

## 第4章 マウスへの硫酸水素アンモニウム吸入ばく露実験

### 第1節 単回ばく露実験及び28日間吸入ばく露実験

#### I 目的

1970年代から80年代にかけての疫学研究等から、硫酸塩に健康影響の疑いがあることが示されているが<sup>1,2)</sup>、硫酸塩のエアロゾル吸入の毒性研究についてはデータが限られている<sup>3,4)</sup>。刺激性の高い順に、硫酸、硫酸水素アンモニウム、硫酸アンモニウム及び硫酸ナトリウム、と言われており<sup>5,6)</sup>、硫酸水素アンモニウムは、環境中の濃度は比較的低いものの(第2章)、酸性度が高いことから、動物の呼吸器上皮への刺激作用・傷害作用が高いことが推測される。

硫酸水素アンモニウムの呼吸器毒性については、ぜん息<sup>7)</sup>あるいは感染症<sup>8)</sup>の増悪影響、また、気道線毛のクリアランス効率<sup>5)</sup>や肺胞マクロファージの機能<sup>9)</sup>を検討した報告がある。しかし、主に硫酸や他の硫酸塩との比較という位置づけで扱われることが多く、急性吸入毒性や3濃度以上を設定した一般的な吸入毒性試験の報告はなされていない。

そこで、硫酸水素アンモニウムのマウスにおける詳細な吸入毒性データを取得するため、単回ばく露実験と28日間の反復ばく露実験を行った。

#### II 方法

##### 1 実験動物

6週齢のBALB/cAnNCrIcrljの雄性マウス又は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、床敷(アルファドライ;イーピーエス益新)入りのプラスチック製ケージに4匹ずつ収容し、基礎飼料CE-2(日本クレア)と、限外ろ過した水道水を自由摂取させ、室温 $22.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $54.9 \pm 4\%$ 、換気回数毎時10回(HEPAフィルター経由)、12時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

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 吸入ばく露

###### (1) ばく露システム

吸入ばく露は、エアコンプレッサーとフィルター・ドライヤー(アイ・エー・シー)に、吸入ばく露システム4式(シンファクトリー)を接続した設備で行った。各システムの構成は、レギュレーター、流量計、エアロゾル発生装置、鼻部ばく露チャンバー、エアロゾル回収用バブラー、排気系フィルター、排気流量コントローラー及び排気ポンプである(図1)。エアロゾル発生装置には硫酸水素アンモニウム( $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ 、試薬特級、富士フィルム和光純薬、CAS No.7803-63-

6) を超純水に溶解した水溶液をそれぞれ 90 mL ずつ入れた。

鼻部ばく露チャンバーは呼気が速やかに除去されるフローパスト式で、給気流量は各群ともにマウス 1 匹当たり 0.3 L/min となるように設定した。マウスは保定器に入れ、鼻部ばく露チャンバーのポート部分に固定した (図 1)。

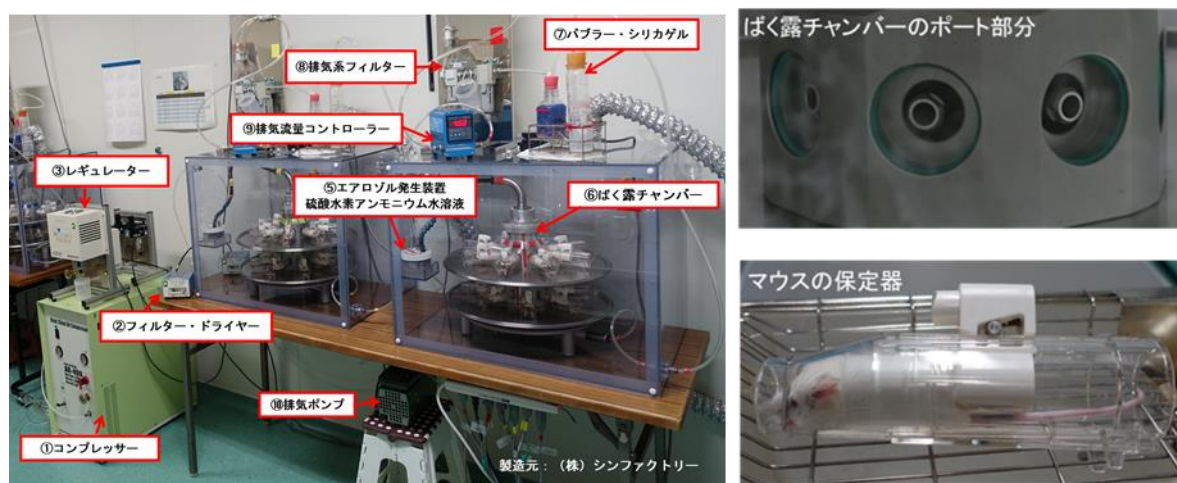


図 1. 吸入ばく露装置

## (2) ばく露濃度の設定

硫酸水素アンモニウムの水溶液濃度とチャンバー内の空気中濃度の関係を調べるため、水溶液の濃度を 0.0009 g/L から 5.5 g/L まで変化させてエアロゾルを発生させ、ばく露チャンバーのポート部分にミニサンプラー (石英繊維フィルター) をセットし、流量 0.2 L/min で、15 分間硫酸水素アンモニウムのエアロゾルを採取した。フィルターに捕集された硫酸水素アンモニウムを蒸留水で抽出し (第 2 章)、イオンクロマトグラフ (ICS-1000 ; サーモフィッシャーサイエンティフィック) で硫酸イオンを分析することにより、ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度を算出した。その結果、水溶液濃度とチャンバー内の空気中濃度の良好な相関関係が確認された (図 2)。これをもとに、ばく露実験で用いる硫酸水素アンモニウム水溶液を調製した。

