

第2節 ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露実験

1 目的

吉田らは、1980年代に、卵白アルブミン（以下 OVA と略す）誘導型のぜん息モデルのモルモットを用いた実験において、硫酸アンモニウムのばく露が症状を悪化させることを示した^{1,2)}。しかしながら、その後、同様の結果は報告されておらず、免疫学的解析に適したマウスによる報告が無いため、増悪のメカニズムは不明である。そこで、本研究では、硫酸アンモニウムのぜん息モデルマウスに対するぜん息の増悪の有無を調べるため、また、免疫学的な知見を得るため、OVA 誘導型ぜん息モデルマウスを用い、硫酸アンモニウムの2週間ばく露実験を実施した。

2 方法

(1) 実験動物及び群構成

6週齢の BALB/cAnNCrIj の雌性マウスを購入し(日本チャールス・リバー)、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て、プラスチック製ケージに4匹ずつ収容し、第1節の実験と同じ条件下で飼育した。

各群16匹として、超純水のミストをばく露させる対照群(1群)、低濃度の硫酸アンモニウムをばく露させる群(2群)、高濃度の硫酸アンモニウムをばく露させる群(3群)、ぜん息を誘導する群(4群)、ぜん息を誘導して低濃度の硫酸アンモニウムをばく露させる群(5群)及びぜん息を誘導して高濃度の硫酸アンモニウムをばく露させる群(6群)の6群に分けた(表1)。

表1. 実験概要

動物	BALB/cAnNCrIj 雌性マウス、ばく露開始時：13週齢
群構成と濃度	各群 16匹 1群 対照群：0 mg/m ³ (超純水) 2群 低濃度群：10 mg/m ³ 3群 高濃度群：100 mg/m ³ 4群 ぜん息群：OVA 5群 ぜん息+低濃度群：OVA+10 mg/m ³ 6群 ぜん息+高濃度群：OVA+100 mg/m ³
硫酸アンモニウムばく露	
被験物質	硫酸アンモニウム (試薬特級) CAS No.7783-20-2
ばく露方法	鼻部吸入ばく露
ばく露期間	1日おきに2週間、6回、1時間/日
OVAぜん息誘導	
免疫方法	OVA 2 µg + 硫酸カリウムアルミニウム (20 mg/mL)、腹腔内投与2回
感作方法	1.5% OVA/PBS、ネブライザー全身吸入ばく露30分
ばく露期間	1日おきに2週間、6回、30分/日 (硫酸アンモニウムばく露後に実施)

ばく露期間には、一部、週末の欠測を除き、第1節と同様に、体重及び摂餌量を毎日測定した。

飼育及び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

硫酸アンモニウムの吸入ばく露は、第1節と同じばく露システムを用い、流量等の設定値も同様にして実施した。正常動物に対する影響は非常に弱かったため(第1節)、また、増悪の有無を評価することを優先するため、今回は硫酸塩のぜん息の増悪能を検討した既報に比べて高濃度のばく露を実施することとした。吉田らの実験では2週間に5回の吸入感作を行う系で強い変化を検出できた濃度は 10 mg/m^3 であったことから²⁾、マウスとモルモットの感受性の違いを考慮し、低濃度を 10 mg/m^3 に、高濃度を 100 mg/m^3 に、それぞれ設定した。ミスト発生装置に、硫酸アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、富士フィルム和光純薬、試薬特級)を低濃度群は0.11% (w/v)、高濃度群は1.1%の濃度になるように調製して、ミスト発生装置に入れた。対照群には超純水を用いた。

ばく露は、1日1時間、1日おきに2週間、合計6回のばく露を行った(図1、表1)。剖検時に処理可能な動物数に制限があるため、各群を2つのサブグループに分け、初回のばく露から剖検まで、すべての操作は2日ずつずらして実施した。ばく露濃度のモニタリングは、第1節と同様の手法で、6回のばく露のうち、全群のサブグループが同日にばく露される4回のばく露日において、測定した。

