

令和3年度  
正常マウスへの  
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3年度の研究計画

## 目的

正常マウスに対する急性・亜急性の吸入毒性を調べる。  
ぜん息増悪の検討試験で用いる濃度領域の選定に役立てる。

## ■ エアロゾルの性質確認

- ・ 鼻部ばく露チャンバーにおけるエアロゾル濃度と粒子径を調べた  
→ 粒子径のピークは0.3~0.5 $\mu\text{m}$ であった

## ■ 急性ばく露実験

- ・ 単回、3時間ばく露による急性毒性を確認した  
→ 最大で500mg/m<sup>3</sup>のばく露を実施したが、影響は認められなかった

## ■ 28日間吸入ばく露実験（亜急性吸入毒性試験）

- ・ 14日間の予備実験  
→ ほとんど毒性が見られなかった。なお、体重減少等の極端な動物への負荷も無かった
- ・ 3時間/日で28日間ばく露し、反復ばく露の影響を詳細に調べる。
- ・ 最高濃度を予備実験と同一にして3濃度を設定した。

## ■ 呼吸機能への即時影響

- ・ 硫酸塩の、ヒトの吸入試験 (Utell *et al.* 1983) やモルモットのぜん息モデル実験において、ばく露直後に影響が観察されているが (吉田ら 1979)、マウスの情報は無い。
- ・ 呼吸機能解析装置により、マウスへの即時影響を調べる。
- ・ 今年度は、高濃度で影響の有無を探る。

# (1) 28日間吸入ばく露実験

## ■ 実験概要

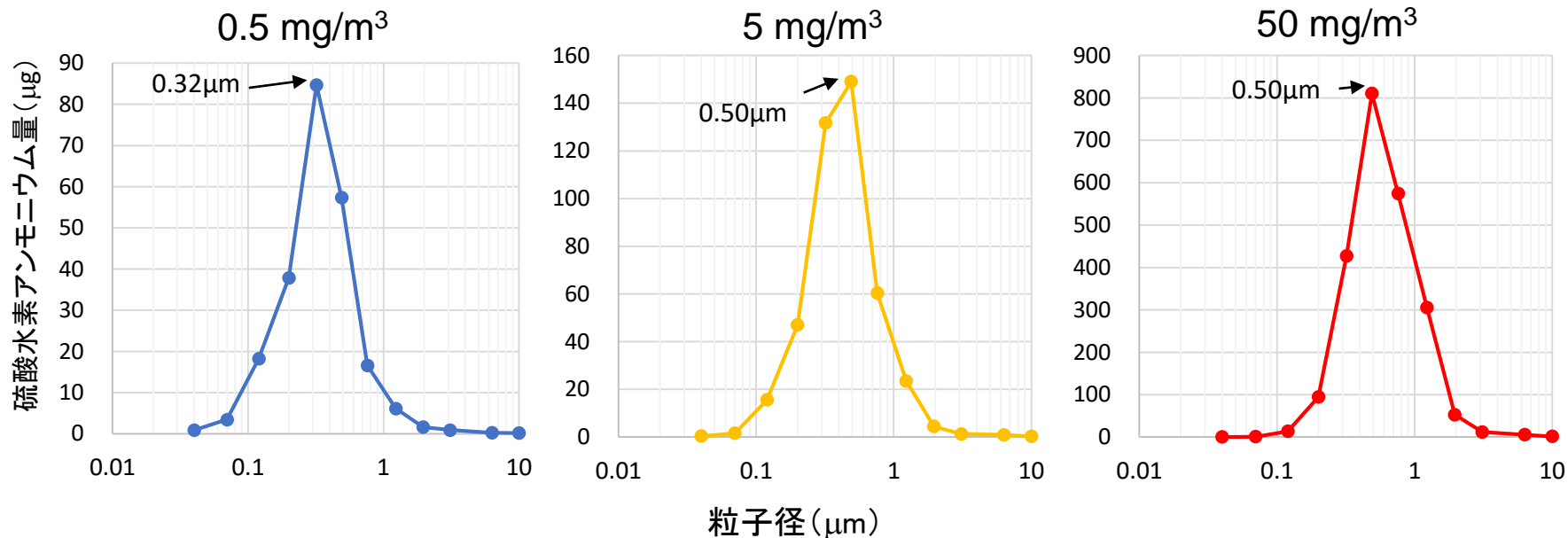
被験物質	硫酸水素アンモニウム(富士フィルム和光純薬:純度99.9%、014485-100、CAS:7803-63-6)
動物	BALB/c マウス 8週齢 雄24匹・雌24匹
ばく露条件	吸入鼻部ばく露、3時間/日、28日間連続ばく露
剖検・解析	最終ばく露の翌日に剖検 臓器重量、血液検査、気管支肺胞洗浄液(BALF)の細胞学的・生化学的解析、病理組織学的解析、肺組織の遺伝子発現解析(リアルタイムPCR)

## ■ 群構成

群名	性	ばく露濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	水溶液濃度 (mg/L)	動物数
対照群	雄	0	0	6
低濃度群		0.5	70	6
中濃度群		5	540	6
高濃度群		50	4500	6
対照群	雌	0	0	6
低濃度群		0.5	70	6
中濃度群		5	540	6
高濃度群		50	4500	6

