

平成30年度
ぜん息モデルマウスの作製・評価

東京都健康安全研究センター
生体影響研究科

目的

OVA誘導型ぜん息モデルマウスを作製する

硫酸アンモニウムがぜん息症状に与える影響を検討するため、軽度な症状のぜん息モデルを得る。

前回の分科会での報告

主な検討内容

期間： 短期モデル・長期モデル

感作方法： 経鼻投与・ネブライザー吸入

手法： 免疫学的解析・気道抵抗(気道過敏性)

⇒経鼻投与は炎症が激しすぎたため、ネブライザー短期モデルを再検討し、今後の実験に採用することにした。

経鼻投与とネブライザー吸入の比較（前回報告）

●作製方法

動物: BALB/c ♀マウス 8週齢 各群 N=5

免疫: 3回 腹腔投与 OVA (2 μ g) とアラム (7mg) の混合液 0.3mL

感作: 6回 経鼻投与 0.2% OVA 40 μ L または ネブライザー吸入 1.5% OVA 30分

●肉眼観察

経鼻投与



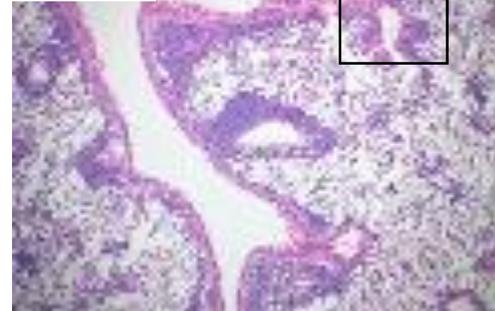
ネブライザー



●病理組織像

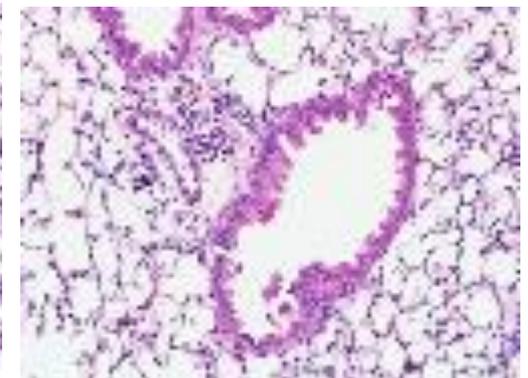
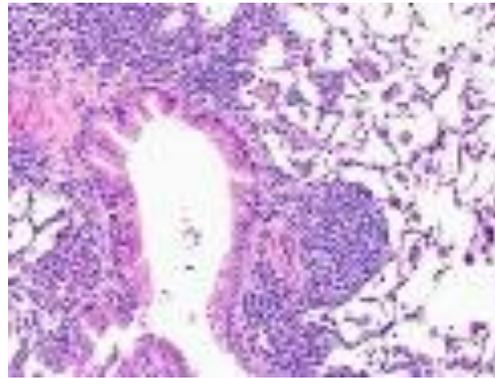
#101

経鼻投与



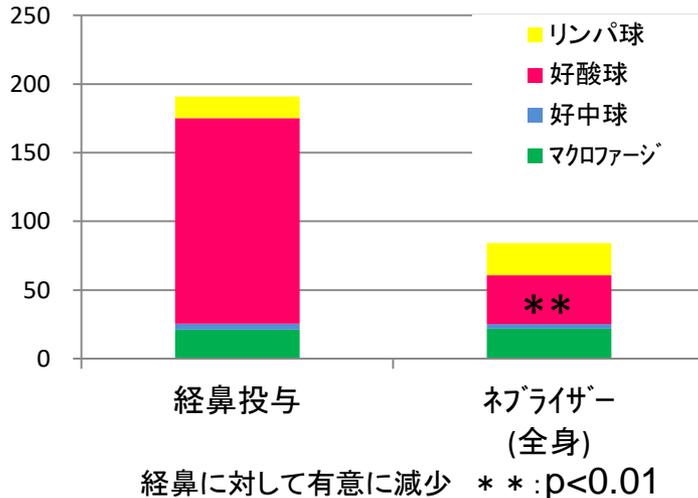
#202

ネブライザー



●BALF中の細胞診断

($\times 10^4$ 個/mL)



経鼻投与よりも弱く、比較的均一な炎症反応が観察された。

短期モデルの再確認・気道抵抗測定

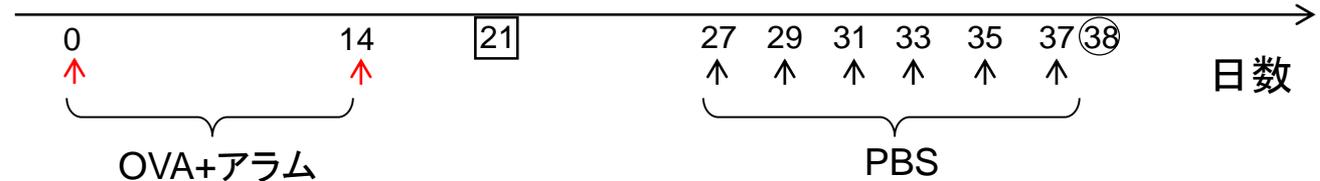
●作製方法

動物: BALB/c ♀ マウス 6週齢 各群 N=9

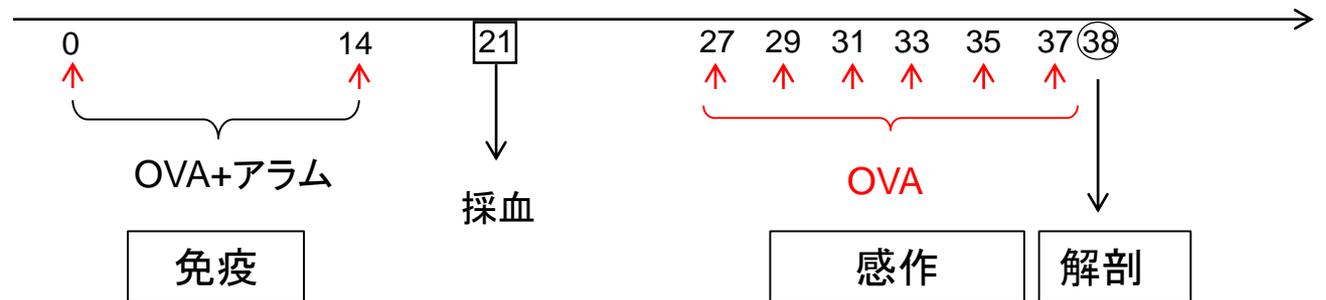
免疫: 2回 腹腔投与 OVA(2 μ g)とアラム(7mg)の混合液 0.3mL