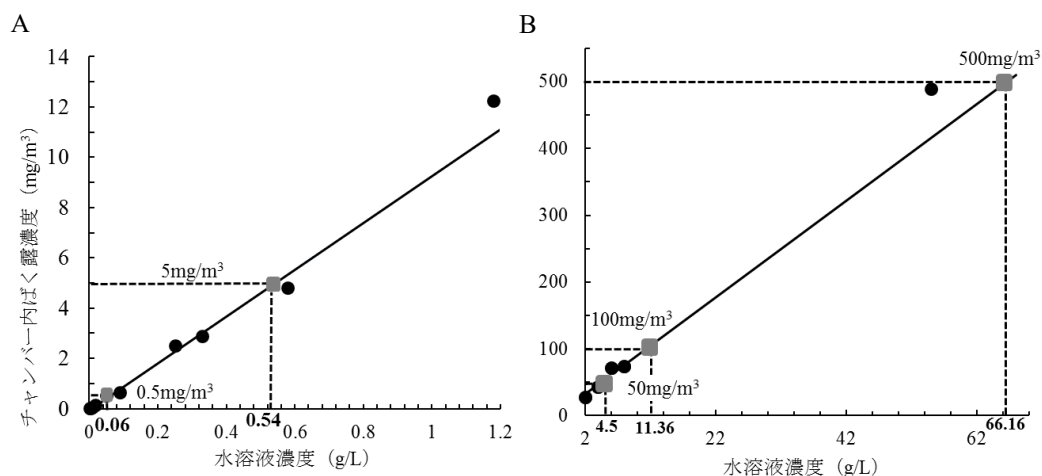


図 2. 水溶液とチャンバー内濃度の関係

低濃度側 A 及び高濃度側 B のグラフ。灰色四角が実験に選んだ 5 種類の濃度 (0.5、5、50、100、500 mg/m³)。

### 3 単回ばく露実験

雌雄のマウス各 3 匹を実験に用いた。ばく露前に、ばく露装置への馴化期間を 3 日間設け、ばく露時のマウスは 8 週齢であった。馴化及びばく露期間中の平日の毎朝、マウスの体重を測定した。

1 式のばく露システムを用い、硫酸水素アンモニウムのばく露を 1 日に 3 時間実施し、 $50 \text{ mg/m}^3$  (4.50 g/L 水溶液)、 $100 \text{ mg/m}^3$  (11.36 g/L 水溶液) 及び  $500 \text{ mg/m}^3$  (66.16 g/L 水溶液) の順に、同じ動物にばく露した。ただし、それぞれのばく露の間に 7 日間の回復期間を設けた。ばく露中及びばく露後に動物の状態を目視で確認した。

$500 \text{ mg/m}^3$  のばく露翌日に、後述の 4 (5) と同様に、安楽死、解剖、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の分析及び病理組織学的解析を実施した。

### 4 28 日間反復ばく露実験

#### (1) 実験デザイン

雌雄マウス各群 6 匹とし、対照群、低濃度群、中濃度群及び高濃度群の 4 群に分け、それぞれ、0 (超純水)、0.5、5 及び  $50 \text{ mg/m}^3$  の硫酸水素アンモニウムのエアロゾルをばく露した (表 1)。ばく露装置への馴化期間を 3 日間設けてから、ばく露実験を開始した。マウスは、ばく露開始時期には 8 週齢、ばく露終了時期には 12 週齢であった。

表 1. 28 日間反復ばく露実験の概要

動物	BALB/c マウス 8週齢 雄24匹・雌24匹		
群構成	対照群	$0 \text{ mg/m}^3$ (超純水)	雄 6匹 雌 6匹
	低濃度群	$0.5 \text{ mg/m}^3$	雄 6匹 雌 6匹
	中濃度群	$5 \text{ mg/m}^3$	雄 6匹 雌 6匹
	高濃度群	$50 \text{ mg/m}^3$	雄 6匹 雌 6匹
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)		
ばく露条件	吸入鼻部ばく露、3時間/日、28日間連続ばく露 最終ばく露の翌日に剖検		

ばく露システムを 4 式用意し、対照群のばく露には清浄空気を用い、低濃度群、中濃度群及び高濃度群のばく露には、チャンバー内濃度が上記濃度になるように、エアロゾル発生装置にそれぞれ、対照群には超純水、低濃度群には  $0.07 \text{ g/L}$ 、中濃度群には  $0.54 \text{ g/L}$  及び高濃度群には  $4.50 \text{ g/L}$  の硫酸水素アンモニウム (試薬特級、富士フィルム和光純薬) の水溶液をそれぞれ入れ、エアロゾルを発

生させた。なお、水溶液の pH はそれぞれ、3.2、2.3 及び 1.8 であった。ばく露は、1 日 3 時間、週に 7 日間行い、実験期間は 28 日間とした（表 1）。

## （2）エアロゾル粒子径の測定

粒子状物質を除去したボックス内に（容積：366 L）、ばく露システムのエアロゾル発生装置から硫酸水素アンモニウムのエアロゾルを放出させ、12 段階に粒子径の分離が可能なステージを備える空気採取装置（Electrical Low Pressure Impactor ; ELPI、デカチ）で放出開始直後から 30 分間ボックス内空気を採取した。エアロゾルの放出流量は 5 L/min、空気採取量は 10 L/min の条件で、 $0.5 \text{ mg/m}^3$ （0.07 g/L 溶液）、 $5 \text{ mg/m}^3$ （0.54 g/L 溶液）及び  $50 \text{ mg/m}^3$ （4.50 g/L 溶液）の 3 つの濃度について採取を行った。ELPI の各ステージの石英繊維フィルターに捕集された硫酸水素アンモニウムを上記 2（2）のとおりイオンクロマトグラフで測定することで、粒子径の分布を解析した。

## （3）チャンバー内ばく露濃度の測定

ばく露期間中、毎日、ばく露実験の直前に 1 度、エアロゾルを採取し、濃度を測定した。ばく露システムを 10 分間稼働させた後、ばく露チャンバーのポート部分にミニサンプラーをセットし、流量 0.2 L/min で、10 分間硫酸水素のエアロゾルを採取した。フィルターに捕集された硫酸水素アンモニウムを蒸留水で抽出し、イオンクロマトグラフで硫酸イオンを分析することにより、ばく露濃度を算出した。

## （4）体重・摂餌量の測定

装置への馴化期間から最終ばく露日まで、毎朝マウスの体重を測定した（ばく露日は、ばく露直前に測定）。また、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。

## （5）剖検

### ア 採血

動物は、ばく露最終日の翌日に、イソフルラン吸入麻酔下で腹大動脈から全採血することにより安楽死させた。また、その新鮮血を血液検査に用いた。

### イ 臓器の摘出及び主要臓器の重量測定

全ての動物から、気管、肺、鼻腔、脳、脊髄、肝臓、胃、腸管、腎臓、心臓、脾臓、副腎、胸腺、大腿骨及び精巣（又は卵巣及び子宮）を摘出し、病理組織学的解析に供した。肺は舌及び気管と併せて摘出し、下記のとおり、右葉副葉を分子生物学的解析用とし、その他の右葉は BALF の採取に用い、副葉を除く全葉を、病理組織学的解析に用いた。

