

令和5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9月

研究の目的と概要

【目的】 硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露がぜん息モデルマウスに及ぼす影響を調べる

- ヒト吸入実験で、ぜん息患者の呼吸機能への影響を認める報告があるが、知見が少ない。(Utell *et al.*, 1983)
- 硫酸アンモニウムについてはモルモットへの即時影響の報告があるが、免疫学的な評価が不十分である(吉田ら1979、北畠ら、1979)。
- マウスを用いた実験はほとんど無く、ぜん息モデルマウスへのばく露実験が一報あるのみである(Cassee *et al.*, 1999)。



【実験1】 2週間の反復ばく露実験

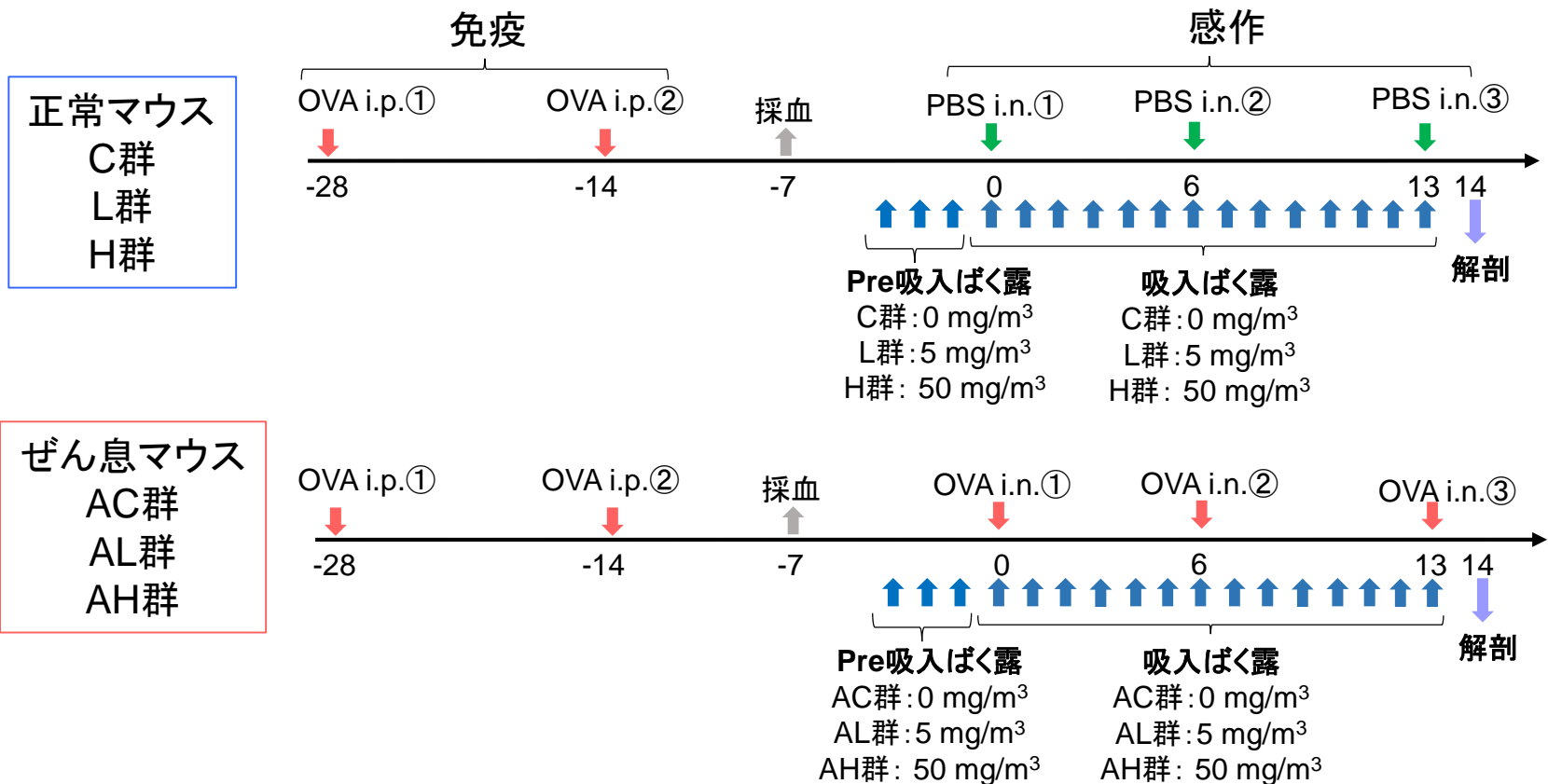
- ぜん息モデルマウスを用いた系で、ぜん息症状の増悪影響を検討する。
- 昨年度の予備実験ではわずかな影響を示唆する結果が得られた。
- 今回は、感作を始める直前にさらに3日間のばく露を追加することとした。

【実験2】 単回ばく露実験

- ばく露によりぜん息モデルマウスの気道過敏性が上昇するかを調べる。
- 昨年度までの研究では、3分間の経気道ばく露の直後に影響が認められたが、顕著な変化ではなく、また、モデルマウスでの強い影響は見られていない。
- 今回は、ばく露条件及び評価方法を変更することとした。

【実験1】2週間の反復ばく露 実験概要

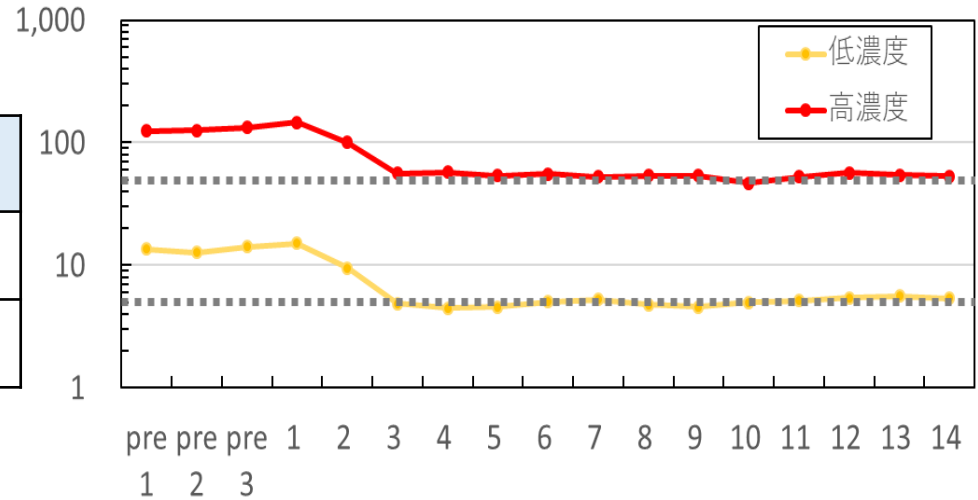
動物	BALB/c 雌マウス 全6群 各群8匹 解剖時 15週齢
吸入ばく露	超純水あるいは硫酸水素アンモニウム NH_4HSO_4 (試薬特級) 1日3時間、14日間連続ばく露 (+感作前に3日間ばく露) 0 mg/m^3 (陰性対照)、5 mg/m^3 (低濃度)、50 mg/m^3 (高濃度)
ぜん息モデル	免疫: 腹腔内投与 (i.p.); OVA 2 μg + 硫酸カリウムアルミニウム (20 mg/mL) 感作: 経鼻投与 (i.n.); OVAを 0.01%の濃度 (w/v)
解析項目	BALF中の白血球の解析、病理組織学的解析、免疫学的解析、分子生物学的解析