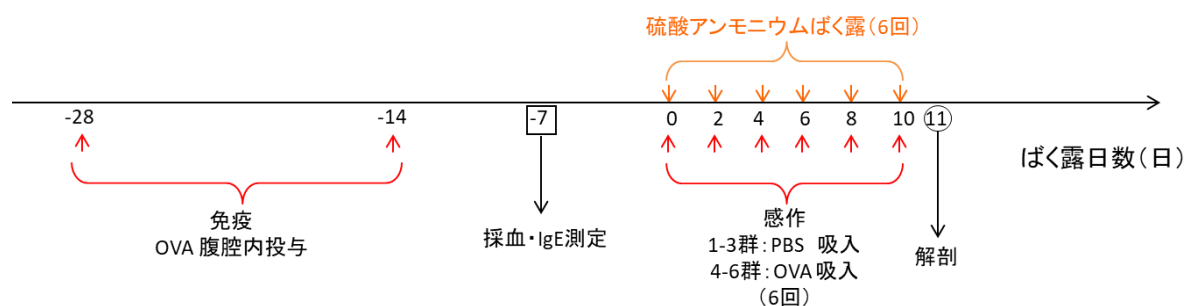


図1. 実験スケジュール

(3) OVA 誘導型ぜん息モデルマウスの作製

全動物に、OVA (低エンドトキシン、富士フィルム和光純薬) $2 \mu\text{g}$ と硫酸カリウムアルミニウム (富士フィルム和光純薬) 20 mg/mL の懸濁液を1匹あたり 0.3 mL 、2週間の間隔で2回腹腔内投与(免疫)した(図1)。その後、全動物の尾静脈から $50 \mu\text{L}$ 程度の血液を採取し、血漿中のIgE濃度を測定した。2回目の腹腔内投与の2週間後から、吸入によるOVA感作を、硫酸アンモニウムと同日に1日おきに合計6回実施した(表1・図1)。硫酸アンモニウムのばく露の1時間後に、1から3群にはPBSを、4から6群には1.5% (v/w) のOVA (Grade V、純度98%以上、シグマアルドリッチ)の水溶液を、それぞれ超音波式ネブライザー(オムロン)によって霧化させ、全身吸入により30分間、ばく露した。

なお、硫酸アンモニウムによる増悪の影響を検出しやすくすることを目的に、ぜん息モデルマウスの症状が軽度になるように、試薬、ばく露濃度及び頻度等の条件を事前に検討し、至適条件を設定した。

(4) 剖検

動物は、最終ばく露日の翌日に、イソフルラン吸入麻酔下で腹大動脈から全採血して安楽死させた。血液は抗凝固剤 EDTA-2K を入れた試験管に採取し、4℃、3,000 rpm で 10 分間遠心分離することで血漿を得た。

各群 16 匹のうち、10 匹については、気管、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、甲状腺及び胸腺を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、病理組織学的解析に供した。ただし、肺については、副葉を結紮し、他の全ての葉に PBS を注入し、BALF を回収した後に固定した。BALF の沈殿は白血球数の計測に、上清は生化学的解析に用いた。副葉は凍結し、分子生物学的解析に用いた。

残りの 6 匹については、気道抵抗の測定（予備の条件検討を 1 匹ずつ含む）に供した。

(5) 病理組織学的解析

摘出した臓器は、第 1 節と同様に処理し、H&E 染色したスライド標本を作製した。観察部位は基本的に第 1 節と同様であったが、肺実質については気管支の所見をより定量的に評価することを目的として、左葉の頭尾軸に沿った 5 か所の横断面、右葉の前葉及び中葉の横断面、さらに後葉については最大割面を、光学顕微鏡下で観察した。

各群 10 匹の動物について、ぜん息症状で一般的に認められる各種の所見を 4 段階に分類し、変化なしまたはほぼ変化が見られないものを 0、弱いものを 1、中程度のものを 2、強いものを 3 とし、4 段階のスコアで評価した。

また、気管支上皮の杯細胞による粘液産生を観察するため PAS 染色 (Periodic acid-Schiff stain) を行った。肺組織切片を過ヨウ素酸水溶液で酸化処理し、シッフ試薬 (富士フィルム和光純薬) と反応させた後、亜硫酸水溶液で洗浄を行った。また、ヘマトキシリンにより核を染色した。各群 10 匹の左葉を染色し、気管支の面積あたりの PAS 陽性領域を画像解析ソフト (ImageJ、米国立衛生研究所) によって求めた。気管支の面積は、基底膜の内側の面積とした。1 匹の左葉の切片から直径 0.2 から 0.4 mm の気管支を 3 つ無作為に選び平均値を 1 匹のデータとした。

