

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

次年度、硫酸アンモニウムがぜん息症状を増悪するかどうかを検討するため

主な検討項目

●プロトコール

期間： 短期モデル及び長期モデル

感作方法： 経鼻投与及びネブライザー吸入

●評価手法

免疫学的解析

気道抵抗(気道過敏性)

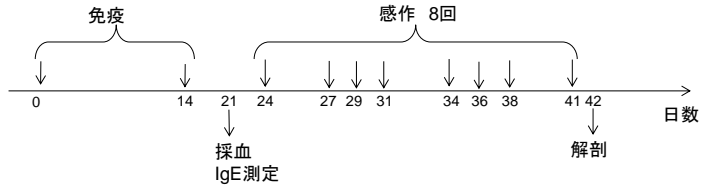
短期モデル 実験概要

●動物 BALB/c ♀マウス 10週齢

●作製手順

免疫 OVA 2 μ g + アラム 腹腔投与 0.5 mL

感作 1.5% OVA / PBS [・20 μ L 経鼻投与
・30分 ネブライザー鼻部吸入]



●群構成 5群 各群N=6

- ・無処理
- ・経鼻PBS
- ・経鼻OVA感作
- ・ネブライザーPBS
- ・ネブライザーOVA感作

●分析

- ・BALF⇒細胞診
- ・肺⇒病理組織, qRT-PCR

解剖時の体重・臓器重量

項目	無処理	経鼻投与		ネブライザー	
		PBS	OVA	PBS	OVA
体重 (g)	22.1 \pm 0.4	18.4 \pm 2.5 #	19.8 \pm 2.7	20.1 \pm 1.8 #	20.8 \pm 1.1 #
胸腺 (mg)	35.0 \pm 8.4	17.9 \pm 12 #	16.9 \pm 9.6 ##	20.0 \pm 8.9 #	23.3 \pm 8.2 #
脾臓 (mg)	101.7 \pm 7.5	115.0 \pm 16	136.7 \pm 18 ##	123.3 \pm 15 #	135.0 \pm 14 ##
肺 ※ (mg)	230.0 \pm 14	203.3 \pm 24 #	276.7 \pm 26 **	225.0 \pm 15	230.0 \pm 27

