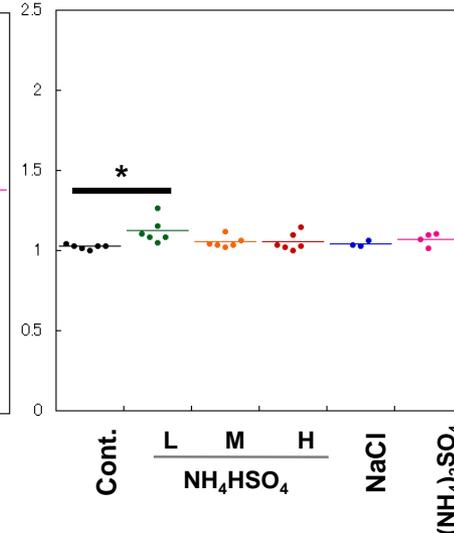
## 呼吸抵抗



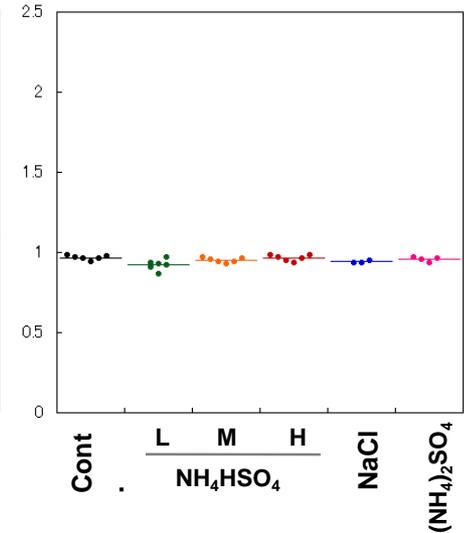
## 中枢気道抵抗



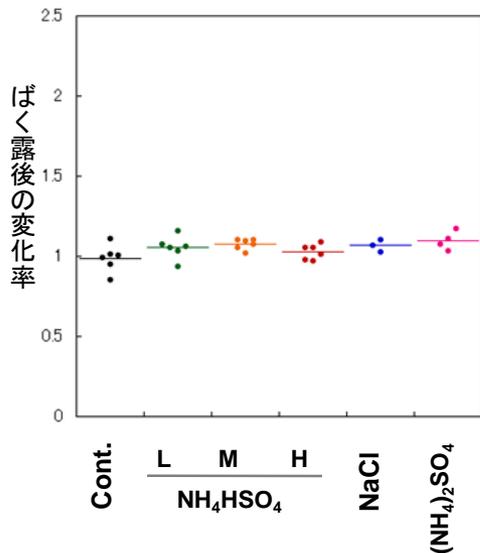
## エラスタンス



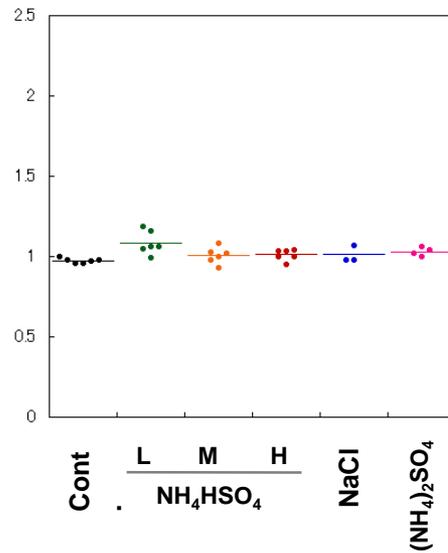
## 最大吸気量



## ティッシュダンピング



## ティッシュエラスタンス



- 硫酸水素アンモニウムのばく露で主に呼吸抵抗が上昇したが、用量依存性は認められなかった。
- 硫酸アンモニウムでも抵抗値の有意な増加を認めた。
- 陰性対照物質と想定した塩化ナトリウムでは影響が見られなかった。

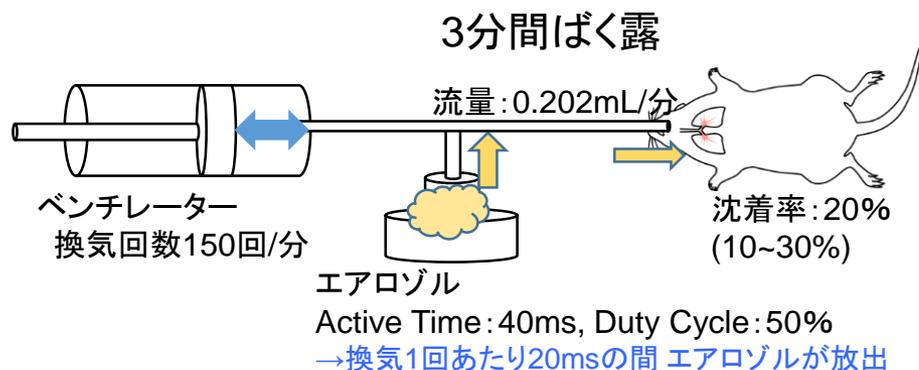
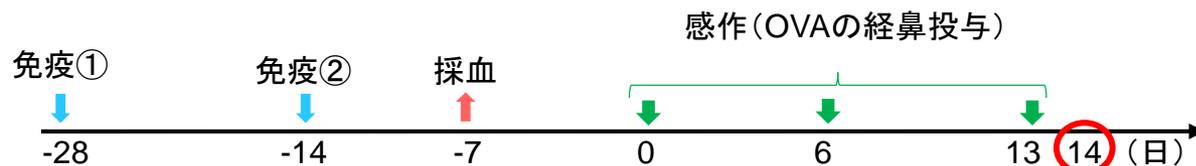
# 実験概要 ぜん息モデルマウスへのばく露

