

第4章 硫酸アンモニウムばく露動物実験

第1節 正常マウスへの3か月吸入ばく露実験

1 目的

硫酸塩に健康影響の疑いがあることや^{1, 2)}、PM_{2.5}の構成成分の中で大きな割合を占める可能性が示されているが、硫酸アンモニウムの毒性試験はほとんど行われておらず^{3, 4)}、特に、マウスの呼吸器系に与える影響を調べた報告はない。また、長期的なばく露の影響を調べた報告例がない。そこで、本研究では、硫酸アンモニウムのばく露が与える亜慢性毒性を調べるため、正常マウスに対して3か月間の鼻部吸入ばく露実験を行った。

2 方法

(1) 実験動物

6週齢のBALB/cAnNCrIcrljの雌性マウスを購入し(日本チャールス・リバー)、馴化飼育後にばく露実験に供した。動物は、コンベンショナル飼育室にて、床敷(アルファドライプラス、ESP 益新)入りのプラスチック製ケージに4匹ずつ収容し、基礎飼料CE-2(日本クレア)と、限外ろ過した水道水を自由摂取させ、室温24±1℃、湿度50±5%、換気回数毎時10回(HEPAフィルター経由)、12時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

飼育及び動物実験は当センター動物実験実施規程に基づいて、動物実験委員会の事前審査及び承認を受け、その管理の下実施された。

(2) 吸入ばく露

ア 吸入ばく露装置

吸入ばく露は、エアコンプレッサーとフィルター・ドライヤー(IAC)に、吸入ばく露システム4式(シンファクトリー)を接続した設備で行った。各システムの構成は、レギュレーター、流量計、ミスト発生装置、鼻部ばく露チャンバー、ミスト回収用バブラー、排気系フィルター、排気流量コントローラー及び排気ポンプであった(図1)。ミスト発生装置には硫酸アンモニウム((NH₄)₂SO₄、試薬特級、富士フィルム和光純薬)を超純水に溶解した水溶液をそれぞれ90mLずつ入れた。

鼻部ばく露チャンバーは呼気が速やかに除去されるフローパスト式で、給気流量は各群ともにマウス1匹当たり0.3L/minとなるように設定した。マウスは保定器に入れ、鼻部ばく露チャンバーのポート部分に固定した(図1)。

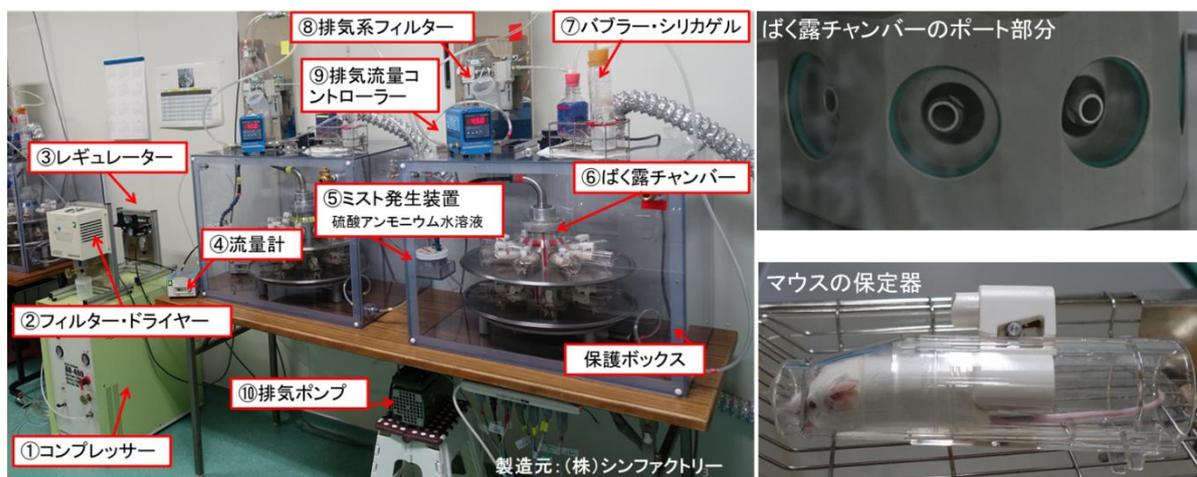


図 1. 吸入ばく露装置

イ チャンバー内ばく露濃度

硫酸アンモニウムの水溶液濃度とチャンバー内の空気中濃度の関係を知るため、ばく露チャンバーのポート部分にミニサンプラー（石英繊維フィルター）をセットし、流量 0.2 L/min で、20 分間硫酸アンモニウムのミストを採取した。フィルターに捕集された硫酸アンモニウムを蒸留水で抽出し、イオンクロマトグラフで硫酸イオンを分析することにより、ばく露チャンバー内の空気中濃度を算出した（第 2 章方法（2）イ参照）。

ウ ばく露濃度とばく露期間

3 か月間のばく露実験における濃度を設定するため、事前に少数のマウスを用い、ばく露を行わない対照群、硫酸アンモニウムを 500 mg/m³ ばく露する群及び 1,000 mg/m³ ばく露する群の 3 群に分け、1 日 3 時間のばく露を 3 日間連続する予備試験を行った。体重、臨床症状、病理組織学的解析、気管支肺胞洗浄液（以下 BALF と略す）の生化学分析を実施したところ、ばく露 2 日目以降に両ばく露群に有意な体重減少が見られ、特に 1,000 mg/m³ で顕著であったが、他の項目において顕著な変化は認められなかった。亜慢性毒性試験でばく露濃度を 500 mg/m³ 以上に設定すると動物が衰弱し実験を継続できないことが予想された。また、既報の硫酸塩の吸入ばく露実験の多くは、当時の大気環境中のワーストケースや職業ばく露の程度を想定して 0.1 から 1 mg/m³ 程度で実施されている⁵⁻⁷⁾。これらを考慮し、低濃度を 1 mg/m³、中濃度を 10 mg/m³、高濃度を 100 mg/m³ にそれぞれ設定することとした（表 1）。

表 1. 実験概要

動物	BALB/cAnNCrICrij 雌性マウス 9週齢
ばく露方法	吸入鼻部ばく露
期間	3か月間（94日間）、5日間／週、3時間／日
被験物質	硫酸アンモニウム（試薬特級）CAS No.7783-20-2
群構成と濃度	各群16匹 対照群： 0 mg/m ³ （清浄空気） 低濃度群： 1 mg/m ³ 中濃度群： 10 mg/m ³ 高濃度群： 100 mg/m ³

ばく露システムを 4 式用意し、対照群のばく露には清浄空気を用い、低濃度群、中濃度群及び高濃度群のばく露には、チャンバー内濃度が上記濃度になるように、ミスト発生装置にそれぞれ 0.01%、0.11%及び 1.1%の硫酸アンモニウム水溶液をセットした。

ばく露は、各群 16 匹の動物に対して、1 日 3 時間、週に 5 日間行い、2 日間の休息期間を設け、実験期間は 3 か月間（94 日間）とした（表 1）。ばく露濃度のモニタリングは、上記（2）イと同様の手法で、週 2 回、ばく露開始前に測定を実施し、ばく露期間 3 か月の間に合計 27 回行った。

エ 各ばく露濃度における硫酸アンモニウムミストの粒子径の測定

粒子状物質を除去したチャンバー（容積：366 L）内に、ばく露システムのミスト発生装置から硫酸アンモニウムの粒子を放出させ、12 段階に粒子径の分離が可能なステージを備える ELPI で粒子放出開始直後から 30 分間チャンバー内空気を採取した。ミストの放出流量 5 L/min、空気採取量 10 L/min の条件で、低濃度（0.01%溶液）、中濃度（0.11%溶液）及び高濃度（1.1%溶液）のそれぞれについてミストを採取した。ELPI の各ステージ（石英繊維フィルター）に捕集された硫酸アンモニウムを蒸留水で抽出し、イオンクロマトグラフで硫酸イオンを分析してミストの粒径分布を求めた（第 2 章方法（2）イ参照）。