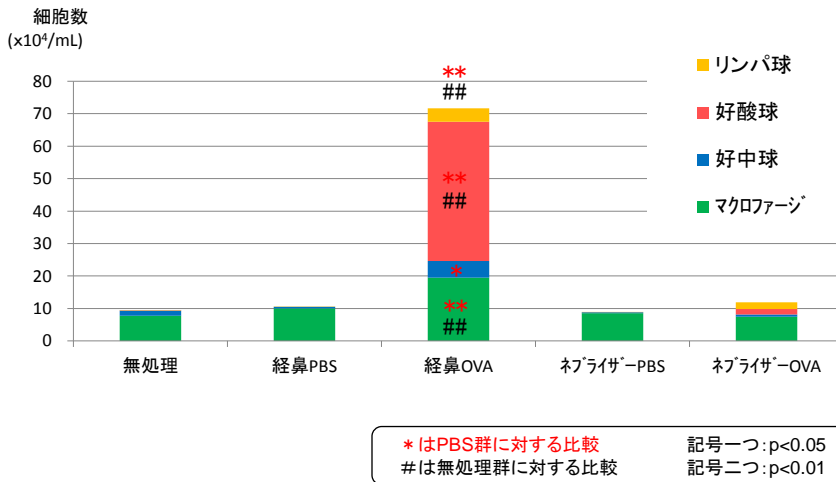
* はPBS群に対する比較
は無処理群に対する比較

記号一つ: p<0.05
記号二つ: p<0.01

※肺はBALF回収後の重量

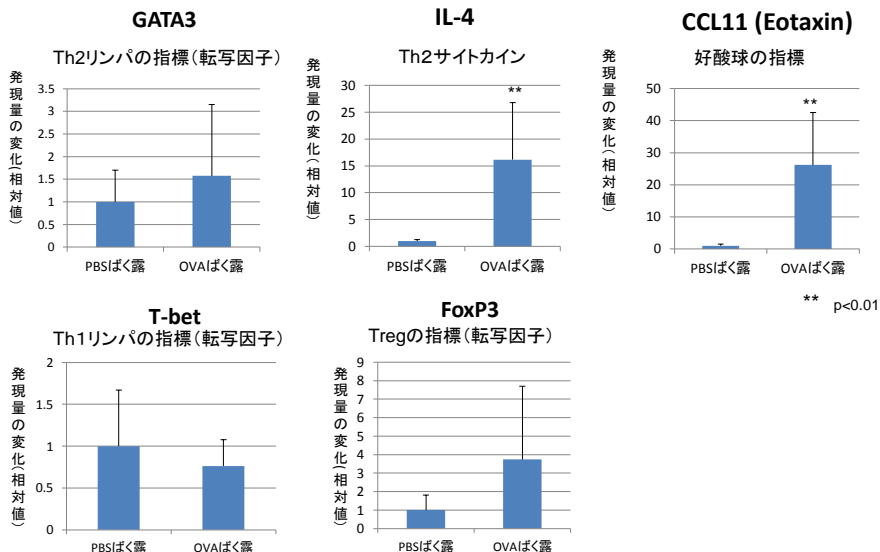
経鼻投与において、肺重量がOVA投与群で有意に増加した。
無処理に比べて、胸腺重量が各群で有意に減少した。
⇒ぜん息とは無関係に実験操作で免疫系にダメージがあったと推測される

BALF 細胞診



経鼻投与において、白血球(特に好酸球)の増加がOVA投与群に見られた。
 ネブライザーばく露においては、有意な増加は認められなかった。

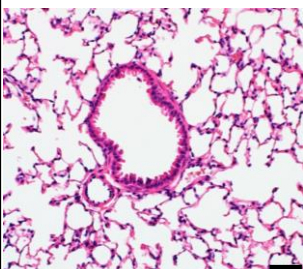
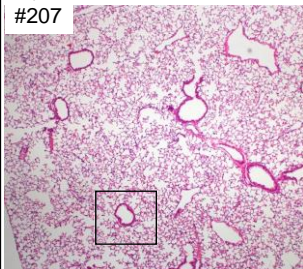
肺組織における遺伝子発現(経鼻投与)



OVA経鼻投与群で、Th2サイトカイン及び好酸球マーカーの有意な発現上昇が見られた。

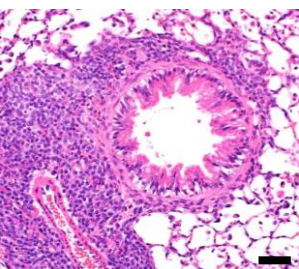
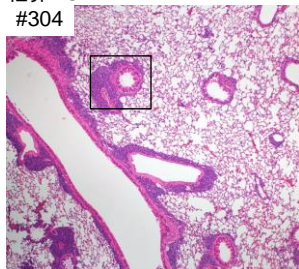
病理組織

経鼻 PBS
#207



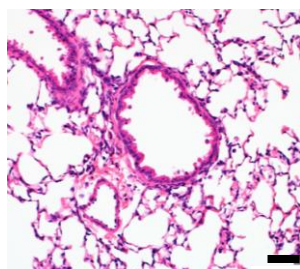
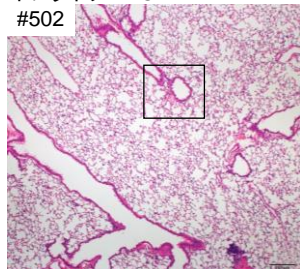
50μm

経鼻 OVA
#304



50μm

ネブライザー OVA
#502

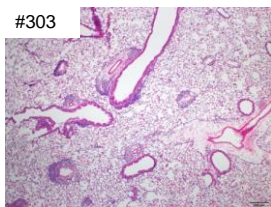
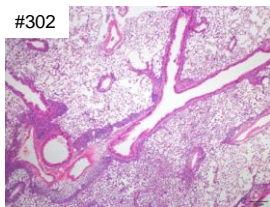
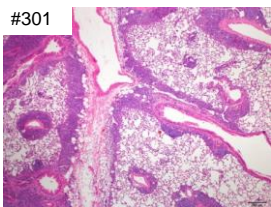


