

令和4年度

正常マウス及びぜん息モデルマウスへの 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4年8月

令和4年度の研究計画

目的

マウス呼吸機能への即時影響を調べる

最終年度に行うぜん息マウスへの反復ばく露実験の予備的結果を得る

■ 硫酸水素アンモニウムの呼吸器能への即時影響

- ・ 昨年度は非常に高濃度のばく露で影響が見られたため、低濃度の領域を検討する
- ・ 他の関連物質と比較する
- ・ ぜん息モデルマウスに対する影響を調べる

■ ぜん息モデルマウスのばく露実験のための予備検討

- ・ 卵白アルブミン（OVA）ぜん息モデル作出方法の検討
肺炎症の再現性や病変の個体差に関して懸念があったため、経鼻投与による感作方法を再検討する
- ・ 硫酸水素アンモニウムによる増悪影響の予備検討
ぜん息モデルマウスに14日間の連続ばく露実験を小規模に行う

(1) 硫酸水素アンモニウムの呼吸器能への即時影響

■目的

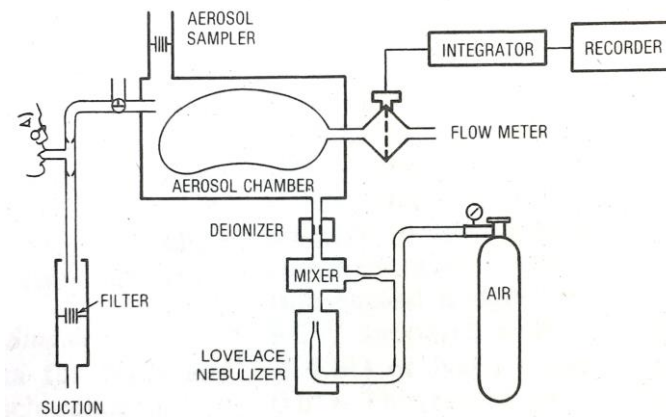
昨年度は急性ばく露試験の $500\text{mg}/\text{m}^3$ に相当する高濃度で実験し、呼吸機能への影響を認めた

- ・溶液濃度: $66\text{ mg}/\text{mL}$
- ・ばく露時間: 5分間
- ・沈着量推計: 約 $667\mu\text{g}/\text{lung}$



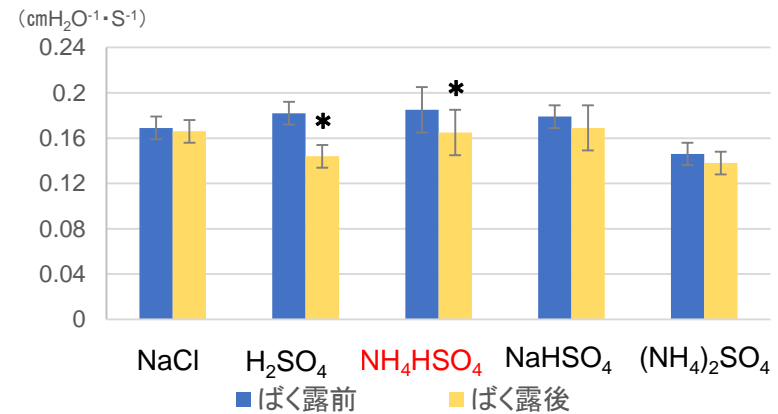
より低濃度領域での即時影響を検討する

■過去の人体吸入実験 (ぜん息患者への $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 16分間ばく露)

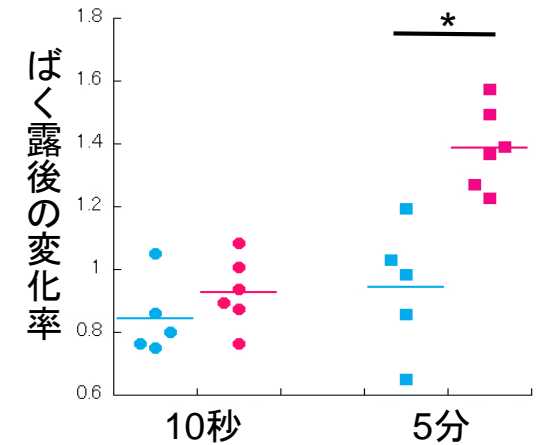


(Utell et al., 1983 グラフ改変)