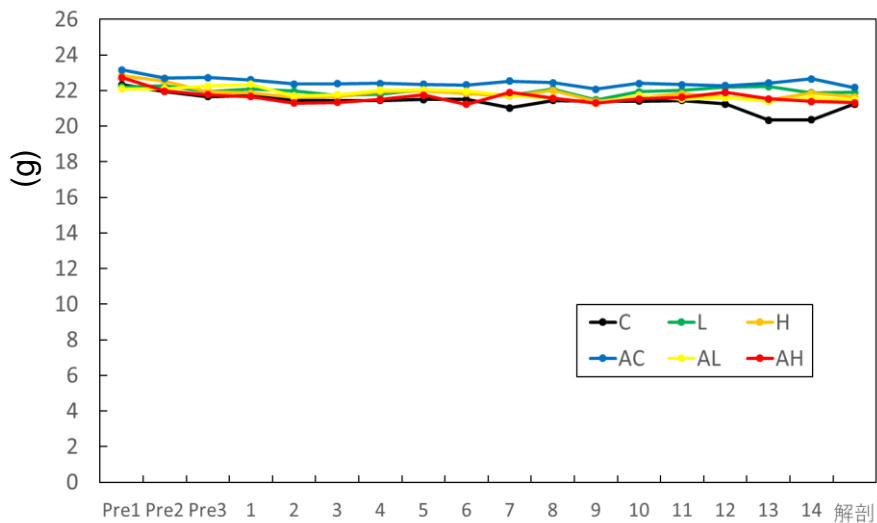
ばく露濃度等

■ ばく露期間中のチャンバー内濃度

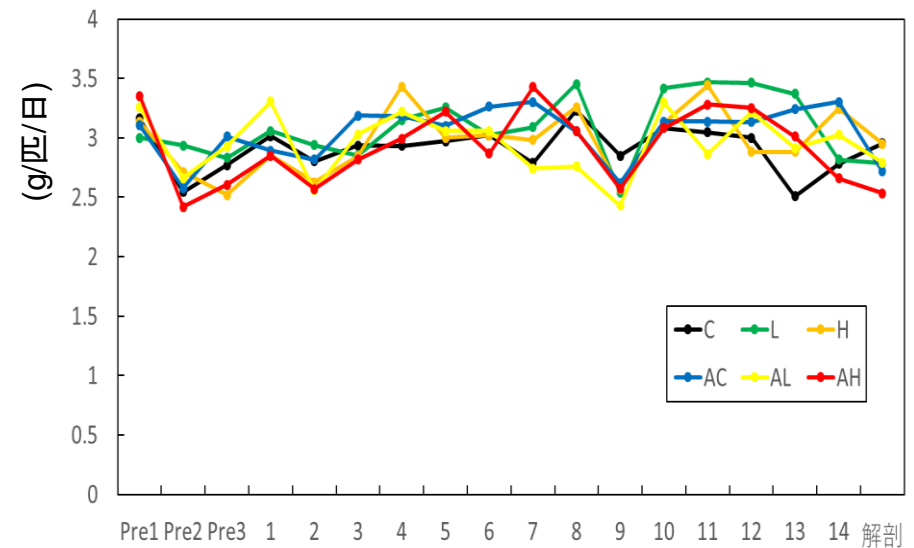
濃度群	溶液濃度 (mg/mL)	目標値 (mg/m ³)	平均値±標準偏差
低濃度	0.45	5	7.4±3.8
高濃度	4.5	50	75.1±34.9



■ 体重推移



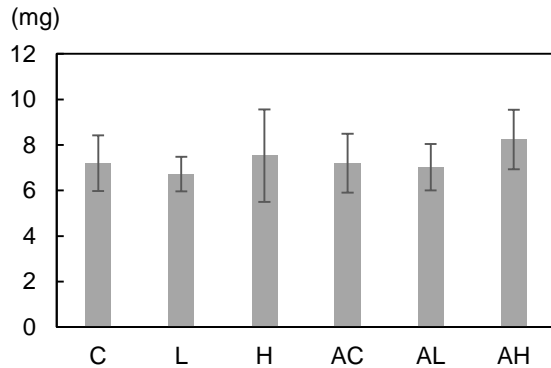
■ 摂餌量



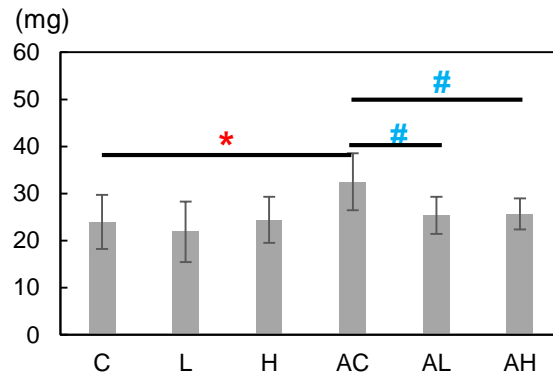
- ばく露開始時は濃度が予想より高くなってしまったが、その後は安定した。
- 体重や摂餌量にばく露の影響は見られなかった。

臓器重量

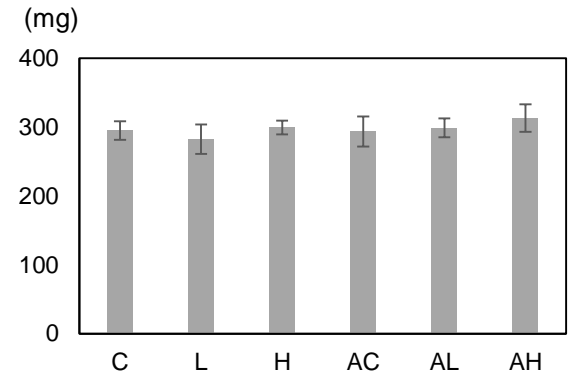
副腎



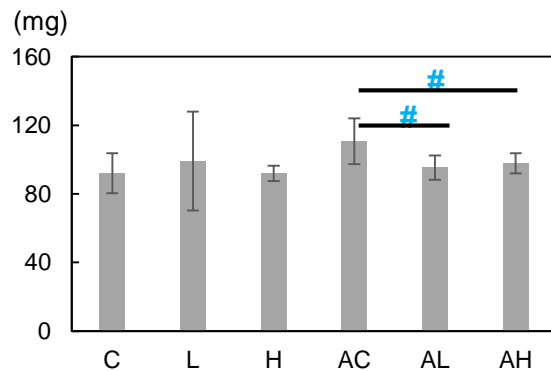
胸腺



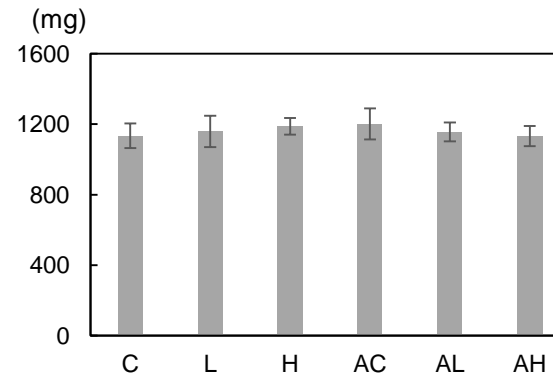
腎臓



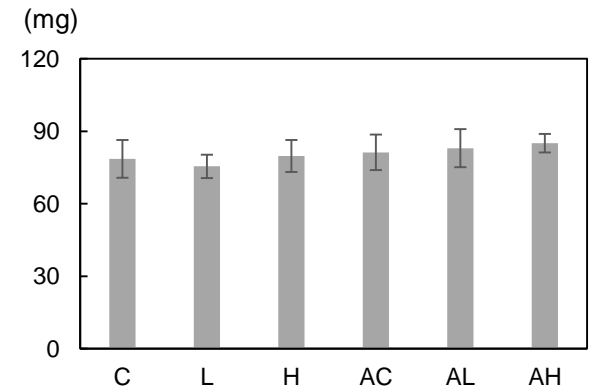
脾臓



肝臓



肺 左葉のみ(参考値)

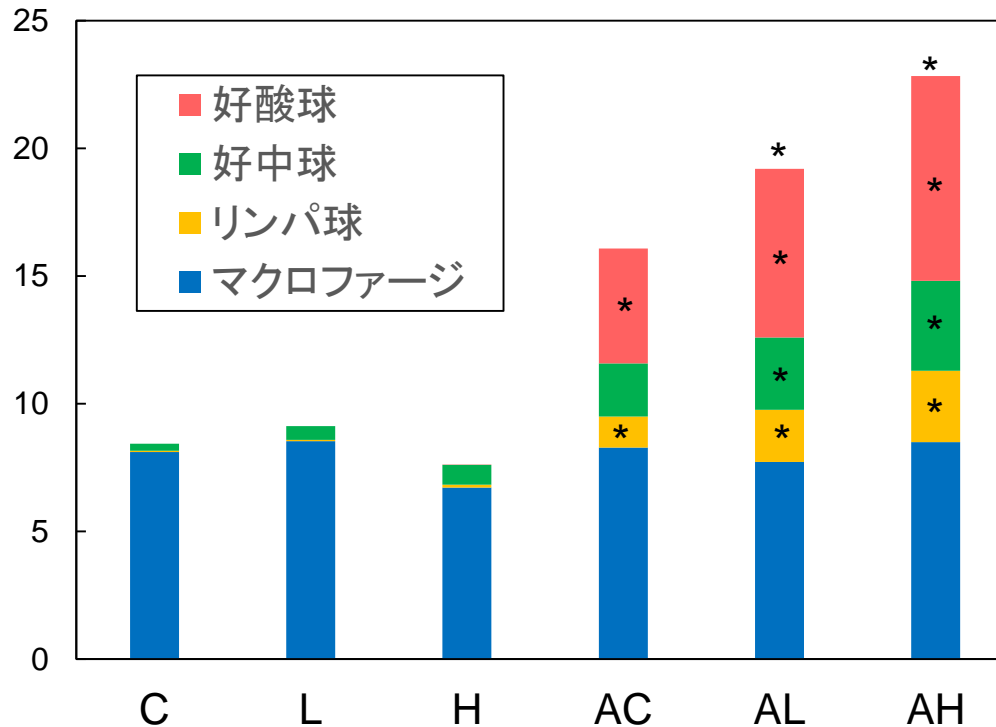


Dunnett Test * $p < 0.05$; C群
$p < 0.05$; AC群

- AC群での胸腺重量が高く、AL群・AH群で有意な低下を認め、脾臓でも同様の傾向がみられたが、毒性学的には重要でないと思われる。
- 肺重量に差異はみられなかった。