感作: 6回 ネブライザー吸入 1.5% OVA 30分

対照群



ぜん息群



●主な分析項目

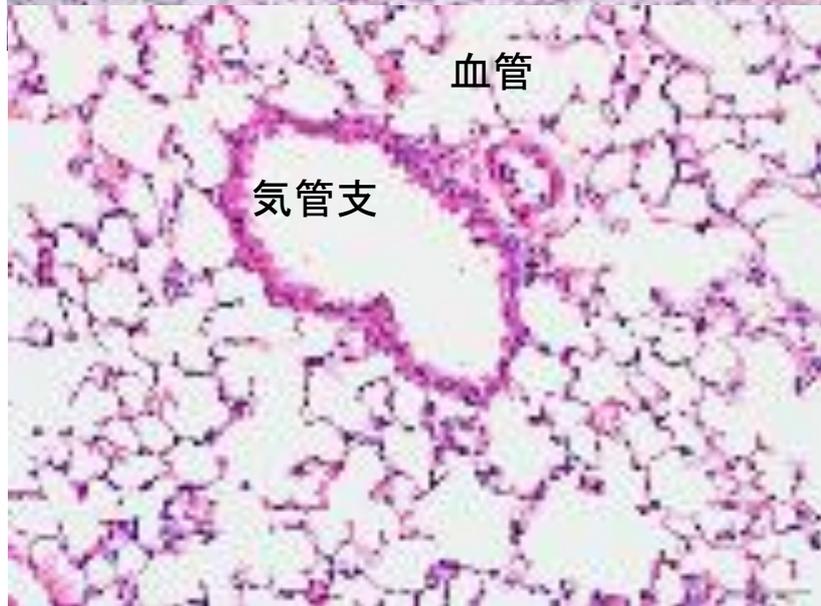
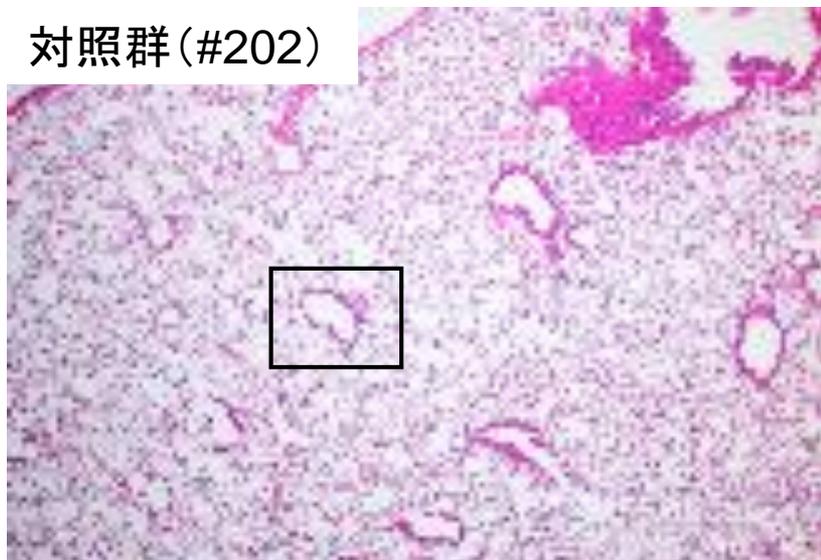
病理組織学的解析

BALFの細胞診断

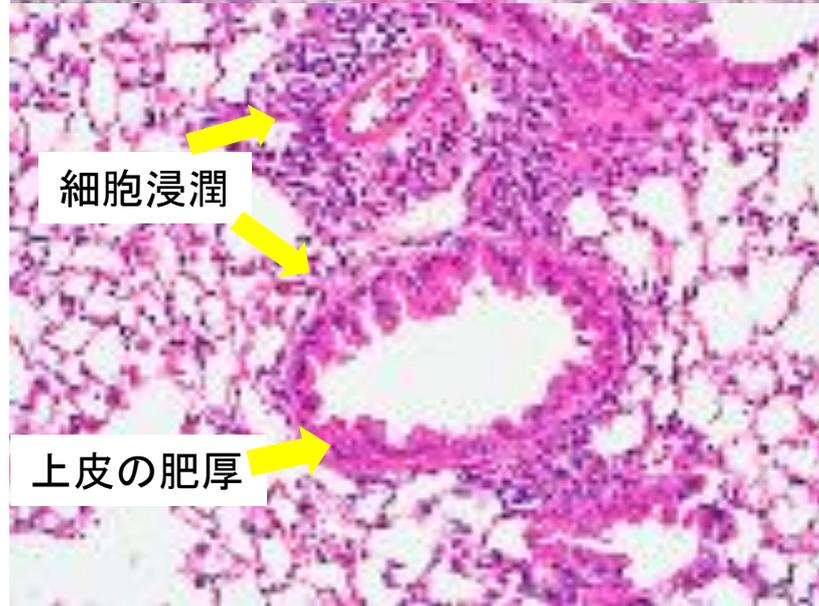
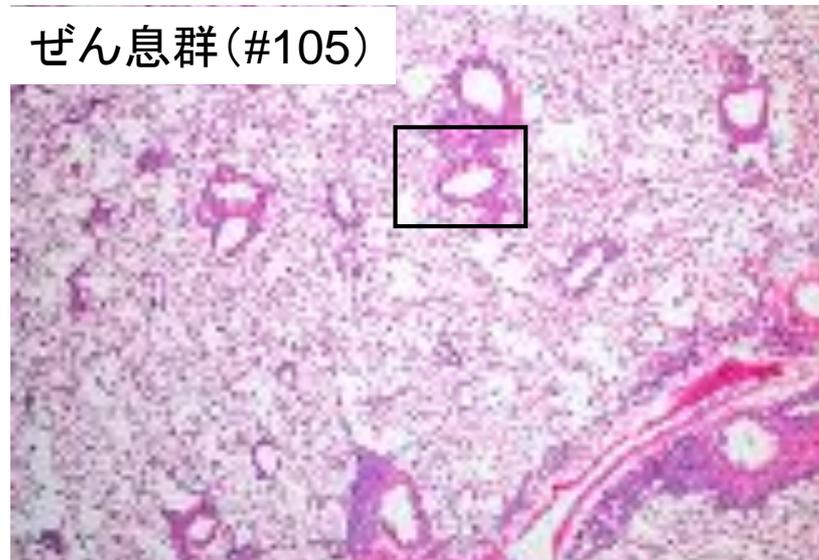
気道抵抗(機器の導入時の予備検討)

病理組織像

対照群 (#202)



ぜん息群 (#105)