50μm

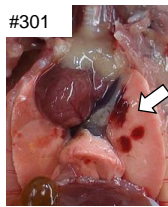
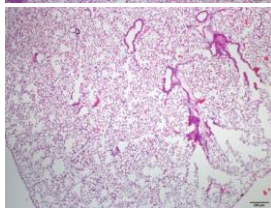
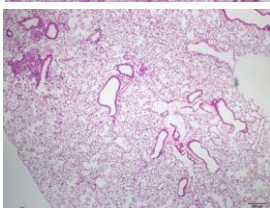
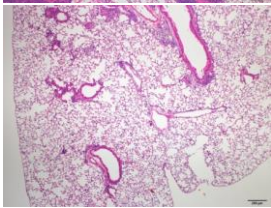
OVA経鼻投与群で、血管周囲及び気管支周囲に多数の炎症細胞の浸潤が見られた。ネブライザーばく露でもわずかな細胞浸潤が見られたが、反応は弱かった。

経鼻投与による炎症反応の偏在

近位
(肺門付近)



遠位
(尾側)



肺門付近で激しい炎症反応が見られるのに対し深部では弱かった。肉眼的には、肺実質における出血斑や肺門部の膨隆が見られた。

病理組織観察のまとめ

組織・部位	所見	無処理 (N=6)	経鼻		ネブライザー		
			PBS (N=6)	OVA (N=6)	PBS (N=6)	OVA (N=6)	
気管	炎症細胞浸潤	0	1 (1)	4 (1)	2 (1)	2 (1)	
	気管上皮肥厚	0	0	0	0	0	
	杯細胞増生	0	0	0	0	0	
	気管平滑筋肥厚	0	0	0	0	0	
	気管支腺増生	0	0	0	0	0	
近位 細気管支 ～終末 気管支	血管・気管支周囲粘膜 浮腫	0	0	0	0	0	
	炎症細胞浸潤 (気管周囲)	0	0	6 (2.2)	0	2 (1)	
	炎症細胞浸潤 (血管周囲)	0	0	6 (2.2)	0	4 (1)	
	気管支上皮肥厚	0	0	5 (1)	0	0	
	杯細胞増生	0	0	0	0	0	
	気管支平滑筋肥厚	0	0	0	0	0	
	遠位	血管・気管支周囲粘膜 浮腫	0	0	0	0	0
		炎症細胞浸潤 (気管周囲)	0	0	0	0	0
		炎症細胞浸潤 (血管周囲)	0	0	4 (1)	0	2 (1)
		気管支上皮肥厚	1 (1)	1 (1)	3 (1)	0	0
杯細胞増生		0	0	0	0	0	
肺胞管～ 肺胞	気管支平滑筋肥厚	0	0	0	0	0	
	マクロファージ浸潤	0	0	5 (2.2)	0	1 (1)	
	マクロファージ集簇	0	0	5 (2.4)	0	2 (1)	
	出血	0	0	2 (1)	0	0	

観察された個体数 (平均スコア) ※スコア: 1～3

考察

●好酸球性の炎症反応が認められ、ぜん息症状を起こすことができたと考えられる。

●経鼻投与では炎症反応に部位的な偏りが生じやすかった。

→肺の深部まで到達しなかった？

OVA溶液の質・手法・手技の問題か？

●ネブライザーばく露では反応が弱く、影響の見られない個体が多かった。

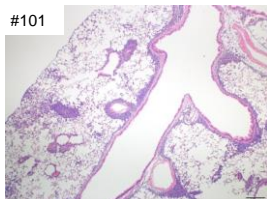
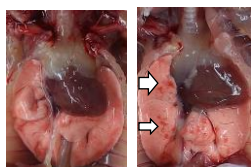
→溶液の霧化などネブライザー条件？