BALF中の白血球細胞の解析

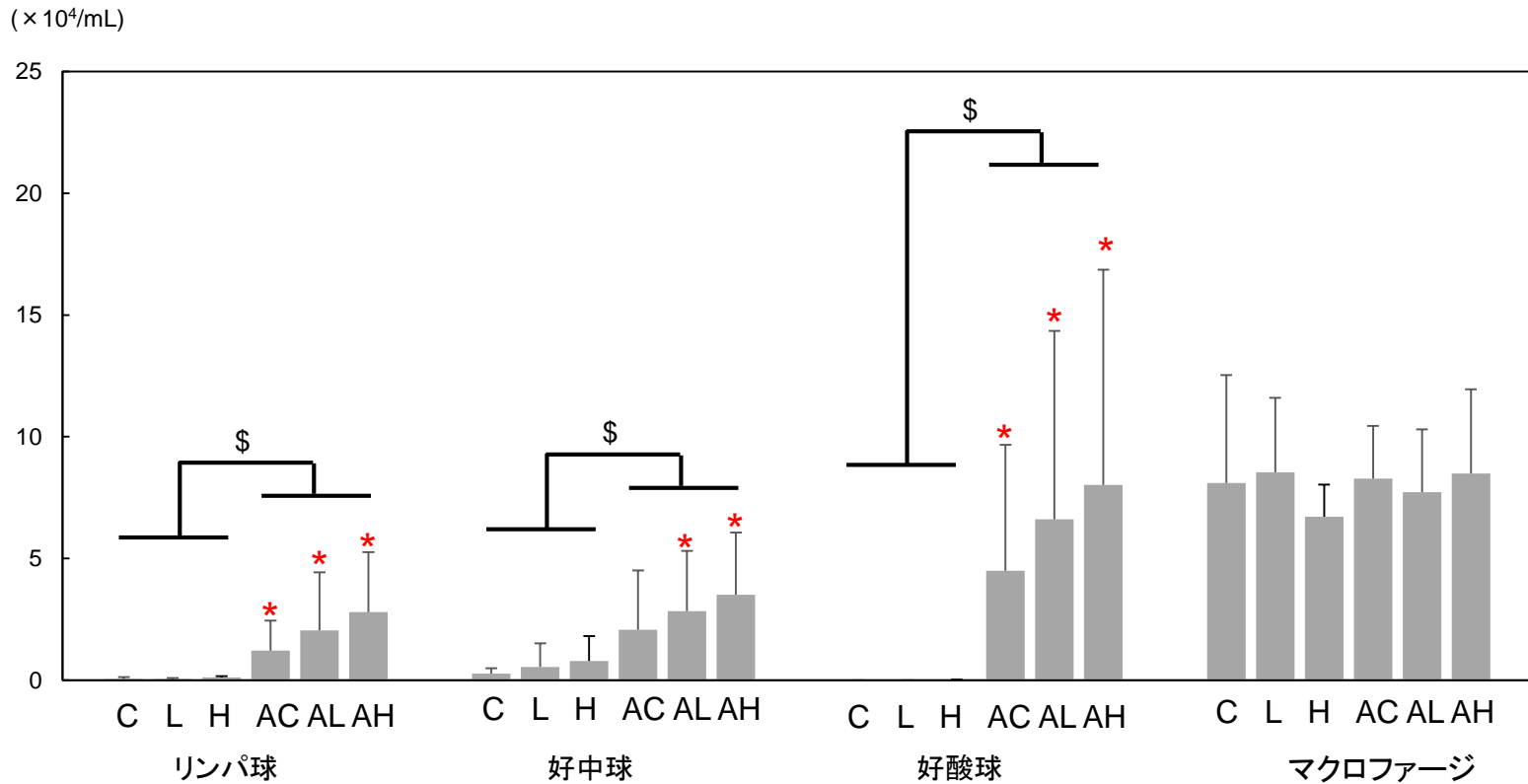
($\times 10^4/\text{mL}$)



Dunnett Test * $p < 0.05$; vs C群

- ぜん息モデルマウスではマクロファージ以外の細胞が有意に増加した。
- AL群・AH群では、AC群に対して増加傾向が見られたが、有意な変化ではなかった。

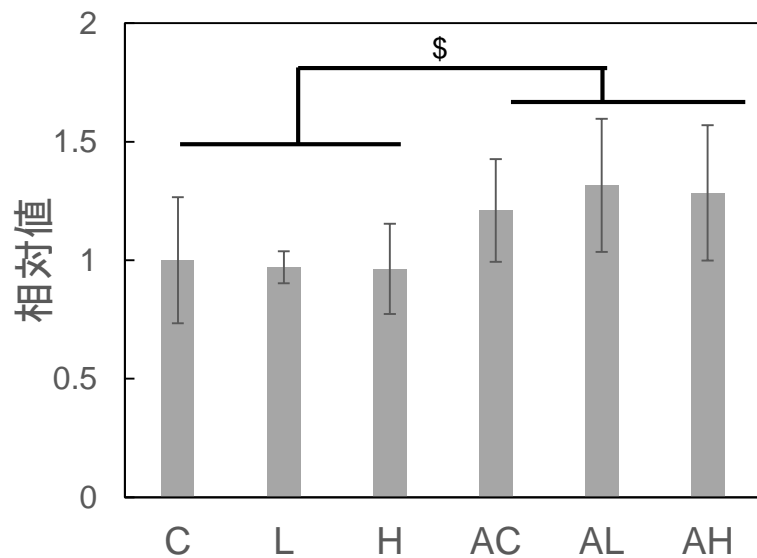
BALF中の白血球細胞の解析（細胞種ごとの比較）



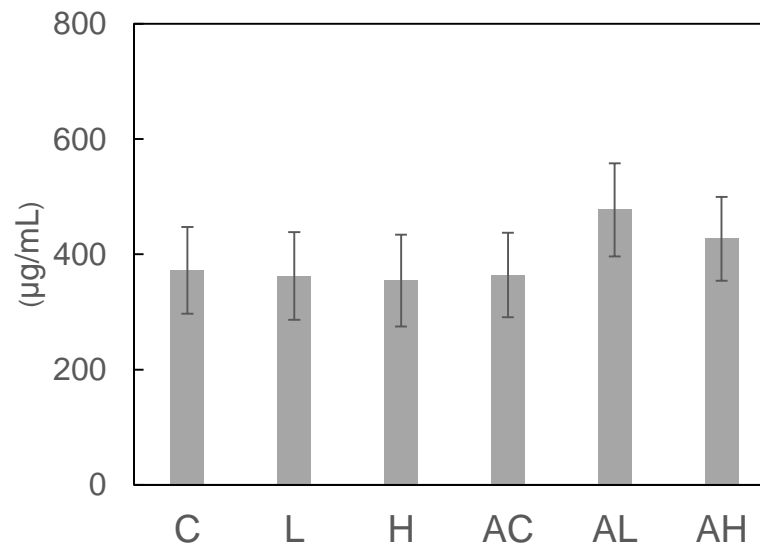
Dunnett Test * $p < 0.05$
Student's t-test \$ $p < 0.05$

生化学的解析 (BALF上清)

