

## 第3節 マウスの呼吸機能へ与える影響

### I 目的

硫酸塩のエアロゾルのばく露により生体影響が認められた報告の多くは、ヒトあるいはモルモットの吸入ばく露後の呼吸機能を評価したものであった。Utellらの報告では、硫酸、硫酸アンモニウム、硫酸水素アンモニウム又は硫酸水素ナトリウムをぜん息患者へ0.1、0.45及び1 mg/m<sup>3</sup>の16分間吸入ばく露させた結果、硫酸と硫酸水素アンモニウムの0.45及び1 mg/m<sup>3</sup>の濃度で有意な気道コンダクタンスの減少が認められた<sup>1)</sup>。ぜん息モデルモルモットでは、硫酸アンモニウムのばく露により呼吸困難度が増強された<sup>2-4)</sup>。モルモットはこうしたぜん息増悪評価で影響を検出しやすいモデルであり、また、硫酸塩の研究が盛んであった70年代から80年代にかけてはサイズの小さな動物での呼吸機能評価は技術的に難しかったこともあり、これまでのところ、マウスのデータが得られていない。

第1節・第2節の結果を踏まえると、マウスの呼吸機能への影響は、モルモットに比べれば、弱いあるいは検出されない可能性もあるが、本事業においてマウスにおける硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露の総合的な影響を評価するためには、既報で陽性結果が示されてきた項目についても検討する必要がある。そこで、本節では、小型動物にも適する呼吸機能解析装置を用い、BALB/cマウスの呼吸機能に与える影響を二つの実験デザインで評価した。

一つは、正常マウスあるいはぜん息モデルマウスに対して3時間の鼻部吸入ばく露を行った後に気道収縮薬を用いた気道過敏性試験を行うものである。この実験では、硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露で気道上皮のバリア機能が一時的に低下し、刺激物質への応答性が増加する可能性について検討した。もう一つは、呼吸機能解析装置に付属するエアロゾル発生装置により、正常マウスあるいはぜん息モデルマウスに対して気道内に硫酸水素アンモニウムをごく短時間噴霧し、直後の呼吸機能を評価するものである。こちらでは、ヒト吸入ばく露実験で見られたような即時的な呼吸機能への影響を検討した。

### II 方法

#### 1 実験動物及びぜん息モデル作製

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)、馴化飼育後に、ぜん息モデル作製及び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、プラスチック製ケージに4匹ずつ収容し、第1節の実験と同じ条件下で飼育した。

ぜん息モデルの作製は、第2節II 2(2)と同様に行った。OVAと硫酸カリウムアルミニウムの懸濁液を腹腔内投与し、OVA特異的IgE濃度の上昇を確認した後、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(図1)。

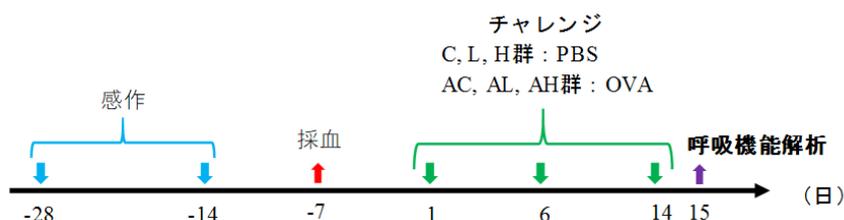


図 1. ぜん息モデルマウスの作出プロトコール

15日目にばく露と呼吸機能測定を行った

呼吸機能解析が終了した動物は、深麻酔の状態です装置から取り外し、速やかに頸椎脱臼により安楽死させた。

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 単回吸入ばく露による気道過敏性の評価

### (1) 吸入ばく露

本実験では、第2節と同じ濃度でばく露を行うこととした。各群6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<sup>3</sup>)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<sup>3</sup>)の硫酸水素アンモニウムをばく露させる群(H群)、ぜん息モデルに超純水のエアロゾルをばく露する群(AC群)、ぜん息モデルに低濃度の硫酸水素アンモニウムをばく露させる群(AL群)及びぜん息モデルに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)。なお、全6群を4つのサブグループに分け、初回のチャレンジから気道過敏性試験まで、すべ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。ただし、試験日までに原因不明の死亡(1例)、実験中の窒息死(2例)あるいは異常値による除外個体(2例)があったため、実際に解析に使用された動物数は表1のとおり、4から6例となった。