# ばく露期間中の粒子径及びチャンバー内濃度

## 平均粒子径

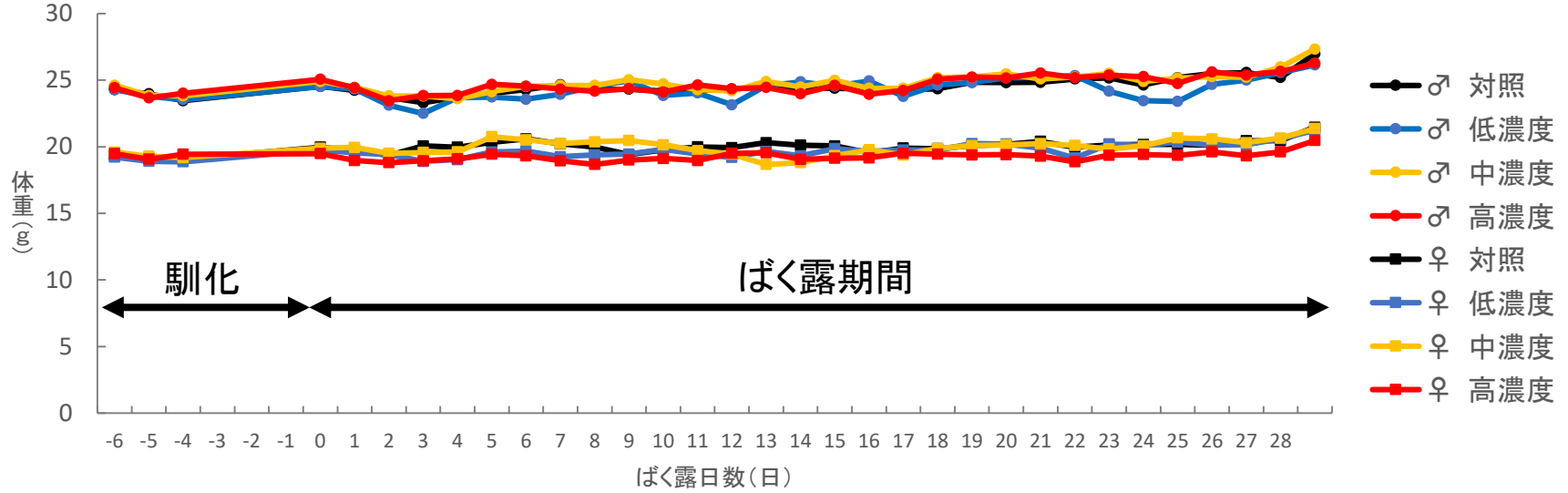


## チャンバー内濃度平均値

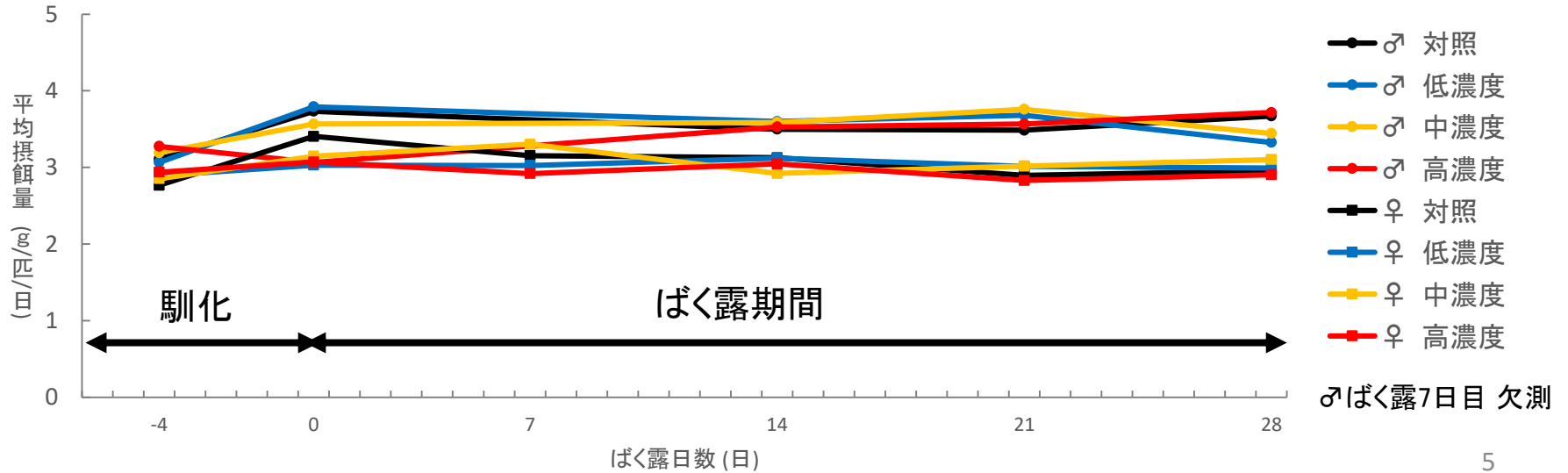
	溶液濃度 (mg/L)	目標値(mg/m <sup>3</sup> )	チャンバー内濃度の 平均値 ± 標準偏差(mg/m <sup>3</sup> )		
低濃度群	70	0.5	0.4	±	0.1
中濃度群	540	5	4.7	±	1.3
高濃度群	4500	50	42.6	±	7.1