乳酸脱水素酵素(LDH)活性



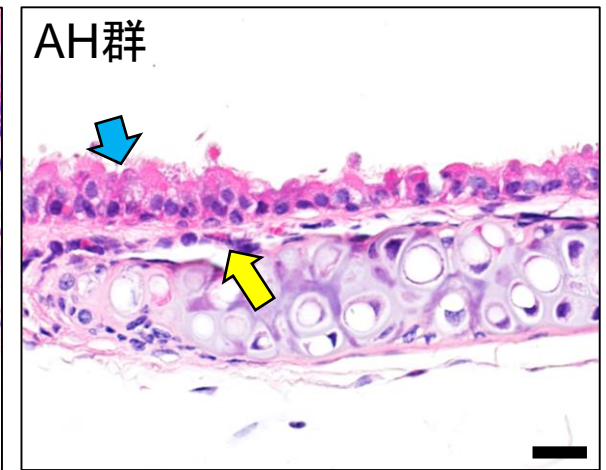
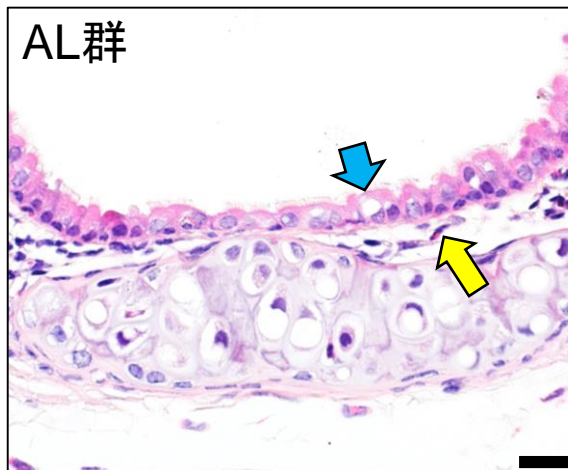
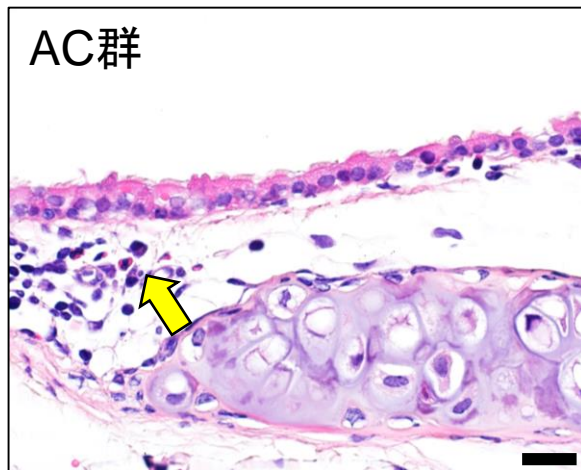
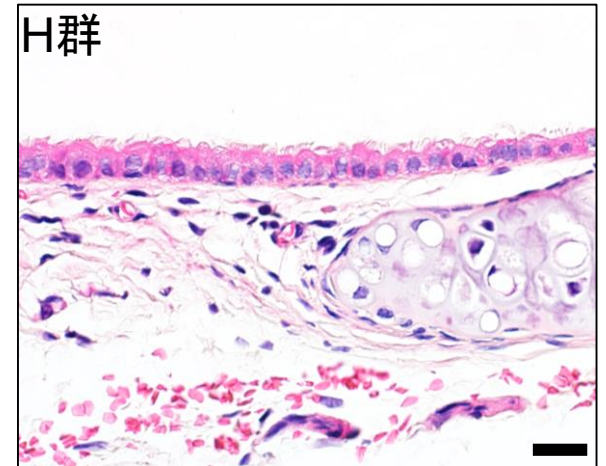
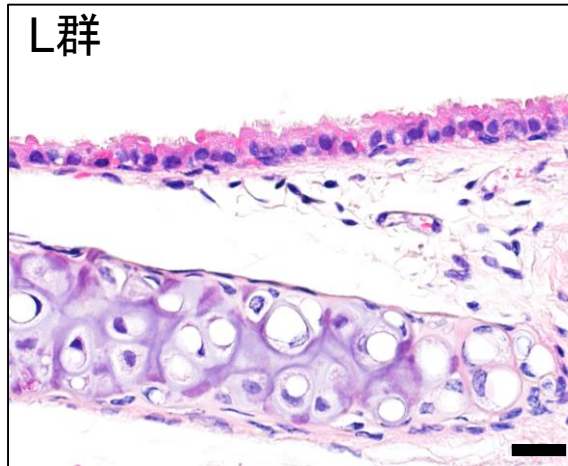
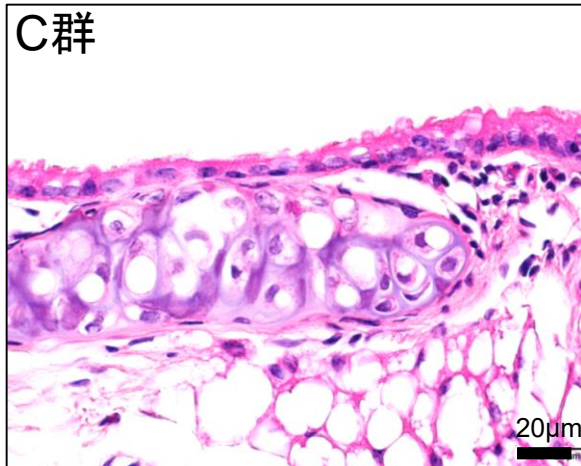
総タンパク質



Mann Whitney U-test \$: $p < 0.05$

吸入ばく露による細胞毒性や組織損傷は見られないが、AC群、AL群、AH群におけるLDHの増加は、モデルマウスの気道炎症に起因するものと考えられる。

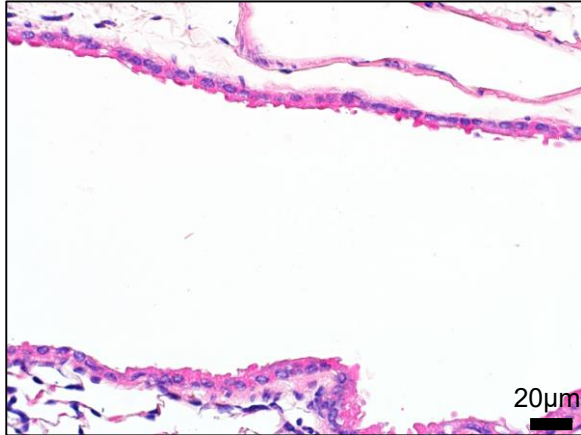
病理組織学的解析（気管）



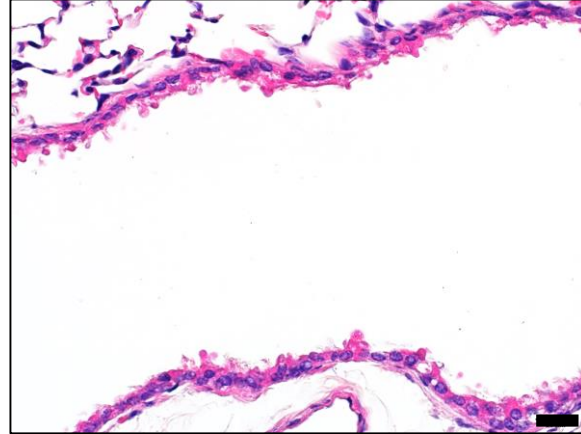
- ぜん息モデルマウスにおいて、粘膜下の好酸球の浸潤(↑)や粘液産生の微増(↑)を認めるが、AL群・AH群での顕著な変化は観察されなかった。