(6) BALF 中の細胞数

BALF の沈殿を 2% のウシ血清アルブミンを含む PBS で再懸濁し、第 1 節と同様に、白血球を分類・計数し、各種の細胞数を算出した。

(7) 免疫学的解析

ア 血中の免疫グロブリン濃度

OVA の吸入感作前と剖検時に採取した血漿^{しょう}については、ELISA キット（アブカム）を用いて IgE を測定した。

イ リンパ節におけるリンパ球サブセット解析

肺に関連するリンパ節として、肺門リンパ節及び縦隔リンパ節を摘出し、すりつぶした後、孔径 70 μm のフィルターを通し、溶血試薬（ベクトンディッキンソン）で赤血球を溶血させた後、白血球、B 細胞、T 細胞、ヘルパーT 細胞、キラーT 細胞及び死細胞の検出のため、それぞれ、APC-Cy-7 標識抗 CD45 抗体、PE 標識抗 CD19 抗体、APC 標識抗 CD3 抗体、FITC 標識抗 CD4 抗体、BV421 標識抗 CD8 抗体及び 7-AAD（いずれの蛍光試薬もベクトンディッキンソン）と反応させ、フローサイトメーター（CytoFlex S、ベックマンコールター）で計測・解析した。

(8) 生化学的解析

BALF 上清における IL-5 の値を、ELISA キット（R&D システムズ）を用いて測定した。

(9) 分子生物学的解析

各群 16 匹のうち 8 匹について、凍結した肺の右葉（副葉）を凍結粉砕器（安井器械）で粉砕し、組織片からフェノール・クロロホルム抽出法により、total RNA を抽出し、逆転写キット（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて 1st strand cDNA を得た。各種のぜん息及び炎症関連遺伝子に特異的なオリゴプライマーセット（表 2）を作製し、SYBR Green（サーモフィッシャーサイエンティフィック）により定量的 RT-PCR を行った。既知のコピー数の DNA の希釈系列を利用し、目的遺伝子の発現量を算出し、*h2a* 遺伝子の値で標準化した。

表 2. 定量的 RT-PCR で使用したプライマー

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>arg-1</i>	CATTGGCTTGCGAGACGTAGA	TTGCCAATCCCCAGCTTGT
<i>ccl-11</i>	CAGATGCACCCTGAAAGCCATA	TGCTTTGTGGCATCCTGGAC
<i>clca3 (gob-5)</i>	CATCGCCATAGACCACGACG	TTCCAGCTCTCGGGAATCAAA
<i>foxp-3</i>	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	TTCTCACAACCAGGCCACTTG
<i>gata-3</i>	GAGGTGGACGTACTTTTTAACATCG	GGCATACTGGCTCCCGT
<i>h2a-v1</i>	CGTATCACCCCTCGTCACTT	TCAGCGATTTGTGGATGTGT
<i>ifn-g</i>	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC
<i>il-4</i>	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
<i>il-6</i>	CCACGGCCTTCCCTACTTC	TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
<i>il-10</i>	AAGGGTTACTTGGGTTGCC	CTCTTATTTTACAGGGGAGA
<i>t-bet</i>	GCCAGGGAACCGCTTATATG	GACGATCATCTGGGTCACATTGT
<i>tgf-b</i>	CACCGGAGAGCCCTGGATA	GCCGCACACAGCAGTTCTT

(10) 気道抵抗の測定

最終ばく露の翌日に呼吸機能解析装置（フレキシベント FV-FX、emka）により、気道過敏性試験を実施し、気道抵抗の上昇の程度を比較した。マウスに3種混合麻酔（メドトミン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 4 mg/kg、ベトルフェール 5 mg/kg）を皮下注射後に、気管を切開しカニューレを挿管し、装置本体に接続した。筋弛緩剤（エスラックス静注、MSD）を 0.4 mg/kg の用量で腹腔内投与した後、強制振動法による 2.5 Hz の振動をベンチレーターによって 1.25 秒間与えることで、気道抵抗を測定した。気道平滑筋収縮物質であるメサコリン（O-アセチル-β-メチルコリンクロリド、富士フィルム和光純薬）の 0、8 及び 16 mg/mL の希釈列を 1 匹ごとに低濃度から順に吸入させ、気道抵抗を測定した。各濃度で 12 回のデータを取得し、ピーク値を各濃度の気道抵抗値とした。