# 体重および摂餌量の経時変化

## 体重



## 摂餌量



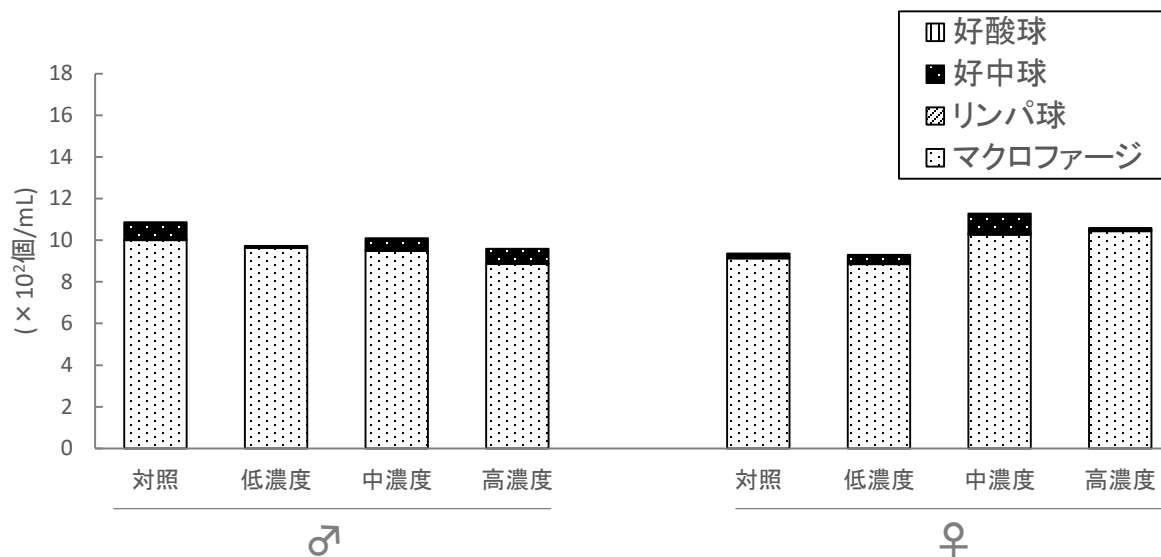
# 臟器重量

	対照	低濃度	中濃度	高濃度
♂				
最終体重 (g)	25.9 ± 1.5	25.4 ± 0.98	26.4 ± 1.2	25.6 ± 1.8
肺 (mg)	126.9 ± 11	129.2 ± 15	135.9 ± 9.6	140.0 ± 21
副腎 (mg)	4.6 ± 1.1	4.5 ± 0.82	4.1 ± 0.60	4.8 ± 0.64
胸腺 (mg)	33.7 ± 6.5	29.8 ± 6.5	31.4 ± 5.0	29.1 ± 7.0
心臓 (mg)	116.4 ± 6.6	118.1 ± 11.9	113.5 ± 6.4	113.4 ± 8.9
精巢 (mg)	157.1 ± 8.7	164.0 ± 10.3	168.9 ± 9.3	160.8 ± 11
腎 (mg)	377.0 ± 22	382.9 ± 15	379.3 ± 10	387.5 ± 33
脾臓 (mg)	87.4 ± 14	84.4 ± 11	78.2 ± 6.6	88.7 ± 4.3
脳 (mg)	428.9 ± 21	430.5 ± 7.0	419.3 ± 9.6	431.9 ± 10
肝臓 (mg)	1336.5 ± 120	1337.0 ± 86	1408.5 ± 55	1330.6 ± 140
♀				
最終体重 (g)	20.4 ± 1.4	20.4 ± 1.1	20.8 ± 0.7	19.6 ± 1.1
肺 (mg)	116.4 ± 4.5	111.8 ± 9.1	117.6 ± 13	112.3 ± 13
副腎 (mg)	6.1 ± 0.46	6.5 ± 1.5	7.3 ± 0.52	7.3 ± 1.5
胸腺 (mg)	46.1 ± 7.1	41.4 ± 8.3	40.3 ± 6.9	37.5 ± 6.8
心臓 (mg)	94.4 ± 11	88.1 ± 7.6	90.5 ± 4.9	91.5 ± 7.0
卵巣 (mg)	6.6 ± 0.86	6.7 ± 1.4	6.0 ± 1.0	6.8 ± 1.7
子宮 (mg)	36.3 ± 14	41.9 ± 29	34.6 ± 12	36.6 ± 20
腎 (mg)	273.0 ± 14	264.6 ± 28	269.9 ± 16	269.2 ± 14
脾臓 (mg)	85.1 ± 11	79.5 ± 8.8	77.0 ± 8.0	82.6 ± 8.4
脳 (mg)	424.1 ± 16	421.7 ± 25	417.5 ± 16	414.1 ± 14
肝臓 (mg)	1007.6 ± 54	1041.6 ± 98	1048.3 ± 73	986.4 ± 34