病理組織学的解析（肺内気管支）

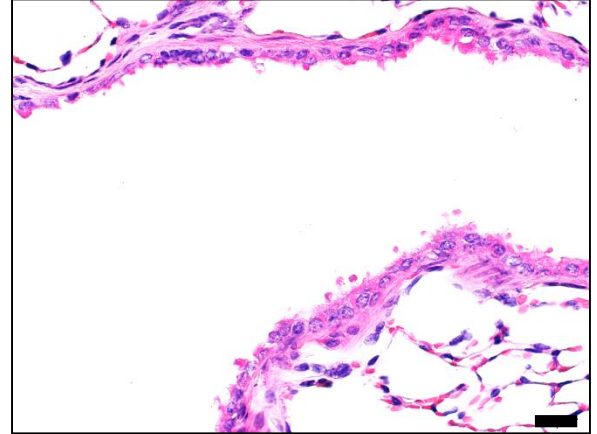
C群



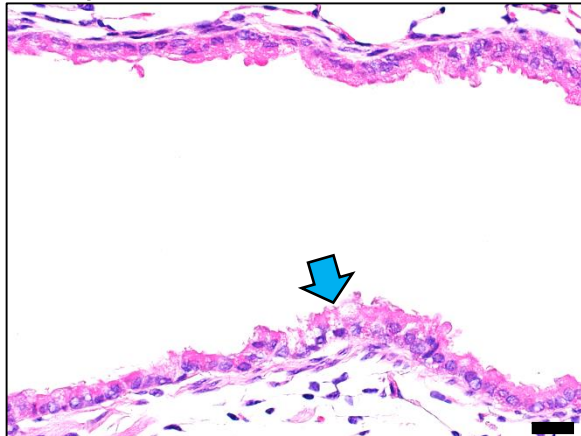
L群



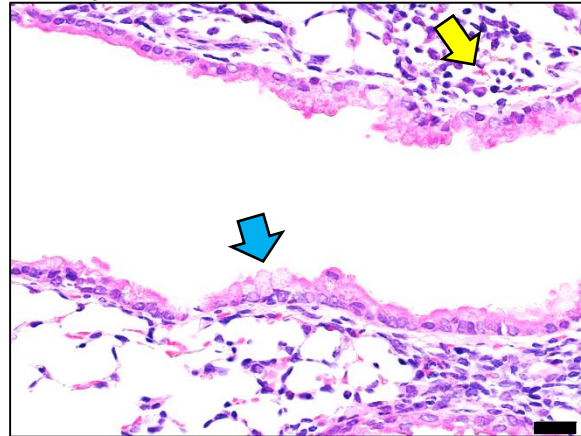
H群



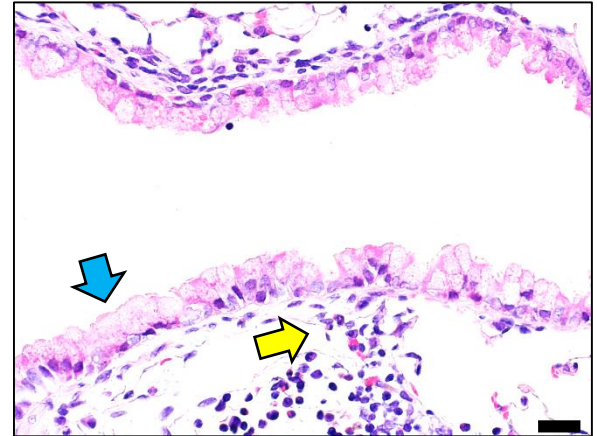
AC群



AL群

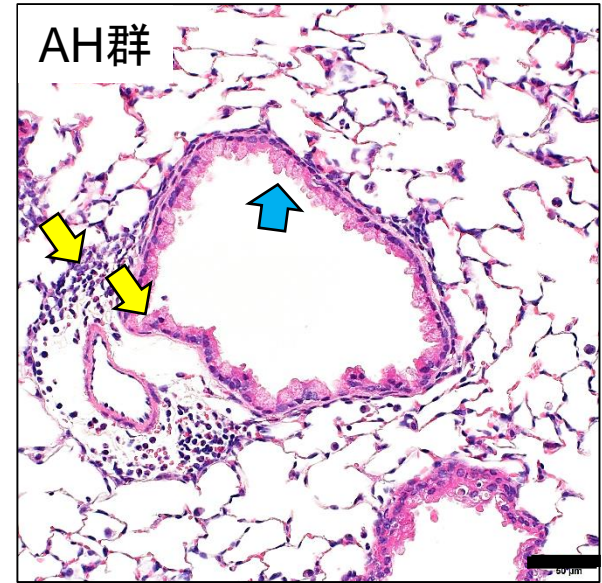
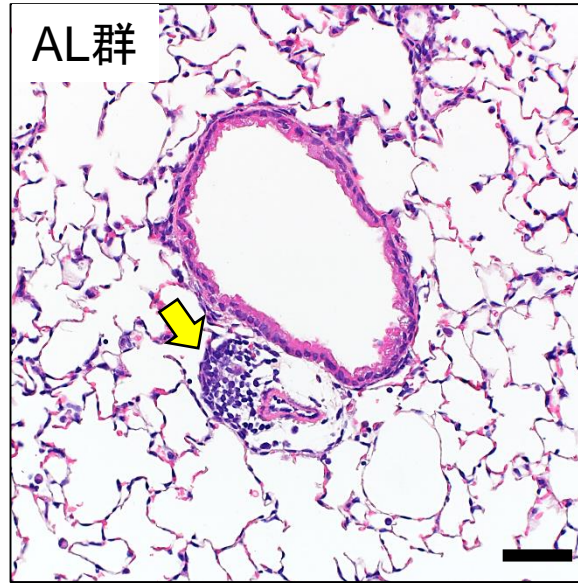
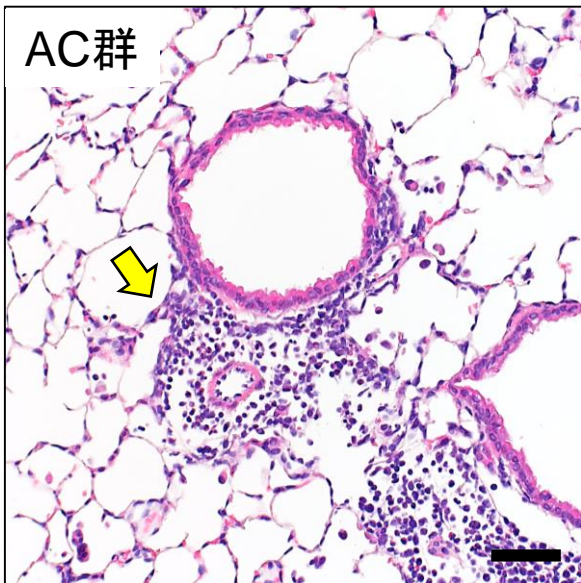
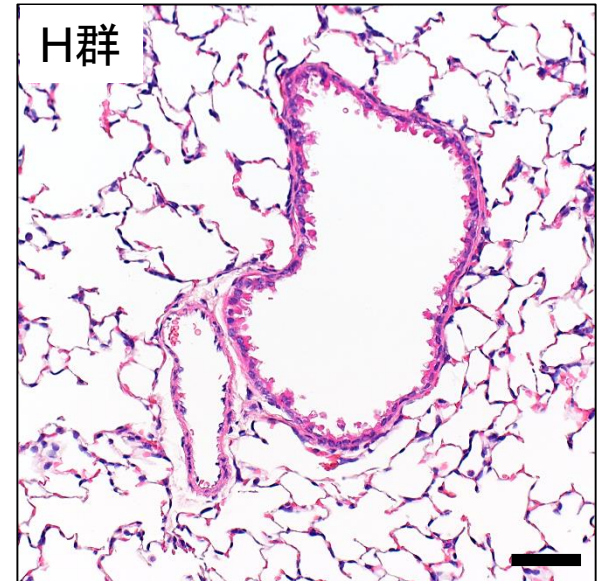
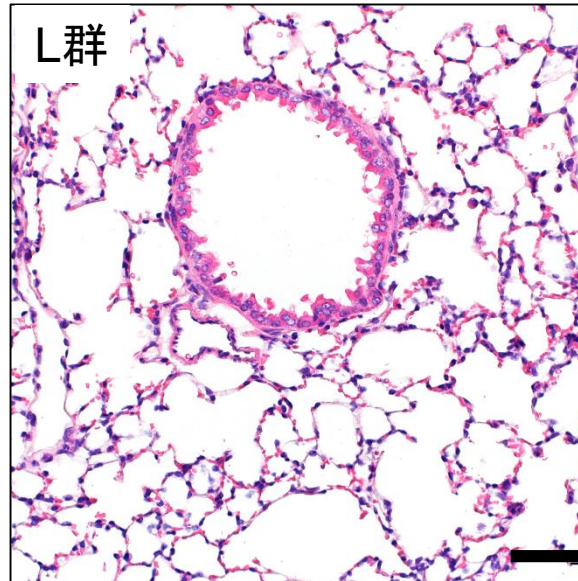
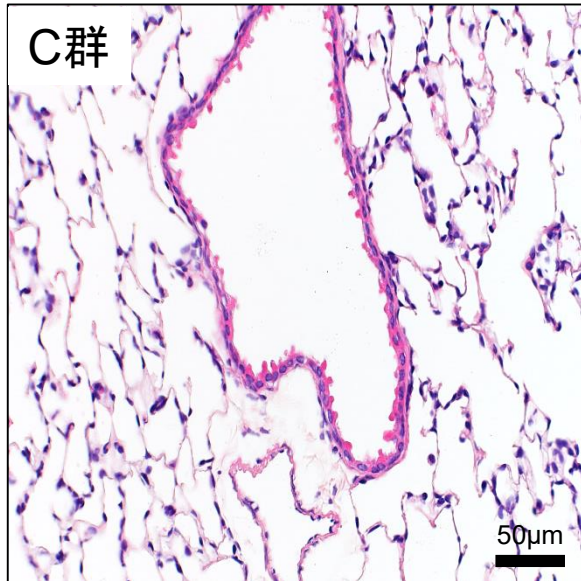


AH群



- ぜん息モデルマウスにおいて、粘膜下の好酸球の浸潤(↑)や杯細胞の増生(⇩)を認めた。
- AH群では比較的、杯細胞の増加(粘液産生)が顕著であった。

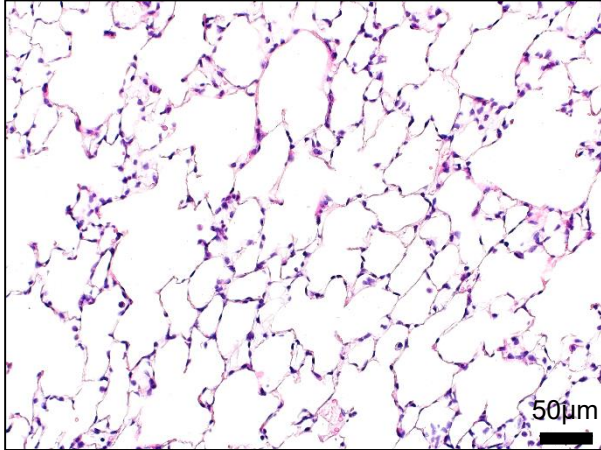
病理組織学的解析（肺実質）



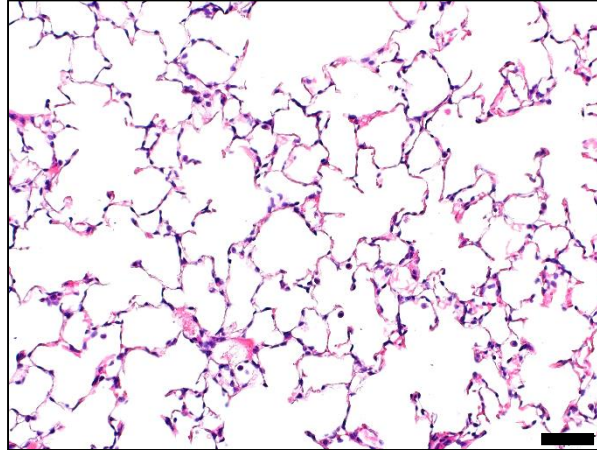
- ぜん息モデルマウスにおける血管周囲の細胞浸潤(⬇)は、群間で差異は見られなかった。
- AH群では、杯細胞の増生(⬆)がやや目立っていた