（3）体重及び摂餌量

装置への馴化期間から実験終了までの期間、月曜日から金曜日まで毎日体重を測定した。また、金曜日と月曜日に残餌量を秤量することにより、それぞればく露期間の平均摂餌量（月曜日から金曜日）と、休息期間の平均摂餌量（土曜日及び日曜日）をマウス 1 匹当たりの摂餌量として算出した。

（4）剖検

ア 採血

動物は、ばく露最終日の翌日に、イソフルラン吸入麻酔下で腹大動脈から全採血した後、解剖に供した。血液は抗凝固剤 EDTA-2K を入れた試験管に採取した。新鮮血は、血液検査及びリンパ球サブセット分析に用い、4°C、3,000 rpm で 10 分間遠心することで得られた血漿を IgG 及び IgE の測定に供した。

イ 臓器の摘出及び主要臓器の重量測定

全ての動物から、気管、肺、心臓、肝臓、腸管、唾液腺、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、甲状腺、眼球、ハーダー腺、胸腺、縦隔リンパ節、脳（嗅脳を除く）、卵巣及び子宮を摘出した。肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、脳及び卵巣については臓器重量を測定した。各臓器の相対重量は体重 100 g 当たりの臓器重量として表した。

肺については、各群 16 匹のうち 8 匹は臓器重量を測定後、左葉を病理標本作製に、右葉は凍結して生化学あるいは分子生物学的解析に用いた。残りの 8 匹の肺については、全葉から BALF の回収を行った。

ウ BALF の回収

マウスを安楽死させた後に、1 mL の注射筒に 18G 翼静針（テルモ）を接続したものを気管に挿管し、2 mL の PBS (pH7.2) を 3 回に分けて注入し、肺全葉から 1.5 mL の洗浄液を回収した。回収した BALF を 1,500 rpm で 10 分間遠心し、沈殿を細胞数の計数に、上清は生化学的解析に用いた。

(5) 病理学的解析

摘出した主要臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液中で固定した。肺は注射筒を用いて気管から 10% 中性緩衝ホルマリン液を注入して固定した。包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色（以下 H&E 染色と略す）は定法により実施し、光学顕微鏡によって組織標本の観察を行った。

呼吸器については以下の部位を観察した。鼻腔は、先端部、切歯の後端部（部位 I）、切歯乳頭部（部位 II）及び第一臼歯前端部（部位 III）の 4 か所の横断面について、気管は、甲状腺の部位、気管支分岐部の手前及びその中間部の 3 か所の横断面を観察した。肺実質については、左葉は最大割面、右葉の前葉及び中葉は気管に沿った長軸方向の面、右葉後葉は最大割面、右葉副葉は横断面を観察した。

その他の主要臓器については最大割面を含む一般的な観察部位について検索した。

(6) 血液検査

多項目自動血球計数装置（KX-21NV、シスメックス）を用い、赤血球数、白血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均ヘモグロビン量、

平均ヘモグロビン濃度及び血小板数を測定した。また、塗抹標本を作製し、メイグリュンワルド・ギムザ染色を行い、光学顕微鏡観察により白血球を分類・計数することにより、各種の白血球の個数を算出した。

(7) 免疫学的解析

ア 血中の免疫グロブリン

血漿中の IgG 及び IgE の定量には、それぞれマウスを対象とした市販の Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) キット (アブカム) を用いた。

イ 末梢血中のリンパ球サブセット分析

溶血試薬 (ベックマンコールター) で赤血球を溶血させた後、白血球、B 細胞、T 細胞、ヘルパー T 細胞、キラー T 細胞及び死細胞の検出のため、それぞれ、APC-Cy-7 標識抗 CD45 抗体、PE 標識抗 CD19 抗体、APC 標識抗 CD3 抗体、FITC 標識抗 CD4 抗体、BV421 標識抗 CD8 抗体及び 7-AAD (いずれの蛍光試薬もベクトンディッキンソン) と反応させ、フローサイトメーター (CytoFlex S、ベックマンコールター) で計測・解析した。

(8) BALF 中の細胞数

BALF の沈殿を 2% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で再懸濁し、チュルク液で 5 分間染色した後、細胞計数用スライドグラスに滴下して総細胞数の計測を行った。また、再懸濁液を自動遠心塗抹装置 (サクラファインテック) により 2,000 rpm で 5 分間遠心分離し、メイグリュンワルド・ギムザ染色した。この塗抹標本を光学顕微鏡観察により診断し、白血球を分類・計数し、各種の白血球の個数を算出した。

(9) 生化学的解析

ア BALF 中の LDH 活性

呼吸器上皮への細胞毒性を評価するため、BALF の上清について、LDH の活性を吸光度計を用いた手法により測定し (LDH cytotoxicity Detection kit、タカラバイオ)、結果は吸光度で表した。

イ 肺組織のマロンジアルデヒド (以下 MDA と略す) 濃度

凍結した肺の右葉 (中・後・副葉) を 1.15% KCl 中でホモジェナイザー (マイクロテック・ニチオン) によりすりつぶし、定法によりチオバルビツール酸反応物質としての MDA 濃度を測定した。

(10) 分子生物学的解析

凍結した肺の右葉 (前葉) を凍結粉碎器 (安井器械) で粉碎し、組織片から

フェノール・クロロホルム抽出法により、total RNA を抽出し、逆転写キット（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて 1st strand cDNA を得た。*h2a*、*il-6*、*kc* 及び *ccl-2* に特異的なオリゴプライマーセット（表 2）を作製し、1st strand cDNA を用いて SYBR Green（サーモフィッシャーサイエンティフィック）による定量的 RT-PCR を行った。既知のコピー数の DNA の希釈系列を利用し、目的遺伝子の発現量を算出し、*h2a* の値で標準化した。

表 2. 定量的 RT-PCR に用いたプライマー

遺伝子名	Fwdプライマー配列 (5'→3')	Rvsプライマー配列 (5'→3')
<i>ccl-2</i>	TCAGCCAGATGCAGTTAACGC	TGATCCTCTGTAGCTCTCCAGC
<i>h2a</i>	CGTATCACCCCTCGTCACTT	TCAGCGATTTGTGGATGTGT
<i>il-6</i>	CCACGGCCTTCCCTACTTC	TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
<i>kc</i>	TGTCAGTGCCTGCAGACCAT	CCTCGCGACCATTCTTGAGT

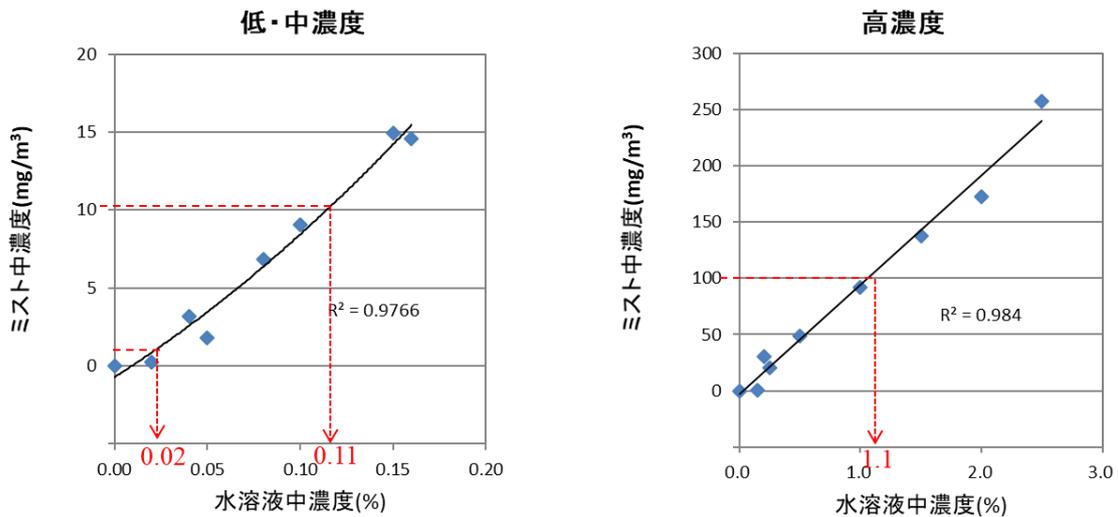
(11) 統計解析

対照群とばく露群との差異の検定には、体重・摂餌量・臓器重量・血液検査・BALF の白血球数及び肺の MDA 濃度については、Dunnnett の多重比較検定を、遺伝子発現解析と LDH 活性については Steel の多重比較検定を、また、病理組織学的解析における病理所見の出現率の差違については Fisher の正確確率検定を用い評価した。