臓器摘出後に、肺、脳、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、副腎、胸腺及び精巣（又は卵巣及び子宮）について、臓器重量を測定した。肺は舌から肺まで摘出し、全体の重量を測定後、各肺葉を摘出した後に再度、舌から気管までの重量を測定することにより算出した。なお、子宮及び卵巣は欠測があり、n=3となった。各臓器の相対重量は体重 100 g 当たりの臓器重量として算出した。

## ウ BALF の採取

マウスを安楽死させた後に、気管を切開して針無しツベルクリン注射筒に 18G 翼静針（テルモ）を接続したものを挿管し、1.2 mL のリン酸緩衝液（PBS）を 3 回に分けて注入し、およそ 0.8 mL を回収した。採取した BALF を 1,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を生化学的分析に用い、沈殿を 2% ウシ血清アルブミン（BSA）含有 PBS に再懸濁させ、白血球数の計測・白血球分画の診断を行った。

## （6）病理組織学的解析

摘出した主要臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液中で固定した。ただし、肺は、水柱圧 30cm の条件でホルマリン溶液を緩徐に注入して固定した。パラフィン包埋、薄切及びヘマトキシリン・エオジン染色（H&E 染色）を定法により実施し、光学顕微鏡によって組織標本の観察を行った。

各臓器の最大断面を中心として作成した標本を観察した。肺は、各葉 1 枚以上について、鼻腔は、通常観察する切歯の後端部（I）、切歯乳頭部（II）、第一臼歯前端部（III）の 3 か所に、鼻腔先端部を加えた合計 4 か所について観察した。

## （7）血液検査

多項目自動血球計数装置（KX-21NV、シスメックス）を用い、赤血球数、白血球数、血色素量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均ヘモグロビン量、平均ヘモグロビン濃度及び血小板数を測定した。また、塗抹標本作製し、メイグリュンワルド・ギムザ染色を行い、光学顕微鏡観察により白血球を分類・計数することにより、各種の白血球の個数を算出した。

## （8）BALF 中の白血球細胞の解析

BSA 含有 PBS に再懸濁した細胞を、チュルク液で 5 分間染色した後、細胞計数用スライドグラスに滴下して総細胞数の計測を行った。

また、再懸濁液を自動遠心塗抹装置（サクラファインテック）により 2,000 rpm で 5 分間遠心分離し、メイグリュンワルド・ギムザ染色した。この塗抹標本を光学顕微鏡観察により診断し、白血球を分類・計数し、各種の白血球の個数を算出した。

## (9) 生化学的解析

BALF 上清の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は、LDH 標準品 (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて標準曲線を作成し、LDH Cytotoxicity Detection kit (タカラバイオ) によって測定した。BALF 上清の総タンパク質濃度は、銅イオンによる発色を利用したキット (2-D Quant Kit ; サイティバ) によって測定した。

## (10) 分子生物学的解析

凍結した肺の副葉を凍結粉碎器 (マルチビーズショッカー ; 安井器械) で粉碎し、組織片からスピンカラム抽出法 (RNeasy; キアゲン) により、total RNA を抽出した。逆転写キット (SuperScript III ; サーマフィッシャーサイエンティフィック) を用いて total RNA から 1st strand cDNA を得た。表 2 のとおり、8 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作製し、リアルタイム PCR キット (Power SYBR ; サーマフィッシャーサイエンティフィック) を用いて、定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) を行った。目的遺伝子の発現量は、*H2a* の結果で標準化した。

表 2. qRT-PCR に用い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>H2a</i>	CGTATCACCCCTCGTCACTT	TCAGCGATTTGTGGATGTGT
<i>Hmox1</i>	CACTCTGGAGATGACACCTGAG	GTGTTCTCTGTCAGCATCACC
<i>Il1b</i>	CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGA	TGTGCTCTGCTTGTGAGGTGCTG
<i>Kc</i>	TGTCAGTGCCTGCAGACCAT	CCTCGCGACCATTCTTGAGT
<i>Muc5ac</i>	CAGGACTCTCTGAAATCGTACCA	AAGGCTCGTACCACAGGGA
<i>Sod2</i>	TAACGCGCAGATCATGCAGCTG	AGGCTGAAGAGCGACCTGAGTT
<i>Tgfb</i>	CACCGGAGAGCCCTGGATA	GCCGCACACAGCAGTTCTT
<i>Tnfa</i>	CACCACGCTCTTCTGTCT	GGCTACAGGCTTGTCACTC

## (11) 統計解析

各データの対照群とばく露群 (低濃度群・中濃度群・高濃度群) との差異については Dunnett 法による多重比較検定を行った。肺組織の分子生物学的解析における対照群と高濃度群の 2 群間比較の検定には Wilcoxon 法を用いた。

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 単回ばく露実験

500 mg/m<sup>3</sup> までの高濃度のばく露中に急性症状その他の異常は認められず、死亡例もなかった。保定器に糞尿が見られ、わずかに被毛が汚れる個体が一部認められる程度であった。ばく露期間中の平均体重は、雄が 26 g、雌が 21 g 前後で推移

した。ばく露中及び休息期間中、ばく露の影響を疑う体重の増減は認められなかった。

BALF 中の白血球の細胞分画の内訳は、大半がマクロファージであり、好中球、好酸球及びリンパ球はほとんど観察されなかった。鼻腔、気管及び肺実質の病理組織学的解析において、過去の無処置マウスの検査結果と比べて著変はなく、ばく露の影響は認められなかった。

既報の動物実験<sup>5,7-9)</sup>に比べて 100 倍近い高濃度でばく露を実施したものの、炎症反応や気管粘液の増加をはじめとした呼吸器への急性的な作用が無いため、例えば 500 mg/m<sup>3</sup> で反復ばく露を行うことも可能と考えられた。しかし、硫酸塩の人体への影響について、0.1 から 1 mg/m<sup>3</sup> 程度でばく露した報告があることから<sup>3,4,10)</sup>、それらと比較可能なレベルのばく露濃度群も低濃度側で設定すべきであるため、28 日間の反復ばく露実験では、最高濃度を高く設定しすぎるのは不適切と考えた。

## 2 28 日間反復ばく露実験

### (1) 硫酸水素アンモニウムの粒子径分布

反復ばく露実験では、0.5、5 及び 50 mg/m<sup>3</sup> の 3 つの濃度を設定した。ばく露実験に先立って、各濃度のエアロゾルの粒子径を測定した。最頻粒子径は、それぞれ、0.32、0.50 及び 0.50 μm であり、粒子の大部分は 2 μm 以下であることから、十分に肺の深部まで沈着する大きさであると考えられた (図 3)。