病理組織学的解析（肺実質）

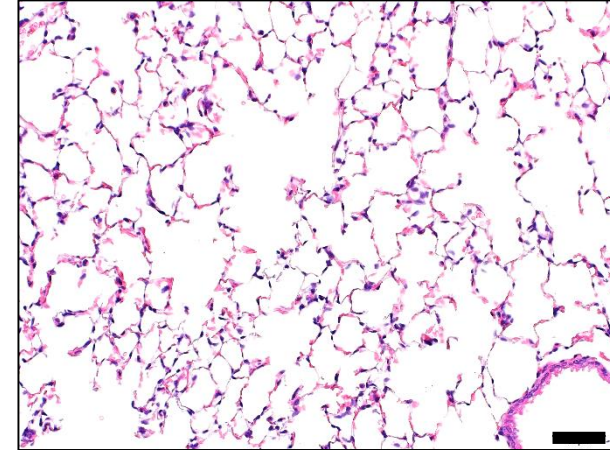
C群



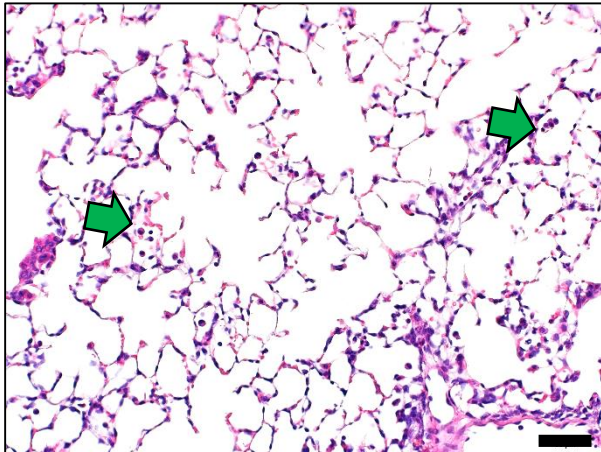
L群



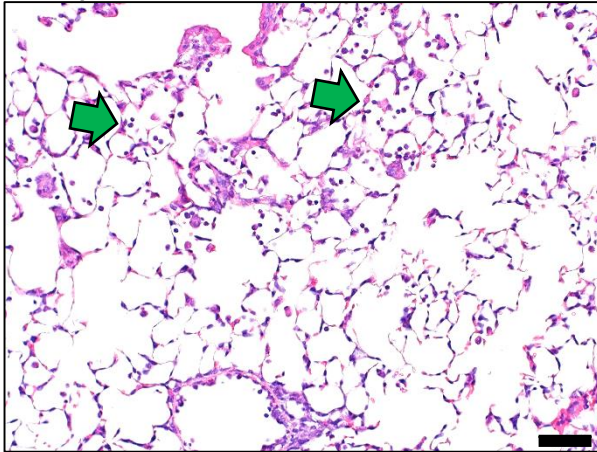
H群



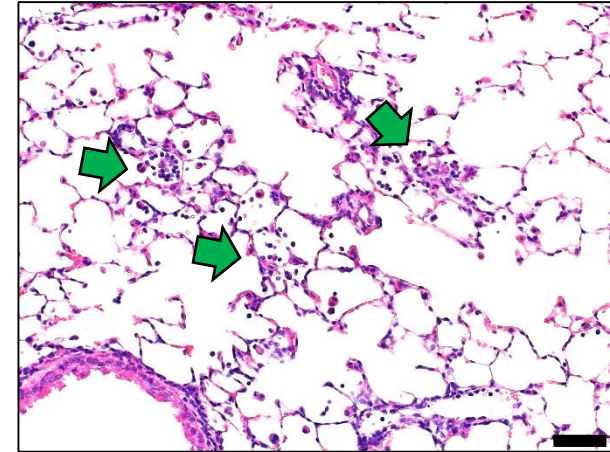
AC群



AL群

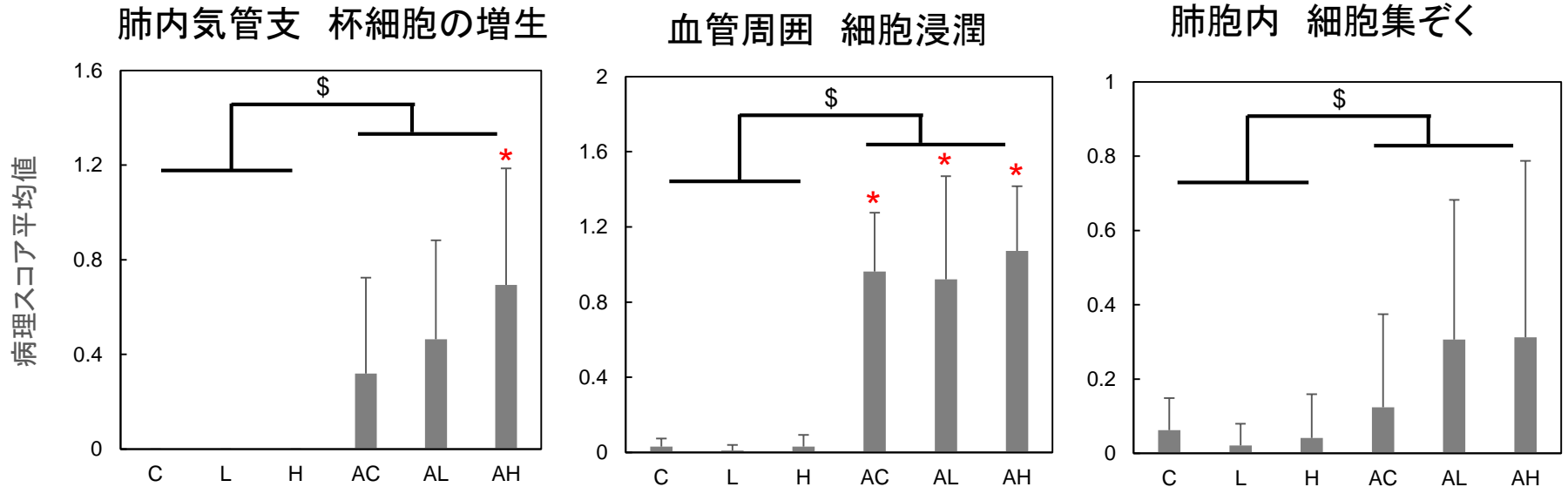


AH群



- AL群・AH群で、肺胞腔内の細胞集ぞく(↑)がやや多く認められた。
(ただし、すべてBALF回収後の組織像)