気道コンダクタンスの変化



中枢気道抵抗



ヒト沈着量の推計(約 $240\mu\text{g}/\text{lung}$)から、マウスに相当する量に換算し(約1000分の1)* 今回の実験で検討した

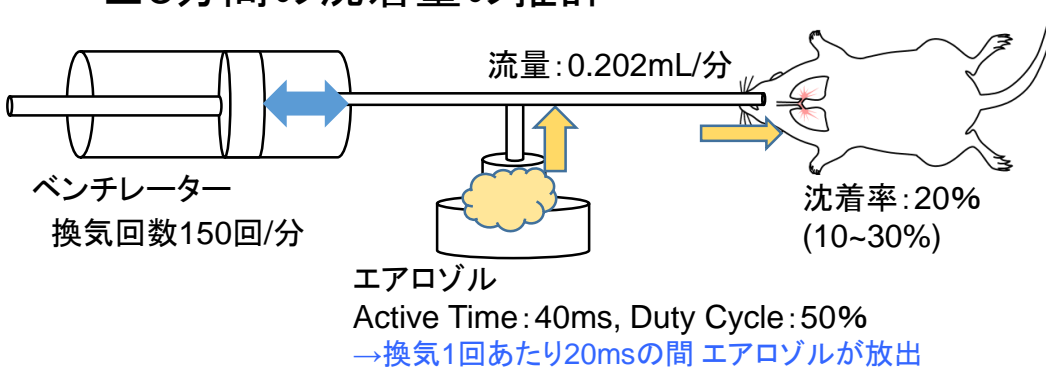
* 気管及び肺胞の面積比 ...EPAのRfC(参照濃度)算出手順書等

実験概要

■方法

被験物質	硫酸水素アンモニウム NH_4HSO_4 (富士フィルム和光純薬:純度99.9%, 014485-100, CAS:7803-63-6) 塩化ナトリウム NaCl (富士フィルム和光純薬:純度99.5%, 191-01665, CAS:7647-14-5)
動物	BALB/c 雌マウス 9週齢
測定機器	emka technologies社 フレキシベント呼吸機能解析装置 FV-FX1
測定条件 (Script)	<i>Deep Inflation</i> x2回 → (<i>Snap Shot</i> → <i>Quick Prime</i>) × 3回 ※ばく露の前後に測定を実施
測定項目	呼吸抵抗、中枢気道抵抗、ティッシュダンピング、ティッシュエラスタンス、エラスタンス、最大吸気量
ばく露時間	3分間

■3分間の沈着量の推計



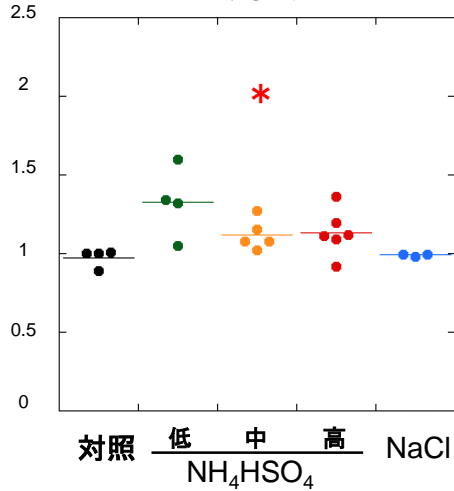
群	水溶液濃度 (mg/mL)	推定沈着量 ($\mu\text{g}/\text{lung}$)	動物数
対照群(純水)	0	0	4
低用量群	0.05	0.303	4
中用量群	0.5	3.03	5
高用量群	5	30.3	6
NaCl群	4.5	27.27	3