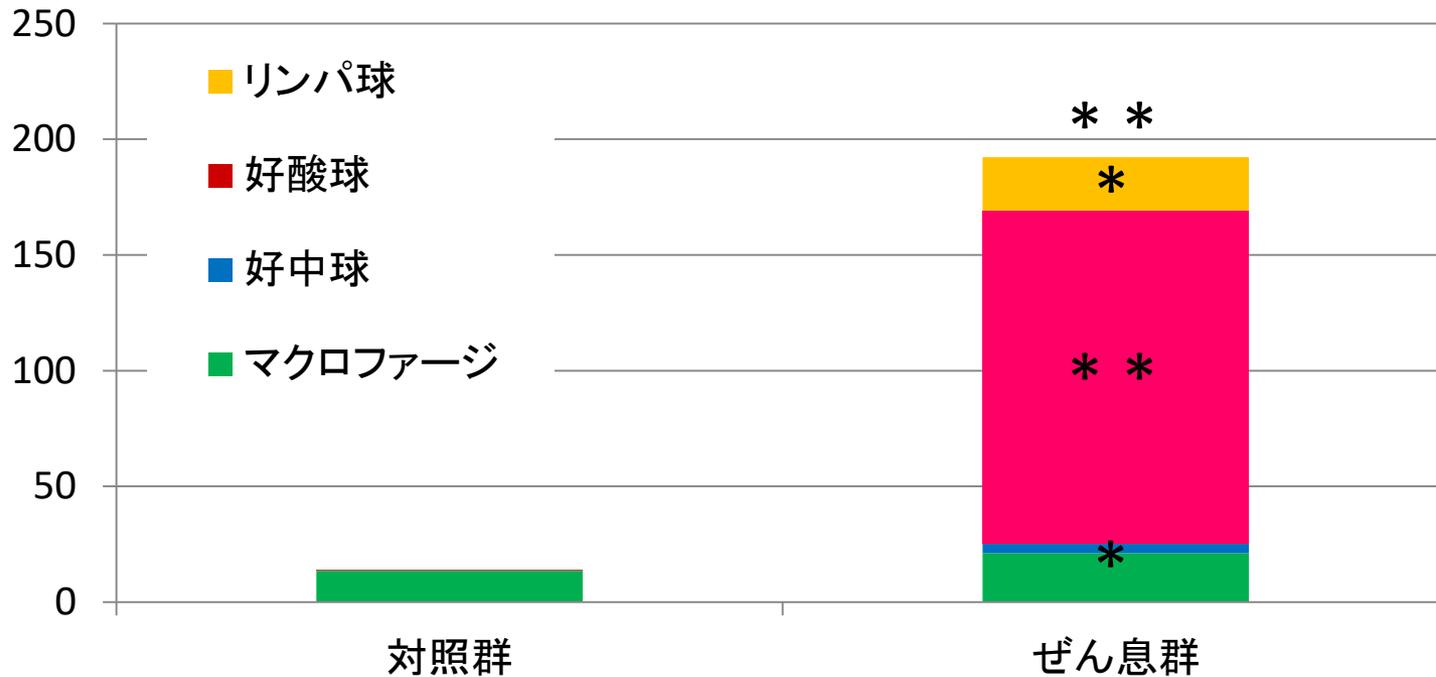


(N=9)

前回と同様に軽度なぜん息症状の誘導が確認された。

BALF中の細胞診断

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



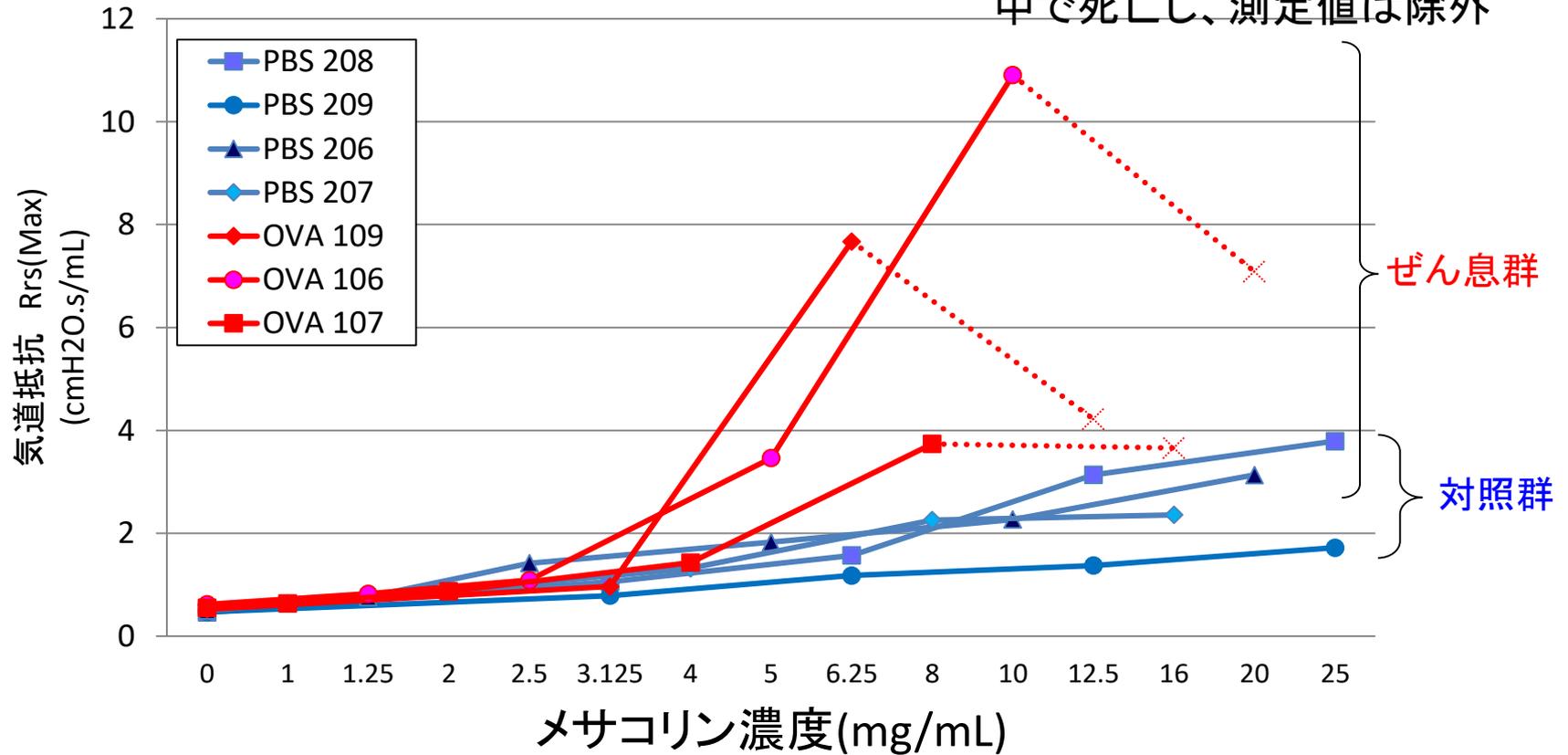
(N=5)

有意な増加 * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

好酸球性の炎症反応が再確認された。

気道抵抗の測定(条件検討)

点線部分: 最高濃度の測定途中で死亡し、測定値は除外



(N=4)

ぜん息群で気道抵抗の上昇が認められたが、メサコリン濃度等の再検討が必要。

ぜん息モデルマウス作製 まとめ

●経鼻投与とネブライザー吸入による感作方法を検討した。

●ネブライザー吸入により、軽度なぜん息モデルを作製することができた。

●新規に導入した呼吸機能解析装置により気道抵抗の測定が可能になった。

※メサコリン刺激条件の再検討が必要

●同じ作製プロトコールで、現在まで4回の実験を実施し、おおむね同程度の症状が観察されている。

令和元年度
ぜん息モデルマウスへの
硫酸アンモニウム吸入ばく露試験

東京都健康安全研究センター
生体影響研究科

モデルマウスへの硫酸アンモニウムばく露(予備試験)

