

第2節 ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露実験

I 目的

各種の硫酸塩の吸入ばく露がぜん息症状に与える影響について、多少の知見がある。しかし、それらの多くは、ぜん息患者への吸入試験や¹⁻³⁾、ぜん息モデルのモルモットへの吸入ばく露試験⁴⁻⁶⁾により呼吸機能への影響を評価したものであり、組織学的・免疫学的に詳細に解析した報告は少ない。また、モルモットは気道過敏性が高い特性を持つため、他のモデル動物での評価が重要であるが、いくつかのラット・ウサギの報告に限られている。特に、マウスに関しては情報が少なく、ぜん息モデルマウスへ反復ばく露した実験一報のみである⁷⁾。この報告では、粒子径 0.085 μm あるいは 0.5 μm のエアロゾルを最高濃度約 1 mg/m^3 で4時間、3日間連続でマウスへばく露した後、気道反応性、病理組織学的解析、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 等を詳細に解析したが、増悪影響は認められなかった⁷⁾。この実験デザインは、当時のワーストケースをもとに、現実的なばく露濃度を設定したものであるが、第1節で述べたとおり、正常マウスへの作用が非常に弱いことを考慮すると、増悪影響の検討については、ばく露の負荷をより高めて評価することが必要と思われる。

そこで、OVA誘導型ぜん息モデルマウスに対し、第1節の28日間ばく露の中濃度及び高濃度に相当する5及び50 mg/m^3 の2つの濃度条件による2週間ばく露を行い、硫酸水素アンモニウムのぜん息増悪影響を調査した。

II 方法

1 実験動物

ぜん息などのアレルギー症状の検討には BALB/c 系マウス、特に、雌が適しているため^{8,9)}、本研究では、雌マウスを用いてばく露実験を行った。6週齢の BALB/cAnNCrIj の雌性マウスを購入し (ジャクソンラボラトリージャパン)、1週間以上の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おいて、第1節の実験と同じ条件下で飼育した。

飼育及び全ての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 実験デザイン

(1) 吸入ばく露

各群8匹として、超純水のエアロゾルをばく露させる対照群 (C群)、低濃度 (5 mg/m^3) の硫酸水素アンモニウムをばく露させる群 (L群)、高濃度 (50 mg/m^3) の硫酸水素アンモニウムをばく露させる群 (H群)、ぜん息を誘導する群 (AC群)、ぜん息を誘導して低濃度の硫酸水素アンモニウムをばく露させる群 (AL群) 及びぜん息を誘導して高濃度の硫酸水素アンモニウムをばく露させる群 (AH群)

の 6 群に分けた (表 1)。

表 1. 2 週間のぜん息増悪検討実験の概要

動物	BALB/cAnNCrIcrij 雌性マウス、ばく露開始時：13週齢
群構成	C群 対照群：0mg/m ³ (超純水) L群 低濃度群：5mg/m ³ H群 高濃度群：50mg/m ³ AC群 ぜん息群：OVA AL群 ぜん息+低濃度群：OVA+5mg/m ³ AH群 ぜん息+高濃度群：OVA+50mg/m ³
ばく露条件	吸入鼻部ばく露、3時間/日、直前に3日間の連続ばく露を実施した後、2週間ばく露を実施 最終ばく露の翌日に剖検
被験物質	硫酸水素アンモニウム (富士フィルム和光純薬：純度99.9%、014485-100、CAS:7803-63-6)
OVAぜん息誘導	感作方法：OVA 2μg+硫酸カリウムアルミニウム (20mg/mL) 腹腔内投与2回 チャレンジ方法：0.01% OVA/PBS 20μL 経鼻投与 約1週間おきに3回 (硫酸水素アンモニウムばく露後に実施)

硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露は、第 1 節と同じばく露システムを用い、流量等の設定値も同様にして実施し、低濃度として 5 mg/m³、高濃度として 50 mg/m³ のエアロゾルを発生させた。

ばく露は、1 日 3 時間、毎日実施し (図 1、表 1)。後述イのとおり、1 回目の OVA チャレンジを 1 日目とした合計 14 日間のばく露とチャレンジを組み合わせた期間を設定し、さらにその直前に 3 日間のばく露期間を設定し、合計 17 日間連続の吸入ばく露を行った。剖検時に処理可能な動物数に制限があるため、全 6 群を 4 つのサブグループに分け、初回のばく露から剖検まで、全ての操作はサブグループごとに 1 日ずつずらして実施した。ばく露期間中の濃度測定については、第 1 節と同様の手法で行った。

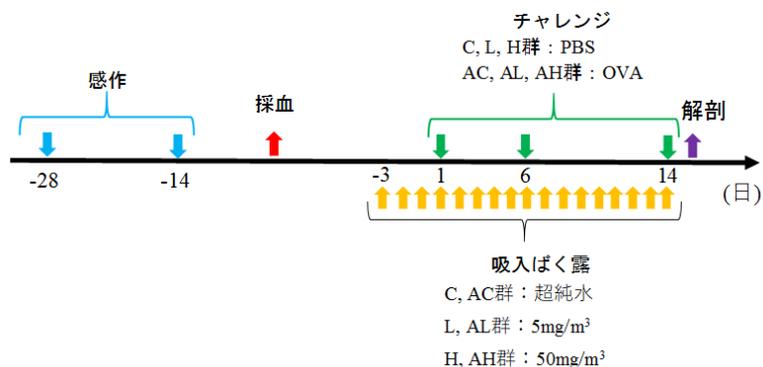


図 1. 2 週間のぜん息増悪検討実験のスケジュール
チャレンジ 1 回目の日を吸入ばく露 1 日目として示す

(2) OVA 誘導型ぜん息モデルマウスの作製

全動物に、OVA（低エンドトキシン、富士フィルム和光純薬）2 µg と硫酸カリウムアルミニウム（富士フィルム和光純薬）20 mg/mL の懸濁液を 1 匹あたり 0.3 mL、2 週間の間隔で 2 回腹腔内投与（感作）した（図 1）。その後、全動物の尾静脈から 50 µL 程度の血液を採取し、血漿中の OVA 特異的 IgE 濃度を ELISA キット（ケイマン）により測定し、血中濃度の上昇を確認した。

2 回目の腹腔内投与の 2 週間後を 1 日目として、経鼻投与による OVA チャレンジを 1 週間おきに合計 3 回実施した（表 1、図 1）。経鼻投与は、硫酸水素アンモニウムのばく露の 1 時間後に行い、C 群・L 群・H 群には PBS 20 µL を、AC 群・AL 群・AH 群には 0.01%（w/v）の OVA（エンドトキシン ≤ 1EU/mg、富士フィルム和光純薬）水溶液 20 µL を、マイクロピペットを用いて投与した。

なお、硫酸水素アンモニウムによる増悪の影響を検出しやすくするため、ぜん息モデルマウスのぜん息様の症状が軽度になるよう、試薬、ばく露濃度及び頻度等の条件を事前に検討した。