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

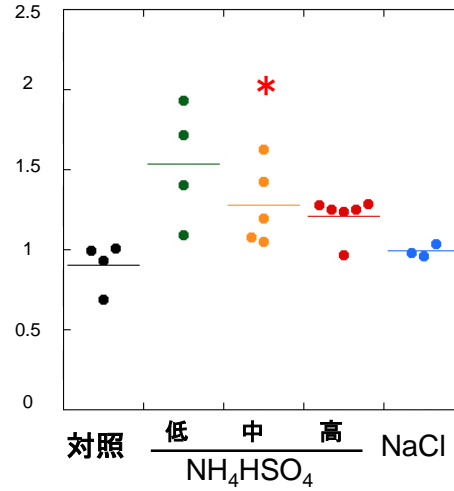
結果

バーは平均値； Steel's Test * $p < 0.05$ ； 対照群

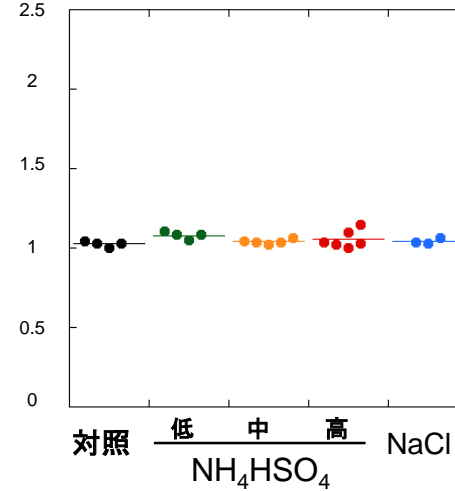
呼吸抵抗



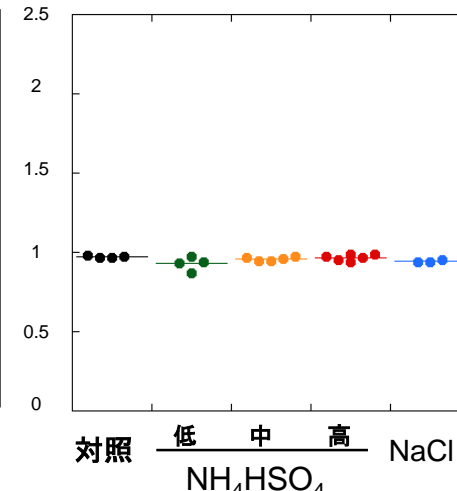
中枢気道抵抗



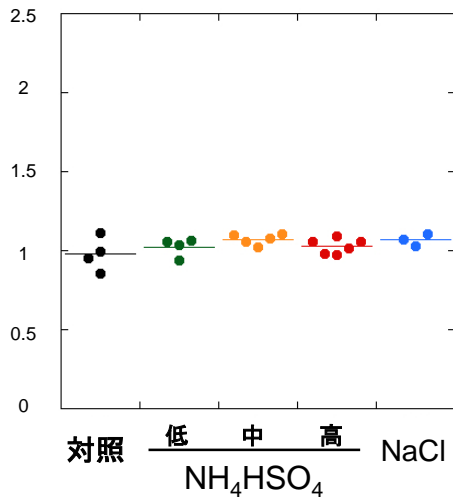
エラスタンス



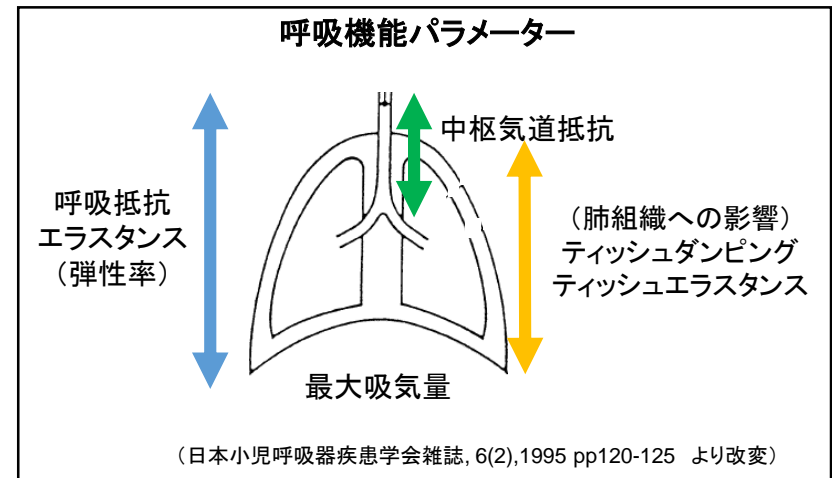
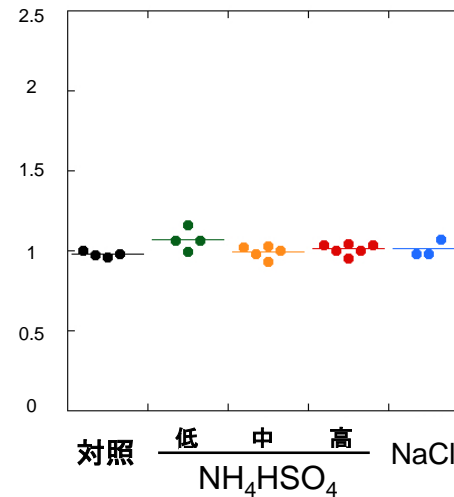
最大吸気量