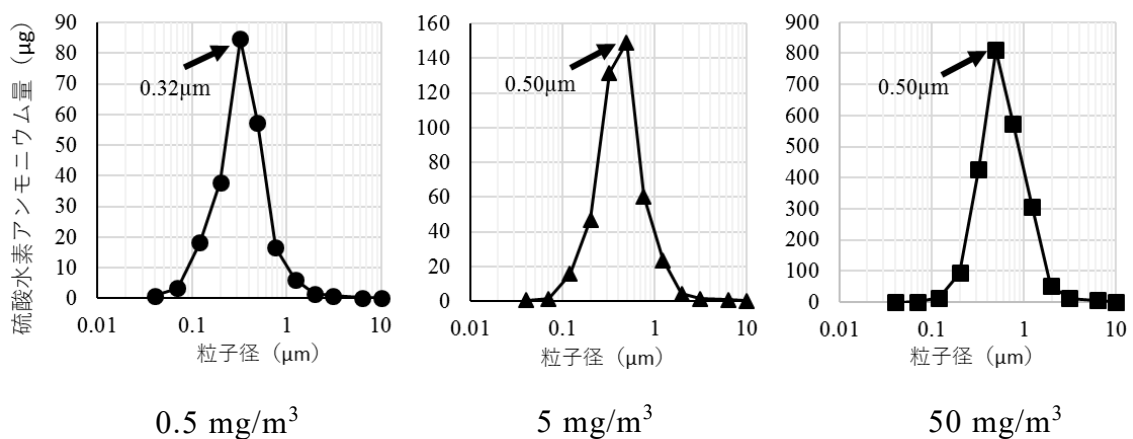


図 3. 各濃度における硫酸水素アンモニウムの粒子径分布

矢印は最頻粒子径を示す。

### (2) 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の低濃度、中濃度及び高濃度の平均値は、それぞれ、0.4 mg/m<sup>3</sup>、4.7 mg/m<sup>3</sup> 及び 42.5 mg/m<sup>3</sup> であった。始めの 1 週間程度が低めに、ばく露期間の後半はやや高めの濃度となったが、全体として、概ね目標濃度を維持することができた (図 4)。

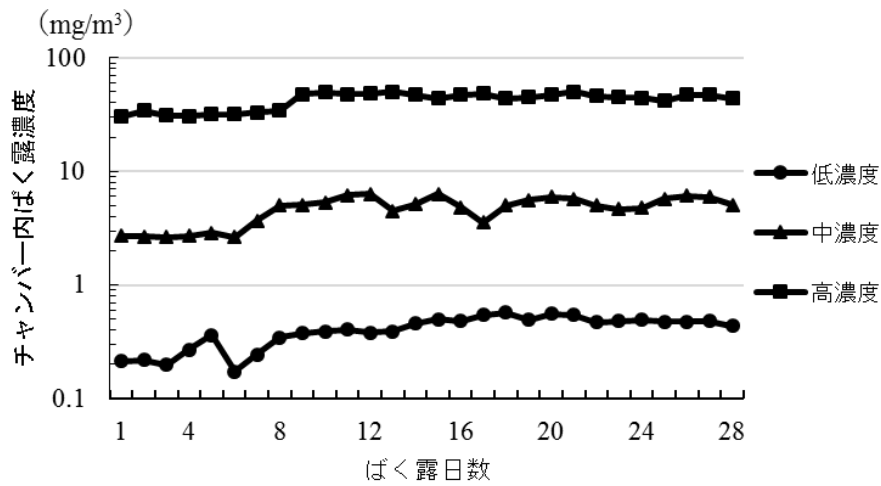


図 4. チャンバー内の硫酸水素アンモニウム濃度の推移  
破線は目標濃度を示す。

### (3) 体重及び摂餌量の推移

雄の低濃度群でわずかに減少傾向を示す日があったものの、反復ばく露の28日間、ばく露の影響を疑う体重及び摂餌量の変化は認められなかった (図 5)。

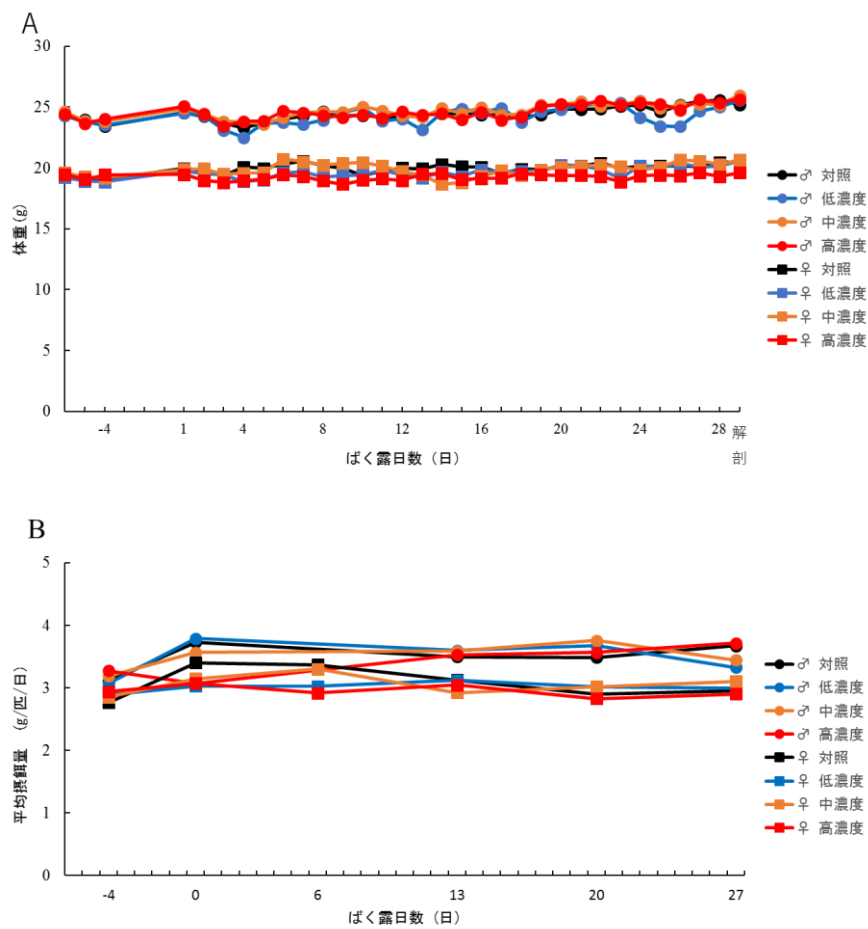


図 5. A ばく露期間中の体重変化 B 摂餌量



#### (4) 体重・臓器重量

解剖時の体重に群間で有意差は無く、主要臓器の絶対重量及び相対重量にも顕著な変化は見られなかった（表 3、4）。雄の肺重量が濃度依存的にわずかに増加する傾向が認められたが、統計学的に有意な変化ではなかった。