OVAの濃度、OVAの質(純度)及びネブライザーの運転条件等を変え、炎症反応が強すぎずに均一になる条件を検討中である。

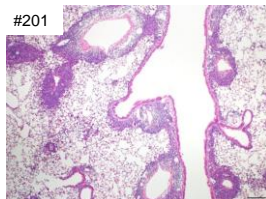
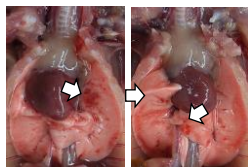
OVA純度の比較(経鼻投与)

- ・感作に用いるOVAを高純度のものに変更
- ・感作：3回

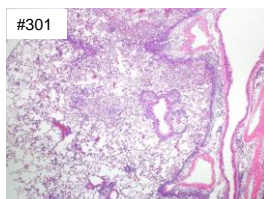
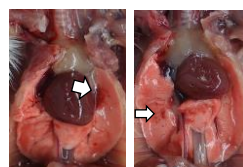
高純度 0.2% 50 μ L
N=4



高純度 1.0% 50 μ L
N=4



低純度 1.5% 20 μ L
N=3

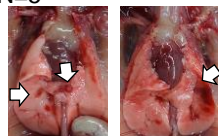


高純度OVAを用いても、部分的で激しい反応が認められた。

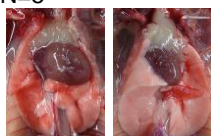
ネブライザーばく露の再検討

- ・感作に用いるOVAを高純度のものに変更
- ・ネブライザー運転条件を変更(霧化量・風量)
- ・感作6回

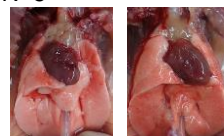
経鼻投与
0.2% OVA 50 μ L
N=5



ネブライザー全身
1.5% OVA
N=5



ネブライザー鼻部
1.5% OVA
N=5



BALF中細胞数
(*10⁴/mL)

250
200
150
100
50
0

経鼻投与

ネブライザー
(全身)

ネブライザー
(鼻部)