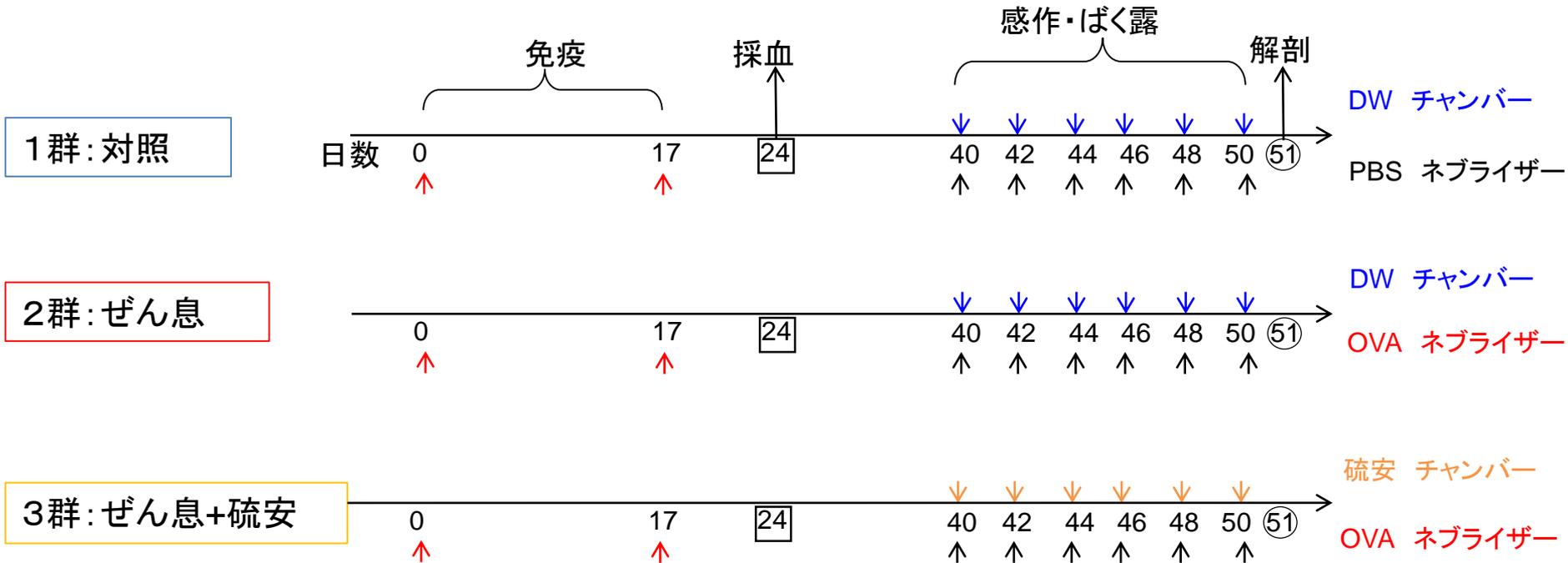
●方法

動物: BALB/c ♀マウス 15週齢 各群N=7

免疫: 2回 腹腔投与 OVA(2 μ g)とアラム(7mg)の混合液 0.3mL

感作: 6回 ネブライザー吸入 1.5% OVA 30分

ばく露: 6回 10 mg/m³ 硫酸アンモニウム(硫安) 1時間



●主な分析項目

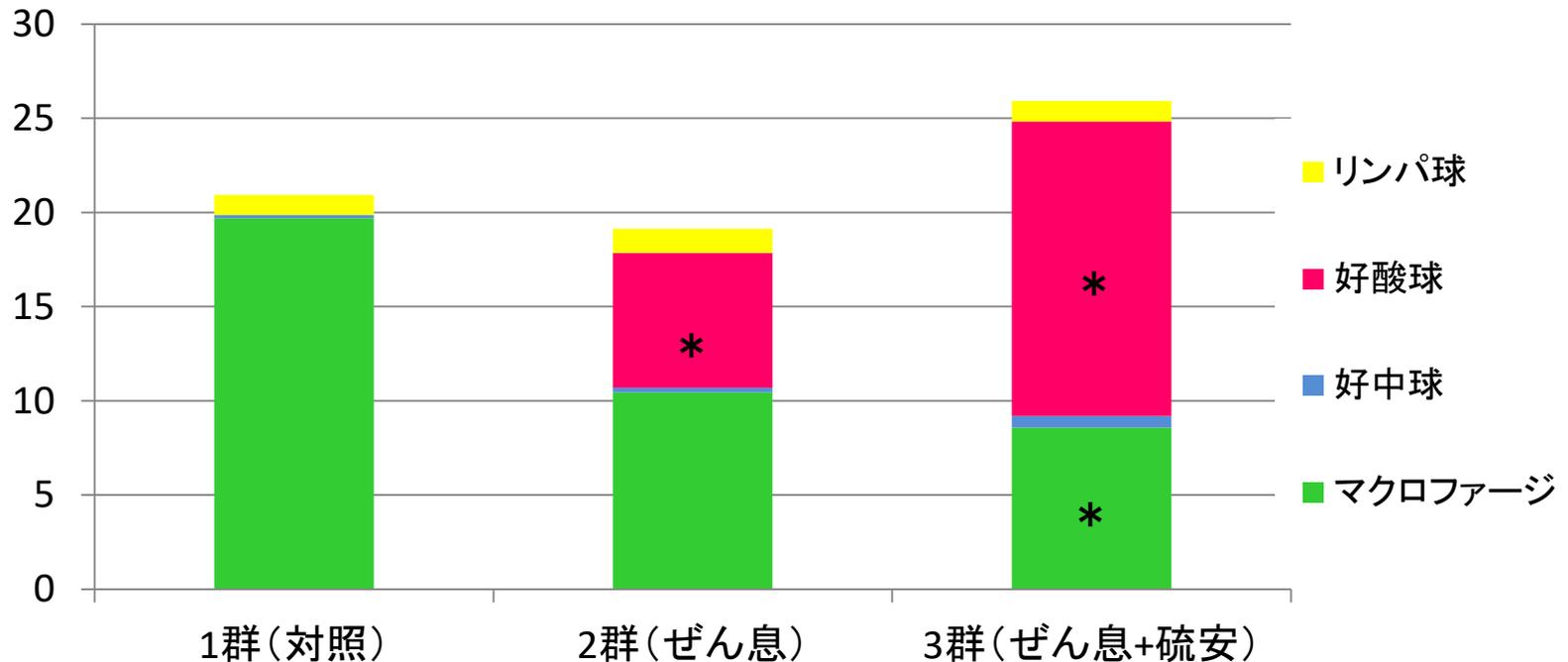
病理組織学的解析・・・HE染色及びPAS染色

免疫学的解析・・・リンパ球サブセット分析(肺の従属リンパ節)、各種の遺伝子発現(肺組織)

気道抵抗

BALF中の細胞診断

($\times 10^4$ 個/mL)



(N=4)