ティッシュダンピング



ティッシュエラスタンス



- 3分間のばく露で主に気道抵抗が上昇したが、用量依存性は認められなかった
- 陰性対照物質と想定した塩化ナトリウムでは影響が見られなかった

(2) ぜん息モデルマウス作製

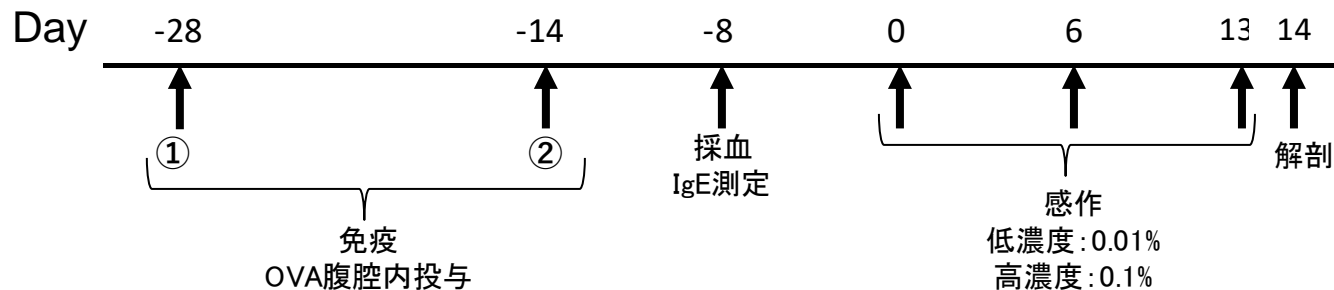
■目的

卵白アルブミン (OVA) 誘発ぜん息モデルの実験条件の確認：経鼻投与

■方法

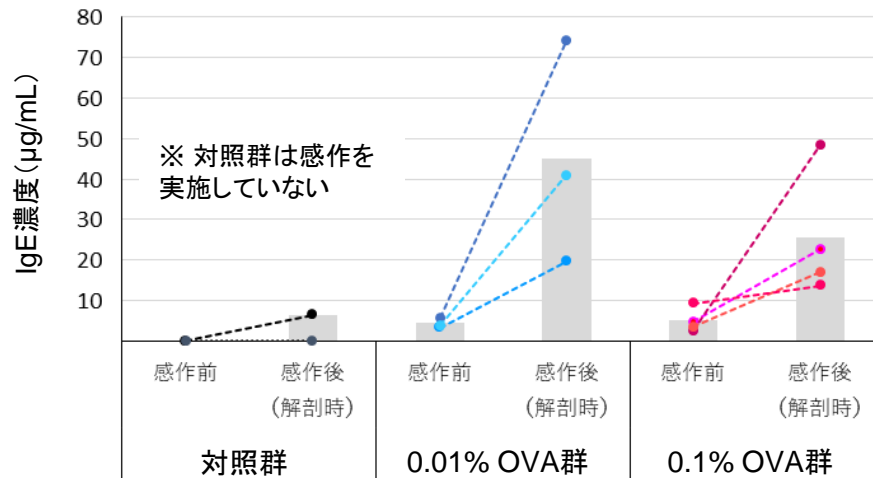
動物	BALB/c 雌マウス 解剖時:15週齢
群構成	対照群 2匹 0.01% OVA群 3匹 0.1% OVA群 4匹
免疫	① OVA 2 μ g +市販のReady to useアジュバント 腹腔内投与 →投与後にほぼ全ての個体で状態が悪化、死亡個体あり(強い腹膜炎) 今後、使用しないこととした ② OVA 2 μ g + 硫酸カリウムアルミニウム (20mg/mL) 腹腔内投与
感作	OVAを 0.01% または0.1% の濃度 (w/v) でPBSに希釈 経鼻投与: 約1週間おきに3回、三種混合麻酔下で、20 μ Lを投与
検討項目	BALF中の白血球の細胞診断 病理組織学的検索