3 結果

(1) 硫酸アンモニウムの水溶液中濃度とミスト中濃度の関係及び粒子径

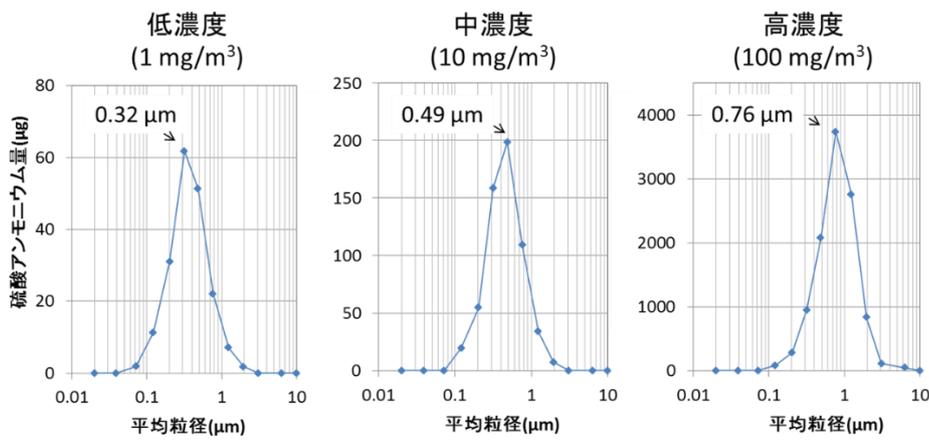
硫酸アンモニウムの濃度を 0.02 から 2.5%まで変えてミストを発生させ、水溶液中濃度とチャンバー内のミスト中濃度の関係を調べた結果、良好な相関関係が確認された（図 2）。これを基に、ばく露実験に用いる各濃度の硫酸アンモニウム水溶液を調製した。



赤矢印：実験で使用した3種類の水溶液濃度

図 2. 水溶液中濃度とミスト中濃度の関係

一方、低濃度、中濃度及び高濃度の硫酸アンモニウムのミストの最頻粒子径は、それぞれ、0.32、0.49 及び 0.76 μm であり、濃度が高いほど大きかった。いずれも、粒子の大部分は 2 μm 以下であった (図 3)。



矢印：最頻粒子径

図 3. 各濃度における粒子径分布

(2) 硫酸アンモニウムのばく露濃度

ばく露期間中に測定したチャンバー内の硫酸アンモニウム濃度の平均値は、それぞれ低濃度が $1.6 \pm 0.5 \text{ mg/m}^3$ 、中濃度が $11.1 \pm 1.6 \text{ mg/m}^3$ 及び高濃度 $108 \pm 13 \text{ mg/m}^3$ であり、3 か月間、おおむね目標濃度を維持することができた (図 4)。

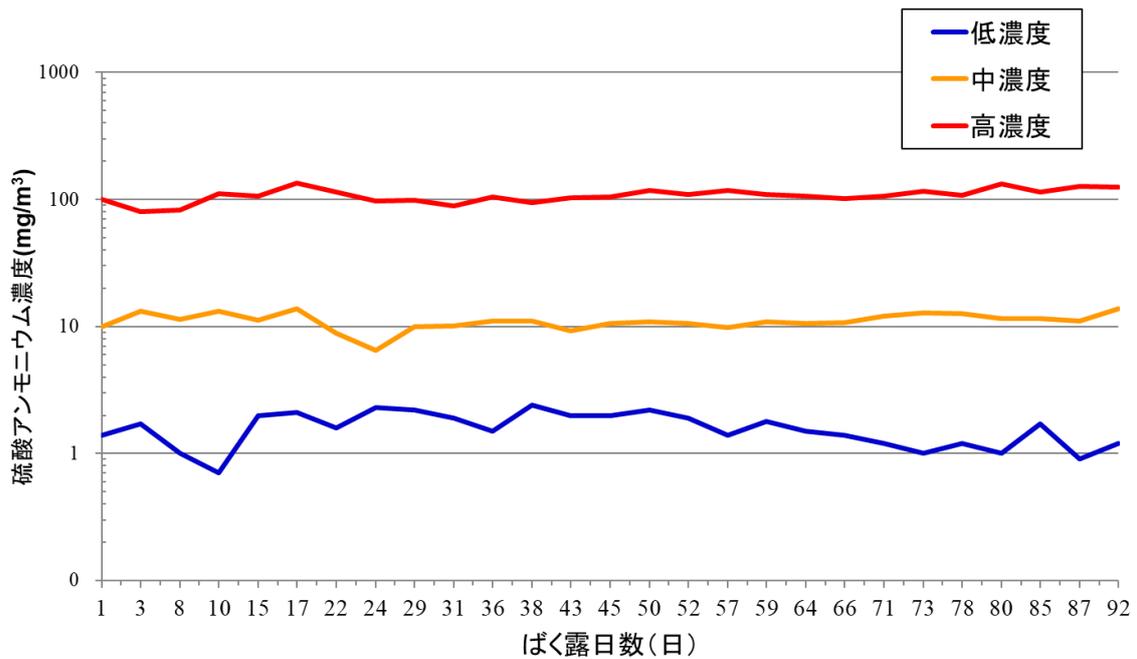


図 4. チャンバー内の硫酸アンモニウム濃度の推移

(3) 体重及び臓器重量

実験期間中の 3 か月間、対照群と比較して各ばく露群の体重に顕著な変化は認められなかった。全群で、3 か月間で 1 割程度 (2 g) の体重増加が見られ (図 5)、月曜日から金曜日のばく露期間にかけて減少し、週末の休息期間に回復するという変動を 1 週間ごとに繰り返した。対照群においても同様の変化が見られた。一方で、ばく露開始後 2 週間頃から、ばく露日である平日に、各ばく露群の体重が対照群に比べて減少する傾向が見られ、特に、低濃度群で有意に低値を示すことがあった (図 5)。