* $p < 0.05$ 1群に対する有意差

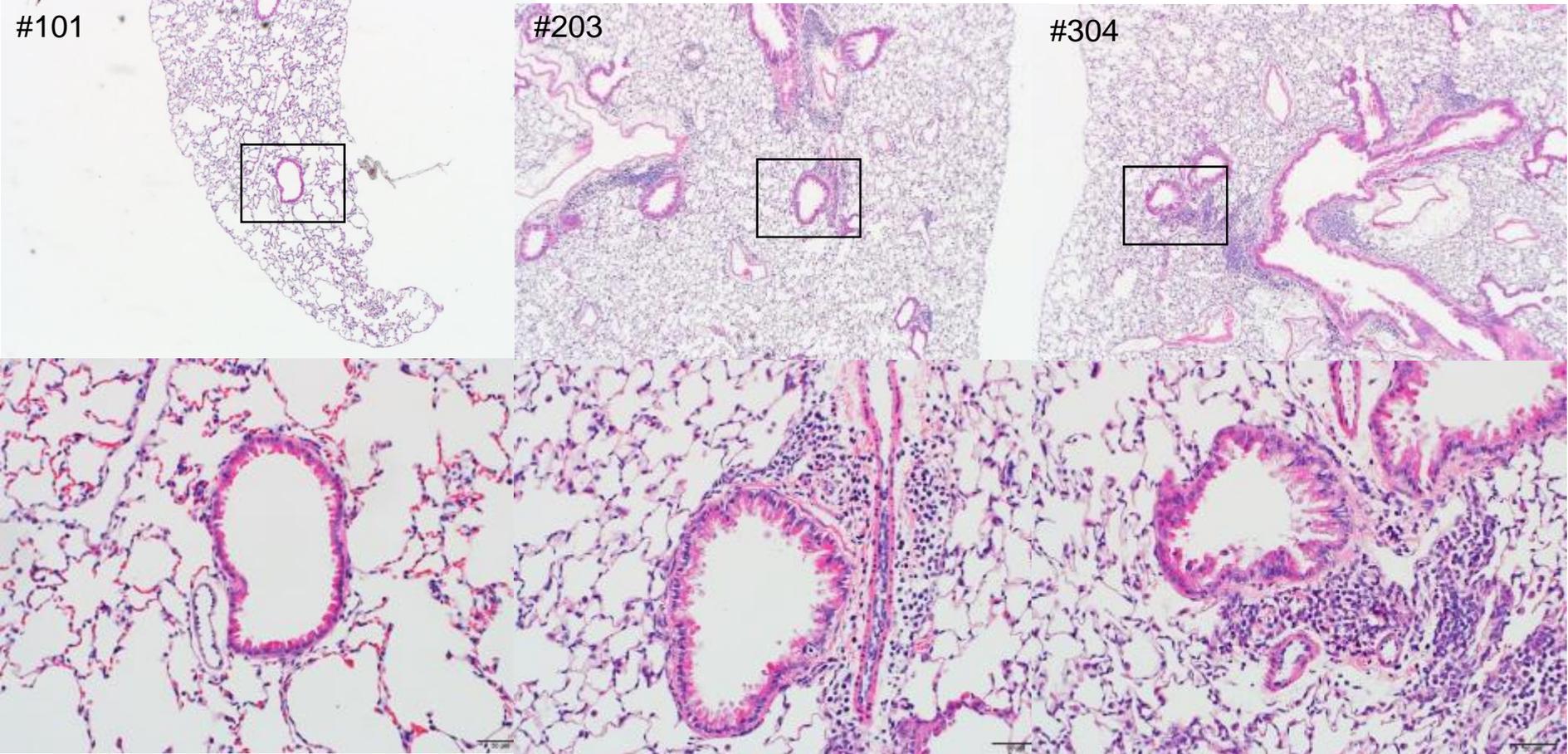
2群及び3群で軽度な好酸球性炎症が確認され、3群において好酸球の増加がやや強かった。

病理組織像

1群 (対照)

2群 (ぜん息)

3群 (ぜん息+硫安)



2群及び3群で好酸球性の肺炎症が見られたが、2群に比べて3群で顕著な増強は認められなかった。

病理所見のまとめ

組織・部位			1群	2群	3群
			対照 (N=7)	ぜん息 (N=7)	ぜん息+硫安 (N=7)
気管支 ～終末気管支	近位	血管・気管支周囲粘膜 浮腫	0	0	0
		炎症細胞浸潤 (気管周囲)	2 (0.75)	7 (0.93)*	7 (1.00)*
		炎症細胞浸潤 (血管周囲)	0	7 (1.00)**	7 (1.00)**
		気管支上皮肥厚	0	6 (1.33)**	6 (1.33)**
		杯細胞増生	2 (1.00)	7 (1.43)*	7 (1.43)*
		気管支平滑筋肥厚	0	0	1 (0.14)
		遠位	血管・気管支周囲粘膜 浮腫	0	0
		炎症細胞浸潤 (気管周囲)	0	1 (0.50)	4 (0.63)
		炎症細胞浸潤 (血管周囲)	0	2 (1.00)	5 (0.70)*
		気管支上皮肥厚	0	4 (1.25)	6 (1.08)**
		杯細胞増生	0	3 (1.00)	6 (1.17)**
		気管支平滑筋肥厚	0	1 (1.00)	0
肺胞管 ～肺胞		マクロファージ・多核巨細胞浸潤	0	0	0
		マクロファージ集簇	0	0	0
		出血	0	0	0

スコア: ±=0.5, +=1, ++=2, +++=3

数字: 病変が観察された個体数

括弧内: スコア平均値 = スコア合計値 / 病変が観察された個体数

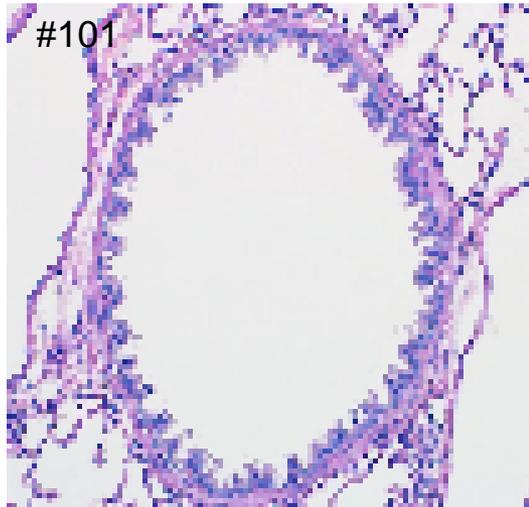
1群に対する有意差

* : p<0.05 * * : p<0.01

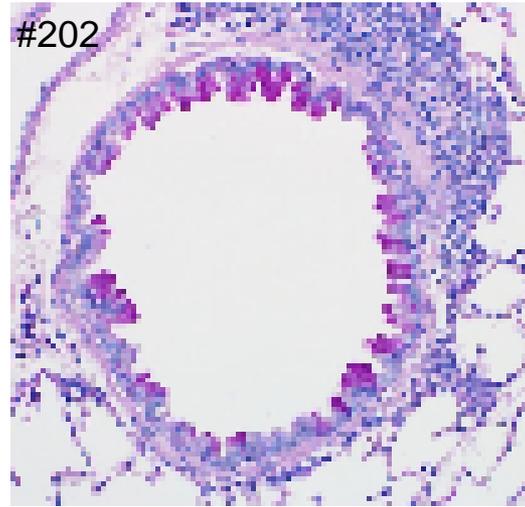
遠位(深部)の終末気管支においては、3群で比較的強い反応が見られた。

細気管支における粘液産生 (PAS染色)

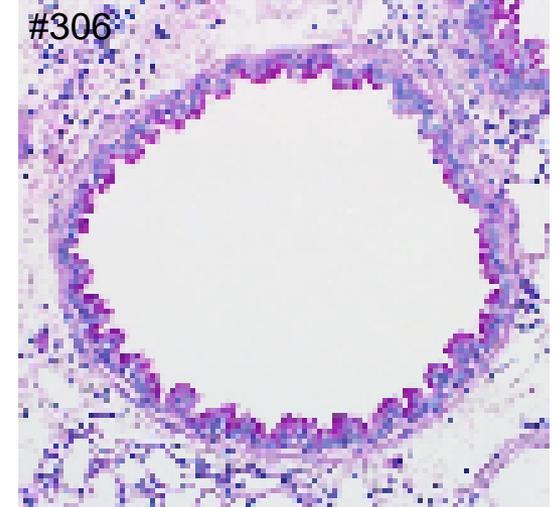
1群 (対照)