■実験スケジュール

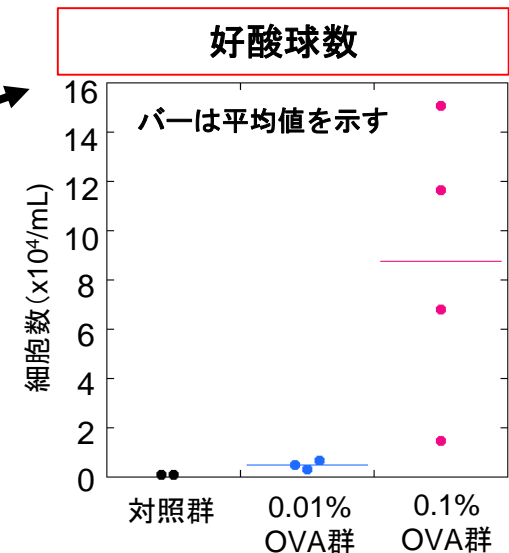
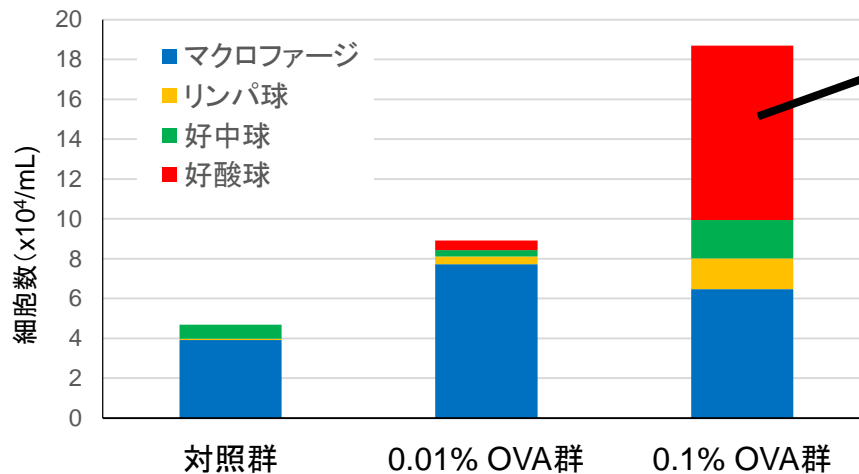


結果

■ OVA特異的IgEの血中濃度



■ BALF中の白血球細胞の診断



- 両条件でOVAの反応性が確認されたが、好酸球の流入は0.1%OVA群で顕著だった
- 対照でも見られた好中球は1回目の腹腔内投与の影響と推測される

結果

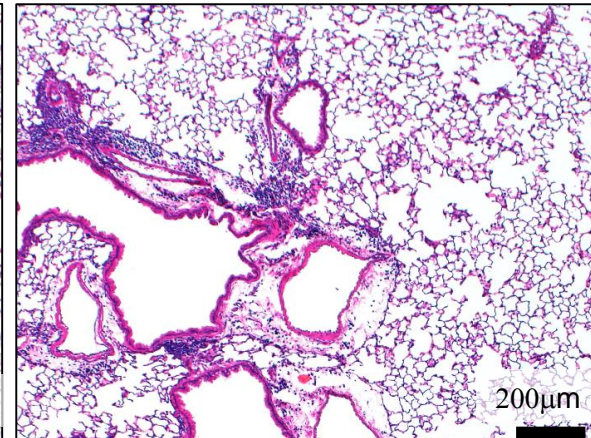
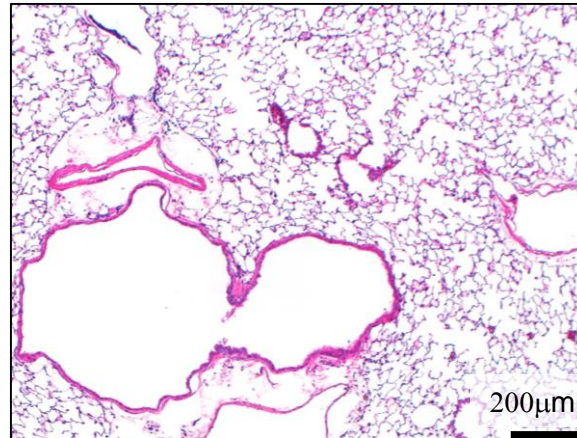
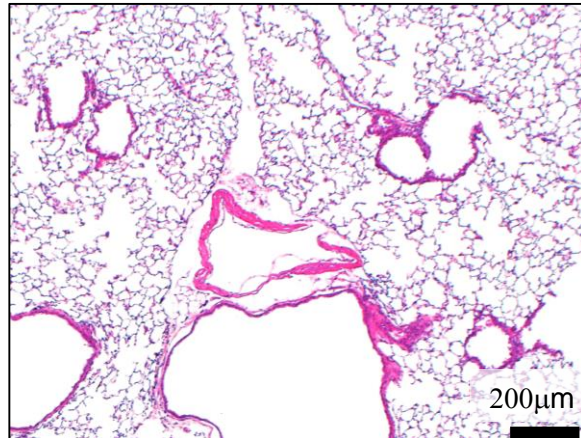
■ 病理組織学的解析