呼吸器系の組織所見まとめ



N=8

肺・右葉の6枚の切片のH&E染色

病理スコア: 0,1,2,3の平均値

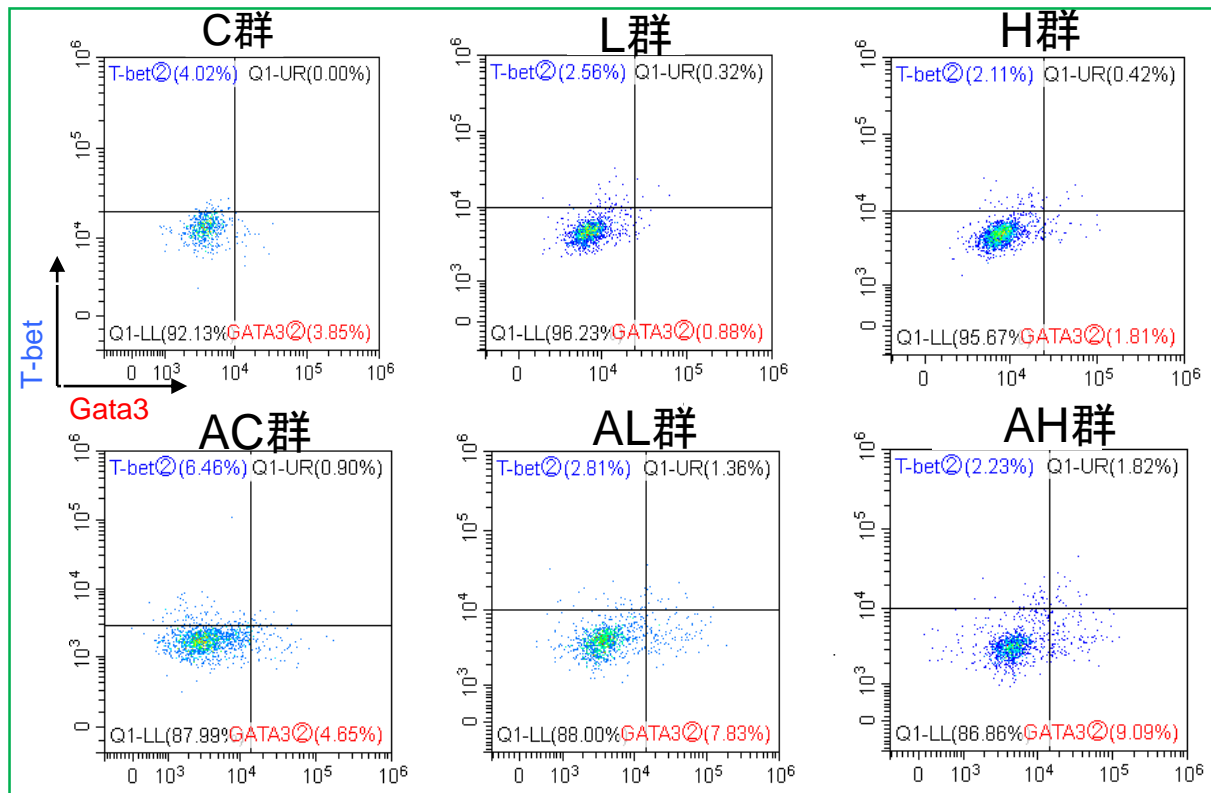
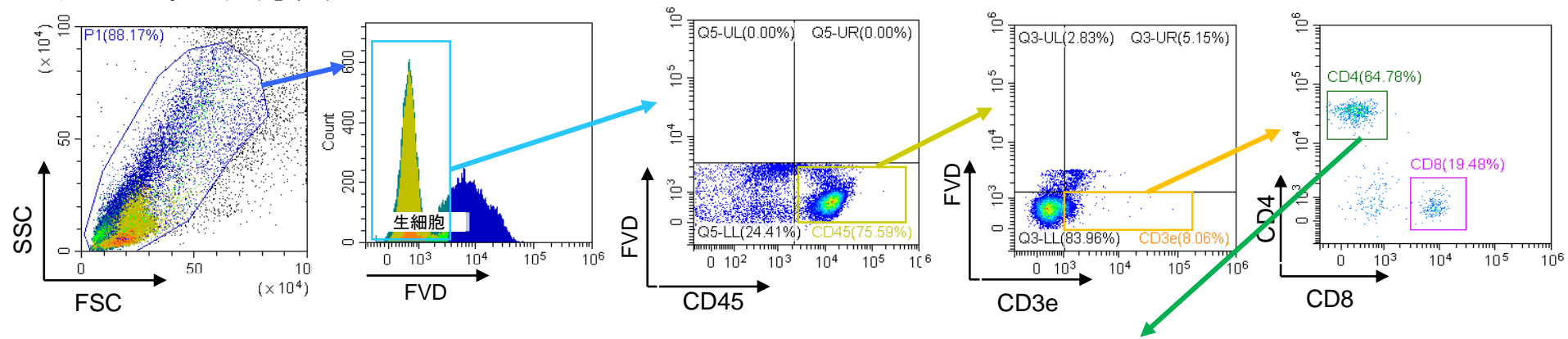
Steel Test *: $p < 0.05$; vs C群

Mann Whitney U-test \$: $p < 0.05$

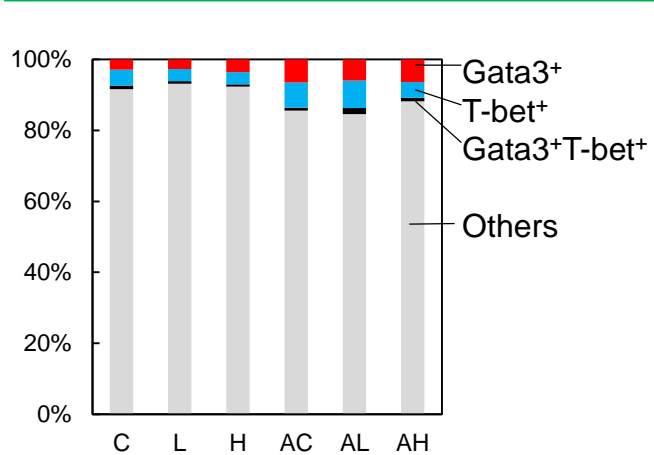
- 杯細胞の増生及び肺胞内細胞集ぞくについて、ばく露による増悪傾向が示された
- いずれも個体差が大きく、AC群に対する統計学的な有意差は認められなかった

肺組織中のリンパ球の集団解析

ゲーティング方法



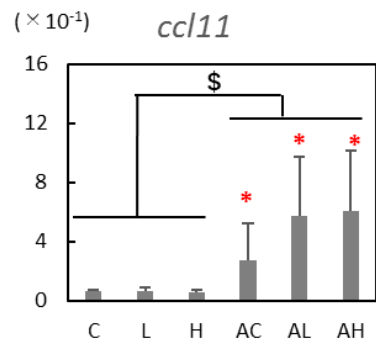
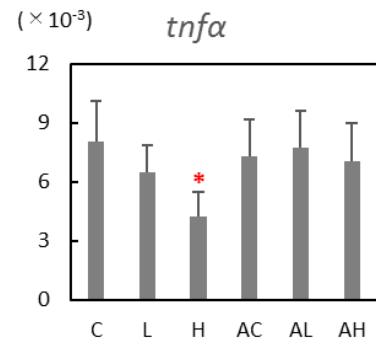
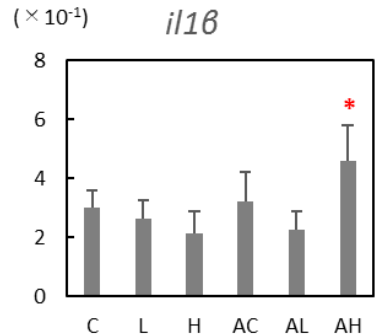
Gata3及びT-bet陽性細胞の割合



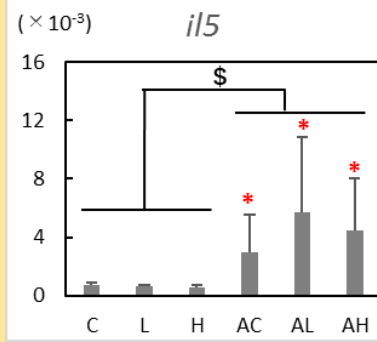
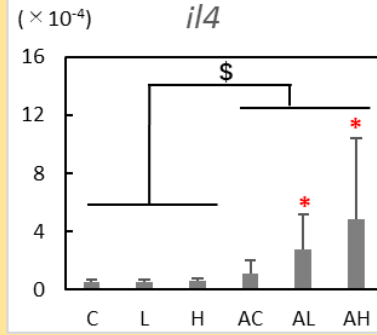
Gata3及びT-bet陽性細胞の割合がぜん息マウスで上昇したが (U-test; $p < 0.05$)、Gata3へのシフトは認められなかった

肺組織における遺伝子発現 (qRT-PCR)

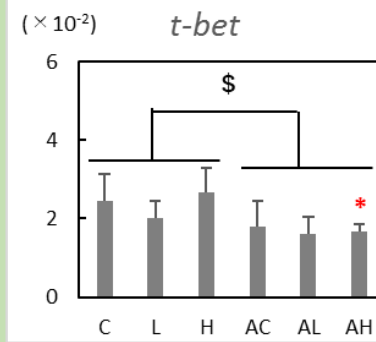
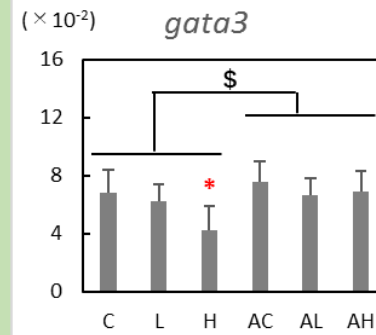
炎症関連



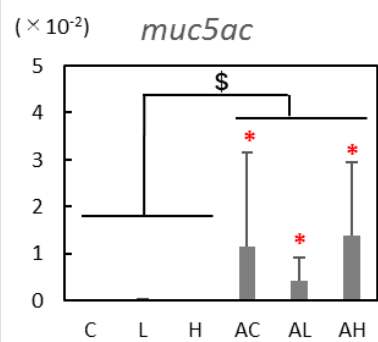
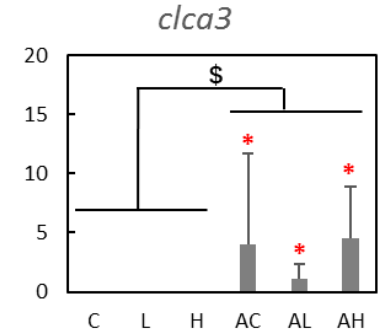
Th2サイトカイン