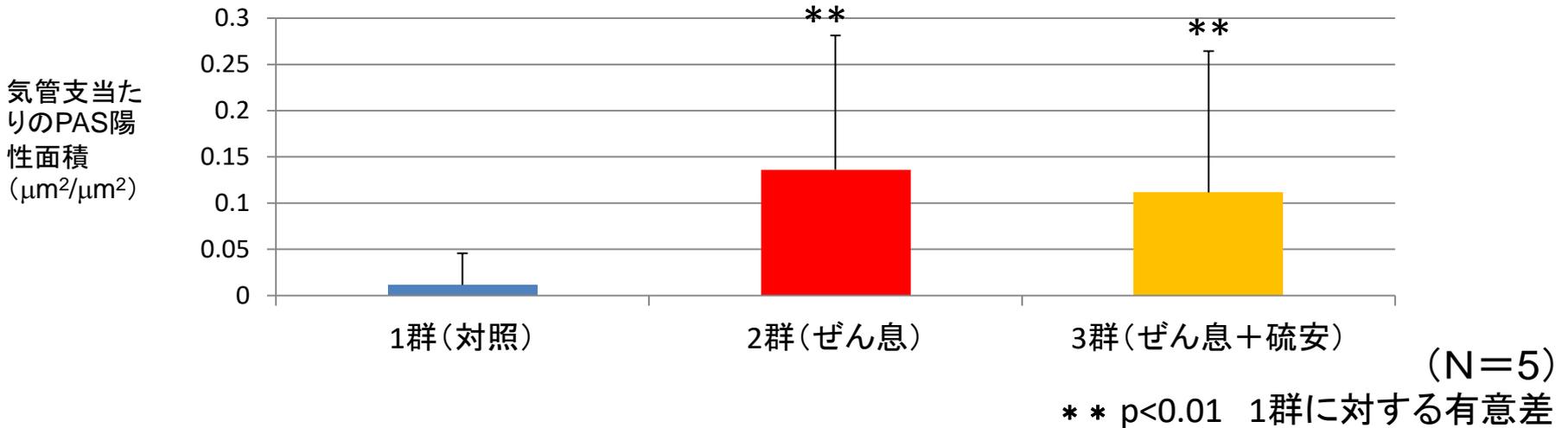
2群 (ぜん息)



3群 (ぜん息+硫安)