■ リンパ球
■ 好酸球
■ 好中球
■ マクロファージ

経鼻に対して
** : p<0.01

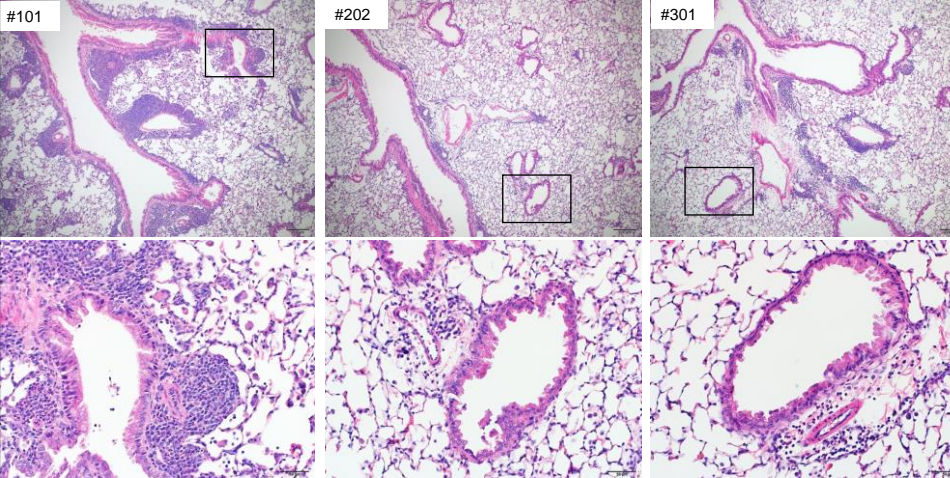
ネブライザーばく露の再検討

病理組織学

経鼻投与

ネブライザー全身

ネブライザー鼻部



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。

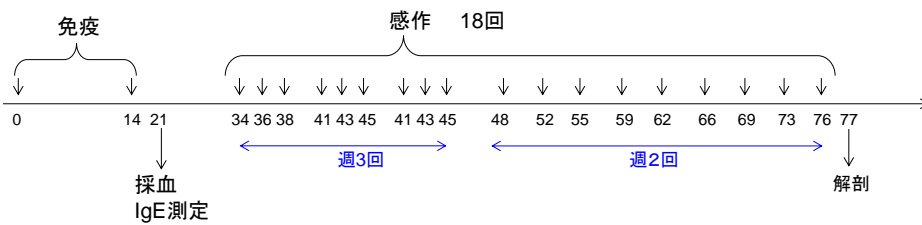
長期モデル 実験概要

●動物 BALB/c ♀マウス 8週齢

●作製手順

免疫 2回 OVA 2 μ g + アラム/ 腹腔投与 0.3 mL

感作 0.1% OVA/ PBS 経鼻投与 40 μ L



●群構成 2群 各群N=12

- ・経鼻PBS
- ・経鼻OVA感作

●分析

- ・BALF⇒細胞診及びELISA
- ・肺⇒病理組織及びqRT-PCR
- ・肺門及び縦隔リンパ節⇒フローサイトメトリー

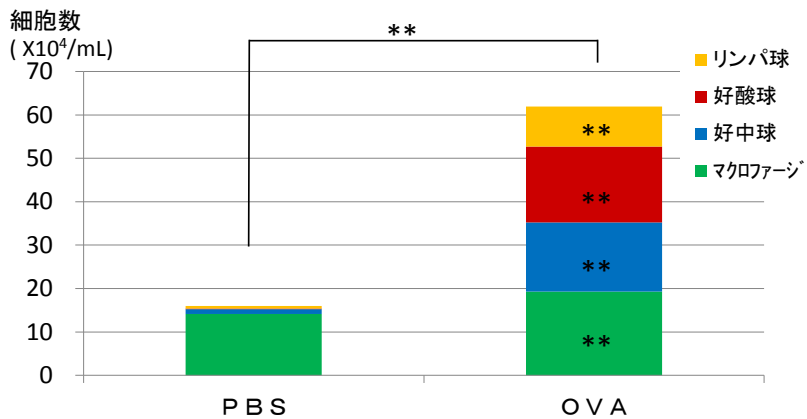
解剖時の体重・臓器重量

項目		PBS (N= 5; 肺のみN=3)		OVA (N = 5)	
		体重 (g)	23.3	± 0.5	23.0
胸腺 (mg)		33.6	± 8.9	33.2	± 14
脾臓 (mg)		118.6	± 10.3	133.2	± 40
肺 (mg)		123.4	± 6	197.0	± 22 **

** : p<0.01

肺重量は有意に増加した。胸腺・脾臓に有意な変化はなかった。

BALF 細胞診



OVA投与群で有意に白血球及び各種細胞が増加した。
好酸球数の増加は短期試験よりも穏やかな傾向であった。

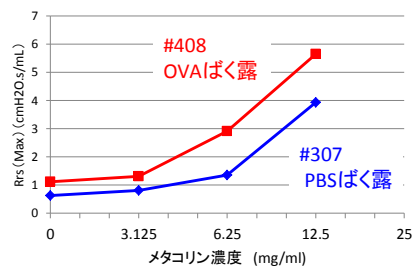
分析中の項目

- 病理組織学的解析 リモデリング(特殊染色等)
- 免疫学的解析 リンパ組織を用いたフローサイトメトリー
- 肺組織における遺伝子発現 qRT-PCR
- BALF中サイトカイン類 ELISA
- 気道抵抗(気道過敏性)

emka社製の呼吸機能測定装置



予備実験結果(気道過敏性)



まとめ

- 好酸球性炎症が認められ、OVAによるぜん息症状を起こすことができたと考えられる。
- 経鼻投与では炎症反応の部位的な偏りが生じやすい
- ネブライザーばく露で条件を修正すれば、炎症反応を抑えたモデルができると考えられる
→再検討中のネブライザー感作の条件を確定させ、次年度の硫酸アンモニウムばく露実験では、ネブライザー(全身)を使用する予定
- 分析中の項目について評価方法を確認する
 - ・長期モデルのリモデリング → 特殊染色等
 - ・リンパ球のサブセット → フローサイトメトリーとqRT-PCR
 - ・気道抵抗 → 呼吸機能測定装置