表 1. 群構成と動物数

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

カッコ内の数字は実験後、実際に解析に使用された動物数

硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露は、第1節・第2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た。

チャンバー内ばく露濃度も同様に計測した。エアロゾルの採取は、各サブグループのばく露日において、動物へのばく露直前に行った。

## (2) 呼吸機能解析 (気道過敏性試験)

マウスに三種混合麻酔薬 (メドトミン 0.3 mg/kg・ミダゾラム 4 mg/kg・酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg) を腹腔内投与後、気管を切開しカニューレを挿管し、呼吸機能解析装置 (フレキシベント FV-FX1、オレンジサイエンス) に接続した。ベンチレーションを開始してから、筋弛緩剤 (ロクロニウム臭化物 1.7 mg/kg、エムエスディー) を腹腔内投与し、自発呼吸を抑制した後、測定を開始した。

付属のネブライザー (FV-ANK、オレンジサイエンス) により、気道平滑筋収縮物質であるメサコリン (*O*-アセチル- $\beta$ -メチルコリンクロリド、富士フィルム和光純薬) の 0、4、8 及び 16 mg/mL の溶液を 1 匹ごとに低濃度から順に気管内に 10 秒間噴霧した。

実験中の定常状態のベンチレーションは、150 回/min とし、測定プログラム (Script) は、下記のとおりとした。

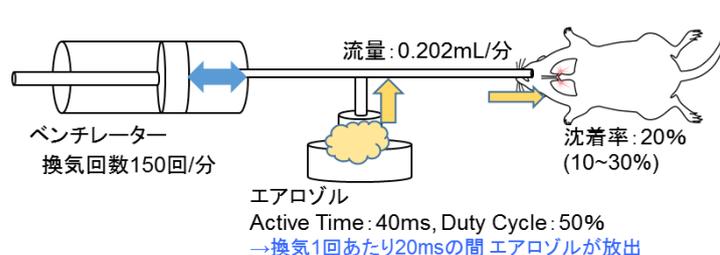
*Deep Inflation* × 2 回 → (*Snapshot:150* → *Quick Prime-3*) × 12 回

各濃度において、5 つのパラメーター、すなわち、呼吸抵抗 (呼吸器全体の抵抗)、中枢気道抵抗 (気道の抵抗)、エラスタンス (弾性率)、ティッシュダンピング (肺実質組織への影響) 及びティッシュエラスタンス (肺実質組織への影響) を測定した。ただし、それぞれ 12 回連続でデータを取得し、ピーク値を各濃度の結果として表記した。生データの信頼性確保のため、オレンジサイエンスが推奨する Coefficient of Determination (COD) >0.95 の基準を採用しており、これを下回る場合には個別データあるいはその個体を解析から除外した。

## 3 気管内噴霧ばく露による即時影響評価

### (1) 実験デザイン

まず、Utell らのぜん息患者への 1 mg/m<sup>3</sup> の 16 分間の吸入ばく露<sup>1)</sup>におけるヒト肺沈着量の推計した (約 240  $\mu$ g/lung)。続いて、これを気道・肺胞面積の比をもとに、マウスに相当する量に換算し (約 1000 分の 1)<sup>5)</sup> (0.24  $\mu$ g /lung)、これに近い肺沈着量 (負荷量) が得られる条件を、本実験における低用量群 (0.3  $\mu$ g /lung 程度) と設定し、公比 10 として中用量群と高用量群を設定した (図 2、表 2)。後述ウの計算を元に、ネブライザーにセットする水溶液の濃度は、それぞれ 0.05、0.5 及び 5 g/L とした。ただし、ばく露時間は、同装置を使った既報の噴霧条件や、予備検討の結果をふまえ、3 分間に設定した (図 2、表 2)。



$$\text{低用量群の推計} \quad \frac{20}{60000} \times 150 \times 0.202 \times 3 \times 0.05 \times 0.2 = 0.000303 \text{ mg (0.303 } \mu\text{g)}$$