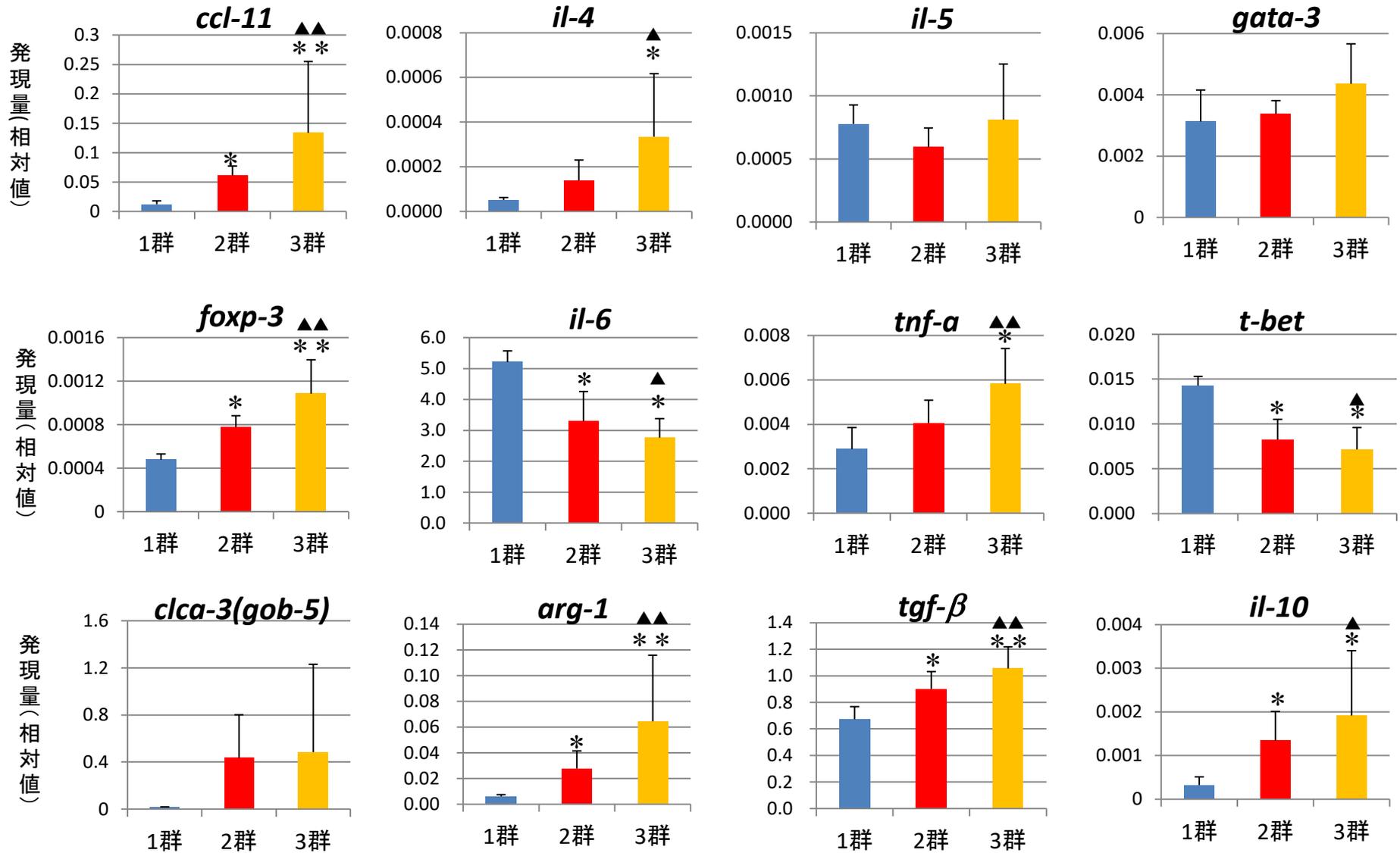


PAS陽性面積



粘液産生の亢進が見られたが、2群と3群の両方で差異は認められなかった。

肺組織における遺伝子発現



** p<0.01、* p<0.05: 1群に対する有意差

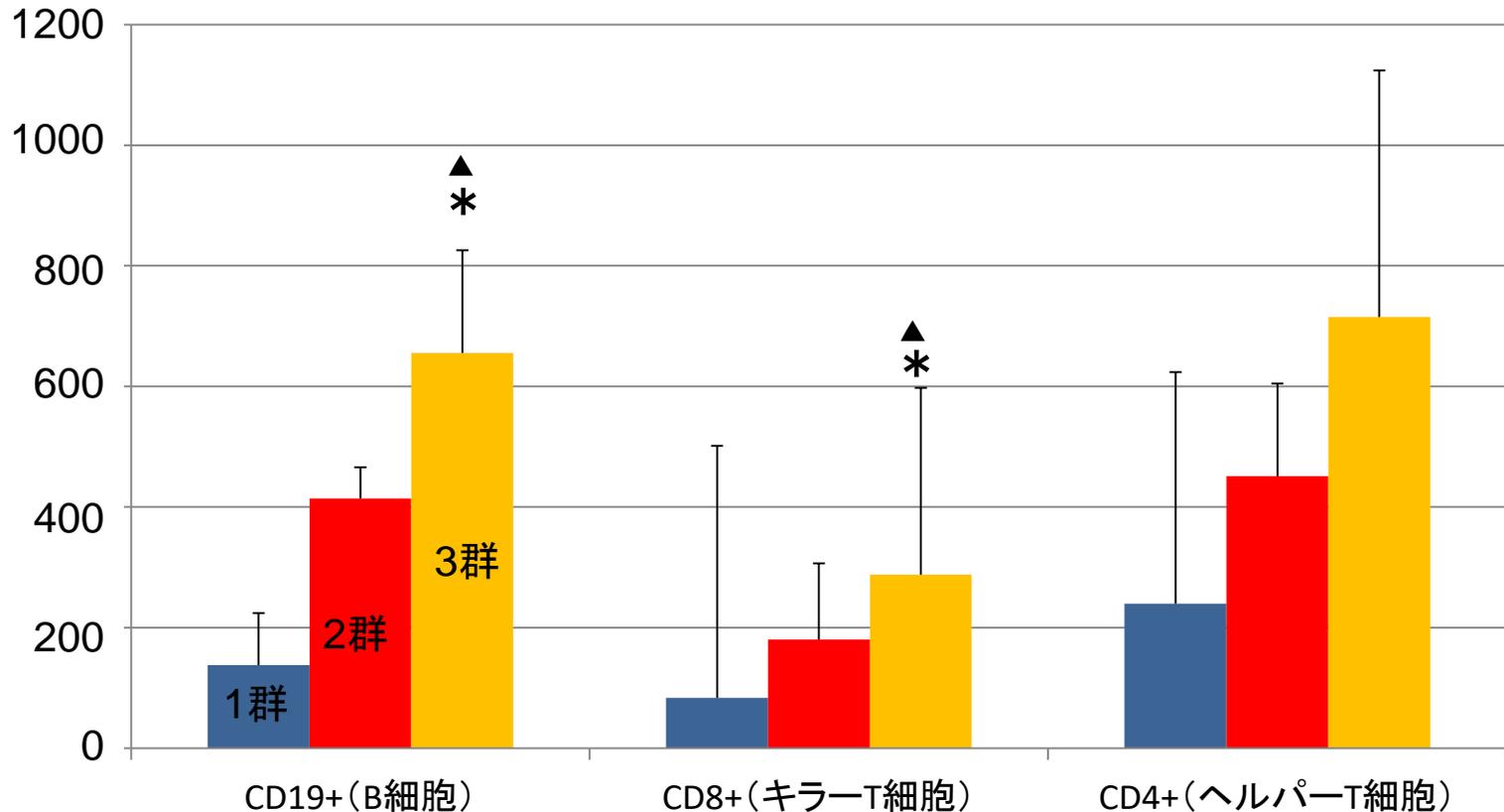
▲▲ p<0.01、▲ p<0.05: 傾向検定

(N=4)

2群及び3群においてぜん息症状を示す発現パターンが見られた。
やや増悪を示す傾向が見られたが、2群と3群の間に有意差は認められなかった。

肺の従属リンパ節におけるリンパ球サブセット

($\times 10^3$ 個/マウス)



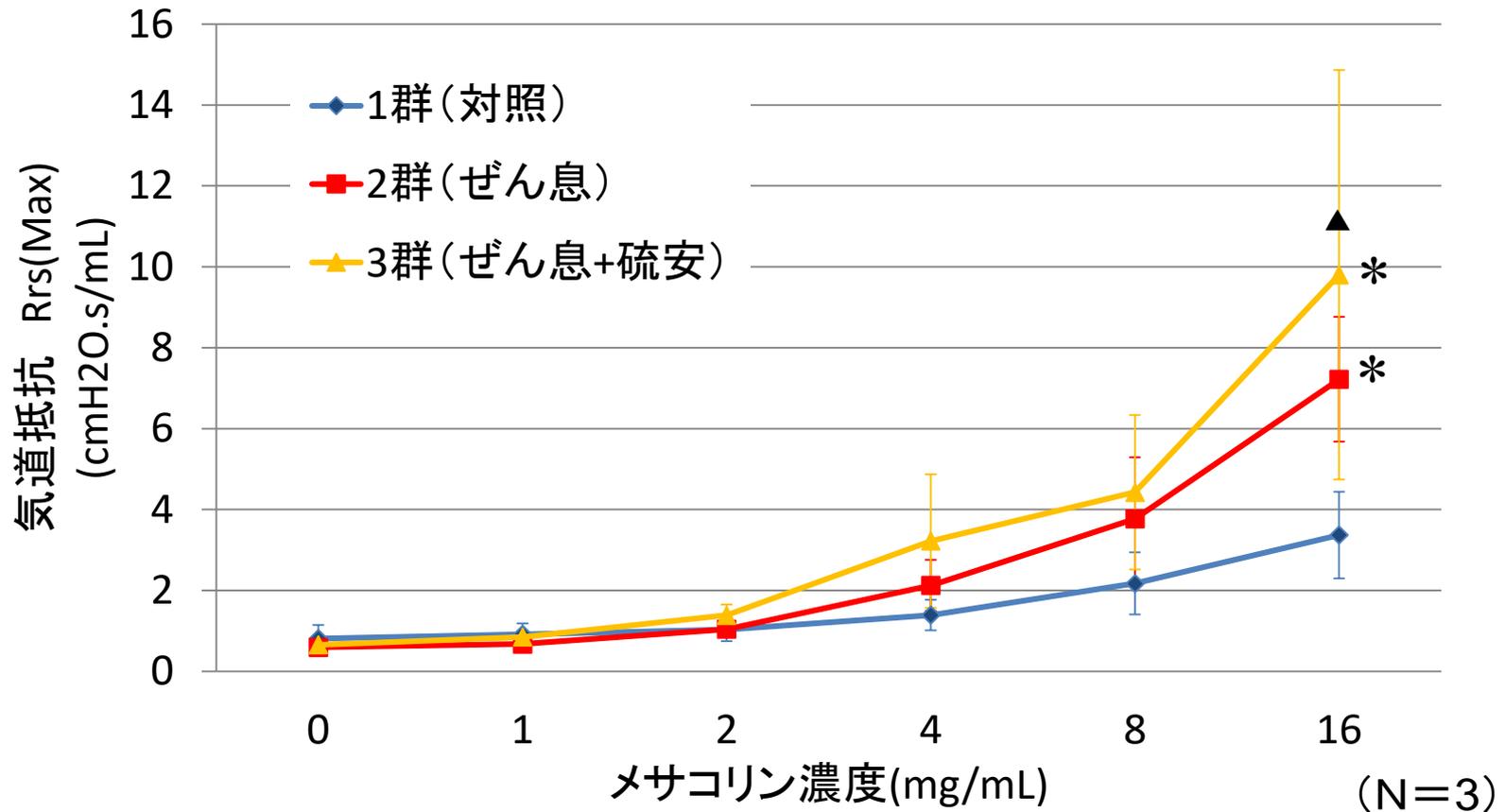
(N=4)