表 3. 解剖時の体重と臓器重量（平均値±標準偏差）

		対照	低濃度	中濃度	高濃度
<b>雄</b>					
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
胸腺	(mg)	33.7 ± 6.5	29.8 ± 6.5	31.4 ± 5.0	29.1 ± 7.0
肝臓	(mg)	1336.5 ± 120	1337.0 ± 86	1408.5 ± 55	1330.6 ± 140
脾臓	(mg)	87.4 ± 14	84.4 ± 11	78.2 ± 6.6	88.7 ± 4.3
腎臓（左右）	(mg)	377.0 ± 22	382.9 ± 15	379.3 ± 10	387.5 ± 33
副腎（左右）	(mg)	4.6 ± 1.1	4.5 ± 0.82	4.1 ± 0.60	4.8 ± 0.64
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
脳	(mg)	428.9 ± 21	430.5 ± 7.0	419.3 ± 9.6	431.9 ± 10
<b>雌</b>					
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
胸腺	(mg)	46.1 ± 7.1	41.4 ± 8.3	40.3 ± 6.9	37.5 ± 6.8
肝臓	(mg)	1007.6 ± 54	1041.6 ± 98	1048.3 ± 73	986.4 ± 34
脾臓	(mg)	85.1 ± 11	79.5 ± 8.8	77.0 ± 8.0	82.6 ± 8.4
腎臓（左右）	(mg)	273.0 ± 14	264.6 ± 28	269.9 ± 16	269.2 ± 14
副腎（左右）	(mg)	6.1 ± 0.46	6.5 ± 1.5	7.3 ± 0.52	7.3 ± 1.5
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
脳	(mg)	424.1 ± 16	421.7 ± 25	417.5 ± 16	414.1 ± 14

表 4. 相対臓器重量（体重 100g あたり）（平均値±標準偏差）

		対照	低濃度	中濃度	高濃度
<b>雄</b>					
肺	(mg)	32.9 ± 3.5	32.7 ± 3.0	35.8 ± 2.5	35.7 ± 5.4
胸腺	(mg)	8.7 ± 1.8	7.6 ± 1.8	8.3 ± 1.4	7.5 ± 2.2
肝臓	(mg)	347.4 ± 46	340.2 ± 35	372.0 ± 29	341.9 ± 59
脾臓	(mg)	22.6 ± 3.5	21.5 ± 3.2	20.6 ± 2.1	22.6 ± 1.6
腎臓（左右）	(mg)	97.9 ± 9.8	97.4 ± 7.5	100.0 ± 5.0	99.5 ± 15
副腎（左右）	(mg)	1.2 ± 0.25	1.1 ± 0.25	1.1 ± 0.18	1.2 ± 0.16
心臓	(mg)	30.2 ± 3.4	30.0 ± 3.1	30.0 ± 2.8	29.1 ± 4.3
精巢	(mg)	40.8 ± 4.3	41.7 ± 4.1	44.6 ± 3.9	41.1 ± 4.5
脳	(mg)	111.2 ± 9.5	109.4 ± 5.0	110.6 ± 5.5	110.4 ± 9.1
<b>雌</b>					
肺	(mg)	23.9 ± 2.2	22.9 ± 2.5	24.5 ± 3.4	22.2 ± 3.7
胸腺	(mg)	9.5 ± 2.0	8.5 ± 2.0	8.4 ± 1.6	7.4 ± 1.6
肝臓	(mg)	205.6 ± 23	213.7 ± 31	218.1 ± 23	193.9 ± 17
脾臓	(mg)	17.5 ± 3.4	16.3 ± 2.0	16.0 ± 1.7	16.3 ± 2.4
腎臓（左右）	(mg)	55.7 ± 6.6	54.3 ± 8.4	56.1 ± 5.1	53.0 ± 5.6
副腎（左右）	(mg)	1.2 ± 0.082	1.3 ± 0.39	1.5 ± 0.13	1.4 ± 0.31
心臓	(mg)	19.3 ± 3.5	18.1 ± 2.5	18.8 ± 1.6	18.0 ± 2.2
卵巣	(mg)	1.4 ± 0.25	1.4 ± 0.33	1.3 ± 0.19	1.4 ± 0.35
子宮	(mg)	11.6 ± 10	8.7 ± 6.1	7.2 ± 2.5	7.3 ± 4.6
脳	(mg)	86.5 ± 8.6	86.3 ± 9.0	86.8 ± 5.9	81.4 ± 7.0

## (5) 血液検査

対照群と比較して、各ばく露群で、白血球数や、各種血液学的検査項目の有意な変化は認められなかった（表5）。

表5. 多項目自動血球計数装置による血液検査（平均値±標準偏差）

		雄				雌			
		対照	低濃度	中濃度	高濃度	対照	低濃度	中濃度	高濃度
WBC	( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	37.2 ± 13	43 ± 12	45 ± 16	41 ± 12	37 ± 9.6	36 ± 8.5	40 ± 16	34 ± 8.4
RBC	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	946.8 ± 60	973 ± 37	945 ± 27	963 ± 46	949 ± 64	931 ± 24	950 ± 33	934 ± 57
HGB	(g/dL)	13.8 ± 0.93	14 ± 0.35	14 ± 0.27	14 ± 0.59	14 ± 0.73	14 ± 0.43	14 ± 0.66	14 ± 0.82
HCT	(%)	46.8 ± 2.9	48 ± 2.1	47 ± 1.5	48 ± 2.7	47 ± 3.5	46 ± 1.8	47 ± 2.8	46 ± 3.0
MCV	(fL)	49.5 ± 1.4	50 ± 1.2	50 ± 1.4	49 ± 1.4	50 ± 1.1	50 ± 1.4	50 ± 1.6	49 ± 1.3
MCH	(pg)	14.6 ± 0.21	15 ± 0.18	15 ± 0.37	15 ± 0.35	15 ± 0.36	15 ± 0.19	15 ± 0.28	15 ± 0.19
MCHC	(g/dL)	29.5 ± 0.64	30 ± 0.81	30 ± 0.73	30 ± 0.93	30 ± 0.84	30 ± 0.77	30 ± 0.47	30 ± 0.84
PLT	( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	118.5 ± 9.2	117 ± 13	112 ± 7.1	114 ± 8.3	104 ± 9.7	113 ± 10	114 ± 15	105 ± 13