## ■方法

被験物質	硫酸水素アンモニウム $\text{NH}_4\text{HSO}_4$
動物	BALB/c 雌マウス ばく露時15週齢
ばく露時間	3分間

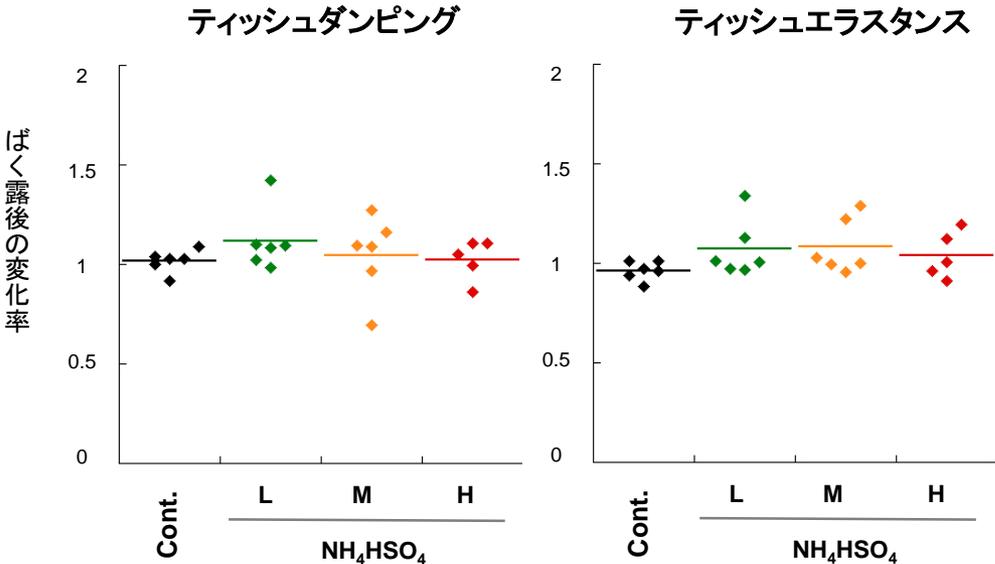
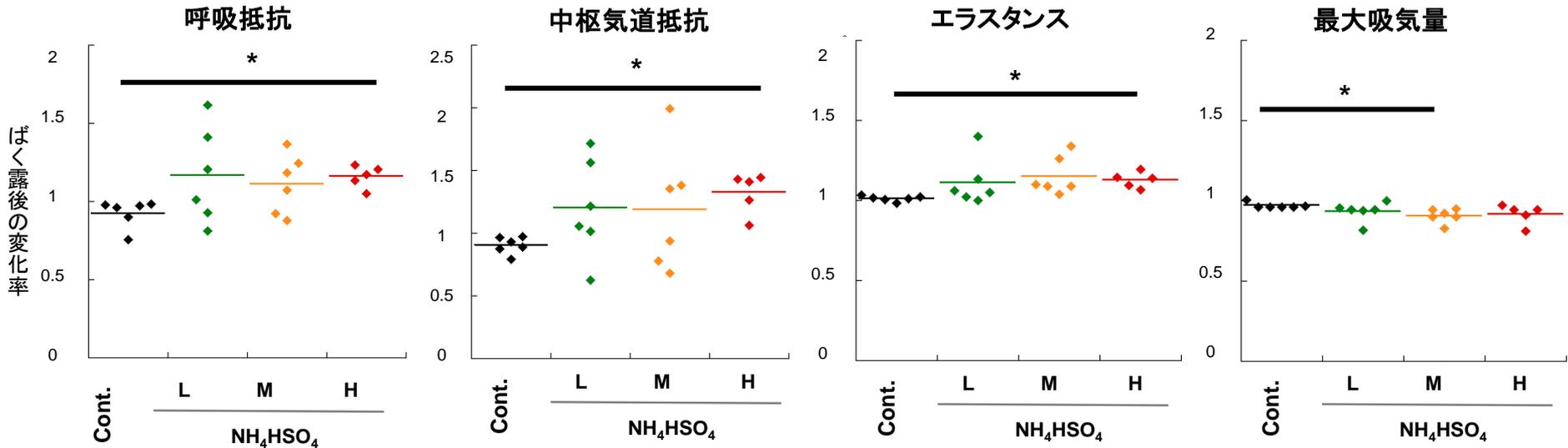
群	水溶液濃度 (mg/mL)	推定沈着量 ( $\mu\text{g}/\text{lung}$ )	動物数
対照(Cont)群	0	0	6
低用量(L)群	0.05	0.303	6
中用量(M)群	0.5	3.03	6
高用量(H)群	5	30.3	5

## ■実験デザイン



# 呼吸機能解析結果②

バーは平均値； Steel's Test \* $p < 0.05$  vs 対照群



- ぜん息マウスにおいても、即時影響が見られたが、変化率は正常マウスと同レベルであった。
- 中枢気道抵抗については用量反応性が見られた。
- 中枢気道抵抗だけでなく、エラスタンスや吸気量等にもやや変化が見られた。

# (2) ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露実験

## ■背景

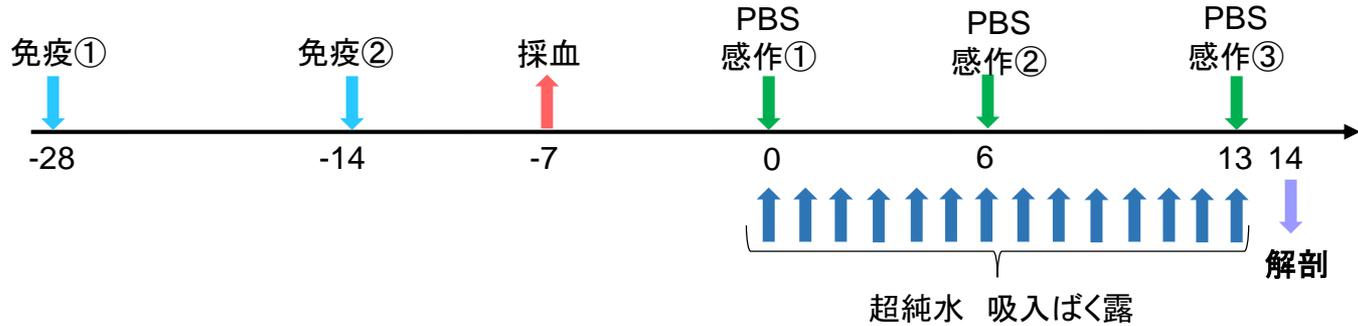
ぜん息患者への影響を想定した硫酸塩の反復ばく露の影響を調べた動物実験はほとんど無く、モデルマウスへの3日間の連続ばく露による評価が一報あるのみで(Casseeら、1999)、知見が不足している。今回は、次年度の本実験のために予備検討を行った。