(11) 統計解析

硫酸アンモニウム単独の影響を評価するため、1 群に対する 2 群及び 3 群の差異について、また、OVA 感作の影響を評価するため、1 群に対する 4 群から 6 群の差異について、それぞれ多重比較検定を行った（表 3）。さらに、硫酸アンモニウムによるぜん息様症状の増悪を検証するため、4 群に対する 5 群及び 6 群の差異について多重比較検定を行った。

パラメトリック検定は Dunnett を、ノンパラメトリック検定は Steel の多重比較検定を用いた。また、1 群から 3 群あるいは 4 群から 6 群の傾向検定には Jonckheere の検定を用いた（表 3）。ただし、各動物の血中 IgE 濃度の感作前と解剖時の差異の検定には、paired-t 検定を行った。

表 3. 統計解析の手法

	体重、摂餌量、BALF中細胞数、 血中IgE（解剖時）	病理スコア、気管支上皮粘液量、リンパ節のリンパ球サブセット、遺伝子発現、気道抵抗、BALF中のIL-5	図表における表記
硫酸アンモニウム単独の影響			
1群 vs 2群・3群	Dunnett	Steel	#
1群-3群（傾向検定）	Jonckheere	Jonckheere	\$
OVA感作の影響			
1群 vs 4群・5群・6群	Dunnett	Steel	*
硫酸アンモニウムによるぜん息様症状の増悪			
4群 vs 5群・6群	Dunnett	Steel	¶
4群-6群（傾向検定）	Jonckheere	Jonckheere	\$

3 結果

(1) 硫酸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アンモニウム濃度の平均値は、それぞれ低濃度が 13.0 mg/m^3 、高濃度が 121 mg/m^3 であった。第1節と同じ条件で濃度調整をしたが、今回は、目標値よりも2割ほど高い濃度であった(表4)。

表4. 硫酸アンモニウムのばく露濃度

	水溶液濃度 (%)	目標値 (mg/m^3)	チャンバー内濃度の平均値±標準偏差(mg/m^3)
低濃度群	0.11	10	13.0 ± 1.9
高濃度群	1.1	100	121 ± 11

(2) 体重及び摂餌量

全群において、2週間を通して顕著な体重の変化は見られなかった(図2)。なお、ばく露実験は各群を2つのサブグループに分けて2日ずつずらして実施したが、体重の結果は、ばく露日数に合わせて一つの結果として群ごとに表示した。グラフにはばく露日のみ表示した。休息日にもばく露日に比べて顕著な増減は見られておらず、群間で有意差も認められなかった。