図 2. 気管内噴霧ばく露実験における 3 分間の沈着量の推定

正常マウスを用いた実験では、超純水（C 群）と硫酸水素アンモニウムのばく露群（L 群（低用量）・M 群（中用量）・H 群（高用量）：n=6）に加え、比較対象として硫酸アンモニウム及び塩化ナトリウムをそれぞればく露する群（それぞれ n=4）の合計 6 群に分けた（表 2）。ただし、塩化ナトリウム群については、異常値による個体を 1 例除外した。

実験時には、マウスは 9 週齢であった。

表 2. 正常マウスを用いた実験における群構成と動物数

群	水溶液濃度 (g/L)	推定沈着量 (μg/lung)	動物数
C 群（対照）	0	0	6
L 群（低用量）	0.05	0.303	6
M 群（中用量）	0.5	3.03	6
H 群（高用量）	5	30.3	6
硫酸アンモニウム群 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	30.3	4
塩化ナトリウム群 NaCl	4.5	27.27	4(3)

カッコ内の数字は実験後、実際に解析に使用された動物数

一方、ぜん息モデルマウスの実験については、超純水及び硫酸水素アンモニウム 3 用量をばく露する合計 4 群に分けた（n=6；表 3）。ただし、H 群については異常値による除外個体が 1 例あった。

実験時には、マウスは 15 週齢であった。

表 3. ぜん息モデルマウスを用いた実験における群構成と動物

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

カッコ内の数字は実験後、実際に解析に使用された動物数

なお、各被験物質のばく露群を2つのサブグループに分け、2日間の実験として実施した。ぜん息誘発についても、初回のチャレンジから気道過敏性試験まで、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。

## (2) エアロゾルの粒子径測定

気管内噴霧ばく露実験に用いる硫酸水素アンモニウムの低用量、中用量及び高用量の各水溶液（それぞれ 0.05、0.5 及び 5 g/L）をネブライザーに容れ、カニューレから噴霧されるエアロゾルを走査電子顕微鏡のサンプルテープ上に 60 秒間捕集し、速やかに走査電子顕微鏡で観察した（Quanta™ FEG250; サーマフィッシャーサイエンティフィック）。無作為に取得した画像に関して、ImageJ（NIH；アメリカ国立衛生研究所）を用いて、各濃度 30 から 500 個程度の粒子の直径を計測した。

## (3) 気管内噴霧ばく露と呼吸機能解析

呼吸機能解析装置（オレンジサイエンス）を用い、ばく露前と、ばく露後のそれぞれで、6つのパラメーター、すなわち、呼吸抵抗、中枢気道抵抗、エラスタンス、ティッシュダンピング、ティッシュエラスタンス及び最大吸気量（肺の容量）を測定した。生データの信頼性については、COD>0.95の基準を採用し、これを下回る場合には、個別データあるいはその個体を解析から除外した。

実験中の定常状態のベンチレーションは、150回/minとし、測定プログラム（Script）は、下記のとおりとした。

*Deep Inflation* × 2回 → (*Snap Shot* → *Quick Prime*) × 3回

マウスは三種混合麻酔薬を腹腔内投与後、気管を切開し、装置に保定した。その後、筋弛緩剤を腹腔内投与し、自発呼吸を抑制してから、ばく露前の測定を行った。被験物質のばく露は、装置に付属するネブライザーを用い、カニューレから直接気管内へ3分間噴霧することにより行った。

ネブライザーにセットする溶液濃度は、0.05、0.5 及び 5 g/Lとした（それぞれ C群、M群及びH群）（表2、表3）。また、硫酸アンモニウムは 5 g/Lあるい

は塩化ナトリウムは 4.5 g/L の濃度の水溶液を用いた (表 2)。

ネブライザーによるエアロゾルの給気流量は 0.202 mL/min、ネブライザーの Duty Cycle (ベンチレーション中に霧化される割合) は 50% に設定した。また、Delivery Ratio (霧化したエアロゾルが肺に沈着する割合) は、過去の文献<sup>6)</sup>から、10% から 30% 程度の幅が想定されるため、沈着量の推計では 20% を採用した。以上の数値から、3 分間ばく露で、マウス肺に沈着する硫酸水素アンモニウムの総量は、L 群 (0.05 g/L) の場合、

$$20/60000 \times 150 \times 0.202 \times 3 \times 0.05 \times 0.2 = 0.000303 \text{ mg/lung (0.303 } \mu\text{g /lung)}$$