T細胞分化



粘液産生



Steel Test *: $p < 0.05$; vs C群
Mann Whitney U-test \$: $p < 0.05$

- ぜん息モデルマウスの影響が認められた。
- 好酸球マーカーのCCL11やTh2サイトカインはばく露群で高くなる傾向があるが、統計学的な有意差は認められなかった

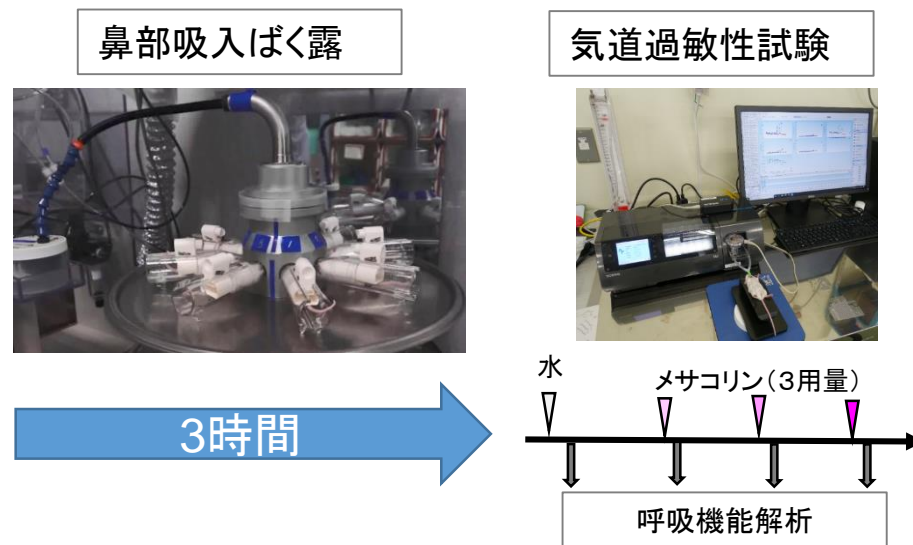
【実験 2】 単回ばく露実験 実験概要

■方法

被験物質	硫酸水素アンモニウム NH_4HSO_4
動物	BALB/c 雌マウス、15週齢
ばく露	硫酸水素アンモニウムの鼻部吸入ばく露、3時間
呼吸機能解析	3時間のばく露直後に、メサコリンを経気道的に噴霧し、各種の呼吸機能解析を行う 3用量のメサコリン刺激による応答を調べる
解析項目	呼吸抵抗、中枢気道抵抗、エラスタンス等
測定機器	オレンジサイエンス社 フレキシベント呼吸機能解析装置 FV-FX1

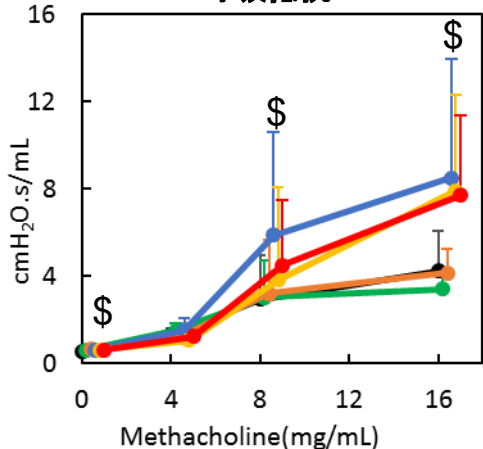
■群構成

群	ばく露濃度 (mg/m ³)	動物	動物数
対照(C)群	0	正常	4
低濃度(L)群	5	正常	6
高濃度(H)群	50	正常	6
対照(AC)群	0	ぜん息	6
低濃度(AL)群	5	ぜん息	4
高濃度(AH)群	50	ぜん息	5

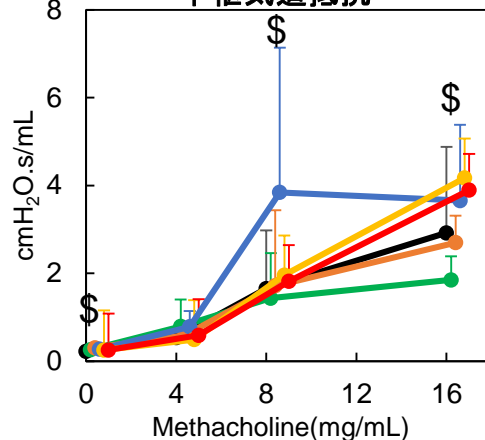


呼吸機能解析結果

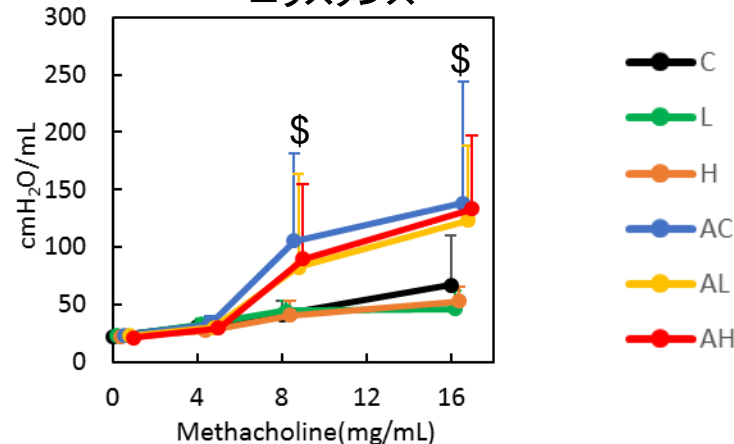
呼吸抵抗



中枢気道抵抗

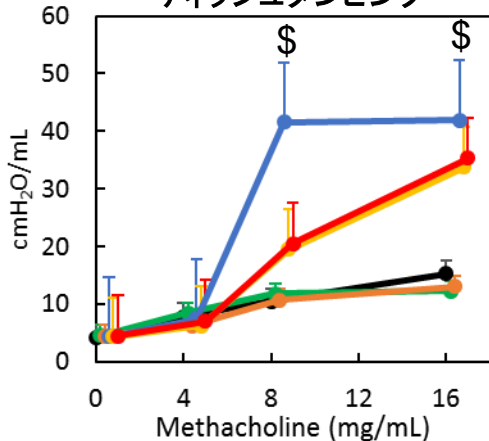


エラスタンス

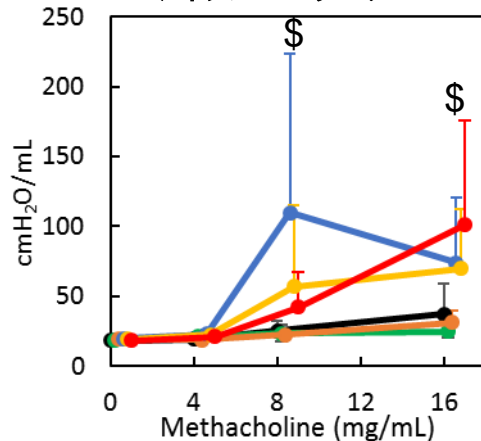


Student's t-test \$ $p < 0.05$
(C,L,H vs AC, AL, AH)

ティッシュダンピング



ティッシュエラスタンス



ばく露濃度

	目標値 (mg/m ³)	平均値±標準偏差 (mg/m ³)
L群/AL群	5	4.3±0.70
H群/AH群	50	45.7±2.9

- 気道過敏性試験における呼吸機能は、ぜん息モデルにおいて変化が認められたが、ばく露による影響はみられなかった。

考察・まとめ

- 2週間の反復ばく露による明確なぜん息増悪作用は認められなかった。しかし、複数の分析でその傾向が認められたことや、昨年度の実験との再現性から、硫酸水素アンモニウムが高濃度では増悪作用を有する疑いがある。
- 作用機序は不明だが、昨年度の細胞試験の結果からは、細胞膜間結合力が低下することでアレルゲンが侵入しやすくなった可能性があげられる。
- 既報の最高濃度 0.972 mg/m^3 でのぜん息モデルマウスへの3日間ばく露で影響は認められなかった(Cassee *et al.*, 1999)が、これは今回の実験よりもばく露の負荷が軽かったためと思われる。
- 明確な増悪影響は見られなかったものの、本研究の結果から、仮に 5 mg/m^3 を増悪作用の基準濃度と考えた場合(最小毒性濃度(LOAEC)など)、都内大気の年平均濃度(約 $0.1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$)をもとにすれば、ばく露マージンは50,000倍程度である。種差・個体差などを考慮しても、健康影響の出ないレベルであると考えられる。
- 呼吸機能解析の結果、単回ばく露では、ぜん息症状を有していても、刺激性物質や各種化学物質への感受性が高まるわけではないことが示唆された。