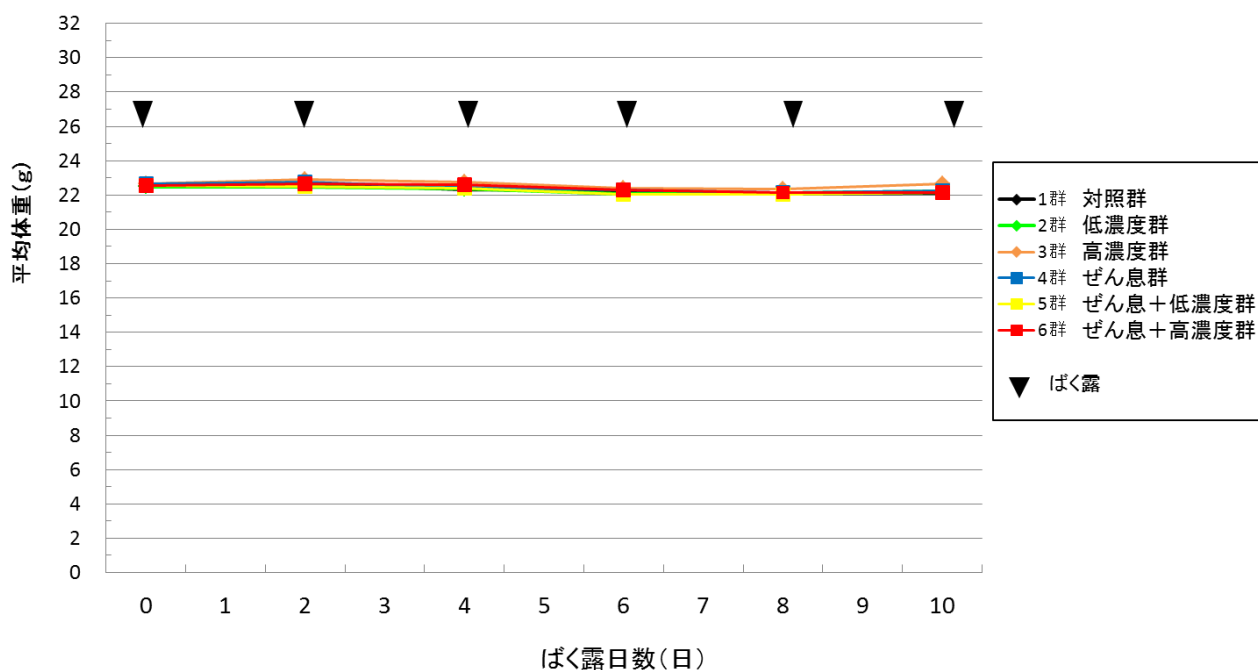


図2. 実験中の体重推移

一方、摂餌量は、対照群を含めた全群で1匹あたり3g程度であったが、ばく露の翌日には減少していた(図3)。

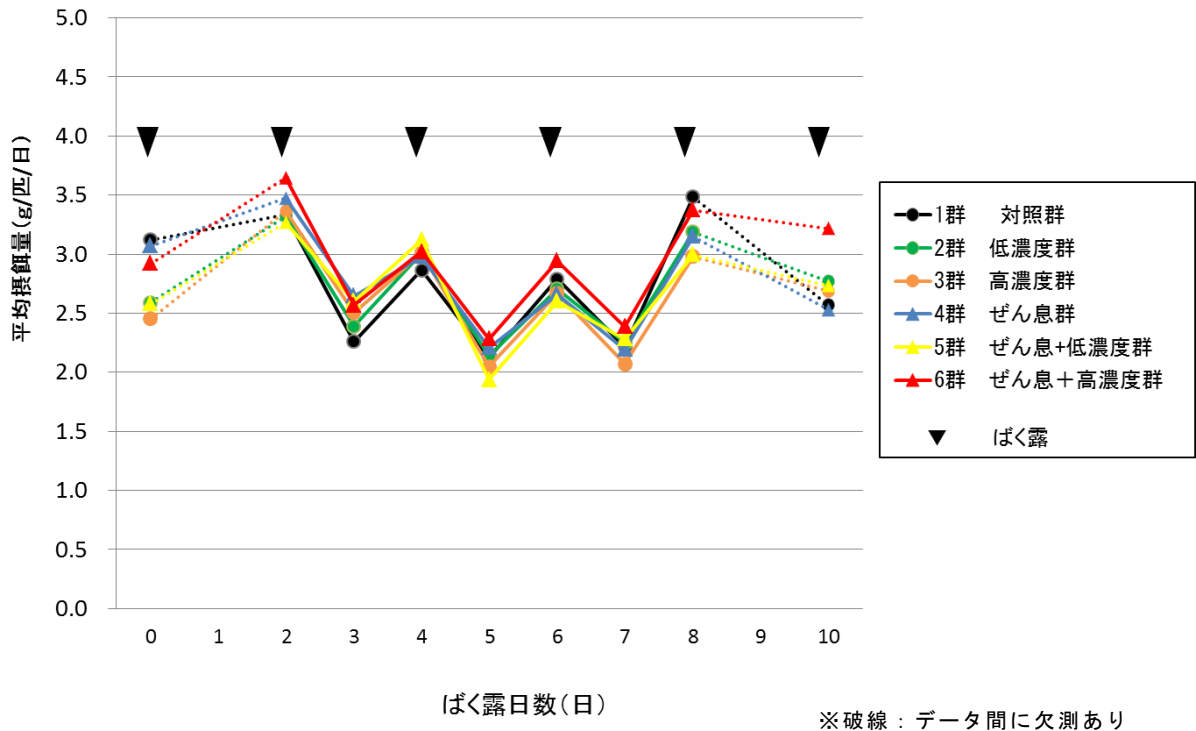


図 3. 実験中の摂餌量推移

(3) 病理組織学的解析

鼻腔では、OVA 吸入を行った 4 群から 6 群において、各部位の上皮に軽度な好酸球、リンパ球及び形質細胞等の炎症細胞の浸潤が見られ、スコア値は 1 群に比べて有意に高くなった (表 5、図 4)。細胞浸潤は、先端部の扁平上皮よりも部位 I から部位 III の呼吸上皮に多く見られた。特に、部位 II では、4 群から 6 群の 3 群の中で、濃度依存的な形質細胞の増加も見られた (表 5)。

また、気管・気管支においても、4 群から 6 群では、軽度な好酸球、リンパ球及び形質細胞の浸潤を認めた (表 5)。特に、リンパ球の浸潤に関しては、濃度依存的に増える傾向が見られたが、いずれも微弱な変化であった (スコア平均値は 1 前後)。

表 5. 上気道の病理検索結果

組織・部位	所見	1群	2群	3群	4群	5群	6群	
		対照群 (n=10)	低濃度群 (n=10)	高濃度群 (n=10)	ぜん息群 (n=10)	ぜん息+ 低濃度群 (n=10)	ぜん息+ 高濃度群 (n=10)	
鼻腔	先端部 扁平上皮	好酸球浸潤	0	0	0	0	0	0.20 ^S
		好中球浸潤	0	0.10	0	0	0	0.20 ^S
		リンパ球浸潤	0	0.10	0	0.22	0.20	0.40 ^{¶,S,*}
		形質細胞浸潤	0	0	0	0	0	0
	部位I 呼吸上皮	好酸球浸潤	0	0	0.05	1.05 ^{**}	0.85 ^{**}	0.75 ^{**}
		好中球浸潤	0	0	0	0	0	0