## ■方法

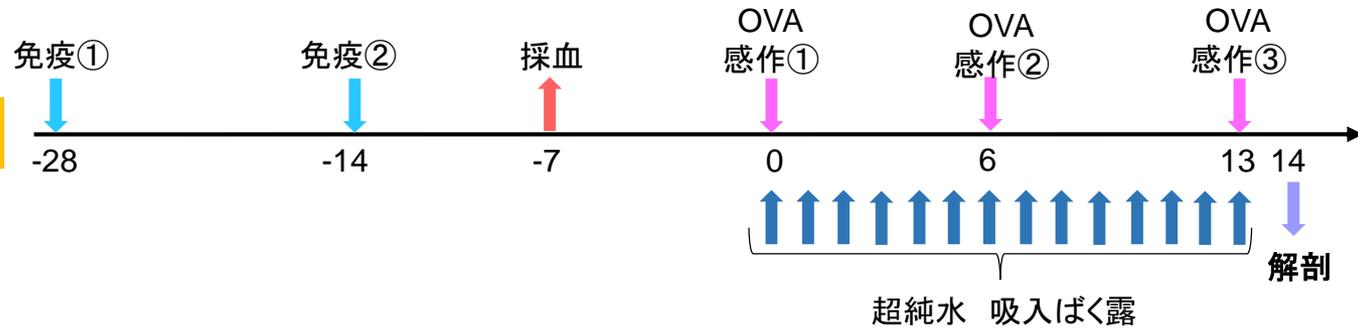
動物	BALB/c 雌マウス 解剖時:15週齢
群構成	対照群(C群) 8匹 ぜん息群(A群) 8匹 ぜん息+ばく露群(AN群) 8匹
鼻部ばく露	被験物質:超純水あるいは硫酸水素アンモニウム $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ (試薬特級) ばく露時間:1日3時間、14日間連続ばく露 濃度:50 mg/m <sup>3</sup>
ぜん息モデル	免疫:OVA 2 $\mu\text{g}$ + 硫酸カリウムアルミニウム (20 mg/mL) 腹腔内投与を2回実施 感作:OVAを0.01%の濃度(w/v)でPBSに希釈し、経鼻投与を3回実施 (三種混合麻酔下で、20 $\mu\text{L}$ を投与)
解析項目	BALF中の白血球の細胞診断、病理組織学的検索、分子生物学的解析

# 実験デザイン

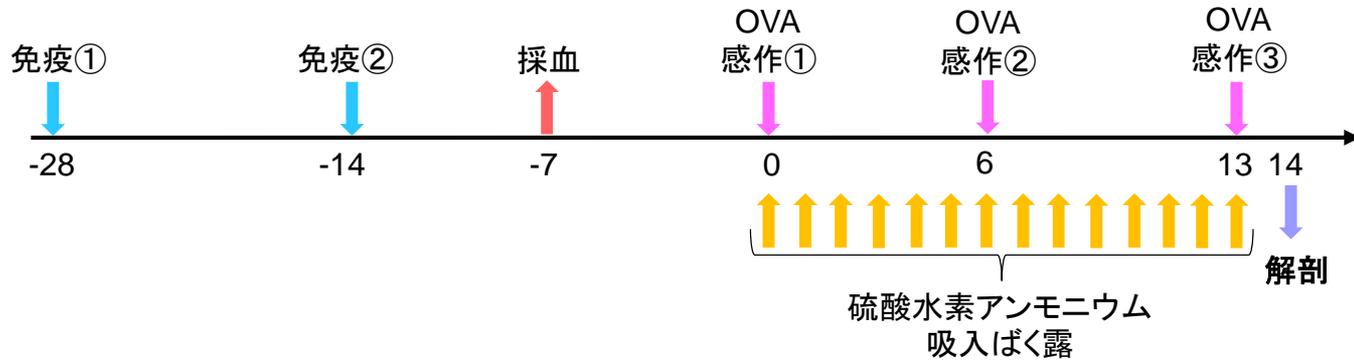
対照群 (C群)



ぜん息群 (A群)



ぜん息+ばく露群 (AN群)