3 体重・摂餌量の測定

チャレンジ前は、1 週間に 1 度以上、ばく露期間中には毎日、体重を測定した。また、ばく露期間中は、給餌器の餌の量を毎日秤量し、マウス 1 匹当たりの摂餌量として算出した。

4 剖検

剖検は、最終ばく露日の翌日に、第 1 節 II 4（5）と同様に実施した。

ただし、摘出臓器は、気管、肺、鼻腔、脳、脊髄、肝臓、胃、腸管、腎臓、心臓、脾臓、副腎、胸腺、大腿骨、卵巣及び子宮とし、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓、卵巣、子宮及び脳については、重量測定を行った。

また、肺は舌及び気管と併せて摘出し、右葉副葉を分子生物学的解析用とし、その他の右葉は BALF を採取した後、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し病理組織学的解析に供した。一方、左葉は BALF を採取した後、免疫学的解析に用いた。

5 病理組織学的解析

摘出した臓器は、第 1 節 II 4（6）と同様に処理し H&E 染色したスライド標本を観察した。観察部位も基本的に第 1 節と同様であるが、肺実質については気管支の所見をより定量的に評価することを目的として、右葉の 3 葉について頭尾軸に沿った横断面の切片を 2 片作製し、1 匹につき合計 6 枚の切片を観察した。

肺実質の観察結果のうち、①（肺内気管支及び細気管支における）杯細胞の増生、②（細気管支に隣接する）血管周囲の細胞集簇、③肺胞内の細胞集簇の 3 点

について、4段階に分類し、変化無しまたはほぼ変化が見られないものを0、弱いものを1、中程度のものを2、強いものを3とし、4段階のスコアで評価した。

また、気管支上皮の杯細胞による粘液産生をさらに詳しく解析するため PAS 染色 (Periodic acid-Schiff stain) を行った。肺組織切片を過ヨウ素酸水溶液で酸化処理し、シッフ試薬 (富士フィルム和光純薬) と反応させた後、亜硫酸水溶液で洗浄を行った。また、ヘマトキシリンにより核を染色した。気管支上皮の面積あたりの PAS 陽性領域の割合を画像解析ソフト (ImageJ; 米国立衛生研究所) によって算出した。気管支の面積は、基底膜の内側からの面積とした。なお、6枚の各切片について最も太い肺内気管支あるいは細気管支を選び、6枚の平均値を1匹のデータとした。

6 BALF の解析

BALF の沈殿については、第1節II 4 (8) と同様に細胞学的に解析し、各種の白血球細胞数を算出した。一方、BALF 上清については、第1節II 4 (9) と同様に生化学的解析を実施した。ただし、LDH の結果は C 群に対する相対値で示した。

7 免疫学的解析

肺組織内のリンパ球のサブセットを解析するため、肺の左葉を 1.25 mg/mL のコラゲナーゼ D (シグマアルドリッチ) で処理し、細胞を遊離させた。孔径 70 μm のフィルターを通し、溶血試薬 (ベクトンディッキンソン) で赤血球を溶血させた後、固定膜透過処理用バッファー (ベクトンディッキンソン) で細胞膜透過処理を行った。白血球、T 細胞、CD4 細胞、CD8 細胞、Th1 細胞 (T-bet) 及び Th2 細胞 (GATA3) を検出するため、表 2 のとおり、蛍光標識されたモノクローナル抗体と反応させ、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。なお、死細胞は Fixable Viability Dye (FVD) により検出した。

表 2. 免疫学的解析に使用した蛍光標識抗体等

抗体	型番	メーカー
CD45-APC-Cy7	561037	ベクトンディッキンソン
CD3e-BV605	561826	ベクトンディッキンソン
CD4-FITC	561828	ベクトンディッキンソン
CD8-BV421	563898	ベクトンディッキンソン
GATA3-PE	12-9966-42	サーモフィッシャーサイエンティフィック
T-bet-APC	644815	バイオレジェンド
eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 506 (FVD)	65-0866	サーモフィッシャーサイエンティフィック

8 分子生物学的解析

第1節II4(10)と同様に、凍結した肺の副葉を粉碎し、14種類の遺伝子について、特異的なオリゴプライマーセットを用いqRT-PCRにより、遺伝子発現量を計測した(表3)。

表3. qRT-PCR で使用したプライマーの配列

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>Arg1</i>	CATTGGCTTGCGAGACGTAGA	TTGCCAATCCCCAGCTTGT
<i>Ccl11</i>	CAGATGCACCCTGAAAGCCATA	TGCTTTGTGGCATCCTGGAC
<i>Clca3</i>	CATCGCCATAGACCACGACG	TTCCAGCTCTCGGAATCAAA
<i>Gata3</i>	GAGGTGGACGTACTTTTAAACATCG	GGCATACCTGGCTCCCGT
<i>H2a</i>	CGTATCACCCCTCGTCACTT	TCAGCGATTTGTGGATGTGT
<i>Il1b</i>	CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGA	TGTGCTCTGCTTGTGAGGTGCTG
<i>Il4</i>	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
<i>Il5</i>	CACCAGCTATGCATTGGAGAAATC	TCTGTACTCATCACACCAAGGAAC
<i>Il6</i>	CCACGGCCTTCCCTACTTC	TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
<i>Il10</i>	AAGGGTACTTGGGTTGCC	CTCTTATTTTACAGGGGAGA
<i>Kc</i>	TGTCAGTGCCTGCAGACCAT	CCTCGCGACCATTCTTGAGT
<i>Muc5ac</i>	CAGGACTCTCTGAAATCGTACCA	AAGGCTCGTACCACAGGGA
<i>Tbet</i>	GCCAGGGAACCGCTTATATG	GACGATCATCTGGGTCACATTGT
<i>Tgfb</i>	CACCGGAGAGCCCTGGATA	GCCGCACACAGCAGTTCTT
<i>Tnfa</i>	CACCACGCTCTTCTGTCT	GGCTACAGGCTTGTCACTC

9 統計解析

C群に対する各群との差異について、Dunnnett法あるいはSteel法による多重比較検定を行った(*マークで表記)。AC群に対するAL群、AH群の差異についても、Dunnnett法あるいはSteel法による多重比較検定を行った(#マークで表記)。また、OVAぜん息が誘発されているかを確認するため、C群・L群・H群を一つの集団として、AC群・AL群・AH群の集団と比較した差異については、Studentのt検定あるいはWilcoxon法による2群比較検定を行った(\$マークで表記)。いずれも、危険率は5%に設定し、両側検定として実施した。

III 結果

1 硫酸水素アンモニウムのばく露濃度

ばく露群のチャンバー内硫酸水素アンモニウム濃度は第1節と同じ条件で、低濃度を5mg/m³、高濃度を50mg/m³と設定したが、平均値は、それぞれ、7.4±3.8mg/m³及び75.1±35mg/m³となった。実験期間の初期に両群とも、2倍程度の高濃度となったが、その後は、目標値を達成できた(図2)。