と推測され (図 2)、M 群及び H 群ではそれぞれ 10 倍及び 100 倍の濃度で沈着するものと仮定した (表 2、表 3)。

#### 4 統計解析

C 群に対する各群との差異について、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、Steel 法による多重比較検定を行った。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 単回吸入ばく露による気道過敏性の評価

##### (1) 硫酸水素アンモニウムのチャンバー内濃度

各サブグループの低濃度群 (目標値 5 mg/m<sup>3</sup>) 及び高濃度群 (目標値 50 mg/m<sup>3</sup>) のばく露チャンバー内濃度の測定結果は、それぞれ 4.3 ± 0.70 mg/m<sup>3</sup> 及び 45.7 ± 2.9 mg/m<sup>3</sup> (平均値 ± 標準偏差) であり、概ね目標値を達成できた。

##### (2) 気道過敏性試験

5 種のパラメーターについて、メサコリンの用量反応性を折れ線グラフとして示した (図 3)。いずれの群においても、用量依存的に値が上昇していた。C 群・L 群・H 群の 3 群に対して、AC 群・AL 群・AH 群の 3 群を比較すると、全てのパラメーターについて 8 及び 16 mg/mL の用量で有意な上昇が見られた。

しかし、いずれも AC 群に対する AL 群・AH 群の変化は見られず、ばく露による影響は認められなかった。なお、AC 群の平均値は AL 群・AH 群より高値をとり、標準偏差が大きいのが、これは、1 例が各パラメーターについて特に高値をとったためであった。この個体の結果については、COD 値は除外する基準に達していないため解析に含めた。