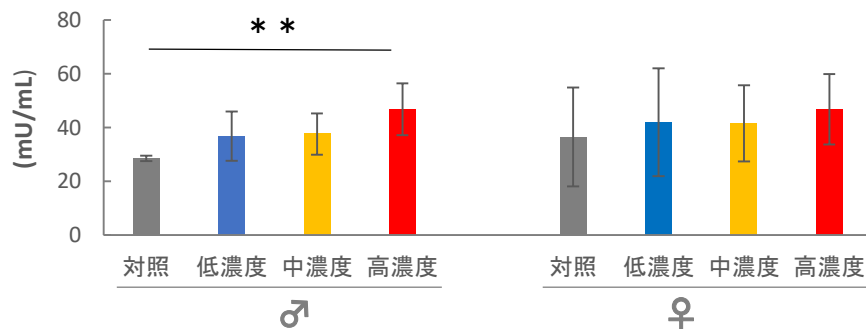
平均值 ± 標準偏差

# BALFの細胞学的・生化学的解析

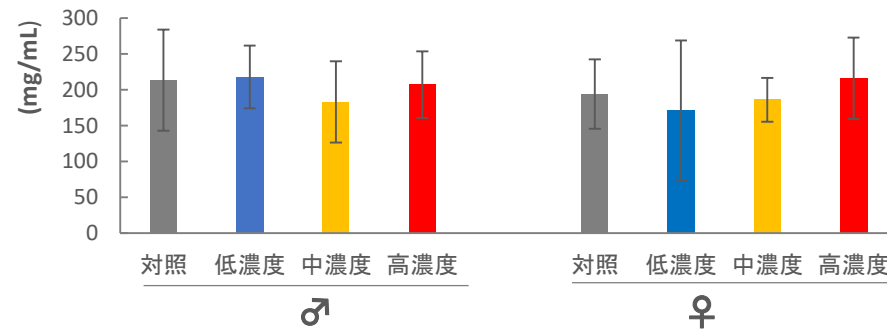
## BALF中の白血球数



## BALF上清のLDH活性



## BALF上清の総タンパク質濃度

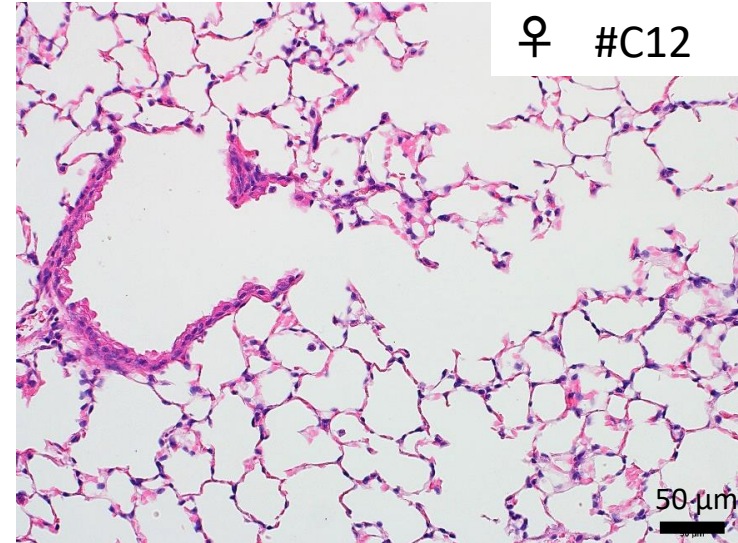
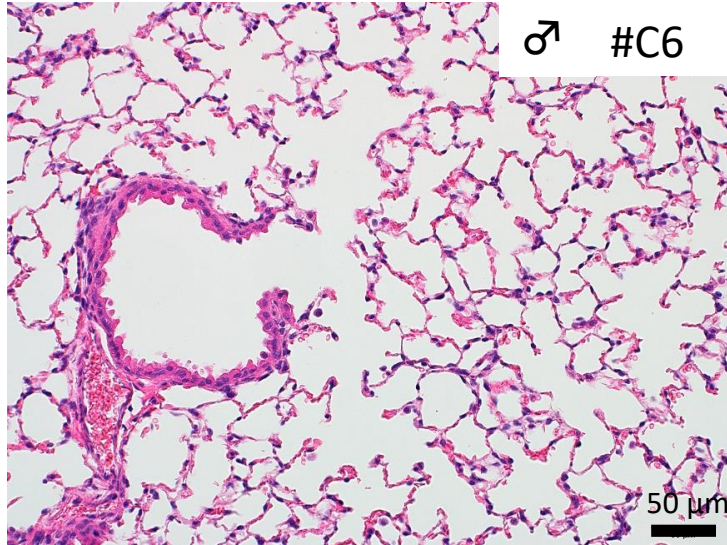


LDH活性に関して、雄のみで高濃度群で有意な上昇を認め、また濃度依存的な変化に見えるため、呼吸器上皮へのわずかな障害性が示唆された。

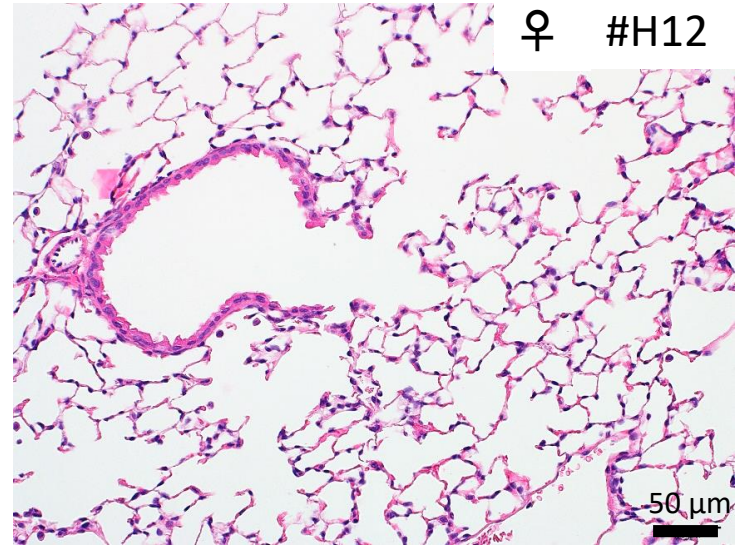
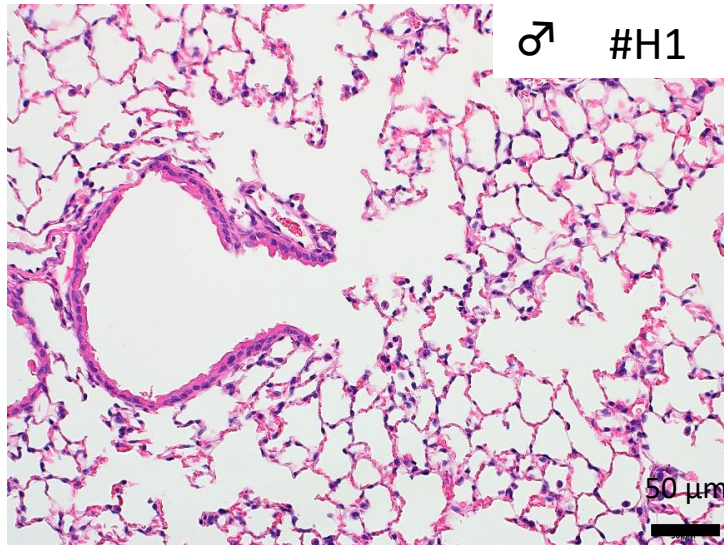
# 病理組織学的解析