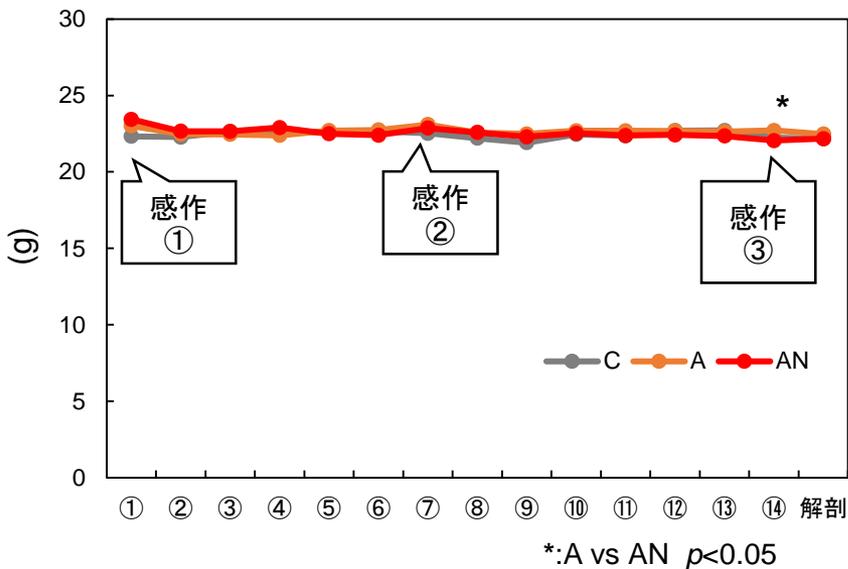
# ばく露濃度等

## ■ ばく露期間中のチャンバー内濃度

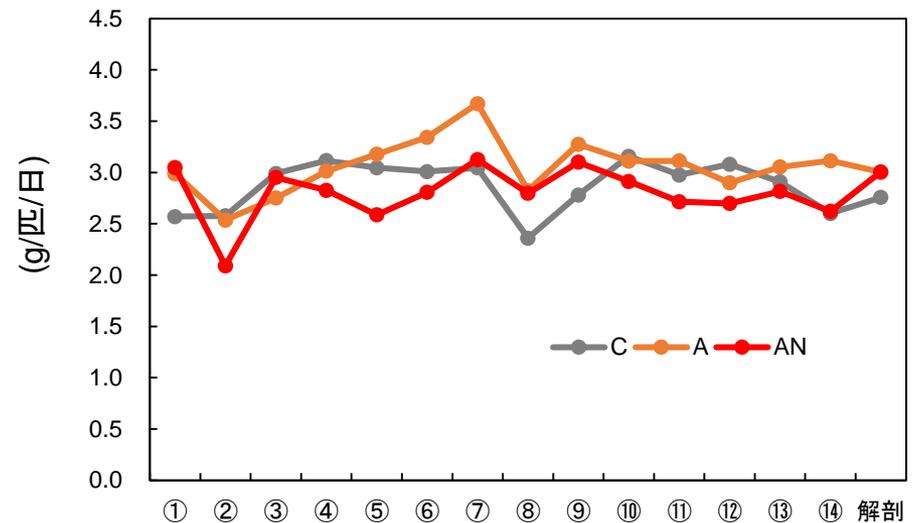
溶液濃度 (mg/L)	目標値 (mg/m <sup>3</sup> )	平均値 ± 標準偏差 (mg/m <sup>3</sup> )
4.5~5.5*	50	65.5 ± 10.5