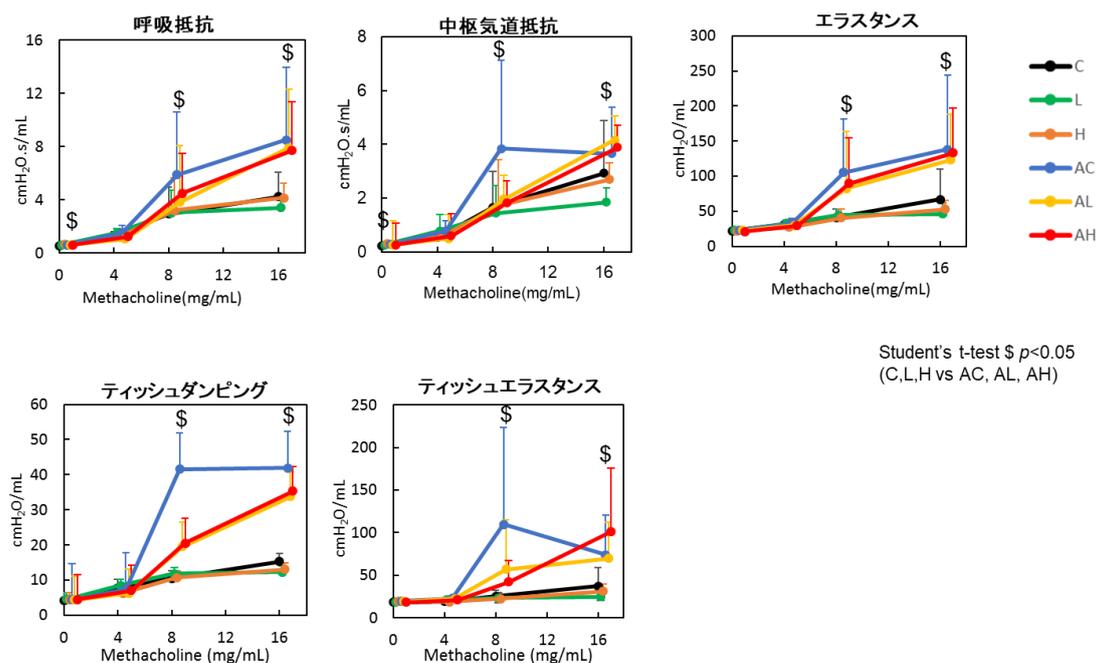


図 3. 単回吸入ばく露後の気道過敏性試験の結果

グラフを見やすくするために、群ごとに横軸におけるドットの位置をずらしてある。

エラーバーは標準偏差を示す。

## 2 気管内噴霧ばく露による即時影響評価

### (1) 硫酸水素アンモニウムのエアロゾルの粒子径

粒子径の計測結果のヒストグラムを図 4 に示した。0.05 g/L (低用量)、0.5 g/L (中用量) 及び 5 g/L (高用量) の各群の値はそれぞれ、 $0.20 \pm 0.059 \mu\text{m}$ 、 $0.32 \pm 0.076 \mu\text{m}$  及び  $0.50 \pm 0.35 \mu\text{m}$  であった (平均値  $\pm$  標準偏差)。いずれも、肺胞領域に到達可能な径であり、また、鼻部吸入ばく露システムの結果とも類似していた。ただし、高用量群では、 $1 \mu\text{m}$  を超えるような大きい粒子も比較的多く観察された。

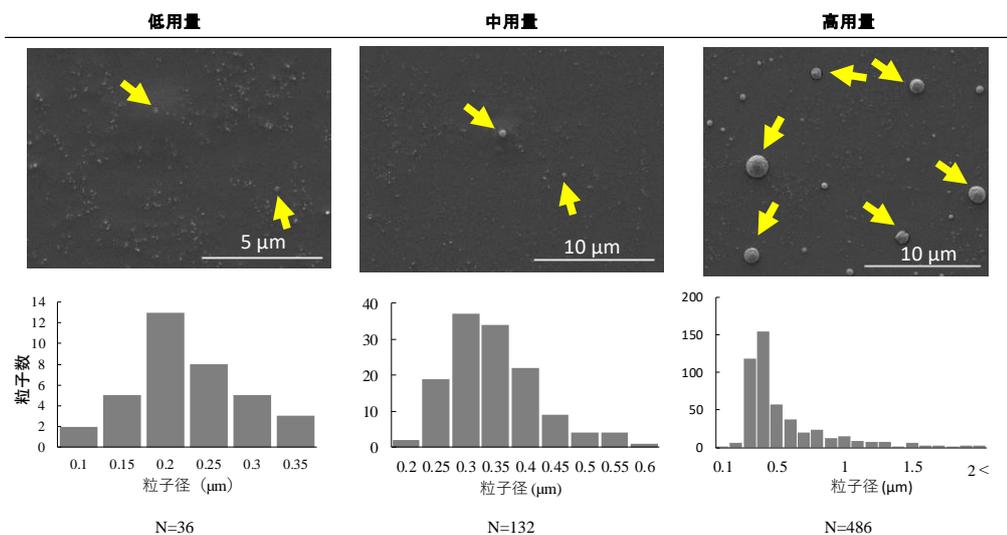


図 4. ネブライザーで発生させた硫酸水素アンモニウムのエアロゾルの粒子径

矢印はエアロゾル粒子を示している。

## (2) 正常マウスに対する即時影響

呼吸機能の各パラメーターの結果は、ばく露後の値を同一個体のばく露前のベースラインの値と比べた変化率で示した (図 5)。硫酸水素アンモニウムのばく露で呼吸抵抗が上昇し、中枢気道抵抗の値も類似する挙動を示した。硫酸水素アンモニウムの作用に用量依存性は認められず、L 群あるいは M 群について有意な上昇が観察された (図 5)。