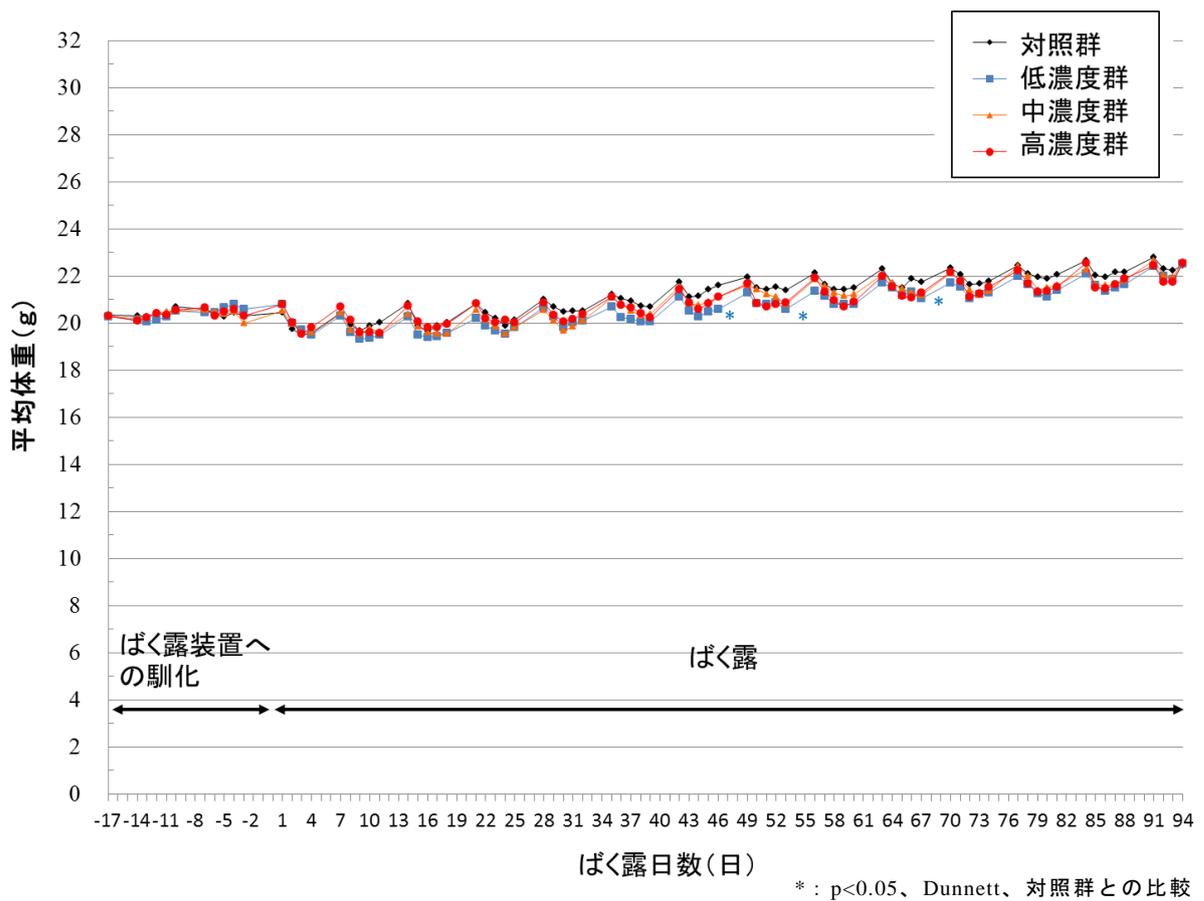


図 5. 実験中の体重推移

解剖時の体重は群間で有意差はなく（表 3）、主要臓器の重量（表 3）及び相対重量（表 4）にも顕著な変化は見られなかった。肺重量は対照群に比べて有意な変化は見られないが、ばく露群で低値を示す傾向にあった。また、卵巣の重量は低濃度群で有意に減少していた。なお、低濃度群の 1 例で、肝臓に自然発生とみられる巨大膿瘍が見られたため、他の個体と比べて重量が 4 割ほど大きく、異常値として表及び検定からは除外した。また、対照群の腎臓の異常な外れ値 1 例を除外し、高濃度群の副腎の 1 例に欠測があるため、それぞれ $n=15$ となった。

表 3. 解剖時の体重と臓器重量 (平均値±標準偏差)

項目		対照群 (n=16)	低濃度群 (n=16)	中濃度群 (n=16)	高濃度群 (n=16)
解剖時体重	(g)	22.2 ±0.8	21.8 ±1.1	22.1 ±0.6	22.0 ±0.8
副 腎 (左右)	(mg)	6.6 ±1.0	6.0 ±1.0	6.0 ±1.0	6.0 ±0.7 ^{c)}
卵 巢 (左右)	(mg)	8.6 ±2.0	7.0 ±2.1 [*]	7.3 ±1.2	7.5 ±1.8
胸 腺	(mg)	21.6 ±5.3	23.9 ±3.5	24.1 ±2.4	22.9 ±5.2
脾 臓	(mg)	92.1 ±13	102.9 ±55	90.4 ±8.8	87.1 ±12
腎 臓 (左右)	(mg)	295.2 ±22 ^{b)}	291.9 ±27	287.8 ±15	284.9 ±13
心 臓	(mg)	91.9 ±5.3	91.4 ±8.0	90.4 ±5.0	91.2 ±4.9
肺 ^{a)}	(mg)	260.5 ±31	255.4 ±28	249.7 ±35	245.7 ±38
脳	(mg)	418.6 ±28	421.3 ±10	419.5 ±10	419.4 ±7.8
肝 臓	(mg)	976.7 ±73	974.9 ±68 ^{d)}	999.8 ±58	980.3 ±84

a) n=8 b) ,c),d) n=15

* : p<0.05、Dunnett、対照群との比較

表 4. 相対重量 (体重 100g あたり) (平均値±標準偏差)

項目	単位	対照群 (n=16)	低濃度群 (n=16)	中濃度群 (n=16)	高濃度群 (n=16)
副 腎 (左右)	(mg)	29.7 ± 4.4	27.1 ± 5.0	27.0 ± 4.3	27.6 ± 3.7 ^{c)}
卵 巢 (左右)	(mg)	38.9 ± 9.2	30.8 ± 9.5 [*]	33.1 ± 5.5	34.1 ± 8.7
胸 腺	(mg)	97.6 ± 27	112.3 ± 16	108.7 ± 10	104.4 ± 25
脾 臓	(mg)	414.9 ± 59	530.1 ± 320	409.1 ± 43	396.7 ± 55
腎 臓 (左右)	(mg)	1328.0 ± 75 ^{b)}	1346.2 ± 110	1301.4 ± 66	1297.4 ± 63
心 臓	(mg)	413.9 ± 21	421.8 ± 29	408.7 ± 23	415.1 ± 21
肺 ^{a)}	(mg)	1189.8 ± 140	1202.3 ± 120	1141.0 ± 160	1117.7 ± 150
脳	(mg)	1885.8 ± 140	1933.2 ± 96	1896.8 ± 52	1910.4 ± 77
肝 臓	(mg)	4396.4 ± 300	4595.5 ± 470 ^{d)}	4518.8 ± 230	4456.6 ± 300

a) n=8 b) ,c),d) n=15

* : p<0.05、Dunnett、対照群との比較

(4) 摂餌量

全群において、摂餌量は実験期間の 3 か月間を通して顕著な変化は見られなかったが (図 6)、体重と同様に、ばく露期間と休息期間で違いが見られ、平日には少なく、週末には多いという変動を繰り返した。また、各ばく露群で、対照群に比べて摂餌量がやや少ない傾向にあり、特に、高濃度群で有意に低値を示すことが多かった (図 6)。