\* ばく露日①~⑥:5.5mg/L ; ばく露日⑦~⑪:5mg/L ; ばく露日⑫~⑭:4.5mg/L

## ■ 体重推移



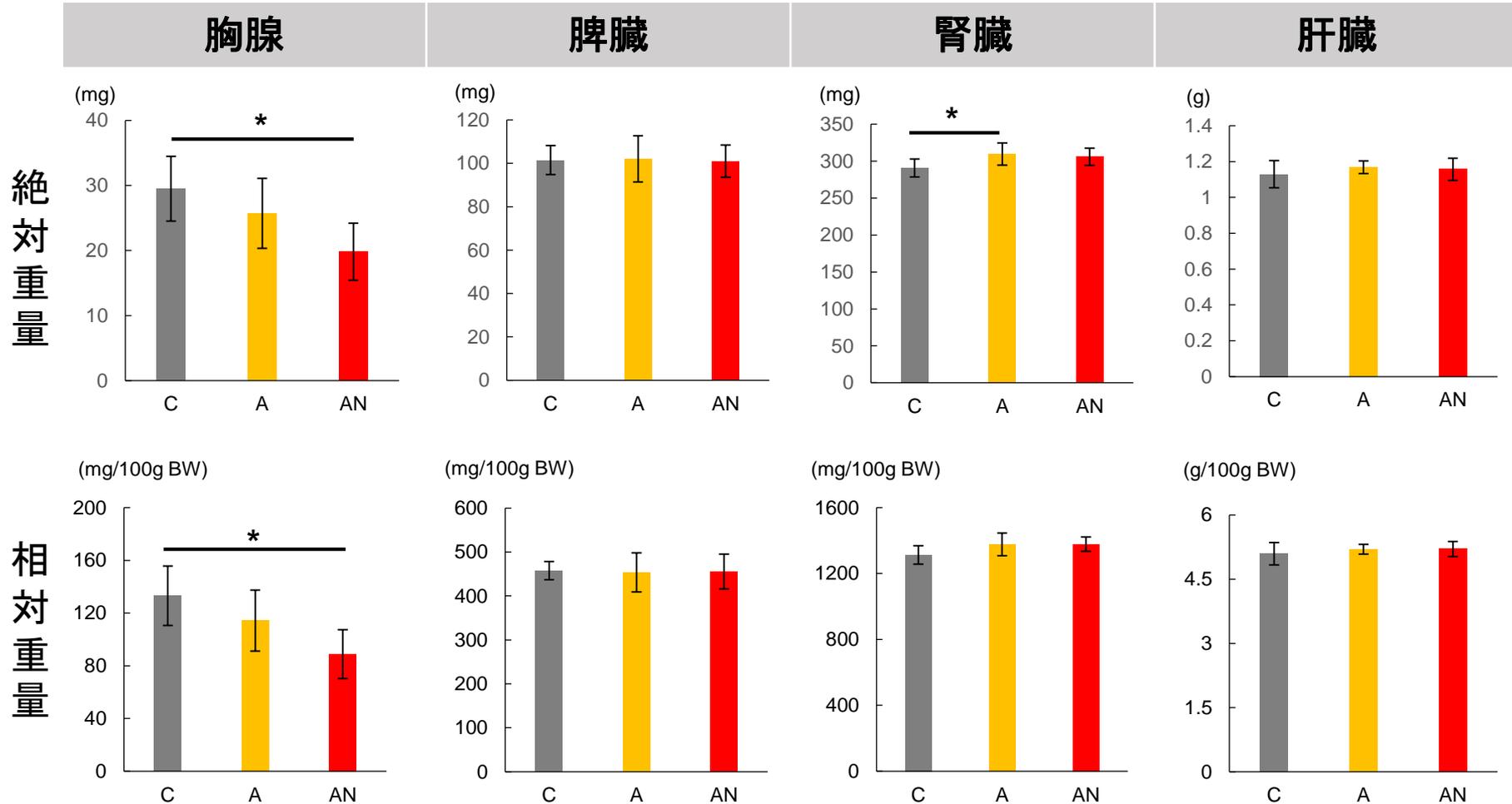
## ■ 摂餌量



- ばく露濃度が予想より高くなってしまい、実験期間中に修正を試みたが安定しなかった。
- 体重や摂餌量にばく露の影響は見られなかった。

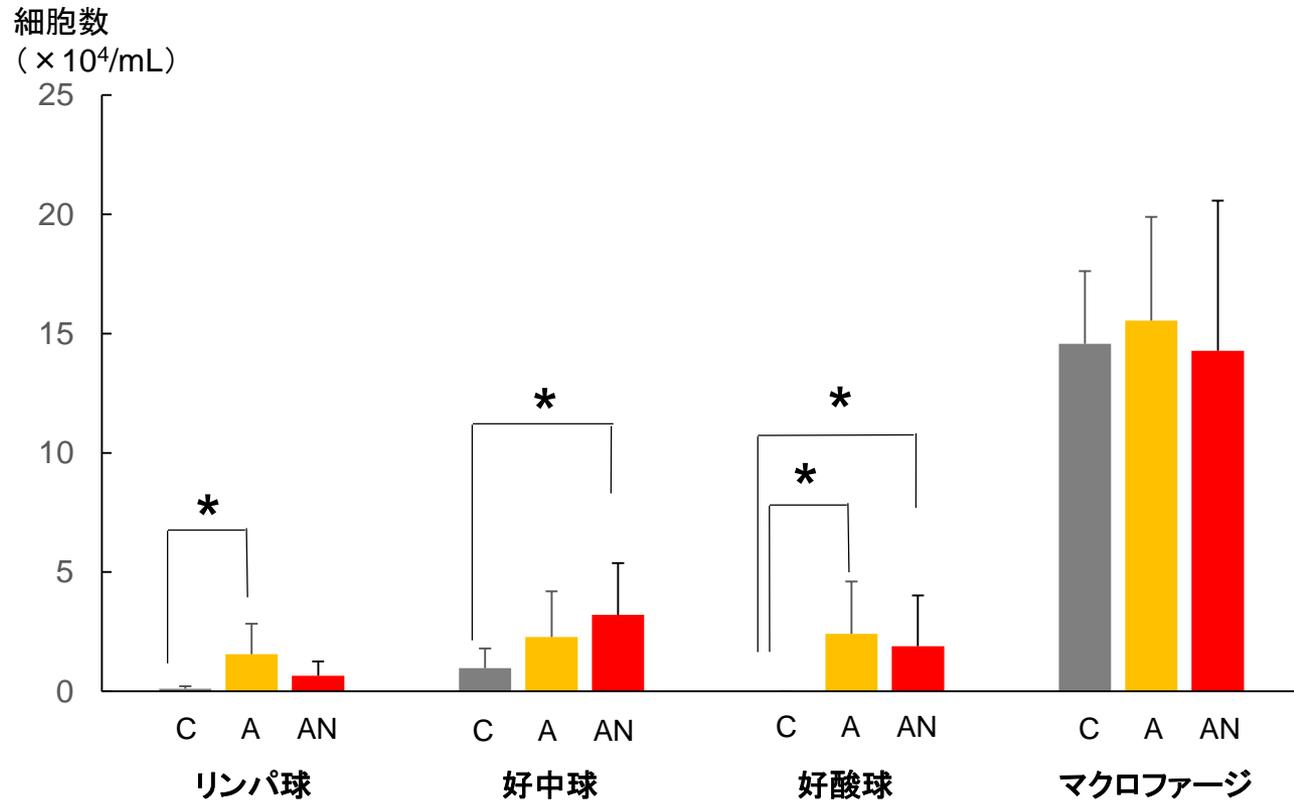
# 臓器重量

Tukey Kramer Test \*  $p < 0.05$  ; C群



- 胸腺重量がAN群では有意に減少し、A群でも比較的低値を示した。
- 腎臓ではわずかな変化ではあるが、有意な増加が見られた。

# BALF中の白血球細胞の解析



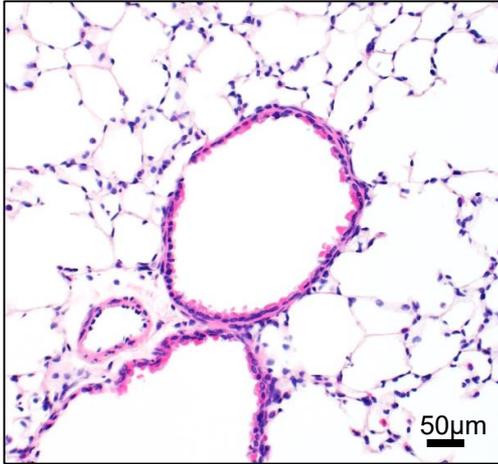
Tukey-kramer Test \*  $p < 0.05$

- リンパ球や好酸球の浸潤が認められた
- 過去に報告済みの低レベルのぜん息モデルと同程度の細胞数であった

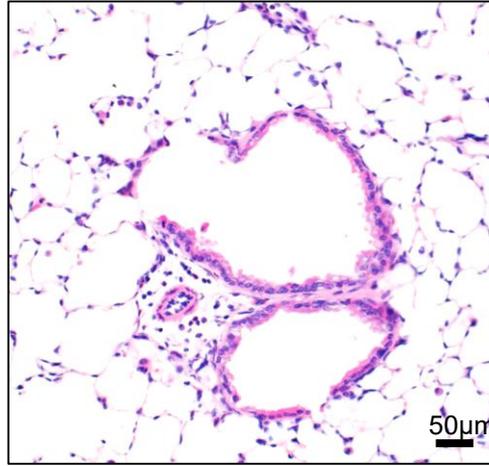
# 呼吸器の組織像

## ■肺実質

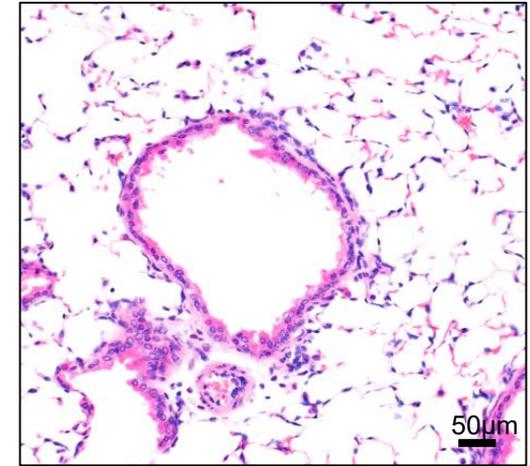
C群