硫酸アンモニウムのばく露でも呼吸抵抗と中枢気道抵抗の有意な増加を認めた一方、陰性対照物質の塩化ナトリウムでは影響が見られなかった。

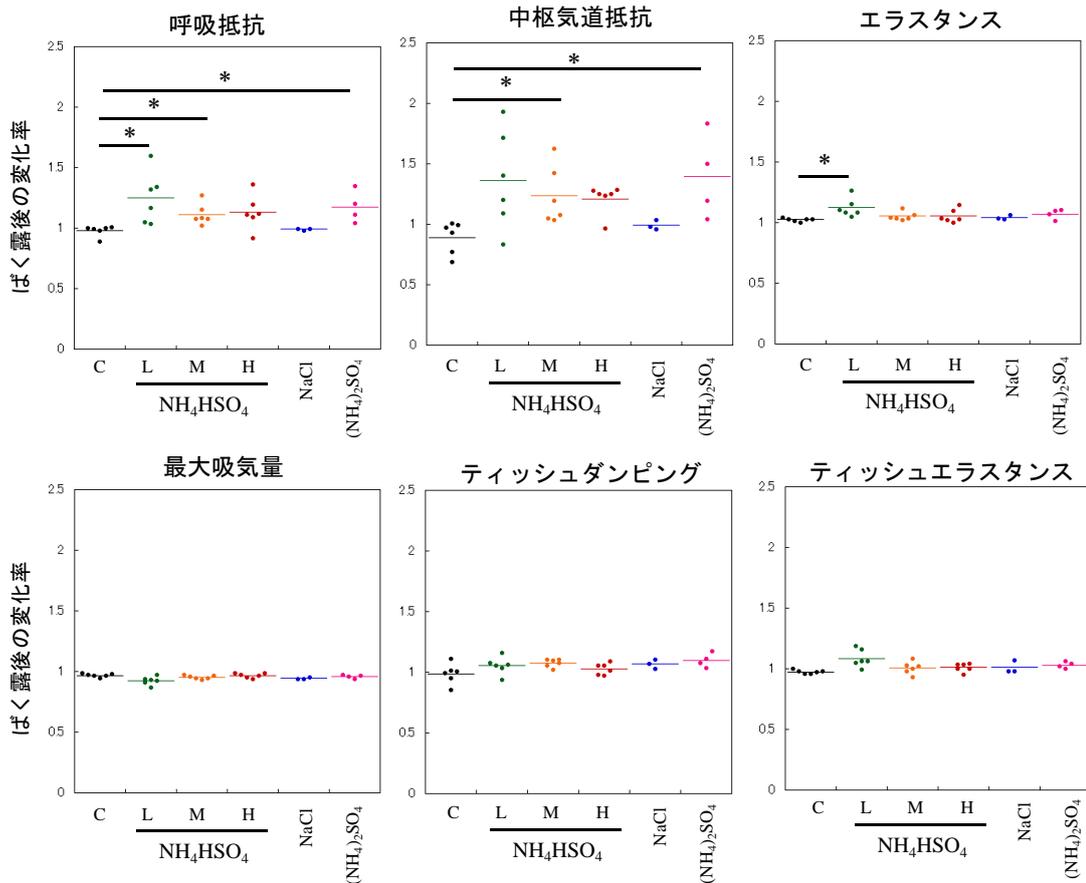


図 5. 正常マウスの呼吸機能への即時影響評価

バーは平均値を示す。\*:Steel  $p < 0.05$ . C:対照 (超純水)、 $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ :硫酸水素アンモニウム、

L:低用量群、M:中用量群、H:高用量群、NaCl:塩化ナトリウム、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :硫酸アンモニウム

## (3) ぜん息モデルマウスに対する即時影響

ぜん息モデルマウスにおいても、硫酸水素アンモニウムのばく露によって、呼吸抵抗や中枢気道抵抗の値が増加する傾向が認められた (図 6)。(2)の結果とは異なり、L 群・M 群・H 群の結果から、中枢気道抵抗では、用量依存性の変化が見られ、主に H 群で有意差が認められた。