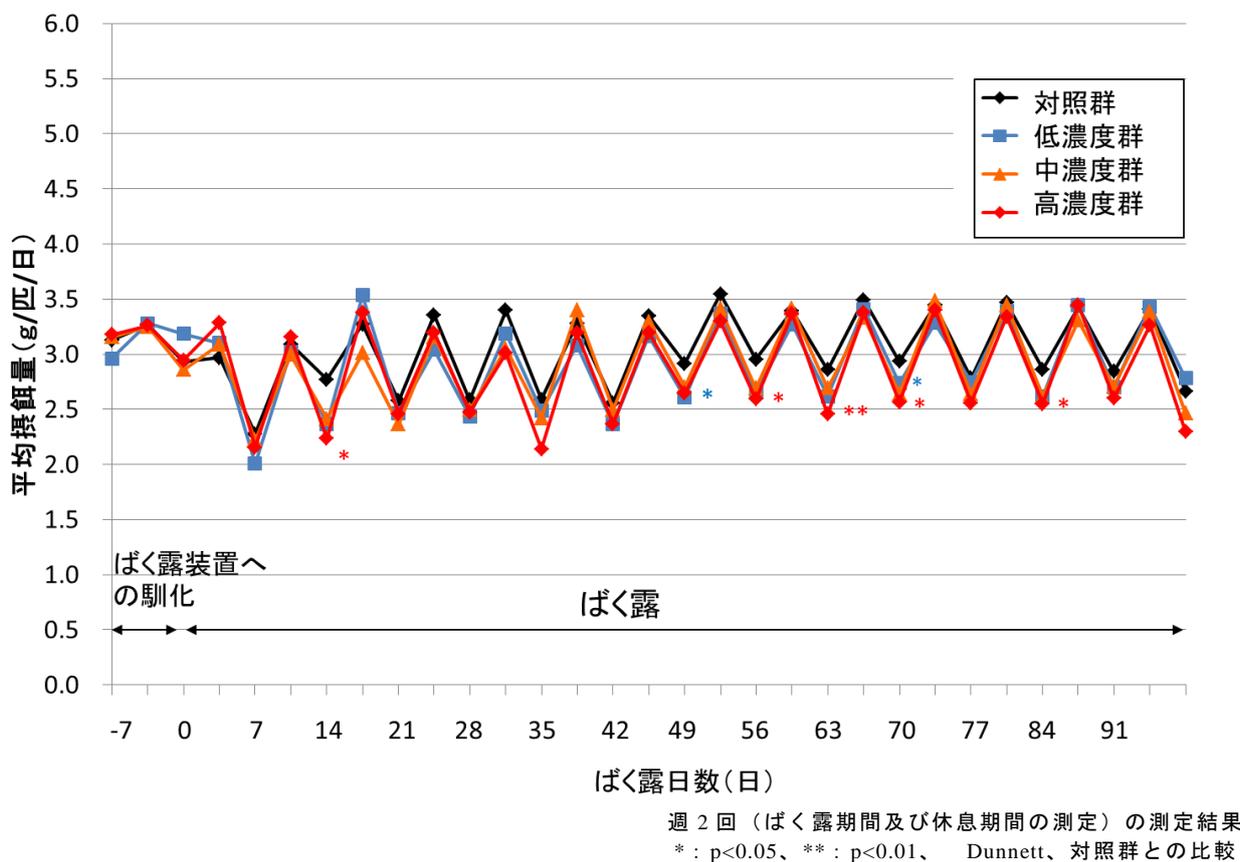


図 6. 実験中の摂餌量推移

(5) 病理組織学的解析

剖検時、中濃度群の 1 例及び高濃度群の 2 例の肺において、赤色を呈し、空気の含有量が少ない領域が部分的に見られたが、組織標本の観察においては、その部位に特に異常は認められなかった。

鼻腔については、ガス状刺激物質のばく露により、部位 II の背側の嗅上皮が障害を受けやすいことから、特にこの部位に着目して観察したが、嗅上皮の変化は認められなかった。その他の観察部位においても、炎症性細胞の浸潤、杯細胞の増生、線毛の消失及び上皮の変性剥離等、吸入ばく露により予想される変化は認められなかった (表 5・図 7)。ただし、先端部において、低濃度群に 1 例、中濃度群に 1 例、高濃度群に 2 例、重層扁平上皮の軽度な肥厚及び粘膜下組織に細胞浸潤を伴う微弱な炎症像が認められた (表 5・図 8)。しかし、炎症反応は限局的で軽度なものであり、上皮細胞の壊死や顕著な細胞の増生を伴うものではなく、統計学的にもばく露の影響とは結論できない所見であった。

表 5. 呼吸器系の病理検索結果

組織・部位	所見	病変の見られた動物数				
		対照群 n=16	低濃度群 n=16	中濃度群 n=16	高濃度群 n=16	
鼻腔 先端部	重層扁平上皮	炎症性細胞浸潤	0	1	1	2
部位 I	重層扁平上皮	肥厚	0	0	0	0
	呼吸上皮	炎症性細胞浸潤	0	1	0	0
		線毛消失	0	0	0	0
		壊死	0	0	0	0
部位 II	重層扁平上皮	炎症性細胞浸潤	0	0	0	0
		肥厚	0	0	0	0
	呼吸上皮	線毛消失	0	0	0	0
		壊死	0	0	0	0
	嗅上皮	壊死	0	0	0	0
部位 III	呼吸上皮	線毛消失	0	0	0	0
		壊死	0	0	0	0
	嗅上皮	壊死	0	0	0	0
気管・気管支		線毛消失	0	0	0	0
		粘液貯留	0	0	0	0
		杯細胞の増生	0	0	0	0
		気管及び気管支平滑筋肥大	0	0	0	0
		気管上皮の変性（線毛消失）	0	0	0	0
		好酸球浸潤	0	0	0	0
		炎症性細胞浸潤	0	0	0	0
		気管/気管支周囲線維化	0	0	0	0
肺実質（細気管支～肺胞）		被膜下における細胞浸潤	2	2	1	2
		細気管支周囲の細胞浸潤	3	0	1	2
		マクロファージ集簇	1	0	0	1
		局所性炎症	0	0	0	1
		肉芽腫様炎症	0	0	0	0
		肺胞上皮の肥大	0	0	0	0
		肺胞壁線維化	0	0	0	0

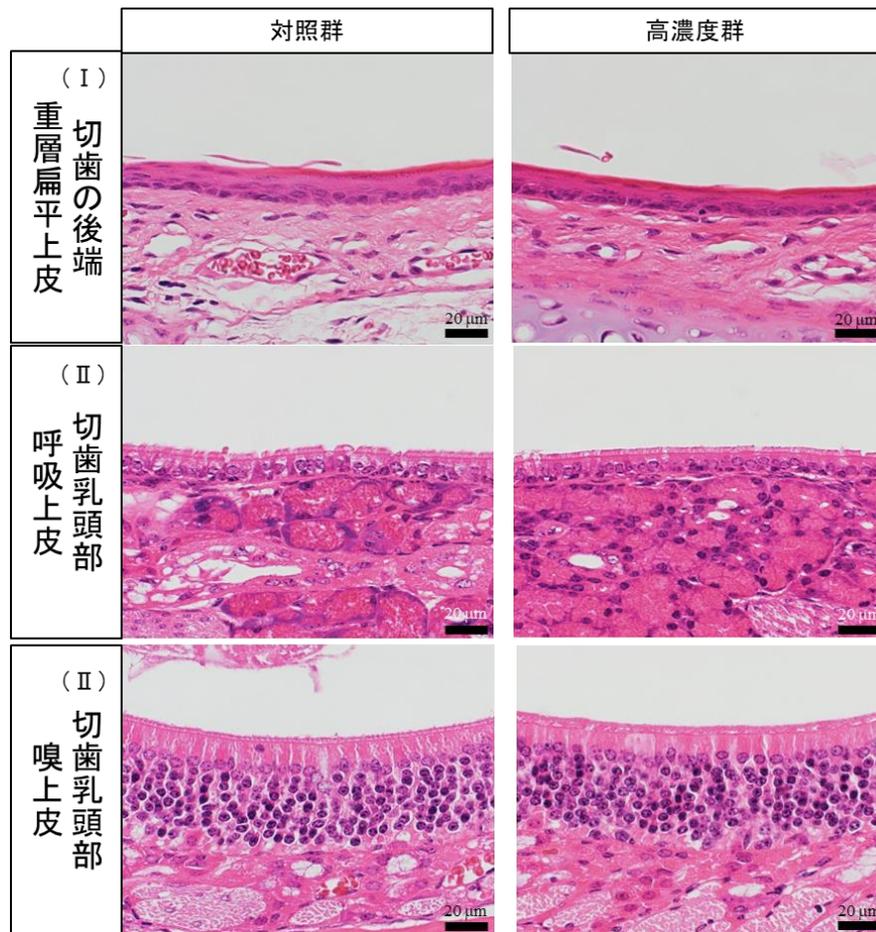


図 7. 鼻腔各部の組織像 (H&E 染色)