A群

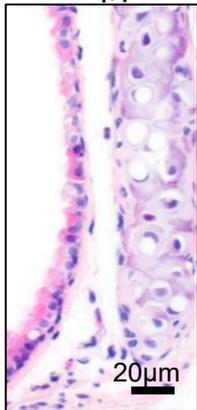


AN群

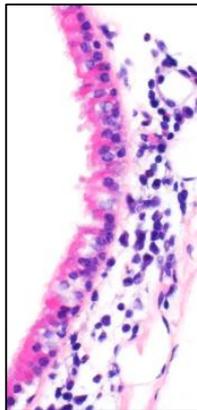


## ■気管上皮

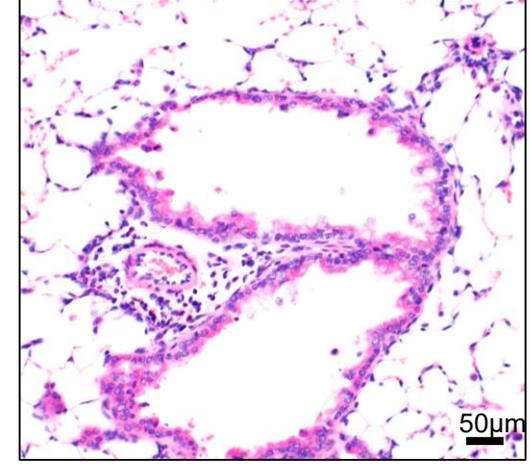
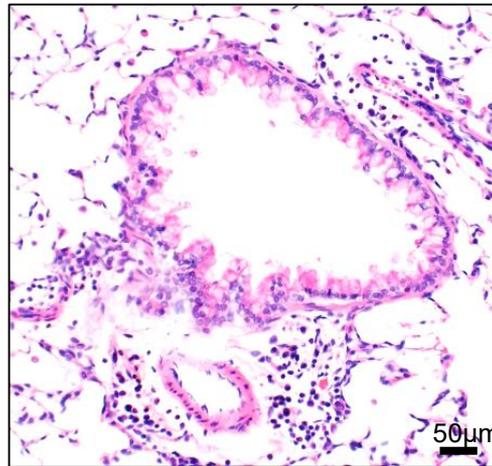
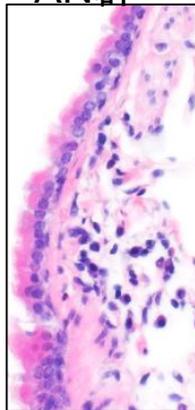
C群



A群



AN群



- 細胞浸潤や杯細胞の増生は低レベルであり、A群とAN群の間に顕著な差は見られなかった

# 呼吸器系の組織所見まとめ

	C群 N=8	A群 N=8	AN群 N=8
気管			
気管周囲 細胞浸潤	0	0.38 ± 0.35 *	0.50 ± 0.41 *
肺実質			
血管周囲 細胞浸潤	0	0.92 ± 0.27 *	0.81 ± 0.44 *
気管支周囲 細胞浸潤	0	0.68 ± 0.25 *	0.42 ± 0.41 *
肺胞 細胞集ぞく	0.07 ± 0.08	0.24 ± 0.21	0.06 ± 0.08
気管支上皮肥厚	0	0.51 ± 0.21 *	0.38 ± 0.38 *
気管支周囲平滑筋肥厚	0.14 ± 0.38	1.20 ± 0.45 *	1.17 ± 0.75 *