なお、中枢気道抵抗だけでなく、エラスタンスや最大吸気量等にもやや変化が見られた。

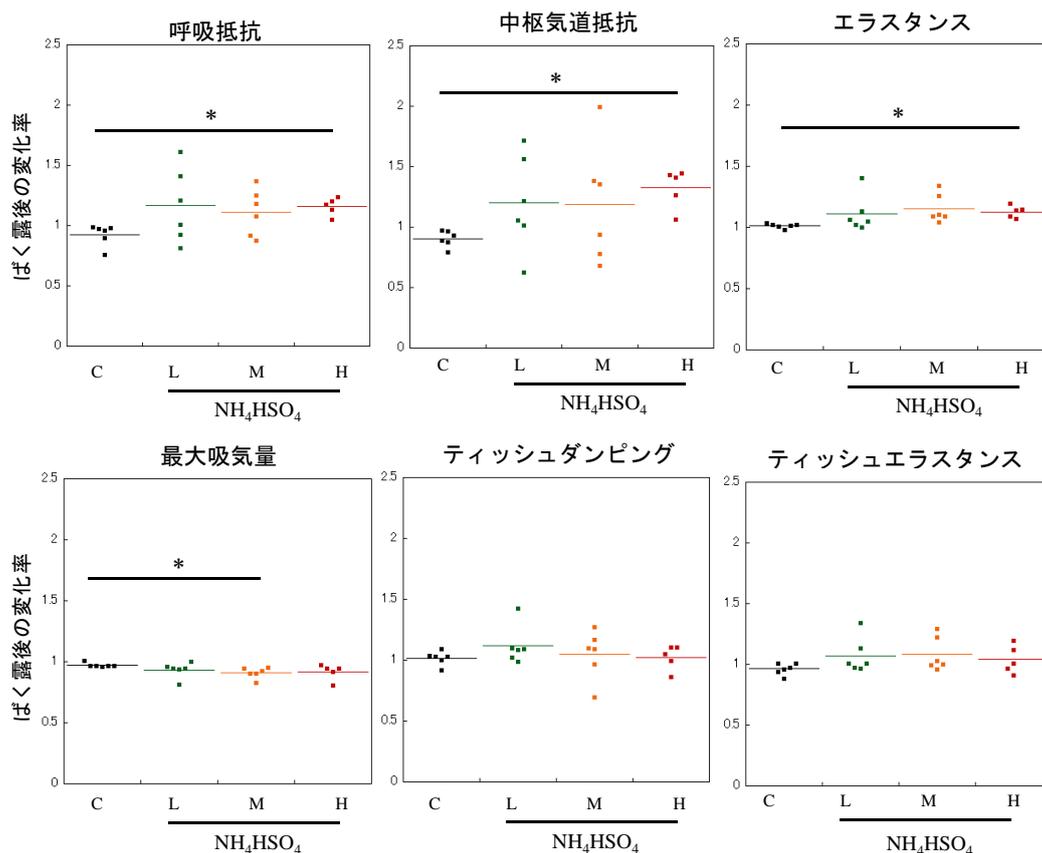


図 6. ぜん息モデルマウスの呼吸機能への即時影響評価

バーは平均値を示す。\*:Steel  $p < 0.05$ . C:対照 (超純水)、 $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ :硫酸水素アンモニウム、L:低用量群、M:中用量群、H:高用量群

#### IV 考 察

今回、ヒトやモルモットの研究で報告されている呼吸機能への影響がマウスでも認められるかを検討するため、2つの異なる実験デザインにより呼吸機能解析を行った。その結果、ばく露直後の短時間にわずかながら影響を及ぼすことが示唆された。

まず、3時間の鼻部ばく露後の気道過敏性試験については、ぜん息モデルマウスの AC・AL・AH 群の3群において、C・L・H 群に比べて有意に過敏性が増加し、メサコリンの高用量側で作用が顕著になるという典型的な試験結果が得られた。しかしながら、AL・AH 群において、AC 群よりも過敏性が高まることはなかった。ばく露によりメサコリン応答性が上がることを期待した実験デザインであったが、この結果は、3時間の単回吸入ばく露では、第3章の Calu-3 細胞の細胞膜間結合力に関する測定で示されたようなバリア機能を減弱させる影響はそれほど強くなかった可能性を示唆している。一方で、第2節で述べたようにぜん息モデルにおける個体差が大きく、1群あたりの動物数が少なかったことも解析結果に影響したと思われる。また、実験デザインそのものについても原因があるかもしれない。すなわち、3時間の吸入ばく露したマウスをばく露1時間後から気道過敏性試験