1群に対する有意差 * $p < 0.05$

▲ $p < 0.05$: 傾向検定

3群において、B細胞とキラーT細胞の有意な増加が見られ、増悪の傾向も認められたが、N=4ではばらつきが大きいいため、注意が必要である。

気道抵抗(全抵抗)



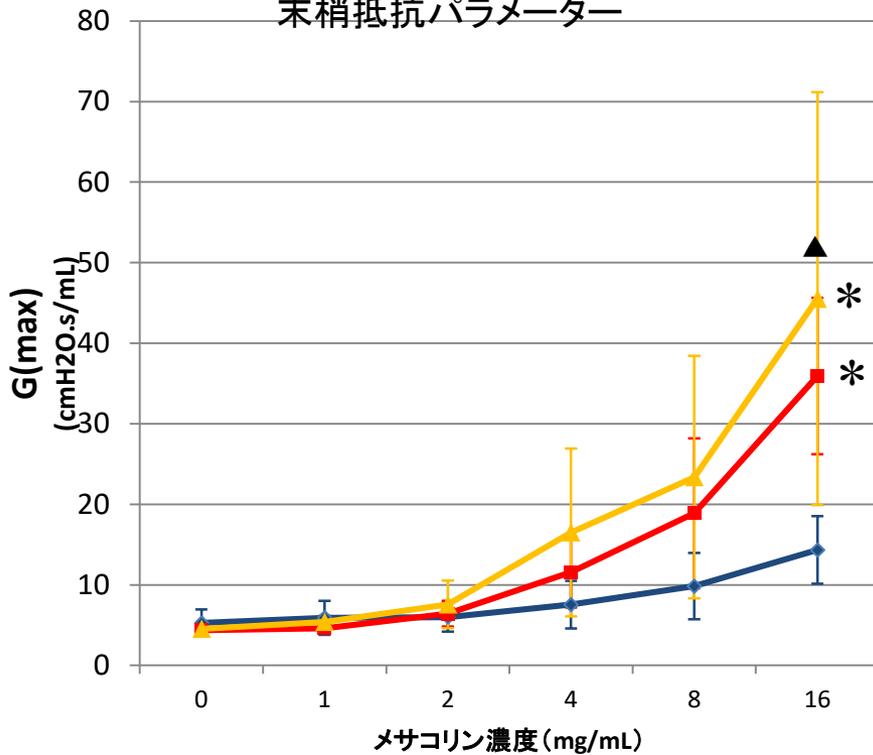
* $p < 0.05$ 1群に対する有意差

▲ $p < 0.05$: 傾向検定

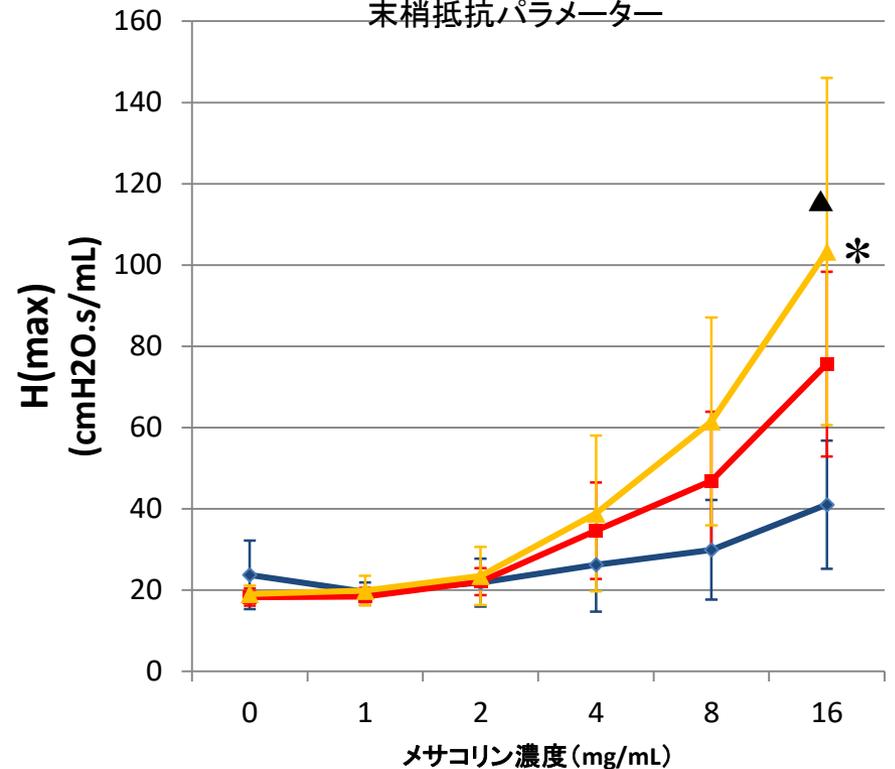
高濃度のメサコリン刺激により、2群及び3群において気道抵抗の有意な増加が認められ、増悪の傾向も見られたが、N=3でばらつきが大きいため注意が必要である。また、2群と3群の間に有意差は認められなかった。

気道抵抗(末梢気道抵抗)

G(tissue damping)
末梢抵抗パラメーター



H(Tissue Elastance)
末梢抵抗パラメーター



(N=3)

* p<0.05 1群に対する有意差

▲ p<0.05: 傾向検定

末梢の抵抗についても増悪の傾向を示したが、全抵抗と同様に、ばらつきが大きかった。

考察

●10mg/m³(都内大気濃度の約5000倍)の硫酸アンモニウムばく露によるぜん息症状の顕著な増悪は見られなかった。

モルモットとは異なる(吉田ら1979年、北畠ら1979年)。マウスではより強い条件でのばく露が必要なかもしれない。

●いくつかの項目で、増悪を示唆する結果も得られたが、2群と3群の間に有意差は無かった。

・肺実質(遠位)での炎症反応の微増・・・硫酸アンモニウムが肺気腫等、肺実質で影響を与える報告がある(Buschら1984年、Loscutoffら 1985年)

・リンパ球数の増加・・・硫酸水素アンモニウムのばく露でわずかに血中IgE濃度が変化する報告がある(Casseeら 1999年)

⇒本試験では、動物数を増やすとともに、高濃度のばく露を行う。

本試験の実験概要(現在、実施中)

- 基本的に方法は予備試験と同じにする
- ただし、以下を変更する
 - ・1群16匹
 - ・正常マウスにおける硫酸アンモニウムの影響を再確認する
 - ・高濃度群(100mg/m³)を追加

群	マウス	硫酸アンモニウム吸入ばく露	動物数(気道抵抗)
1	正常	0 mg/m ³	16 (5)
2	正常	10 mg/m ³	16 (5)
3	正常	100 mg/m ³	16 (5)
4	ぜん息	0 mg/m ³	16 (5)
5	ぜん息	10 mg/m ³	16 (5)
6	ぜん息	100 mg/m ³	16 (5)

BALB/c ♀マウス
15週齢