## (6) BALF 中の白血球細胞の解析

BALF 中の白血球数や細胞分画について、対照群と比較して、各ばく露群で有意な変化は見られなかった（図6）。雌雄ともに、白血球の大半がマクロファージであった。

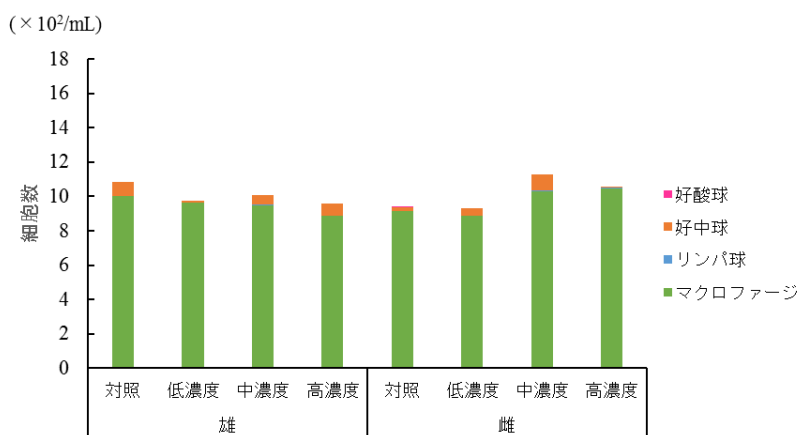


図6. BALF 中の白血球の構成

## (7) 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観察した。LDH 活性について、雄では、対照群に比べ高濃度群で有意な上昇を認めた（図7A）。一方、総タンパク質濃度については、雌雄ともに有意差は認められなかった（図7B）。

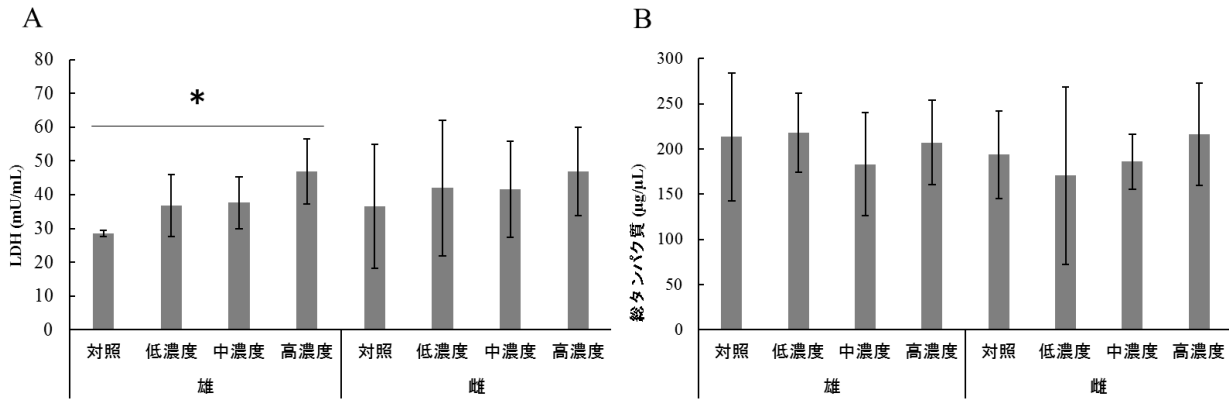


図 7. BALF 上清の生化学的解析

A LDH 活性、B 総タンパク質濃度。エラーバーは標準偏差。\*:  $p < 0.05$  (vs 対照群)

### (8) 病理組織学的解析

鼻腔の各観察部位において、吸入ばく露で予想される変化に着目したが、重層扁平上皮、呼吸上皮及び嗅上皮それぞれにおいて変化は認められなかった。気管についても、著変は見られなかった。

肺実質においては、細気管支上皮、肺胞上皮、間質や肺胞内の免疫細胞及び肺胞腔の大きさについて注目したが、ばく露の影響を疑う組織の傷害や炎症反応は認められなかった (図 8)。高濃度群の 1 例で、肺胞領域にごく微小な炎症巣が認められたが、ばく露との関連とは言い難く、自然発生病変と考えられる。

他の主要臓器については、肝臓の炎症性細胞浸潤、腎うの炎症及び副腎の被膜下細胞の軽度過形成が孤発性に認められたが、それぞれの変化の発現頻度にばく露による影響は認められず、自然発生病変と考えられた。

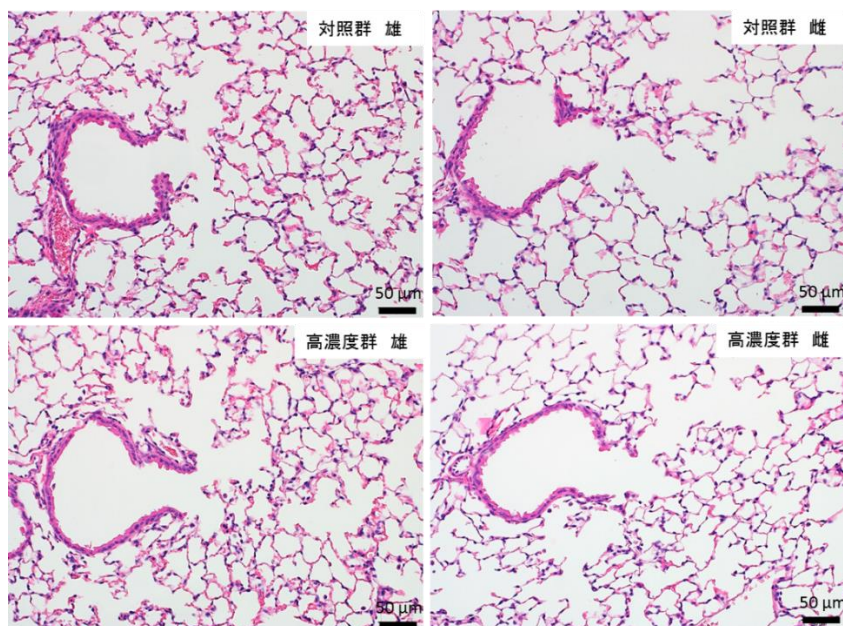


図 8. 28 日間の反復ばく露後の肺実質 (終末気管支から肺胞領域) の組織像 (H&E 染色)