に供したものの、1匹の測定に時間を要するため、測定開始までに個体によって1から4時間程度の回復期間のバラツキがある。このことが、吸入ばく露の増悪影響をさらに捉えづらくした可能性を否定できない。しかしながら、いずれのパラメーターに関しても増悪影響を疑わせるような結果は見られず、これらを考慮しても、3時間単回ばく露による気道過敏性への影響は無かったと考えるのが妥当であろう。硫酸アンモニウムのぜん息モデルモルモットへのばく露実験では、アセチルコリンによる気道過敏性試験で顕著な影響を認めたが<sup>2,4)</sup>、反復ばく露実験での結果であった。本研究においても、例えば第2節と同様の実験プロトコールであれば、何らかの陽性結果が認められた可能性はある。

一方、気管内噴霧ばく露の実験から、高濃度の硫酸水素アンモニウムが、わずかではあるが、呼吸機能への即時影響を及ぼすことが示された。今回の試験系においては、呼吸抵抗の結果は中枢気道抵抗と類似する挙動を示し、ティッシュダンピングやティッシュエラスタンスの変化がほとんど無かったため、呼吸抵抗の変化は主に上部の気管(気道)の収縮であったと推測された。また、硫酸アンモニウムでも同様の結果が得られ、硫酸塩に共通する機構である可能性がある。おそらく、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(迷走神経等や気管支周囲の平滑筋)を刺激したものと推測される<sup>7,8)</sup>。

なお、硫酸塩は吸湿性が高いため、空気中や呼吸器内でも凝集により粒子径が大きくなることが推測され<sup>9,10)</sup>、高用量のエアロゾル粒子の観察で、粒子径が大きかったのはこうした影響の結果かもしれない。しかし、本試験系においては気管内に直接噴霧するため、少なくとも鼻腔内で粗大粒子がトラップされてしまう恐れはなく、粒子径の差は呼吸機能評価には大きな影響を与えなかったと考えられる。

今回の実験においては、呼吸機能への影響は顕著ではなく、正常マウスとぜん息モデルマウスを比較してぜん息での作用の増強は認められなかったものの、正常マウス及びぜん息モデルマウスの別試行の実験で、再現性良く陽性結果が得られた。硫酸塩の即時影響をモルモット以外の実験動物で示したのは初めてのことである。この実験から、ぜん息患者への吸入実験で気道コンダクタンスの有意な低下が見られるレベル<sup>1)</sup>のばく露負荷を与えた場合には、同様の影響がマウスで再現されることがわかった。しかし、このばく露方法は、エアロゾルとしての濃度や、気道・肺実質への沈着量が不明であるなどの不確実性もあり、また、正常マウスに関しては用量依存性が確認されず、最小毒性量(あるいは最小毒性濃度)や無毒性量(あるいは無毒性濃度)を特定することはできなかった。なお、フレキシベントによる気管内噴霧は、経気道のドラッグデリバリーの研究において活用され始めており<sup>6)</sup>、今回、吸入毒性の評価系として有用であることを示した点でも意義があると思われる。

## V 文 献

- 1) Utell, M. J., Morrow, P. E., Speers, D. M., *et al.*: *Am Rev Respir Dis*, **128**, 444-450, 1983.
- 2) 北畠正義, 今井正之, 富田泰子, 他 : 大気汚染学会誌, **16**, 239-243, 1981.
- 3) 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.
- 4) 北畠正義, 今井正之, 小林 勇, 他 : 大気汚染学会誌, **14**, 8-15, 1979.
- 5) US. Environmental Protection Agency. Advances in inhalation gas dosimetry for derivation of a reference concentration (RfC) and use in risk assessment. EPA/600/R-12/044. 2012.
- 6) Yang, L., Gradl, R., Dierolf, M., *et al.*: *Small*. **15**, e190411224, 2019.
- 7) 嗟峨井 勝 : 日衛誌, **74**, 1-11, 2019.
- 8) Schlesinger, R. B., Cassee, F.: *Inhal Toxicol*, **15**, 197-235, 2003.
- 9) 持田 陸宏 : 低温科学, **72**, 41-48, 2014.
- 10) Martonen, T.B., Patel, M.: *J Toxicol Environ Health*, **8**, 1001-1014, 1981.