終末細気管支から肺泡領域の典型的な像

対照



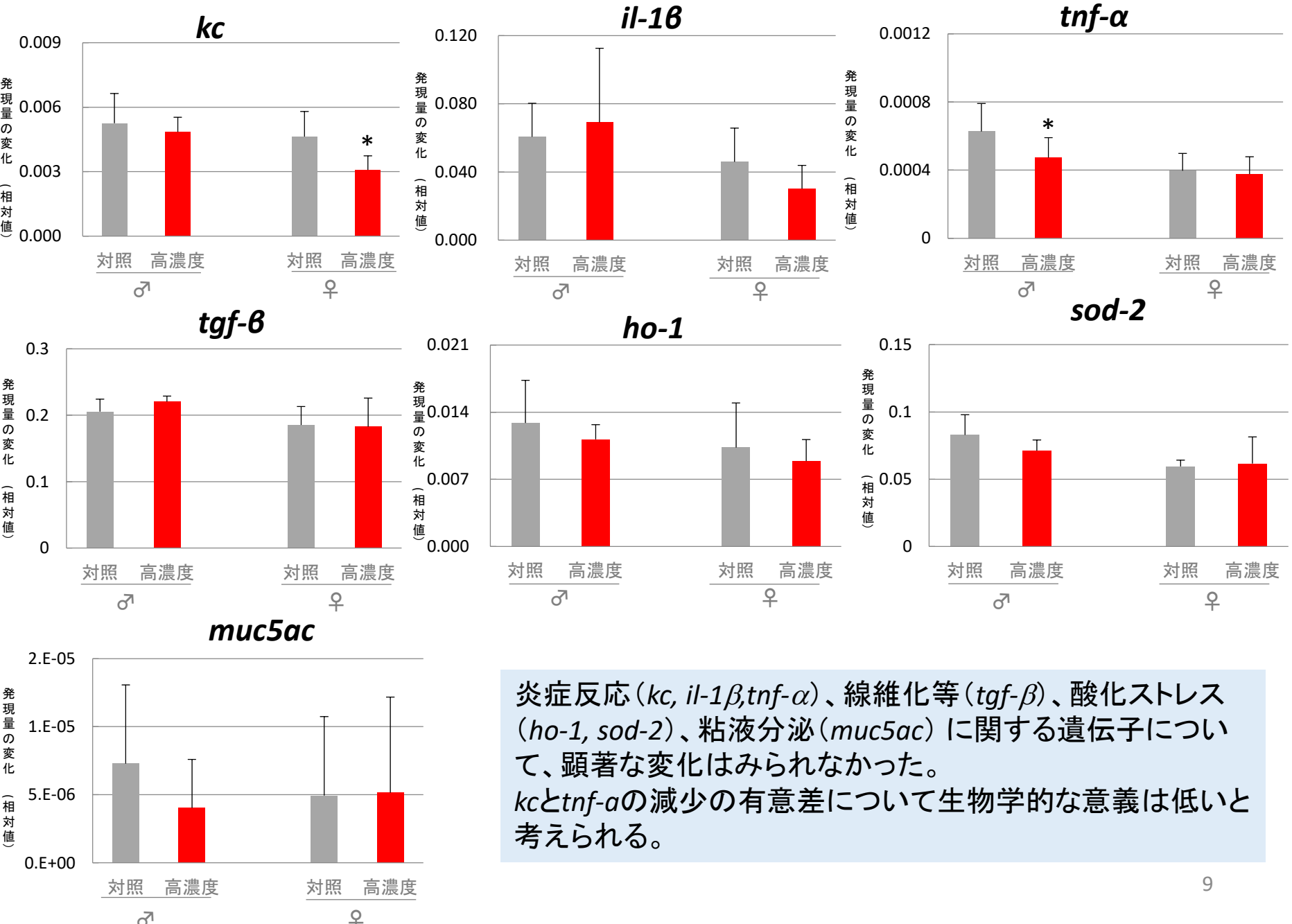
高濃度



鼻腔を含め、呼吸器への影響は認められなかった。  
また、その他の主要臓器についても、ばく露に関連する変化は見られなかった。



# 肺組織における遺伝子発現解析(リアルタイムPCR)



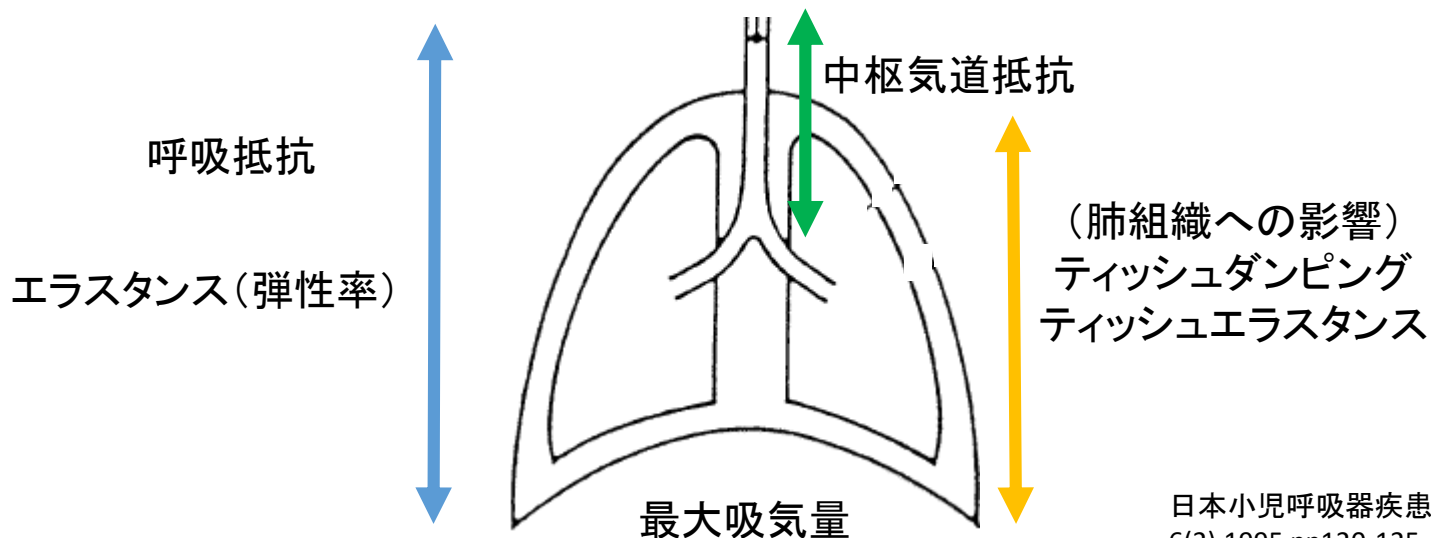
炎症反応(*kc*, *il-1β*, *tnf-α*)、線維化等(*tgf-β*)、酸化ストレス(*ho-1*, *sod-2*)、粘液分泌(*muc5ac*)に関する遺伝子について、顕著な変化はみられなかった。  
*kc*と*tnf-α*の減少の有意差について生物学的な意義は低いと考えられる。