## (9) 分子生物学的解析

各種解析において、ばく露による影響が認められなかったため、肺組織における各種遺伝子の発現は、対照群と高濃度群のみで検討した。qRT-PCRの結果、炎症反応に関わる *Kc*、*Il1b*、*Tnfa*、線維化や組織修復に関わる *Tgfb1*、酸化ストレス関連因子の *Hmox1* や *Sod2*、粘液分泌に関わる *Muc5ac* について、雌雄ともに、高濃度群における発現の亢進は認められなかった (図 9)。

*Kc* 及び *Tnfa* についてばく露群で有意な減少が見られたが、生物学的意義は低いと考えられる。

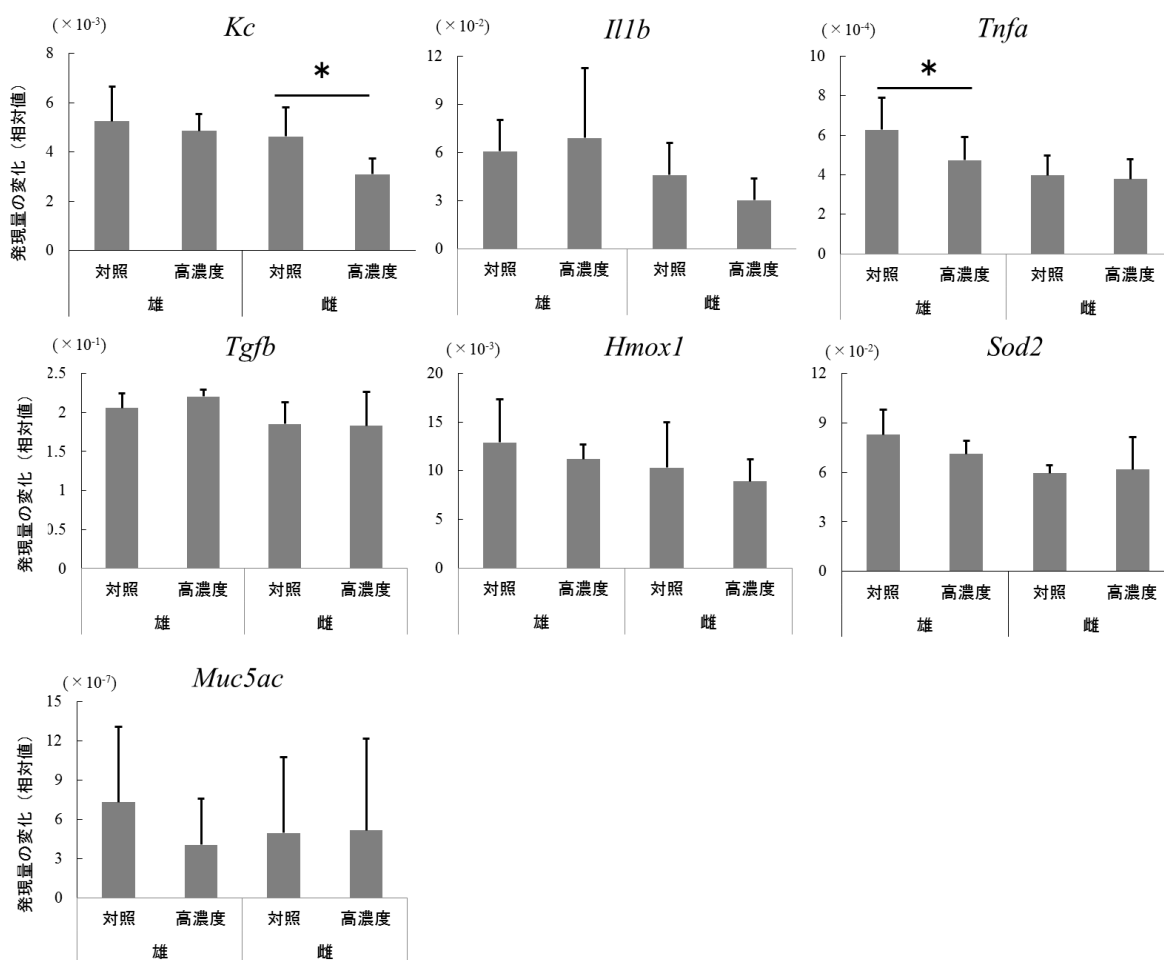


図 9. 肺実質における各種遺伝子の発現解析  
 発現量は *H2a* 遺伝子で標準化された相対値。エラーバーは標準偏差。  
 Wilcoxon test, \*:  $p < 0.05$  (vs 対照群)

## IV 考 察

単回ばく露実験では、既報<sup>5), 7-10)</sup>に比べ 100 倍近い高濃度でばく露を実施したが、マウスの生存に関わるような重篤な影響は与えないことがわかった。OECD テストガイドライン 436 (急性吸入毒性試験) では、エアロゾル (ミスト) の急性吸入毒性については、限度試験の濃度を 5 mg/L (5,000 mg/m<sup>3</sup>) としている。今回、LC<sub>50</sub> 相当値を得ることを目的としたわけではないため、5,000 mg/m<sup>3</sup> まで濃度を上げなかったが、硫酸水素アンモニウムは急性吸入毒性の低い物質であると結論される。

硫酸水素アンモニウムの高濃度ばく露の報告はされていないが、硫酸アンモニウムについては、Pepelko らの予備的な急性毒性試験で 800 から 900 mg/m<sup>3</sup> のばく露でモルモットのほぼ半数が死亡したとされており<sup>11)</sup>。これは、硫酸等その他の刺激物質の高濃度ばく露でも報告されているように、咽頭痙攣や閉塞性の気管支収縮が死因とされている。一方、ラットへの 300 mg/m<sup>3</sup> のばく露実験では、組織学的、血液学的及び呼吸機能の解析において、変化は認められず、1,000 から 1,200 mg/m<sup>3</sup> の高濃度のばく露でも死亡個体は見られなかった<sup>11)</sup>。また、本事業の過去の報告のとおり、マウスの硫酸アンモニウムのばく露において、1,000 mg/m<sup>3</sup> まで濃度を上げて体重の減少は見られたが、死亡例は無かった<sup>12)</sup>。すなわち、Pepelko らの報告は、呼吸器への刺激に対する感受性の高いモルモット特有の変化と考えられ、マウス・ラットへの硫酸アンモニウム及び硫酸水素アンモニウムの急性吸入毒性は低いと考えられる。硫酸水素アンモニウムは硫酸アンモニウム<sup>12)</sup>に比べて酸性度が高かったにもかかわらず (50 mg/m<sup>3</sup> 群の硫酸水素アンモニウム水溶液は pH 1.8)、上皮組織の損傷や、炎症反応や気管粘液の増加をはじめとした呼吸器への作用が無く、おそらくエアロゾルの粒子が呼吸器系の上皮に到達すると速やかに溶解し、希釈・中和され、恒常性が保たれたと推測される。実際、呼吸器上皮に酸性度の高い粒子が沈着しても速やかに中和されるとの報告もある<sup>13)</sup>。