スコア平均±SD

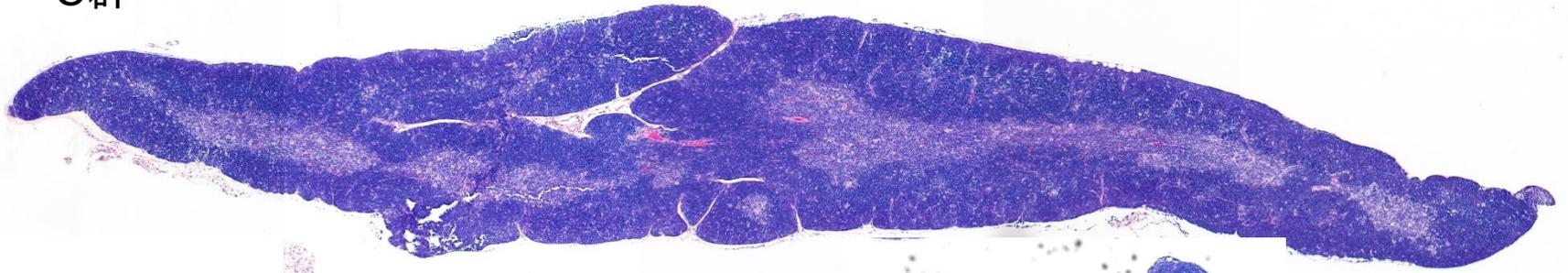
Steel Dwass Test \*  $p < 0.05$ ; vs C群

その他、血管壁の石灰化、気管支肺胞上皮細胞腺腫等が少数例認められた

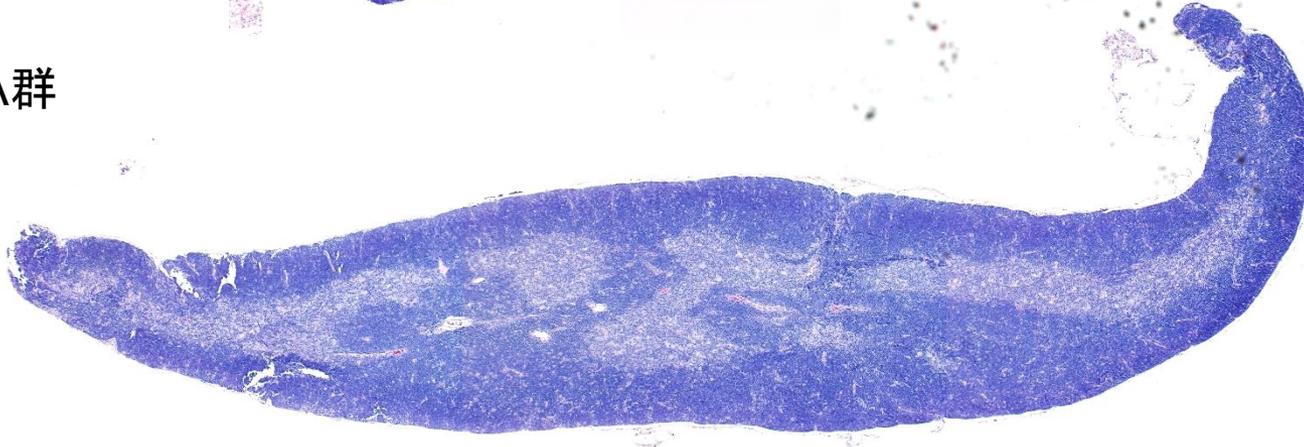
- A群及びAN群ではぜん息様の所見が認められた。
- A群とAN群の間に差異は認められなかったが、どの所見もAN群ではやや低めのスコアであった。