## (2) 呼吸機能への即時影響

### ■ 実験概要

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)
動物	BALB/c 雌マウス 8週齢 11匹
群構成	対照群 (超純水) 5匹
	硫酸水素アンモニウム群 (500mg/m <sup>3</sup> 相当; 66160mg/L) 6匹
ばく露時間	10秒 及び 5分 ネブライザーDuty cycle:50%
測定機器	emka technologies社 フレキシベント呼吸機能解析装置 FV-FX1

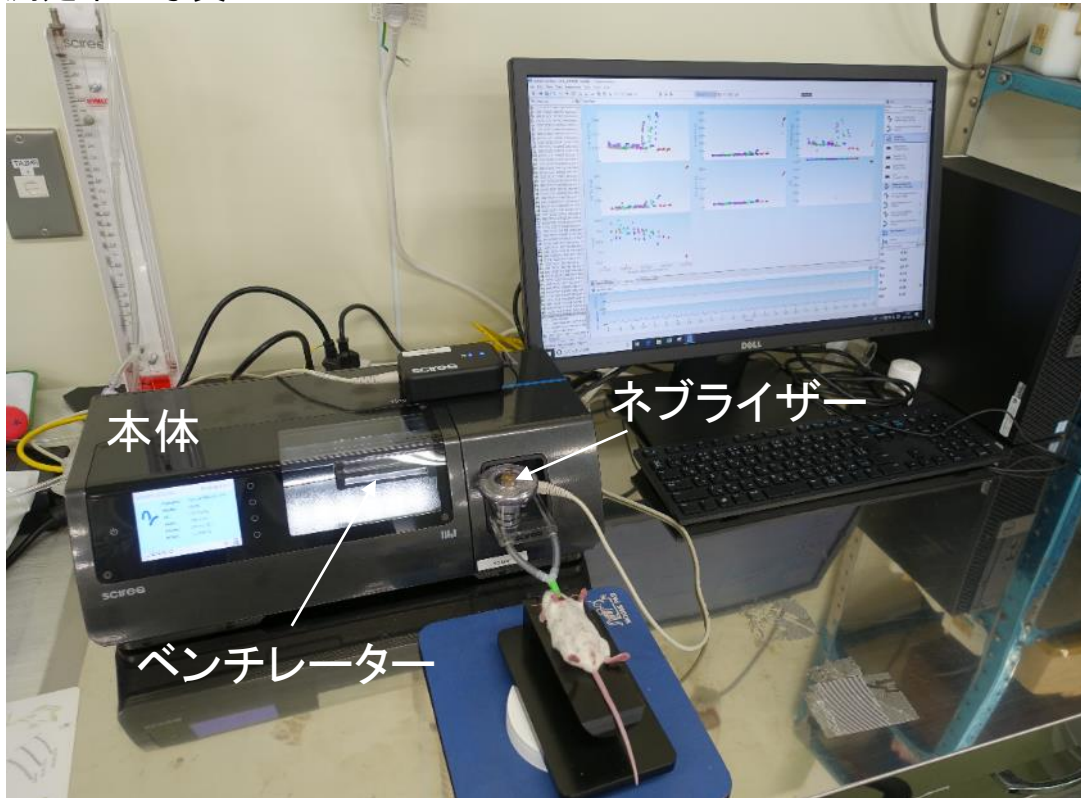
### ■ 呼吸機能パラメーター



# 測定方法

- ①麻酔下で気管切開、カニューレの装着
  - ②ベースラインの呼吸機能を測定
  - ③ネブライザーに溶液を容れて噴霧(10秒あるいは5分)
  - ④呼吸機能を測定
- ※同じ動物について10秒の測定と5分の測定を連続して実施