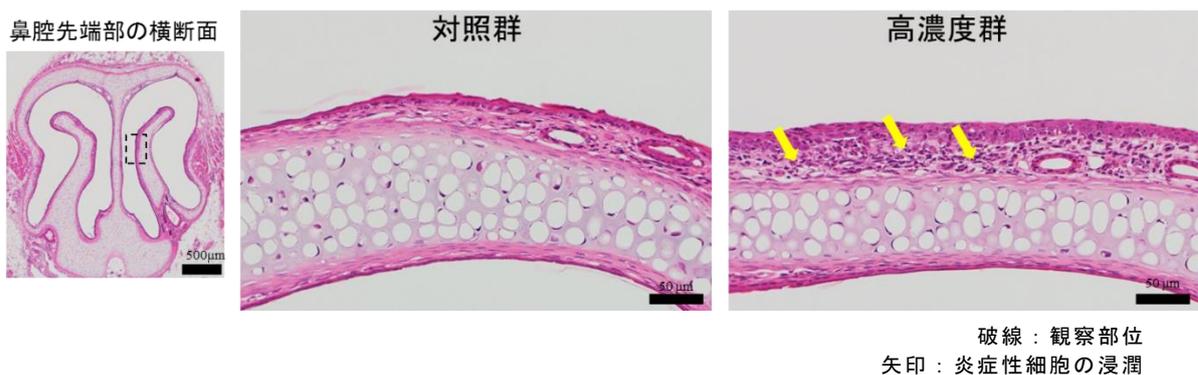


図 8. 鼻腔の先端部に見られた炎症巣 (H&E 染色)

気管・気管支については、ぜん息モデル動物で観察されるような上皮の肥厚、杯細胞の増生、粘膜下織への好酸球及び形質細胞の浸潤は見られなかった(表 5)。

肺実質については、肺の被膜下における細胞浸潤、細気管支周囲の細胞浸潤が対照群及びばく露群で見られ、これらの出現頻度にばく露の影響は認められなかった(表 5、図 9)。各群とも、実験に供した動物のうち半数(8匹)については解剖時に BALF の採取を行わずにホルマリン固定して観察したが、肺胞腔

内のマクロファージは、対照群及びばく露群とも、少数観察されたのみであった。

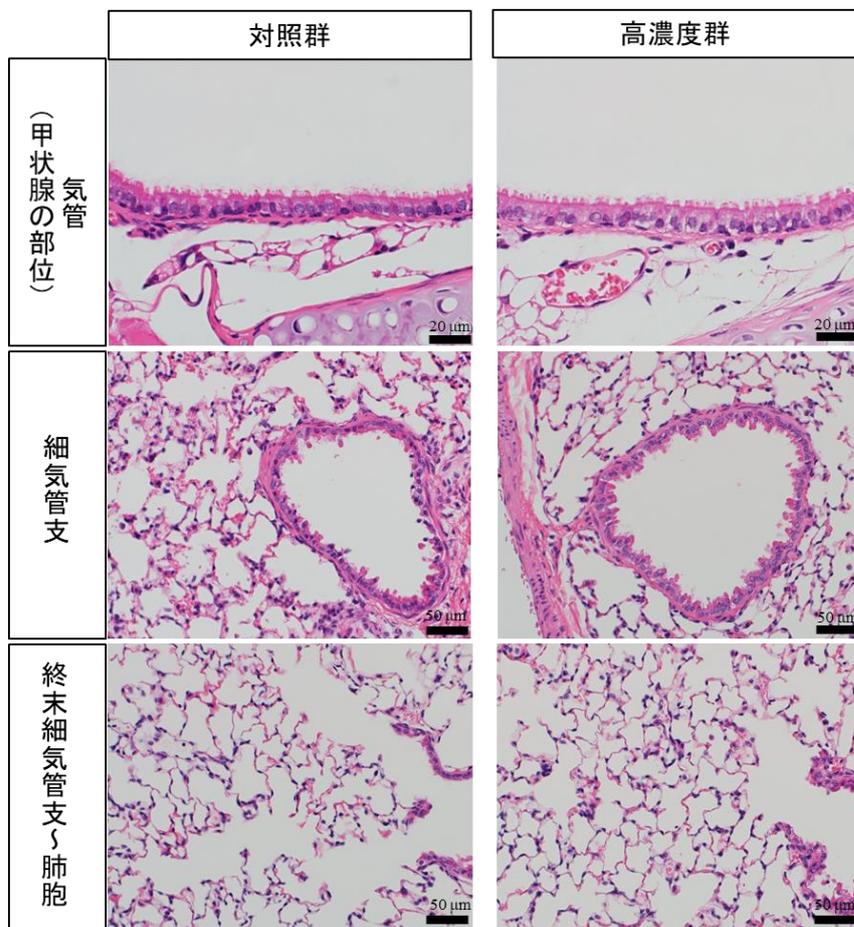


図 9. 気管及び肺実質の組織像 (H&E 染色)

他の主要臓器については、自然発生病変として、肝臓で炎症性細胞浸潤、腎盂⁵の炎症、心外膜における鉍質沈着、副腎の被膜下細胞の軽度過形成、眼球角膜の炎症及び鉍質沈着等が散見されたが、それぞれの変化の発現頻度にばく露による影響は認められなかった (表 6)。低濃度群の 1 例の肝臓に、多数の好中球集簇^{しゅうぞく}と壊死を伴う巨大膿瘍が観察され、これは自然発生病変と考えられる (表 6 からは除外)。なお、この個体については、臓器重量、血液検査及び免疫学的解析においても異常値を示したため、解析からは除外した。

表 6. 主要臓器の病理検索結果

組織	所見	病変の見られた動物数			
		対照群 n=16	低濃度群 n=16	中濃度群 n=16	高濃度群 n=16
肝臓	炎症性細胞浸潤	4	7	5	6
	限局性肝細胞空胞変性	2	0	0	0
	肝細胞小壊死巣	1	1	3	1
腎臓	腎盂 炎症性細胞浸潤	1	1	1	0
	尿細管の萎縮	3	0	0	1
	尿細管拡張	0	0	0	0
	嚢胞	1	1	0	0
	尿細管壊死	1	0	0	0
	再生尿細管	0	2	2	0
心臓	心外膜 鈣質沈着	3	1	2	2
	心筋変性	0	0	0	2
脳	表皮嚢胞	1	0	0	0
副腎	被膜下細胞軽度過形成	16	16	16	15
下垂体	偽嚢胞	0	1	2	0
	嚢胞	1	0	0	0
眼球	角膜鈣質沈着	7	5	6	3
	角膜支質炎症性細胞浸潤	4	2	0	1

(6) 血液検査

対照群と比較して、いずれの項目にも統計学的に有意な変化は見られなかった (表 7)。白血球数は低濃度群ではやや多いのに対し、中濃度群及び高濃度群がやや少ない傾向にあった (表 7)。

表 7. 血液検査の結果 (平均値±標準偏差)

項目	単位	対照群 (n=16)	低濃度群 (n=15) ^{a)}	中濃度群 (n=15) ^{b)}	高濃度群 (n=16)
白血球数	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	21.6 ± 8.9	26.1 ± 13	19.4 ± 7.5	18.1 ± 5.6
好中球	($/\mu\text{L}$)	2.6 ± 1.3	3.6 ± 1.4	2.9 ± 1.9	3.3 ± 1.3
リンパ球	($/\mu\text{L}$)	9.7 ± 4.2	12.3 ± 5.7	8.5 ± 3.2	7.8 ± 3.3
単球	($/\mu\text{L}$)	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
好酸球	($/\mu\text{L}$)	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2
赤血球数	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	914.8 ± 37	921.7 ± 22	904.2 ± 29	899.3 ± 46
ヘモグロビン濃度	(g/dL)	13.8 ± 0.5	13.9 ± 0.4	13.7 ± 0.4	13.5 ± 0.7
ヘマトクリット値	(%)	45.9 ± 2.0	46.2 ± 1.2	45.4 ± 1.4	45.0 ± 2.3
平均赤血球容積	(fL)	50.2 ± 0.4	50.1 ± 0.4	50.2 ± 0.4	50.1 ± 0.5
平均ヘモグロビン量	(pg)	15.1 ± 0.2	15.0 ± 0.2	15.2 ± 0.2	15.0 ± 0.3
平均ヘモグロビン濃度	(g/dL)	30.2 ± 0.4	30.0 ± 0.2	30.2 ± 0.4	30.0 ± 0.5
血小板数	($\times 10^4/\mu\text{L}$)	98.0 ± 6.1	96.5 ± 7.3	94.0 ± 11	101.0 ± 12

a) 異常値のため1例除外 b) 1例欠測

(7) 免疫学的解析

血中の免疫グロブリンについては、各群 8 匹ずつの試料を分析したが、IgG 及び IgE は群間で差は認められず、IgE はほとんどの個体で検出下限値未満であった。