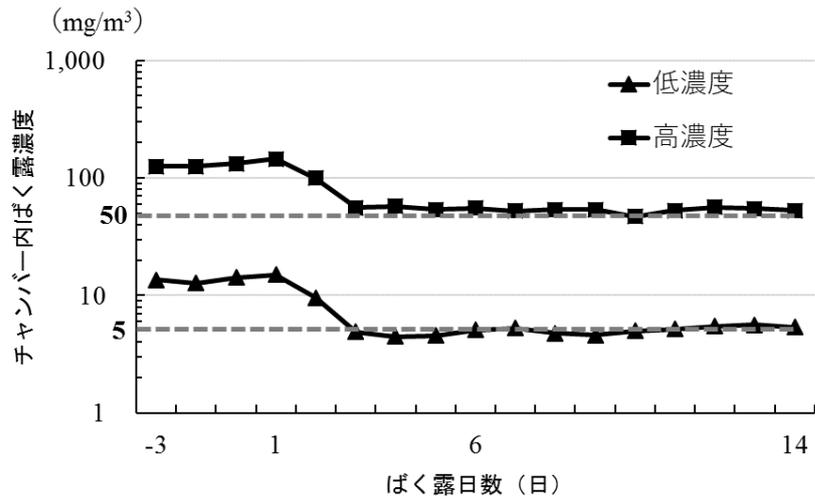


図 2. チャンバー内の硫酸水素アンモニウム濃度の推移
破線は目標濃度を示す。

2 体重及び摂餌量

全群において、2週間を通して、吸入ばく露やOVAチャレンジの影響を疑う顕著な変化は見られなかった（図3）。

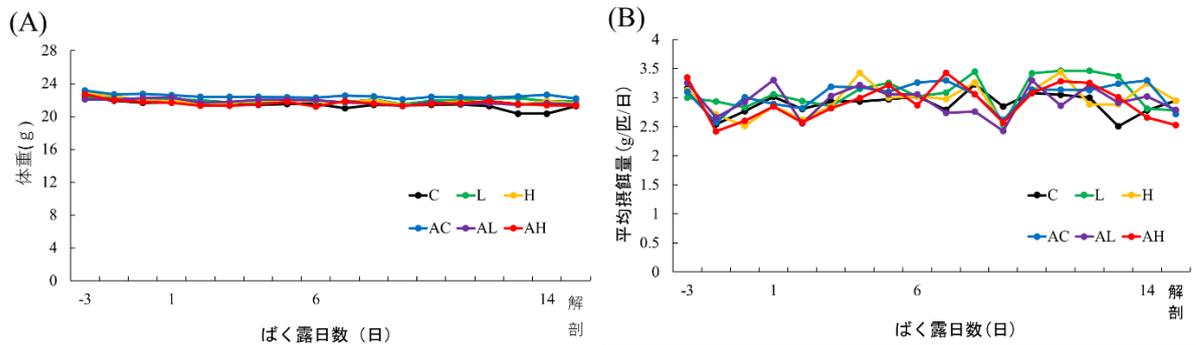


図 3. 実験中の体重推移及び摂餌量の推移
(A) 体重、(B) 摂餌量

3 解剖時の体重・臓器重量

臓器重量及び相対臓器重量については、顕著な変化は認められなかった。ただし、AC群での胸腺重量が有意に高く、AL群・AH群ではAC群に対して有意な低下を認め、脾臓でも同様の傾向が見られた（表4、表5）。

参考データとして、BALF回収後の左葉重量についても表4、表5に表記したが、群間で差異は認められなかった。

表 4. 解剖時の体重と臓器重量（平均値±標準偏差）

項目		C群	L群	H群	AC群	AL群	AH群
解剖時体重	(g)	21.2 ± 0.77	21.9 ± 0.87	21.6 ± 1.2	22.2 ± 1.3	21.5 ± 0.79	21.3 ± 0.78
胸腺	(mg)	24.0 ± 5.8	21.9 ± 6.4	24.4 ± 4.9	32.5 ± 6.1 *	25.4 ± 4.0 #	25.7 ± 3.3 #
肝臓	(mg)	1133.9 ± 70	1159.3 ± 89	1188.4 ± 47	1201.7 ± 88	1156.6 ± 54	1132.9 ± 57
脾臓	(mg)	92.0 ± 12	99.1 ± 29	91.9 ± 4.5	110.8 ± 13	95.3 ± 7.1 #	97.8 ± 5.9 #
腎臓（左右）	(mg)	295.0 ± 13	282.6 ± 21	299.4 ± 10	293.7 ± 22	299.0 ± 14	313.2 ± 20
副腎（左右）	(mg)	7.2 ± 1.2	6.7 ± 0.76	7.5 ± 2.0	7.2 ± 1.3	7.0 ± 1.0	8.2 ± 1.3
心臓	(mg)	89.6 ± 5.4	91.0 ± 7.0	91.2 ± 4.5	91.2 ± 7.8	92.7 ± 5.2	89.8 ± 4.3
卵巣（左右）	(mg)	12.9 ± 7.4	8.4 ± 3.1	10.0 ± 3.9	8.9 ± 2.8	10.1 ± 2.9	11.9 ± 1.8
子宮	(mg)	45.6 ± 11	42.7 ± 28	59.5 ± 52	60.3 ± 27	43.4 ± 14	50.4 ± 13
脳	(mg)	89.6 ± 5.4	91.0 ± 7.0	91.2 ± 4.5	91.2 ± 7.8	92.7 ± 5.2	89.8 ± 4.3
肺（左葉のみ）	(mg)	78.6 ± 7.8	75.5 ± 4.8	79.7 ± 6.6	81.3 ± 7.4	83.0 ± 7.9	85.1 ± 3.8

Dunnett Test *: $P < 0.05$ C群
#: $P < 0.05$ AC群

表 5. 相対臓器重量（体重 100g あたり）（平均値±標準偏差）

項目		C群	L群	H群	AC群	AL群	AH群
胸腺	(mg)	112.7 ± 26	99.5 ± 27	110.3 ± 25	147.6 ± 31 *	117.9 ± 17 #	118.9 ± 15 #
肝臓	(mg)	5339.1 ± 300	5290.3 ± 220	5480.7 ± 310	5419.2 ± 200	5386.3 ± 160	5337.8 ± 400
脾臓	(mg)	433.0 ± 52	451.1 ± 120	421.3 ± 36	502.0 ± 80	443.8 ± 32	456.9 ± 21
腎臓（左右）	(mg)	1390.7 ± 89	1289.7 ± 54	* 1370.8 ± 97	1324.4 ± 52	1392.9 ± 54	1470.8 ± 87 #
副腎（左右）	(mg)	34.0 ± 5.9	30.7 ± 3.2	35.0 ± 11	32.6 ± 6.5	32.7 ± 4.3	38.8 ± 7.5
心臓	(mg)	422.2 ± 31	415.6 ± 27	417.9 ± 36	411.2 ± 23	431.9 ± 24	420.7 ± 15
卵巣（左右）	(mg)	60.6 ± 35	38.1 ± 14	47.4 ± 18	40.5 ± 13	47.2 ± 14	49.8 ± 12
子宮	(mg)	213.7 ± 47	194.3 ± 120	270.5 ± 230	276.2 ± 132	201.1 ± 62	229.3 ± 63
脳	(mg)	1946.8 ± 69	1891.3 ± 88	1885.5 ± 130	1880.2 ± 65	1947.6 ± 57	1982.1 ± 80 #
肺（左葉のみ）	(mg)	373.0 ± 30	345.0 ± 21	359.7 ± 39	366.5 ± 25	386.2 ± 33	395.8 ± 29