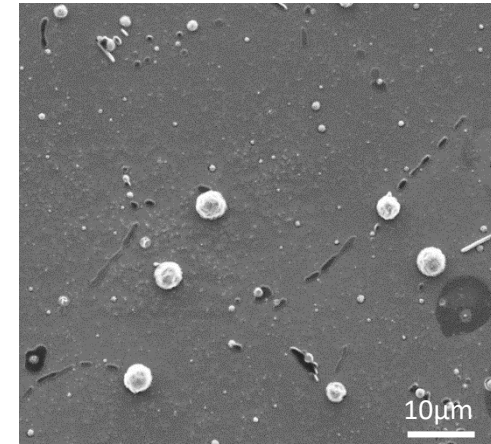
測定中の写真



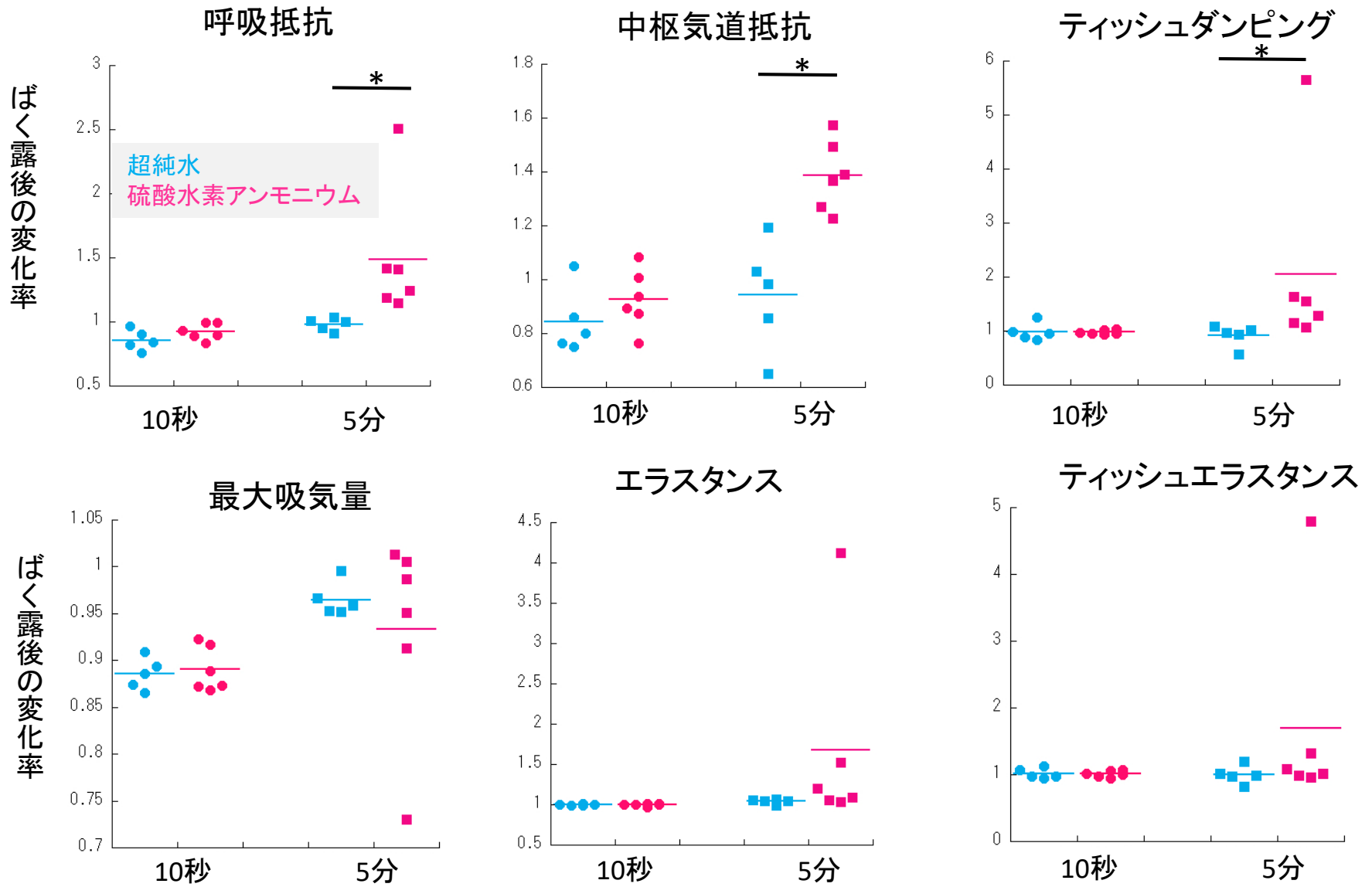
エアロゾル

粒子径のメーカー公表値: 2-4 $\mu$ m

噴霧直後の粒子のSEM像

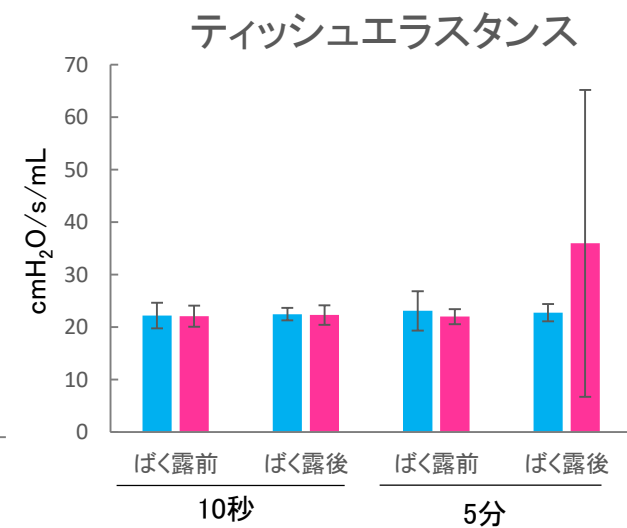
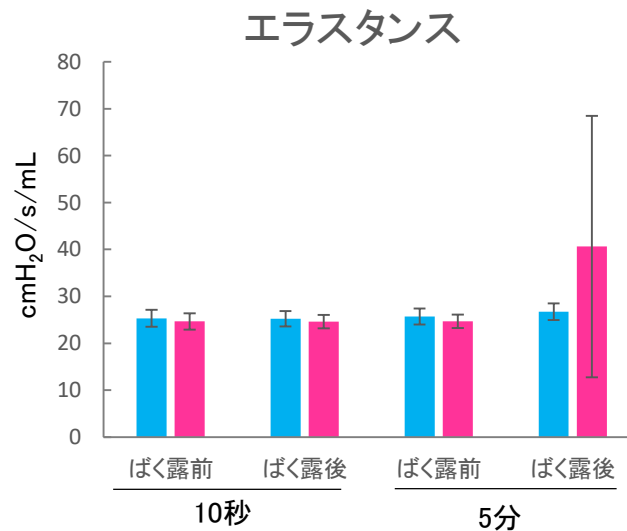
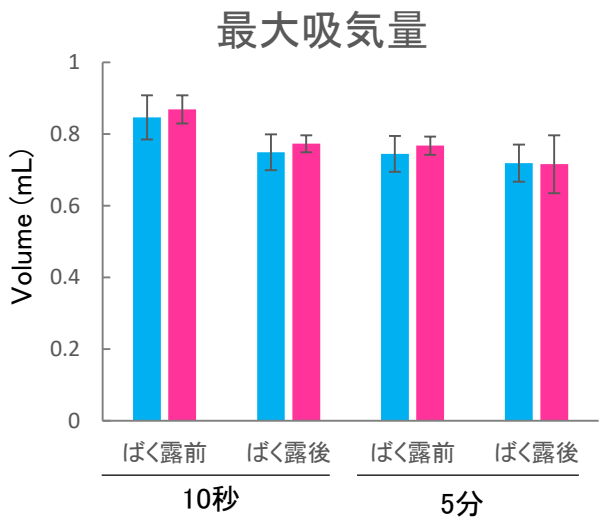
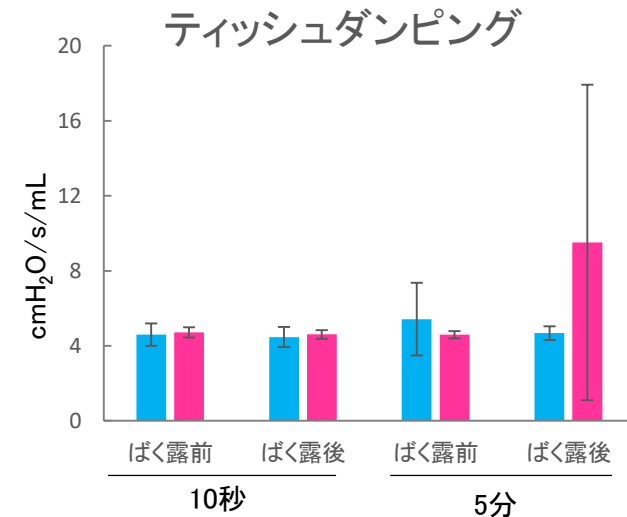
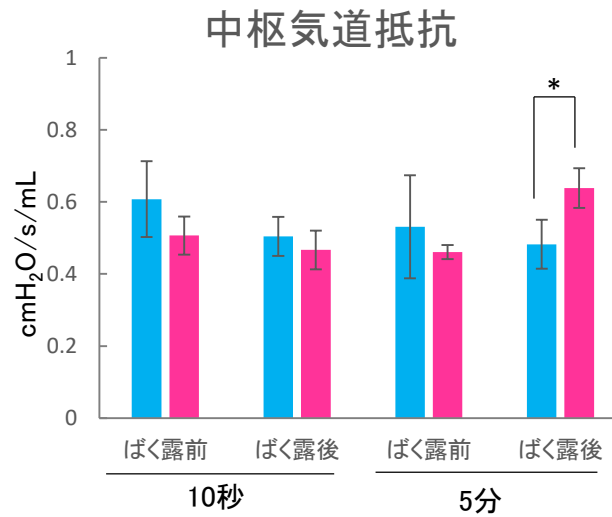
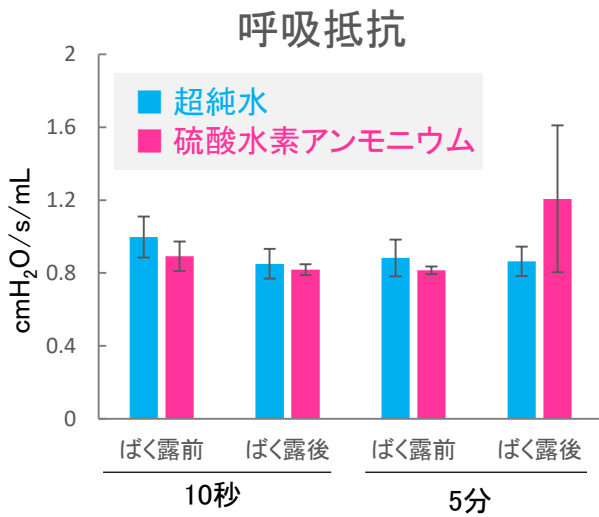