対照群

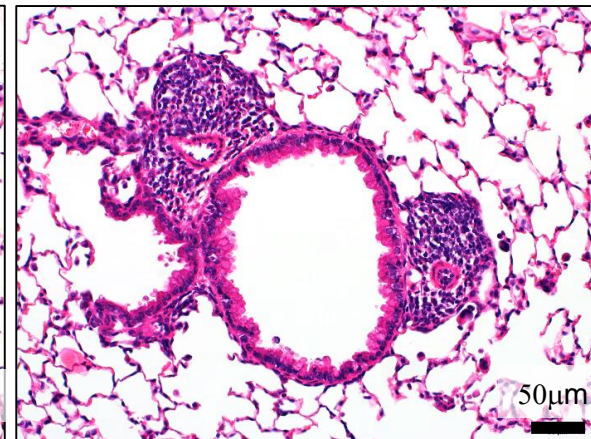
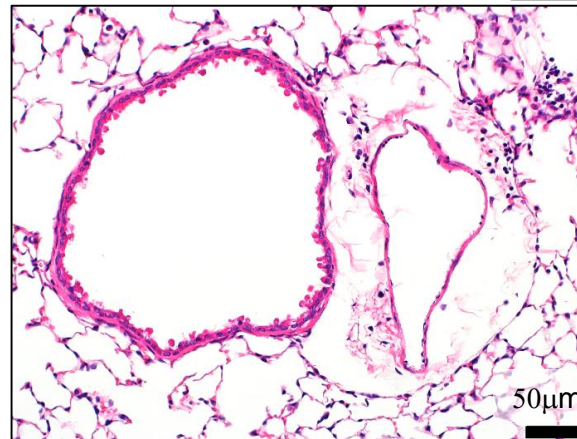
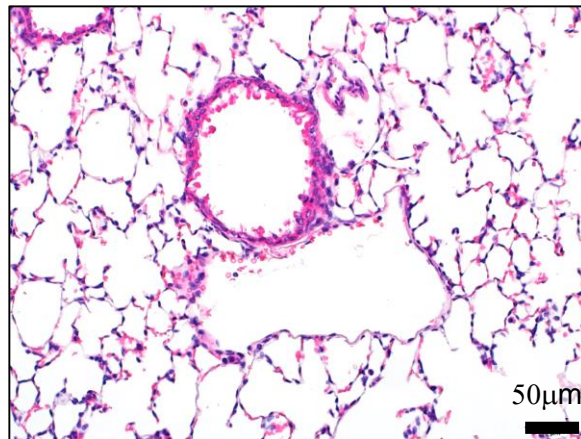
0.01% OVA群

0.1% OVA群

弱拡大



強拡大



※すべてBALF採取後の組織

- 0.01% OVA群では血管周囲にわずかに形質細胞の浸潤があるのみ
- 0.1% OVA群では、好酸球の浸潤や杯細胞の増生が認められ、肺葉内・肺葉間の偏りは少なかった

まとめと今後の予定

- 硫酸水素アンモニウムの呼吸器への即時影響として呼吸抵抗の上昇(おそらく気道収縮)が認められた。
- 昨年度よりばく露負荷を下げても、即時影響が認められ、ぜん息患者の実験 (Utell *et al.*, 1983)と同レベルのばく露負荷でも上昇傾向が見られた。



- ・ぜん息モデルマウスを用いた増悪影響の調査
- ・他の比較対象(希硫酸・硫酸アンモニウム)も確認

- ぜん息モデルマウスの作出条件を概ね確定することができた

免疫: 腹腔内投与、OVA+自作のアジュバント、2回

感作: 経鼻投与、0.1%OVA、3回



- ・再実験を実施中: 1回目の腹腔内投与の物質に問題があったため
強い腹膜炎と肝毒性が見られ、全身状態が悪化
- ・確認後、2週間ばく露実験と即時影響実験に適用する