Dunnett Test *: $P < 0.05$ C群
#: $P < 0.05$ AC群

4 BALF 中の白血球細胞の解析

BALF 中の細胞数は C 群・L 群・H 群の 3 群の間に差は無く、細胞種は大半がマクロファージでわずかに好中球を認めた（図 4）。AL 群及び AH 群の 2 群では、C 群に比べて総細胞数が有意に増加し、また、AC 群・AL 群・AH 群全てで、好酸球及びリンパ球の数が有意に増加していた。これらぜん息誘発の 3 群は、正常な 3 群に比べて有意に細胞数が増加していた。総細胞数やマクロファージ以外の細胞は、AC 群に対して AL 群・AH 群が濃度依存的に増加する傾向が見られたが、AC 群に対する有意差は認められなかった。

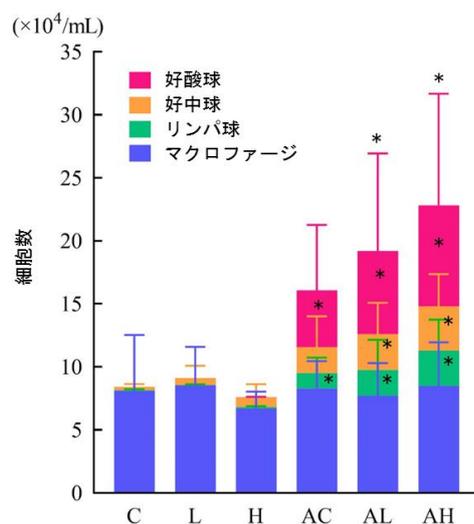


図 4. BALF 中の白血球の構成
エラーバーは標準偏差。*: $p < 0.05$ (vsC 群)

5 BALF 上清の生化学的解析

BALF 上清の LDH を、呼吸器上皮の細胞毒性の指標として、また、総タンパク質を肺泡領域の毛細血管の浸透性の指標として解析した (図 5)。その結果、いずれの項目についても、AC 群・AL 群・AH 群の 3 群では、C 群・L 群・H 群に比べて有意に増加したが、AC 群に対して AL 群・AH 群の変化は認められなかった。総タンパク質の AL 群は C 群に対し有意な上昇を見せた。

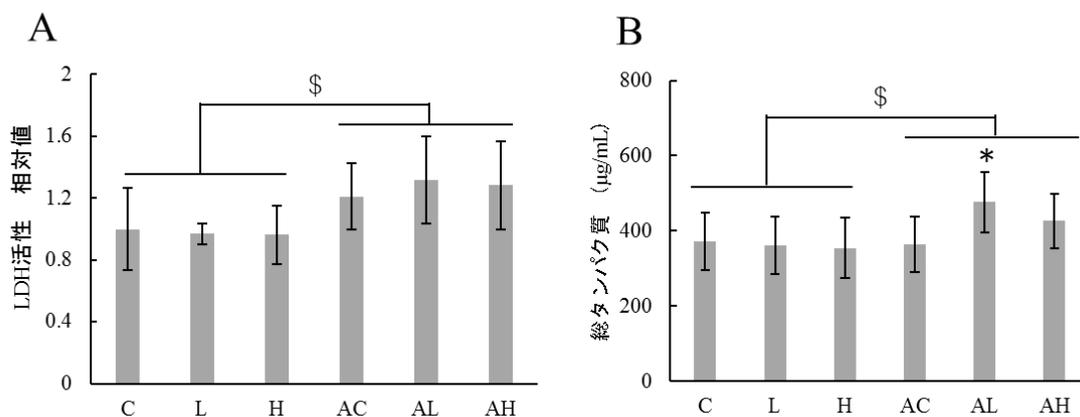


図 5. BALF 上清の生化学的解析

A LDH 活性、B 総タンパク質濃度。エラーバーは標準偏差

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

6 病理組織学的解析

鼻腔では、AC 群・AL 群・AH 群の 3 群において、特に部位 II (切歯乳頭部付近の断面; 第 1 節 II 4 (6)) の呼吸上皮において粘膜下への好酸球・リンパ球・形質細胞等の炎症細胞の浸潤や、粘液産生の微増が認められた。同様に、気管でも、粘膜下への好酸球の浸潤を認めた。これらの所見は、AL 群・AH 群において

増強は認められなかった。

肺実質では、AC群・AL群・AH群において、典型的なぜん息様の気道炎症像が、広域にかつ低レベルに観察された。肺内気管支及び細気管支における杯細胞の増生が観察され、特に、AH群ではやや多い傾向があった(図6)。また、細気管支周囲の血管周囲の好酸球・形質細胞・リンパ球等の細胞集簇（まぐく）が認められた(図7)。

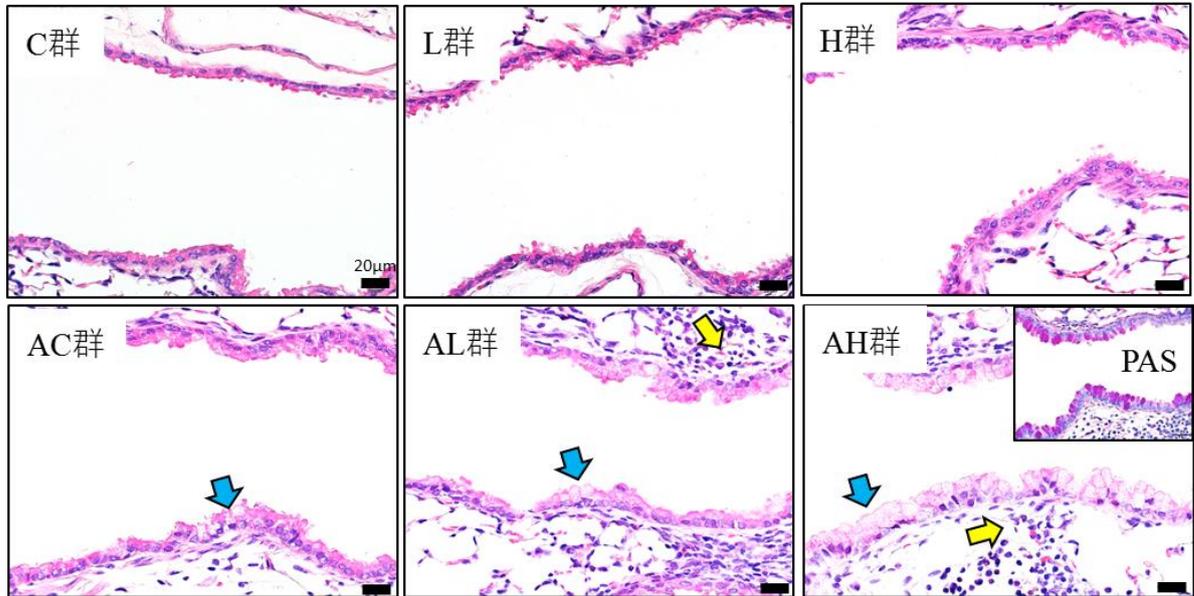


図6. 肺内気管支の組織像 (H&E 染色及びPAS 染色)