# 胸腺の組織像

C群

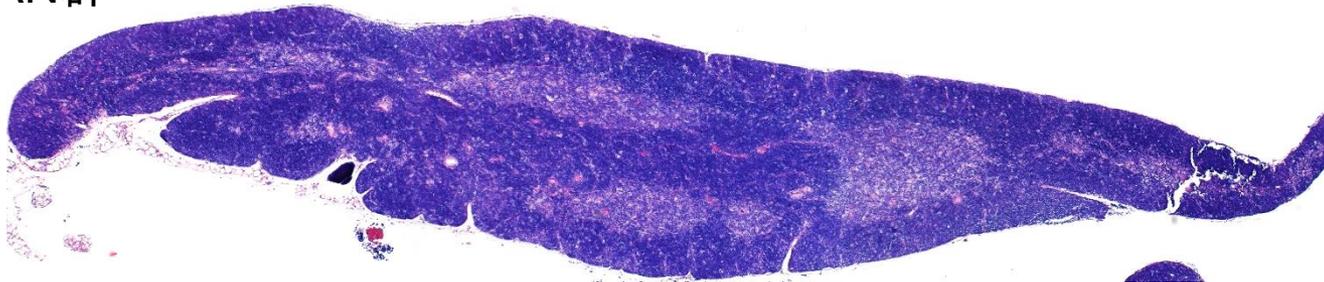


A群



0.5mm

AN群

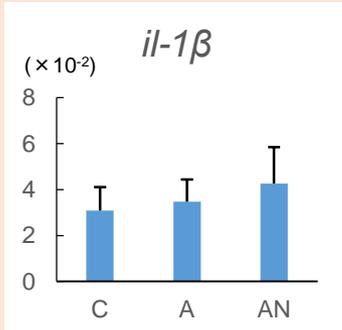


- AN群では皮質がやや菲薄化し、サイズの減少傾向は認められるが、組織構造の異常や顕著なリンパ球のアポトーシスは観察されなかった。

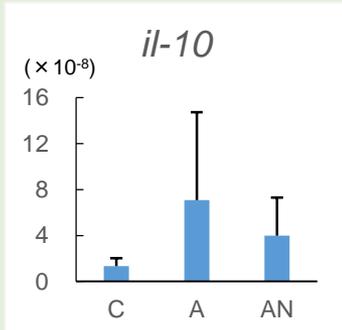
# 肺組織における遺伝子発現

Steel Dwass Test \*  $p < 0.05$ ; C群

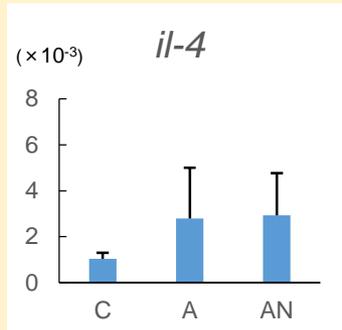
## 炎症



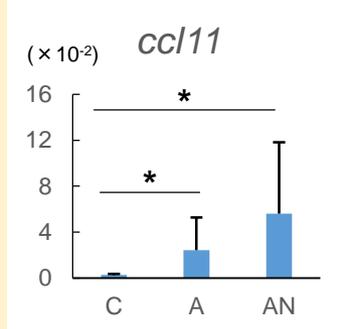
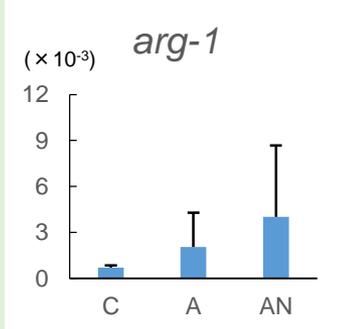
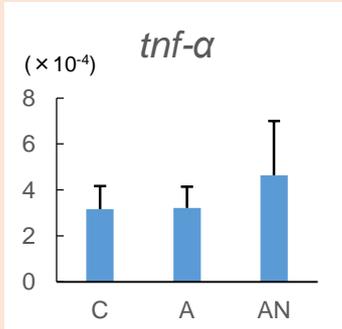
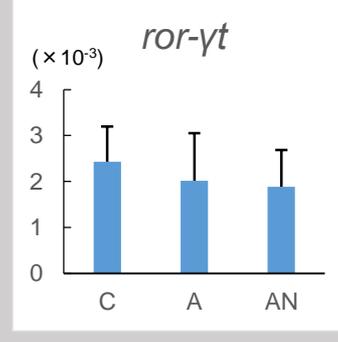
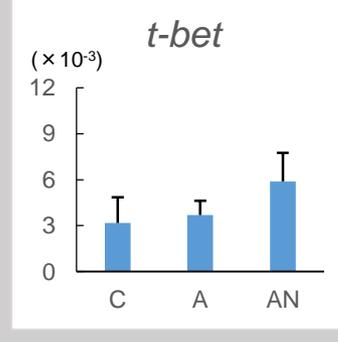
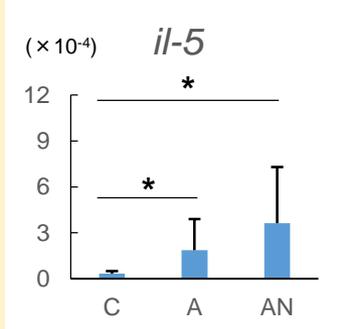
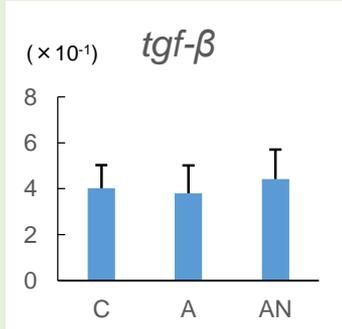
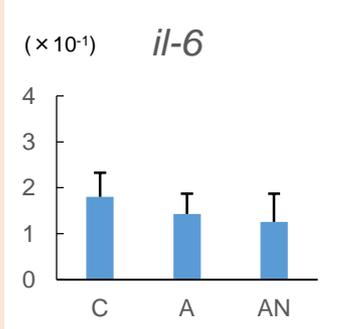
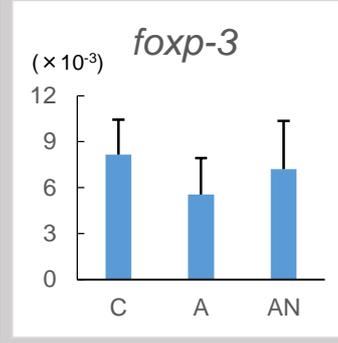
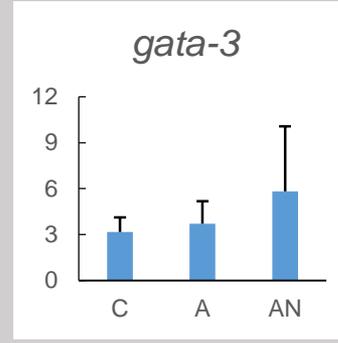
## 免疫抑制



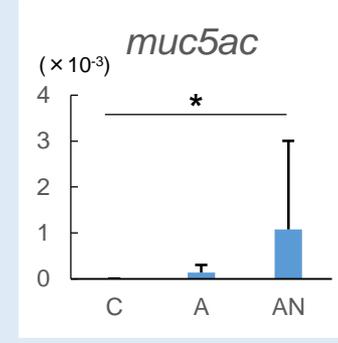
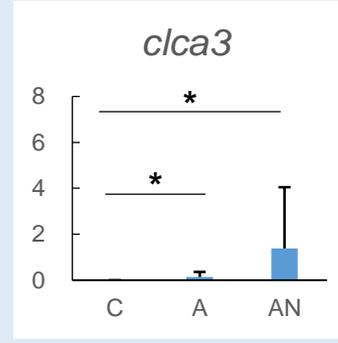
## Th2サイトカイン他



## T細胞分化



## 粘液増生



AとAN群に有意な差は認められないが、わずかに増悪を疑わせる結果もあった。

# 考察・まとめ

## 【即時影響】

- 硫酸水素アンモニウムのエアロゾルの3分間の経気道ばく露により、マウスの呼吸機能への即時の影響が認められた。
- 本試験系では、主に中枢気道への作用であった。非免疫学的機構として、化学的な刺激(酸性度や浸透圧等)により、気道の神経や平滑筋を刺激したものと推測される。
- ぜん息モデルマウスにおいて、同様の結果が得られ、特に気道収縮作用の増強は見られなかったが、これは、ぜん息モデルの程度が低レベルであるためと思われる。エラスタシスのわずかな上昇傾向はぜん息病態に関連する可能性もあるが解釈は難しい。
- 硫酸塩は吸湿性が高いため、呼吸器内で粒子径が増すと考えられる。濃度が高いと、粒子径がわずかに大きい、あるいは凝集が起こりやすいことが推測され、粒子の沈着部位に影響を与える可能性もある。
- 硫酸塩の即時影響についてモルモット以外の実験動物で示したのは初めてである。

# 考察・まとめ

## 【ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露(予備実験)】

- 明らかなぜん息増悪作用は認められなかったが、AN群で比較的強い影響が見られる試験項目もあった。
- 胸腺の萎縮は、免疫毒性というよりも、酸性エアロゾルのばく露によるストレスと考えられるが、詳細は不明である。
- 分子レベルで、ばく露による増悪を示唆する結果もあったため、これら遺伝子が寄与する現象について、組織学的・免疫学的に、詳細な解析を行う必要がある。
- 本実験では、これらの一般的な呼吸器毒性試験に加え、気道過敏性検査を行い、ぜん息増悪に及ぼす影響について結論を得たい。
- ばく露濃度の安定性について再確認する必要がある。