# 呼吸機能の測定結果



呼吸器全体としての抵抗が上昇しており、被験物質による気道収縮だけでなく肺組織での何らかの変化も疑われる。

# (参考)呼吸機能の測定結果(実測値)



## (3) 考察

### ■硫酸水素アンモニウムの亜急性影響

- ・今回、既報の動物実験よりも10倍近い濃度（最大で50mg/m<sup>3</sup>）で反復ばく露を行ったが、マウスに対する器質的な影響は認められなかった。速やかな拡散・中和により恒常性が維持されるものと考えられる。
- ・特に、酸性物質の毒性として想定していた呼吸器上皮の損傷やそれに伴う炎症、粘液分泌の亢進は見られなかった。
- ・硫酸アンモニウムのラット・モルモットへの反復ばく露で認められた肺胞拡張、また、モルモットで見られた肺胞上皮細胞の過形成等（Busch 1984、Loscutoff 1985）は見られなかった。

## ■硫酸水素アンモニウムの即時影響

- ・ 高濃度のばく露（ $500\text{mg}/\text{m}^3$ ）直後に呼吸抵抗及び気道抵抗が上昇した。
- ・ 鼻部ばく露装置による単回ばく露でも同様の影響があったかは不明だが、即時影響の評価は気道への直接ばく露であるため、作用が強かった可能性もある。
- ・ ぜん息患者に対する気道コンダクタンスの低下が観察された報告（16分間、 $1\text{mg}/\text{m}^3$ 、Utellら、1983）と相反しない結果であった。
- ・ 硫酸塩による毒性機序は不明であるが、硫酸イオンもアニオンも問題とならず、プロトン濃度の変化が想定されている（Schlesinger 2003、嵯峨井 2019）。
- ・ 高濃度の化学物質の非特異的な影響であることが考えられるため、低濃度でのばく露や別の物質を用いた実験が必要である。

## (4) まとめ

- 雌雄のBALB/cマウスに硫酸水素アンモニウムのエアロゾルを0、0.5、5及び50 mg/m<sup>3</sup>の濃度で28日間吸入ばく露した結果、生体影響は認められなかった。これまで、硫酸塩の呼吸器影響についてマウスの報告はほとんどなく、比較的長期間の反復影響を評価したデータは有用であると考えられる。
- 雌のBALB/cマウスに硫酸水素アンモニウムのエアロゾルを500 mg/m<sup>3</sup>を5分間ばく露し、直後の呼吸機能への影響を調べた結果、呼吸抵抗及び気道抵抗等の値が上昇した。ぜん息の増悪影響の可能性を示唆する結果であるが、より低濃度でのばく露など、追加実験が必要である。
- 次年度以降、ぜん息モデルへの影響評価を行う予定だが、ばく露濃度は、反復ばく露では50 mg/m<sup>3</sup>、即時影響では500 mg/m<sup>3</sup>を上限として検討したい。