青矢印：杯細胞、黄色矢印：好酸球等の炎症細胞の集簇。

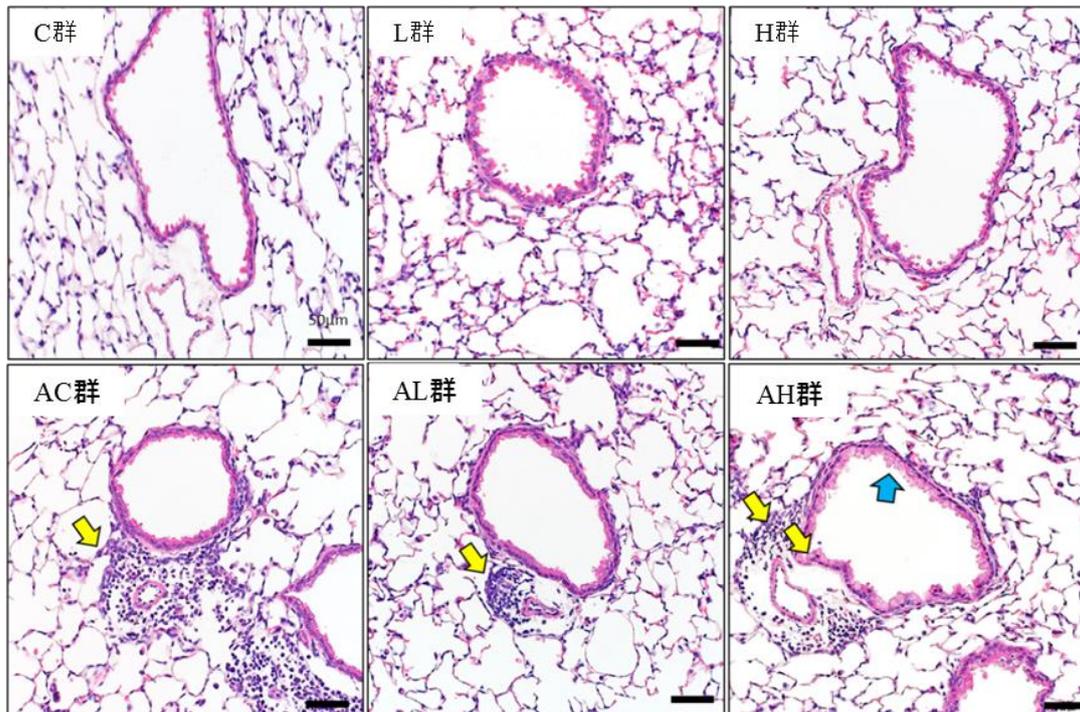


図7. 肺実質 (終末細気管支) の組織像 (H&E 染色)

青矢印：杯細胞、黄色矢印：好酸球等の炎症細胞の集簇。

なお、BALF 回収後の組織観察であったため、全体に、肺胞管から肺胞領域における細胞は少なかったが、一部で肺胞マクロファージや好酸球・好中球の集簇が認められ、AC 群・AL 群・AH 群において比較的多く認められた（図 8）。

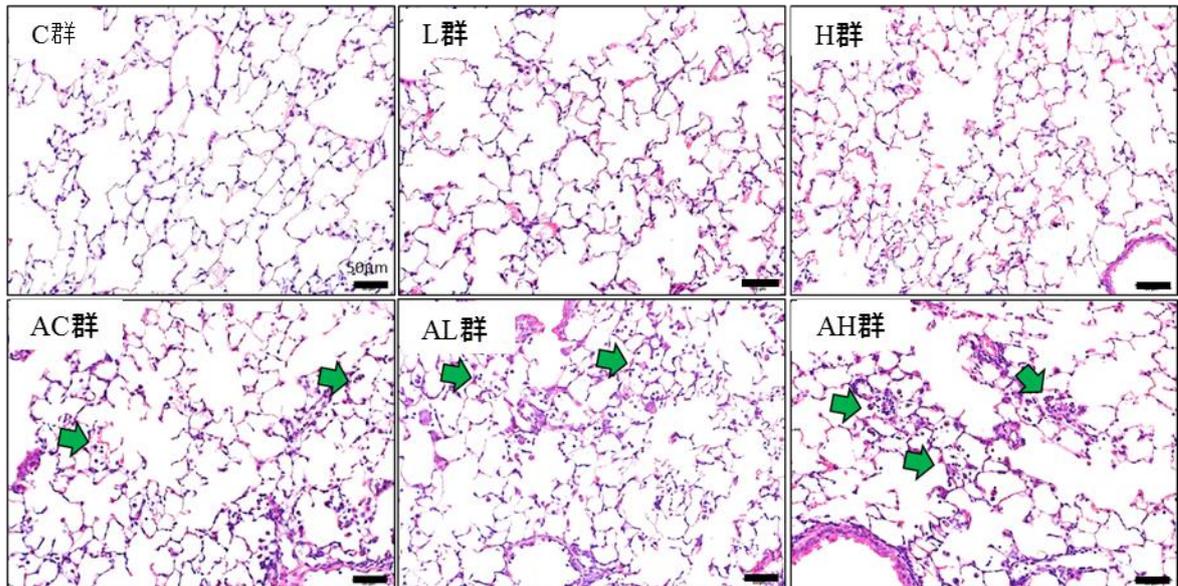


図 8. 肺実質（肺胞領域）の組織像（H&E 染色）

緑矢印：肺胞内の細胞集簇。

①肺内気管支・呼吸細気管支における杯細胞の増生、②血管周囲の細胞集簇及び③肺胞内の細胞集簇という 3 つの所見についてスコアリングを行った結果、平均値は、AC 群・AL 群・AH 群において、0.4 から 1 程度の低レベルではあったが、C 群・L 群・H 群に対して有意に増加した（図 9）。AC 群と比較して AL 群・AH 群における有意な変化は認められなかった。杯細胞の増生のスコアについては、AH 群のみ C 群に対して有意な増加を示し、また、濃度依存的にスコア平均値が増加する傾向が見られた。