また、末梢血中のリンパ球サブセットの構成に統計学的に有意な変化は見られなかった (表 8)。

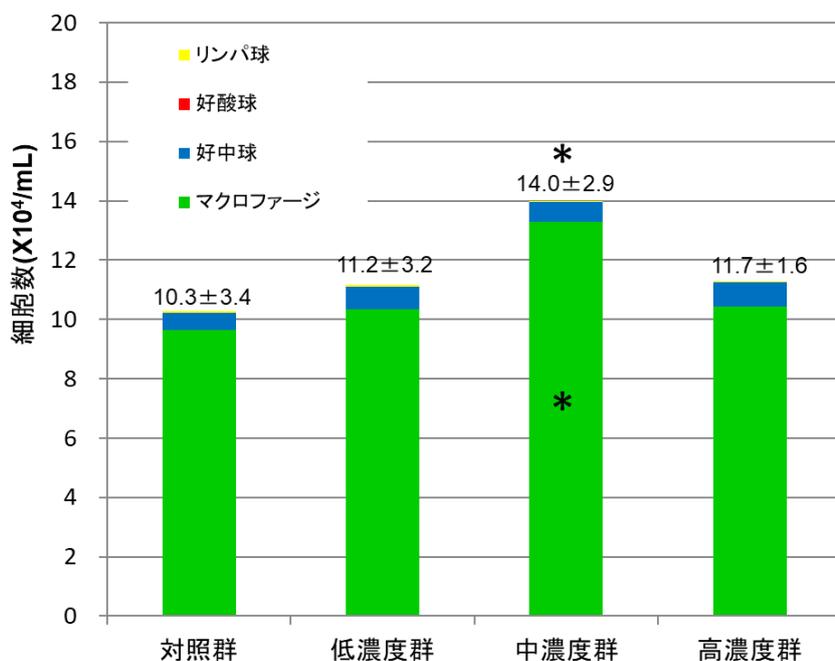
表 8. 末梢血中のリンパ球サブセットの構成 (平均値±標準偏差)

リンパ球サブセット	(単位)	対照群 (n=16)	低濃度群 (n=15) ^{a)}	中濃度群 (n=15) ^{b)}	高濃度群 (n=16)
CD45 ⁺ (白血球)	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	21.6 ± 8.9	26.1 ± 13	19.4 ± 7.5	18.1 ± 5.6
CD3 ⁺ (Tリンパ球)	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	8.1 ± 3.3	10.5 ± 5.1	7.5 ± 3.1	7.1 ± 2.7
CD4 ⁺ (ヘルパーT細胞)	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	6.3 ± 2.5	8.1 ± 3.9	5.8 ± 2.3	5.5 ± 2.1
CD8 ⁺ (細胞障害性T細胞)	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	1.7 ± 0.7	2.2 ± 1.1	1.6 ± 0.7	1.4 ± 0.6
CD19 ⁺ (B細胞)	($\times 10^2/\mu\text{L}$)	5.3 ± 3.1	6.6 ± 4.2	4.6 ± 2.9	3.4 ± 1.4

a) 異常値のため1例除外 b) 1例欠測

(8) BALF 中の細胞数

全ての群において、細胞種の構成は大半がマクロファージであり、好中球や好酸球の割合は低かった (図 10)。総細胞数及びマクロファージ数が、中濃度群のみで、対照群に比べて有意な増加が見られた。



グラフ上部の数値は総細胞の平均値±標準偏差

* : p<0.05、Dunnett、対照群との比較

図 10. BALF 中の細胞数

(9) 生化学的解析

肺の上皮細胞の障害性を評価するため、BALF 中の LDH 活性を調べたが、いずれの群も同程度の数値であり、対照群と各ばく露群の間に有意差は認められなかった (表 9)。

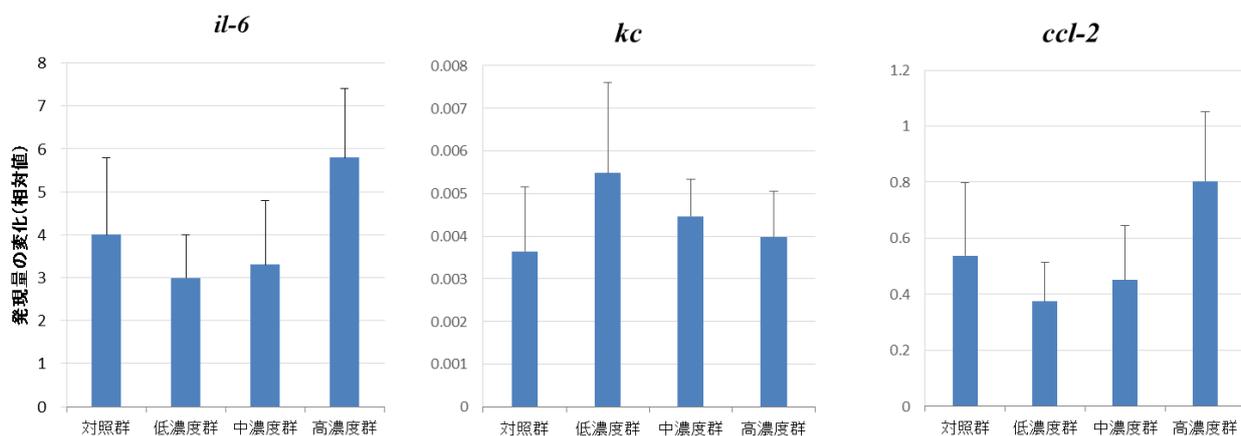
また、酸化ストレスの評価を目的として、過酸化脂質の指標の一つである MDA を肺組織について分析したが、各群で同レベルであり、ばく露の影響は認められなかった (表 9)。

表 9. 肺組織の障害性 (平均値±標準偏差)

	対照群 (n=8)	低濃度群 (n=8)	中濃度群 (n=8)	高濃度群 (n=8)
BALF中のLDH活性 (吸光度 (490-600nm))	0.71 ± 0.19	0.69 ± 0.19	0.59 ± 0.15	0.66 ± 0.18
肺組織のMDA (nmol/100mg Lung)	13.9 ± 8.0	13.3 ± 5.5	9.3 ± 2.1	8.4 ± 1.9

(10) 分子生物学的解析

肺実質における炎症関連遺伝子の発現は、いずれも対照群と同程度であった。*il-6* 及び *ccl-2* では、高濃度で発現量がやや上昇していたが、対照群に対する変化は 1.5 倍程度であり、統計学的な有意差は見られなかった (図 11)。



発現量は *h2a* 遺伝子で標準化された相対値
エラーバーは標準偏差

図 11. 肺実質における炎症関連遺伝子の発現

4 考 察

1、10 及び 100 mg/m³ の硫酸アンモニウム吸入ばく露による 3 か月間の亜慢性毒性試験において、種々の評価を実施したが、正常マウスにほとんど影響を及ぼさないことが分かった。硫酸アンモニウムのミストが気道の刺激性を持つことは知られているが、それは硫酸と比べると 10 分の 1 程度であり、他の硫酸塩よりも低いと言われている⁸⁾。今回、体重と摂餌量の減少と増加の周期的な変化が認められ、その低下傾向がばく露群では、やや強かったため、ミストの刺激によるストレスが示唆される。しかし、硫酸アンモニウムの連続ばく露は、呼吸器系をはじめとした各臓器に器質的な変化を生じさせるものではなかった。鼻腔先端部の炎症等、ばく露群でのみ観察された組織学的な所見もあるが、有意な発生率ではなく、濃度依存性もないことから、ばく露の影響とは考えにくい。また、肺組織における炎症細胞やマクロファージの集簇等の特筆する所見はなく、これは、遺伝子発現及び BALF 中 LDH 活性の結果とも良く一致するものである。BALF 中のマクロファージ数が中濃度で有意に高かったが、特に、組織学的にマクロファージの数や形態等関連する所見は認められなかった。そのほか、いずれの評価項目においても、ばく露の影響を強く疑わせる変化は見られなかった。