既報の結果からは、硫酸塩の吸入毒性の作用機序は不明瞭であり、作用があるとすれば、酸性度が高いこと (プロトン濃度が高いこと) のみが影響すると想定されている<sup>1,2)</sup>。硫酸アンモニウムは生体内で速やかに硫酸イオンとアンモニウムイオンになるが、これらのイオンは正常な動物の体内で多量に存在しており、吸入された量の影響は無視できるレベルである。例えば、環境基準値 (年平均値 15 µg/m<sup>3</sup>) レベルの PM<sub>2.5</sub> を 1 日中吸入した場合でも硫酸イオンの量は 0.075 mg と試算され<sup>1)</sup>、血中の硫酸イオン量である 170 mg の 2,200 分の 1 以下となる。Utell らはヒトの吸入ばく露実験で硫酸ガスや種々の硫酸塩のエアロゾルをばく露し、エアロゾルの酸性度 (pH) に関連した影響の強さを認めたため<sup>14)</sup>、プロトンが気管支の平滑筋に作用するなどの機序が想定される。上記の硫酸塩の急性吸入ばく露で観察されたモルモットの気管支収縮は、こうした機序によるものかもしれない。

しかし、本研究においては、上記のとおり、急性毒性だけではなく 28 日間の反復ばく露を行っても生体影響を捉えられなかった。既報で推測されている作用は、少なくともマウスに対しては微弱かつ可逆的で、反復ばく露を実施しても器質的な変化に繋がらなかったと考えられる。まず、病理組織学的解析では、炎症性細胞の浸潤、杯細胞の増加、線毛の消失及び上皮の変性剥離等の酸性物質や刺激性物質で予想されるような所見は認められなかった。硫酸水素アンモニウムをばく露した動物実験の報告は少なく、組織学的な評価はほとんどなされていないが、硫酸アンモニウムのラット又はモルモットへの反復ばく露では、肺胞拡張<sup>15)</sup>、気管支・肺胞上皮の過形成<sup>16)</sup>が報告されている。今回これらについても注意深く観察したが、変化は検出されなかった。単に被験物質の違いとも考えられるが、本

事業の過去の報告のとおり、硫酸アンモニウムの 3 か月ばく露でもこれらの所見は見られなかったため<sup>12)</sup>、むしろ、動物種の違いであり、マウスでは、ラットに比べても影響が出にくい可能性がある。あるいは、本研究では 1 日あたりのばく露時間がラット・モルモット (6 時間)<sup>15,16)</sup>よりも短いため、その点も影響した可能性がある。また、呼吸器上皮の細胞傷害の指標として BALF の LDH 活性を測定した結果、雄の高濃度群のみで有意な上昇を認めたが、組織学的にこれを裏付ける所見が全く認められなかった。その他、qRT-PCR による分子生物学的解析においても、変化が見られなかった。*in vitro* の結果では (第 3 章)、活性酸素種 (ROS) の産生が有意に増加したことを報告しているが、今回、*Hmox1* (ヘムオキシゲナーゼ 1) 及び *Sod2* (スーパーオキシドジスムターゼ 2) 等の酸化ストレスに関連する遺伝子発現に変化は見られなかった。*in vivo* の実験では被験物質のクリアランス・希釈効果が高いことにより、細胞内の酸化還元状態のバランスが維持されたものと考えられる。

以上、本節では、硫酸水素アンモニウムの吸入による生体影響を調べるため、雌雄の BALB/c 系マウスに、最大 500 mg/m<sup>3</sup> の 3 時間の単回ばく露、あるいは最大 50 mg/m<sup>3</sup> の毎日 3 時間の 28 日間の反復吸入ばく露を行った。酸性度が高いにもかかわらず、本条件における硫酸水素アンモニウムのエアロゾル吸入の生体影響は非常に低いことが明らかとなった。これまで、マウスの吸入ばく露の詳細な試験結果は報告されておらず、この結果は有用な情報提供となる。

## V 文 献

- 1) 嵯峨井 勝 : 日衛誌, **74**, 1-11, 2019.
- 2) Schlesinger, R. B., Cassee, F.: *Inhal Toxicol*, **15**, 197-235, 2003.
- 3) Utell, M. J., Morrow, P. E., Hyde, R.W.: *JAPCA*, 34:931-935, 1984.
- 4) Avol, E. L., Jones, M. P., Bailey, R. M., *et al.*: *Am Rev Respir Dis*, **120**, 319-327, 1979.
- 5) Schlesinger, R.B.: *Environ Res*, **34**, 268-279, 1984.
- 6) Amdur, M. O., Bayles, J., Ugro, V., *et al.*: *Environ Res*, **16**, 1-8, 1978.
- 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) Schlesinger, R.B.: *Environ. Health Perspect*, **63**, 25-38, 1985.
- 9) Schlesinger, R.B., Chen, L.C., Finkelstein, I., *et al.*: *Environ Res*, **52**, 210-224, 1990.
- 10) Utell, M. J., Morrow, P. E., Speers, D. M., *et al.*: *Am Rev Respir Dis*, **128**, 444-450, 1983.
- 11) Pepelko, W. E., Mattox, J. K., Cohen, A. L.: *Bull Environ Contam Toxicol*, **24**, 156-160, 1980.
- 12) 東京都福祉保健局 : 大気汚染物質と健康影響に関する調査研究報告書—基礎的実験的研究— (平成 28 年度から令和元年度まで), 2020.
- 13) Larson, T. V., Covert, D. S., Frank, R., *et al.*: *Science*, **197**, 161-163, 1977.
- 14) Utell, M. J.: *Environ Health Perspect*, **63**, 39-44, 1985.

- 15) Busch, R. H., Buschbom, R. L., Cannon, W.C., *et al.*: *Environ Res*, **33**, 454-472, 1984.
- 16) Loscutoff, S. M., Cannon, W. C., Buschbom, R. L., *et al.*: *Environ Res*, **36**, 170-180, 1985.