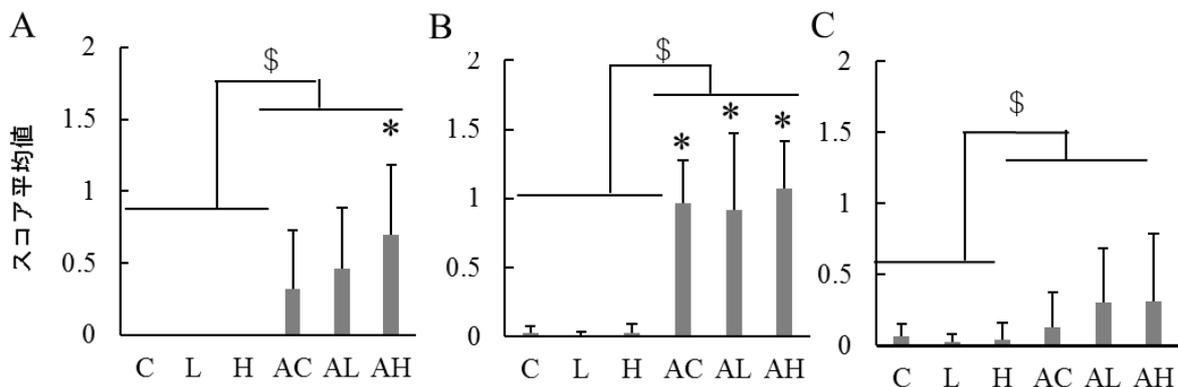


図 9. 肺実質における病理検索結果のスコア

A 杯細胞の増生、B 血管周囲の細胞集簇、C 肺胞内の細胞集簇 エラーバーは標準偏差。

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

また、より定量的なぜん息様症状の評価の一つとして、PAS 染色により、肺内気管支及び細気管支上皮の粘液量を定量した結果、AC 群・AL 群・AH 群の 3 群

では、C群・L群・H群の3群と比較すると顕著な増加が認められた(図10)。

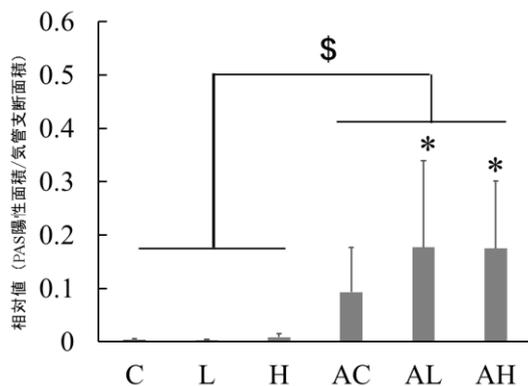


図10. 気管支内腔の粘液量 (PAS 反応陽性面積)

エラーバーは標準偏差。Dunnett Test *: $p < 0.05$, Student's t-test \$: $p < 0.05$

脾臓と胸腺に関しては、臓器重量の有意な変化を説明するような組織学的な変化は認められなかった。

その他の主要臓器については、例えば、肝臓の炎症細胞の浸潤等の自然発生病変と思われる所見や、OVAの腹腔内投与に起因する肝臓、膵臓及び脾臓の被膜におけるOVAの沈着、炎症及び線維化が見られた。しかし、ばく露の影響を疑う著変は認められなかった。

7 免疫学的解析

フローサイトメトリーによる肺組織中のリンパ球の集団解析では、CD4陽性細胞をゲーティングし、GATA3及びT-betにより、それぞれTh1細胞、Th2細胞の比率を評価した(図11)。ぜん息を誘発したAC群・AL群・AH群の3群では、GATA3及びT-bet陽性の細胞がどちらも有意に増加していた。GATA3陽性細胞へのシフトは認められず、また、AC群に対するAL群・AH群の有意な変化も観察されなかった(図11)。

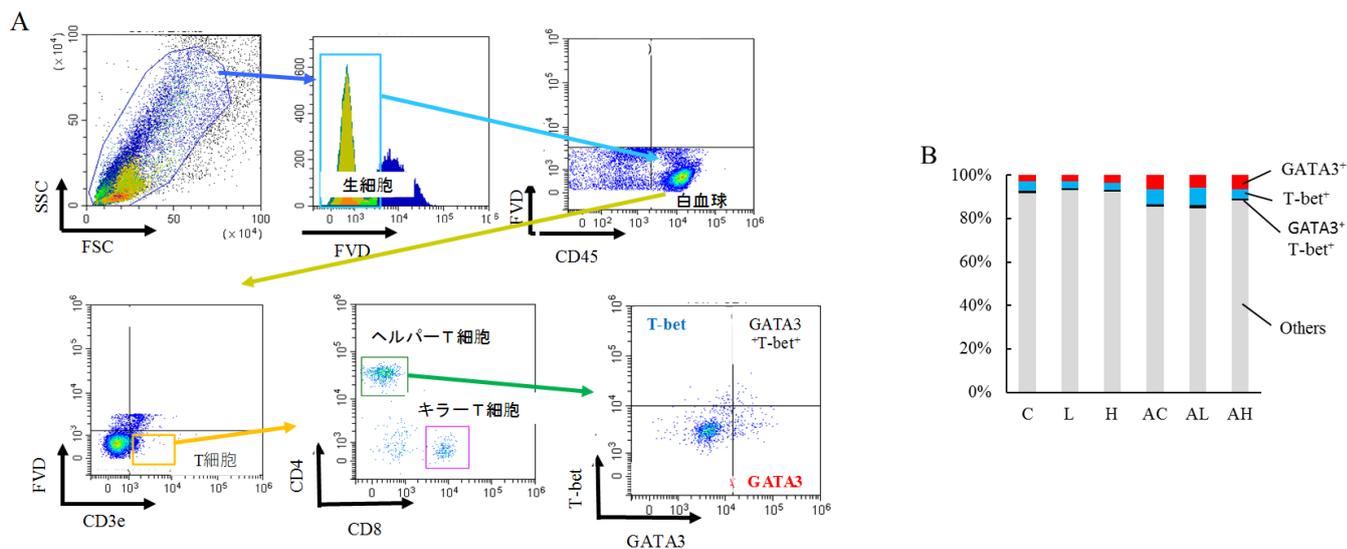


図11. 肺組織中のリンパ球の集団解析

A ゲーティング方法、B CD4陽性細胞におけるGATA3陽性(赤)、T-bet陽性(青)及び両抗体陽性細胞(黒)の割合

8 分子生物学的解析

肺組織で発現する各種遺伝子を qRT-PCR により解析した (図 12)。

炎症関連のインターロイキンやケモカインについては、好酸球マーカーである *Ccl11* (*eotaxin*) が顕著に増加したが、その他の遺伝子発現は変化が見られなかった。各種のぜん息関連遺伝子については、AC 群・AL 群・AH 群の 3 群において有意に上昇していた。Th2 サイトカインの *Il4*・*Il5* は増強され、免疫抑制や粘液産生に関わる遺伝子群も発現が上昇した。また、フローサイトメトリーで解析した二つのリンパ球分化に関する転写因子の発現については、*Gata3* は、AC 群・AL 群・AH 群で有意に増加したのに対し、*Tbet* は減少しており、Th2 へのシフトを示唆するものであった。