今回のばく露条件では、硫酸アンモニウムの最頻粒子径は、低濃度 0.32 μm、中濃度 0.49 μm、高濃度 0.76 μm であり、都内大気中の粒子 0.49 μm と同程度であり、Pepelko ら³⁾のラット 14 日間の吸入ばく露実験の粒子径 (1 から 2 μm) よりは、やや小さかった。どちらの実験においても、肺の深部まで十分に到達すると考えられる粒子径であった。また、既報のラットのばく露実験と同様に³⁾、硫酸アンモニウム濃度が低いほど、ミストの粒子径が小さくなっていた。粒子径が小さいほど、肺の深部へ到達し、肺実質で影響を強く及ぼすことも考えられたが、それを明確に示す結果は得られなかった。

これまで報告されているばく露実験の結果は、いずれも硫酸アンモニウムの毒

性は低いことを示唆しており^{2, 3, 7, 9)}、今回、顕著な変化が認められなかったことはこれらに矛盾しない。既報の吸入ばく露実験の結果のうち、最も強い作用が見られたのはモルモットである。Pepelko らの予備的な急性毒性試験ではモルモットは 800 から 900 mg/m³ のばく露でほぼ半数が死亡したとされている³⁾。これは、硫酸等そのほかの被験物質の高濃度ばく露でも報告されているように咽頭痙攣や閉塞性の気管支収縮が死因とされている。吉田らと北畠らの報告では、モルモットの実験において、0.4 から 10 mg/m³ までのばく露濃度でぜん息の増悪作用が呼吸困難強度として認められたが、感作していない動物へのばく露では対照群と同程度の結果であったため^{4, 10, 11)}、正常動物への硫酸アンモニウム作用は比較的低いと考えられる。ただし、1 mg/m³ 程度のばく露で、肺胞上皮の肥大や過形成等、組織学的な変化が報告されている⁵⁾。

一方、そのほかの動物に及ぼす硫酸アンモニウムの影響は極めて限定的である。例えば、Pepelko らのラットへの 300 mg/m³ の 1、3、7 及び 14 日間のばく露実験では、組織学的、血液学的及び呼吸機能の解析において、変化は認められず、1000 から 1200 mg/m³ の高濃度のばく露でも死亡個体は見られなかった³⁾。エラスターゼ投与によるラットの肺気腫様モデル動物への 1 mg/m³ 吸入ばく露実験では、モデル動物への増悪は見られないが、正常個体への硫酸アンモニウムばく露により、肺機能の測定で残気量の低下、残気率（残気量/全肺気量）の上昇等のわずかな変化が認められた¹²⁾。また、ごく微弱な変化ではあるが、正常動物においても肺胞の拡張すなわち肺気腫様症状が見られたとされている⁵⁾。これは、電子顕微鏡による形態計測学的な解析で検出できる変化であり、今回の 3 か月ばく露で、同様の現象が起こっていても、一般的な標本作製及び光学顕微鏡による組織観察では検出できなかったと考えられる。

近年の硫酸アンモニウムを被験物質とした研究¹³⁾において、*in vitro* 試験で硫酸アンモニウムばく露による活性酸素種（以下 ROS と略す）のわずかな増加が認められたものの、気管内投与されたマウスで酸化ストレスの評価はなされておらず、*in vivo* での影響は不明確である。本研究では、少なくとも MDA による ROS の評価では硫酸アンモニウムの影響は見られなかった。一過性で微弱な変化を動物実験の系で捉えることが難しかったと推測される。さらに、ヒトの吸入ばく露実験でも顕著な影響は見られていない。例えば、1970 年代のロサンゼルスの大霧に相当する濃度の硫酸アンモニウム塩や硫酸ミストを、ぜん息患者や健常者に運動をさせながらばく露した実験で全く影響は見られなかった。¹⁴⁾ また、ぜん息患者に 1 mg/m³ の濃度で 16 分間吸入させた実験でも影響はほとんど見られず、特異的気道コンダクタンスがわずかに低下したが対照群との有意差はなかった⁶⁾。

感受性の高いモルモットにおいて刺激性により起こると推測される影響を除けば、基本的に、硫酸塩の生体内反応は非常に弱いと考えられており、明確な毒性経路は想定されない。硫酸アンモニウムは生体内で速やかに硫酸イオンとアンモニウムイオンになるが、これらのイオンは正常な動物の体内で多量に存在してお

り、吸入された量の影響は無視できるレベルである。例えば、環境基準値（年平均値 $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）レベルの $\text{PM}_{2.5}$ を1日中吸入した場合でも硫酸イオンの量は 0.075 mg と試算され¹⁾、血中の硫酸イオン量である 170 mg の2,200分の1以下となる。一方で、Utellらはヒトの吸入ばく露実験で硫酸ガスや種々の硫酸塩のミストをばく露し、エアロゾルの酸性度（pH）に関連した影響の強さを認めたため⁹⁾、プロトンが気管支の平滑筋に作用するなどの機序も想定される。しかし、呼吸器上皮に酸性度の高い粒子が沈着しても速やかに中和されるとの報告もあり¹⁵⁾、Utellらの実験でも、硫酸アンモニウムのpHは4.8程度の比較的弱い酸であるため、有意な影響は出なかった⁶⁾。なお、本実験で使用した水溶液は、いずれもpH7付近であった。

今回の亜慢性ばく露実験からは、硫酸アンモニウムの吸入ばく露による影響は認められなかった。

5 文 献

- 1) 嵯峨井 勝：日衛誌，**74**, 1-11, 2019.
- 2) Schlesinger, R. B., Cassee, F.: *Inhal Toxicol*, **15**, 197-235, 2003.
- 3) Pepelko, W. E., Mattox, J. K., Cohen, A. L.: *Bull Environ Contam Toxicol*, **24**, 156-160, 1980.
- 4) 吉田克己，今井正之，北畠正義，他：三重大学環境科学研究紀要，**4**, 1-11, 1979.
- 5) Busch, R. H., Buschbom, R. L., Cannon, W. C., et al.: *Environ Res*, **33**, 454-472, 1984.
- 6) Utell, M. J., Morrow, P. E., Speers, D. M., et al.: *Am Rev Respir Dis*, **128**, 444-450, 1983.
- 7) Schlesinger, R. B.: *Environ Health Perspect*, **79**, 121-126, 1989.
- 8) Amdur, M. O., Bayles, J., Ugro, V., et al.: *Environ Res*, **16**, 1-8, 1978.
- 9) Utell, M. J.: *Environ Health Perspect*, **63**, 39-44, 1985.
- 10) 北畠正義，今井正之，富田泰子，他：大気汚染学会誌，**16**, 239-243, 1981.
- 11) 北畠正義，今井正之，小林 勇，他：大気汚染学会誌，**14**, 8-15, 1979.
- 12) Loscutoff, S. M., Cannon, W. C., Buschbom, R. L., et al.: *Environ Res*, **36**, 170-180, 1985.
- 13) Yun, Y., Gao, R., Yue, H., et al.: *Environ Sci Technol*, **51**, 11401-11411, 2017.
- 14) Avol, E. L., Jones, M. P., Bailey, R. M., et al.: *Am Rev Respir Dis*, **120**, 319-327, 1979.
- 15) Larson, T. V., Covert, D. S., Frank, R., et al.: *Science*, **197**, 161-163, 1977.