いずれの遺伝子についても、AC 群に対して AL 群・AH 群で有意な変化を示さなかったが、*Il4*、*Ccl11*、*Arg1* 及び *Il10* については、硫酸水素アンモニウムのばく露濃度に依存的に増加する傾向が見られた。

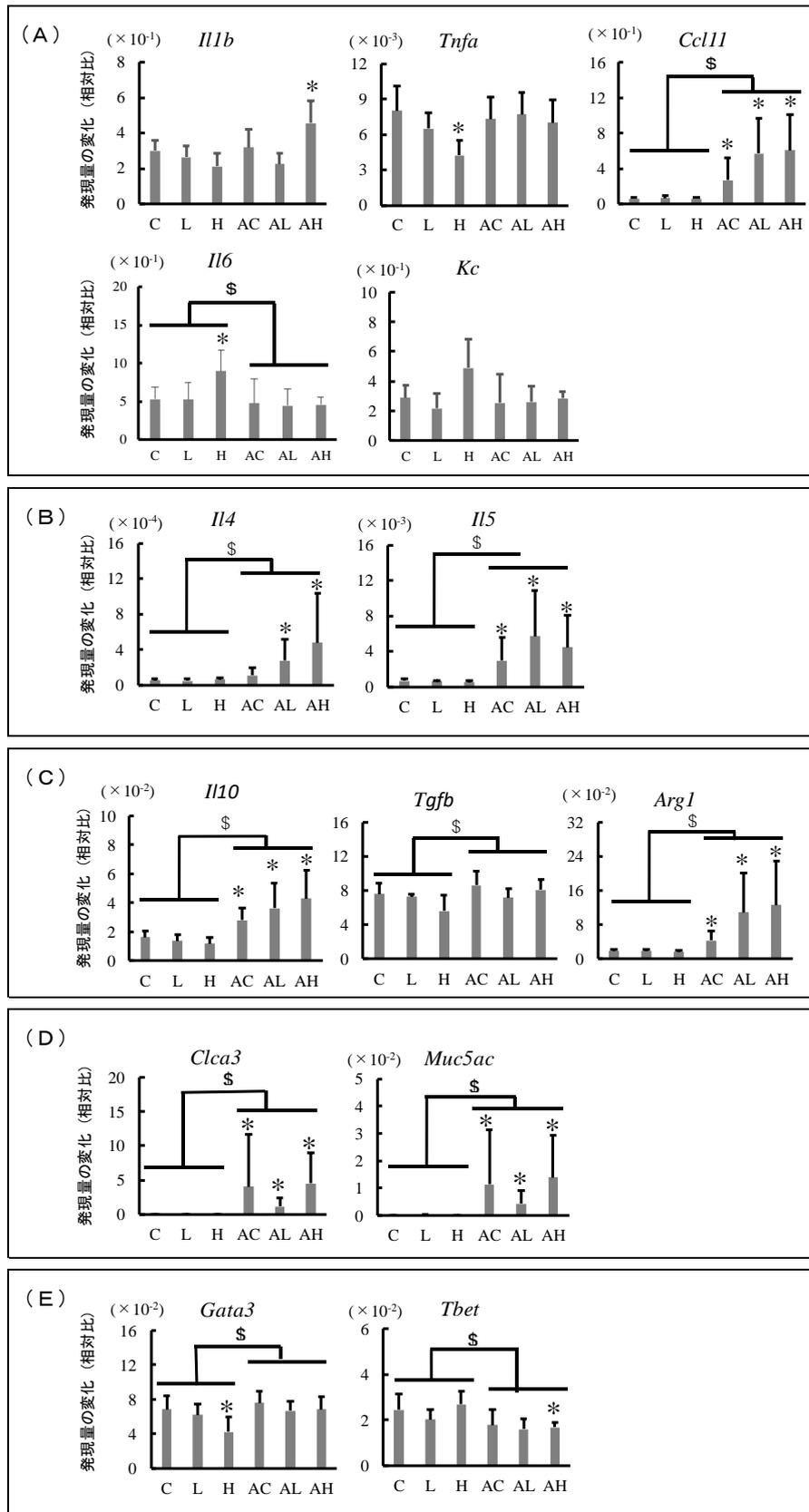


図 12. 肺実質における各種遺伝子の発現解析

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。

Steel Test *: $p < 0.05$, Wilcoxon test \$: $p < 0.05$

- (A) 炎症反応関連遺伝子、(B) Th2 サイトカイン関連遺伝子、(C) 免疫抑制関連遺伝子、
(D) 粘液産生関連遺伝子、(E) リンパ球分化関連遺伝子

IV 考 察

本節では、OVA 誘発性のぜん息モデル作製プロトコールを用いて硫酸水素アンモニウムの反復ばく露を実施し、増悪影響を検討した。OVA チャレンジを行っていない3群に関しては、OVA の腹腔内投与に伴う腹膜炎を除くと、著変は見られず、第1節の結果と同様に、硫酸水素アンモニウム単独の影響がほとんど無いことが確認された。一方で、OVA チャレンジを行った3群に関して、どの群においても、好酸球の気道粘膜下への浸潤、上皮の粘液分泌の亢進及び Th2 サイトカインの増加等について統計学的に有意な変化が認められた。本研究においては、硫酸水素アンモニウムの作用が弱いことを前提に、基準となるぜん息様症状は軽度になるよう、経鼻投与の OVA 負荷や投与回数などを設定した。実際、病理組織学的解析や生化学的解析の結果に見られるように、低レベルのぜん息様症状が誘発されていた。また、重要な点として、各分析結果の群内の個体差が大きかった。OVA チャレンジを吸入ではなく、経鼻投与によって行ったことがバラツキを大きくした可能性がある。また、OVA 腹腔内投与による感作後に OVA 特異的 IgE 濃度が上昇することを確認しているが、定量的な判断を行わなかったことも一因かもしれない。例えば、IgE の値の上位あるいは下位の個体を実験から除外するなどのプロトコールを組むことによってバラツキを小さくできた可能性がある。

このようなぜん息モデル条件において、硫酸水素アンモニウムをばく露した AL 群及び AH 群の結果は、各種の検討において、AC 群に対して有意な変化は見られなかった。しかしながら、BALF の白血球細胞の解析や、病理組織学的解析及び分子生物学的解析の一部では、ばく露による増悪を疑わせる結果が複数見られた。わずかな変化であったため、ぜん息モデルの個体差によって、この増悪影響が相殺されてしまった可能性が高い。また、リンパ球集団の Th1・Th2 分化傾向に関するフローサイトメトリーと qRT-PCR の結果の不一致も個体差が原因かもしれない。

吉田らの OVA 誘導型のぜん息モデルモルモットに 10 mg/m^3 の硫酸アンモニウムを 5 回ばく露した実験では、死亡例が半数に上るほど強い呼吸困難症状が認められた⁵⁾。また、同じグループの北畠らによる、 0.4 及び 2 mg/m^3 の長期反復ばく露実験においても、ぜん息症状の増悪が観察された⁶⁾。本研究では、より酸性度の高い硫酸水素アンモニウムを用い、吉田らが設定した 5 倍の濃度でばく露させたにもかかわらず、明確な増悪影響は見られなかった。この違いは被験物質やばく露条件の違いだけでなく、モルモットとマウスという種差によるところが大きいと考えられる。

第1節で論じたとおり、硫酸水素アンモニウムの毒性の作用点は不明であり、同様にぜん息増悪の機序もわかっていない。既報の硫酸及び各種の硫酸塩を用いたヒトや動物の吸入ばく露及び *in vitro* 試験の結果からは、酸性度が高いことが気道粘膜に作用する¹⁰⁾、線毛運動によるクリアランス機能を低下させる^{11,12)}、炎症の惹起や ROS の発生を起こす¹³⁾、肥満細胞の脱顆粒の誘導^{14,15)}等の機序が考えられている。少なくとも、現時点で、硫酸アンモニウムや硫酸水素アンモニウム

については、炎症反応や明らかな上皮の損傷などを示す *in vivo* の結果は報告されていない。本研究においても、これらを示唆する変化は正常マウス（第1節）と OVA でチャレンジしたマウス（本節）の両方で認められなかった。北畠らは、ぜん息モデルモルモットにおける硫酸アンモニウムの増悪作用の機序としては、PM_{2.5} 等の大気汚染物質が一般的に有する刺激作用により線毛運動の抑止や粘液分泌の増大が起こり、アレルゲン（OVA）の気道壁への滞留や、取り込み増大が起こる可能性を考察している⁴⁾。

これらを踏まえると、第3章で示された、Calu-3 細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露で細胞膜間結合力が低下した結果は興味深い。TEER の低下には上皮細胞間のタイトジャンクションの不全が関係していることが多く、例えば PM_{2.5} 等の大気汚染物質のばく露による炎症や ROS 産生、MAPK 等のシグナル経路により TEER が低下し、Claudin ファミリーや ZO-1 等のタイトジャンクションを構成するタンパク質の発現が減少することが *in vitro* の系で報告されている^{16, 17)}。タイトジャンクションの異常は、酸性物質のストレスによっても引き起こされ、例えば、逆流性食道炎の病態に関連して胆汁酸・胃酸が食道扁平上皮の TEER を低下させる現象が知られている^{18, 19)}。また、Xu らは、これら生体内分子による影響ではなく、単に酸性度が高い環境が上皮組織におけるタイトジャンクションの異常を起こすことを示した²⁰⁾。気道上皮の 16HBE 細胞を pH 7 から pH 4 まで変化させた培地に 8 時間維持し、その挙動を観察したところ、pH が 5 より低い場合に TEER が低下し、Claudin ファミリーや ZO-1 のタンパク質の発現が低下した。そして、このタイトジャンクションの調節に、酸性度のストレスセンサーとして機能する非選択性陽イオンチャネルの TRPV1 が関与していることも示した²⁰⁾。気道上皮の細胞膜間結合の不全は、上皮のバリア機能を減弱させるため、アレルゲンが侵入しやすくなり、ぜん息病態の開始・進行に寄与することは良く知られている^{21, 22)}。第3章の *in vitro* の結果のとおり、ばく露後に、一過性に細胞膜間結合力が低下するとすれば、本節の実験デザインにおいて、OVA 投与の際、OVA の呼吸器上皮への侵入が亢進した可能性がある。今回、*in vitro*・*in vivo* の両方でタイトジャンクション関連分子の評価は行っていないため、今後の課題である。

以上から、5 及び 50 mg/m³ という、既報⁷⁾の 5 倍及び 50 倍高い濃度の硫酸水素アンモニウムのエアロゾルを反復吸入ばく露した場合には、ぜん息モデルマウスに対して顕著な作用はないものの、増悪影響を否定できないと結論される。モデルマウスのプロトコルやばく露条件の改変により、明確な結果が得られる可能性がある。また、その作用機序についても *in vitro* を中心に検討する余地があると思われる。

V 文 献

1) Utell, M. J.: *Environ Health Perspect*, **63**, 39-44, 1985.

2) Avol, E. L., Jones, M. P., Bailey, R. M., *et al.*: *Am Rev Respir Dis*, **120**, 319-327, 1979

- 3) Utell, M. J., Morrow, P. E., Hyde, R.W.: *JAPCA*, 34:931-935, 1984.
- 4) 北島正義, 今井正之, 富田泰子, 他 : 大気汚染学会誌, **16**, 239-243, 1981.
- 5) 吉田克己, 今井正之, 北島正義, 他 : 三重大学環境科学研究紀要, **4**, 1-11, 1979.
- 6) 北島正義, 今井正之, 小林 勇, 他 : 大気汚染学会誌, **14**, 8-15, 1979.
- 7) Cassee, F.R., Dormans, J.A., van Loveren, H., *et al.*: *Report of National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)*, Report No. 650010010, 1999.
- 8) 山下直美, 太田健 : モデル動物の作製と維持, **第4節・第3項**, 319-324, 2004
- 9) 荏原順一, 植木重治 : 日本内科学会雑誌, **95**, 1514-1519, 2006.
- 10) Utell, M. J., Morrow, P. E., Speers, D. M., *et al.*: *Am Rev Respir Dis*, **128**, 444-450, 1983.
- 11) Schlesinger, R. B.: *Environ Health Perspect*, **79**, 121-126, 1989.
- 12) Vollmuth, T. A., Schlesinger, R. B.: *Fundam Appl Toxicol*, **4**, 455-464, 1984.
- 13) Yun, Y., Gao, R., Yue, H., *et al.*: *Environ Sci Technol*, **51**, 11401-11411, 2017.
- 14) 片岡裕美, 中村智美, 田鶴谷 (村山) 恵子, 他 大気環境学会誌, **52**, 12-18, 2017.
- 15) Charles, J. M., Menzel, D. B.: *Arch Environ Health*, **30**, 314-316, 1975.
- 16) Zhao, R., Guo, Z., Zhang, R., *et al.*: *J Appl Toxicol*, **38**, 678-687, 2017.
- 17) Fukuoka, A., Matsushita, T., Morikawa, H., *et al.*: *Clin Exp Allergy*, **46**, 142-152, 2015
- 18) Chen, X., Oshima, T., Shan, J., *et al.*: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **303**, G199-208, 2012.
- 19) Farré, R., van Malenstein, H., De Vos, R., *et al.*: *Gut*, **57**, 1366-1374, 2008.
- 20) Xu, R., Li, Q., Zhou, J., *et al.*: *Biosci Rep*, **33**, e00078, 2013.
- 21) Georas, S.N., Rezaee, F.: *J Allergy Clin Immunol*, **134**, 509-520, 2014.
- 22) Sugita, K, Kabashima, K.: *J Leukoc Biol*, **107**, 749-762, 2020.