		リンパ球浸潤	0	0	0.05	0.95 ^{**}	0.75 ^{**}	0.65 ^{¶,**}
		形質細胞浸潤	0	0	0	0.50 ^{**}	0.30 ^{**}	0.45 ^{**}
	部位II 呼吸上皮	好酸球浸潤	0	0.05	0	0.70 ^{**}	0.60 ^{**}	0.55 ^{**}
		好中球浸潤	0	0	0	0	0	0.05
		リンパ球浸潤	0.15	0.15	0.30	0.90 ^{**}	0.85 ^{**}	0.95 ^{**}
		形質細胞浸潤	0	0.05	0	0.50 ^{**}	0.60 ^{**}	0.90 ^{¶,S,**}
部位III 呼吸上皮	好酸球浸潤	0	0.05	0	0.65 ^{**}	0.65 ^{**}	0.75 ^{**}	
	好中球浸潤	0	0	0	0	0	0.10 ^S	
	リンパ球浸潤	0.10	0.15	0.20	0.65 ^{**}	0.70 ^{**}	0.90 ^{¶,S,**}	
	形質細胞浸潤	0	0.10	0.05	0.55 ^{**}	0.50 ^{**}	0.70 ^{**}	
気管・気管支	好酸球浸潤	0.05	0.05	0.00	0.89	0.50	0.80	
	好中球浸潤	0	0	0	0.06	0.05	0.00	
	リンパ球浸潤	0.10	0.15	0	1.06 ^{**}	0.75 [*]	0.90 ^{**}	
	形質細胞浸潤	0	0	0	0.33 [*]	0.25	0.70 ^S	

スコア平均値=スコア合計値/10匹

* : p<0.05、** : p<0.01、Steel、OVA 感作の影響 (1 群との比較)

¶ : p<0.05、Steel、硫酸アンモニウムによる増悪の影響 (4 群との比較)

\$: p<0.05、Jonckheere、硫酸アンモニウムによる増悪の影響 (4 から 6 群にかけての傾向)

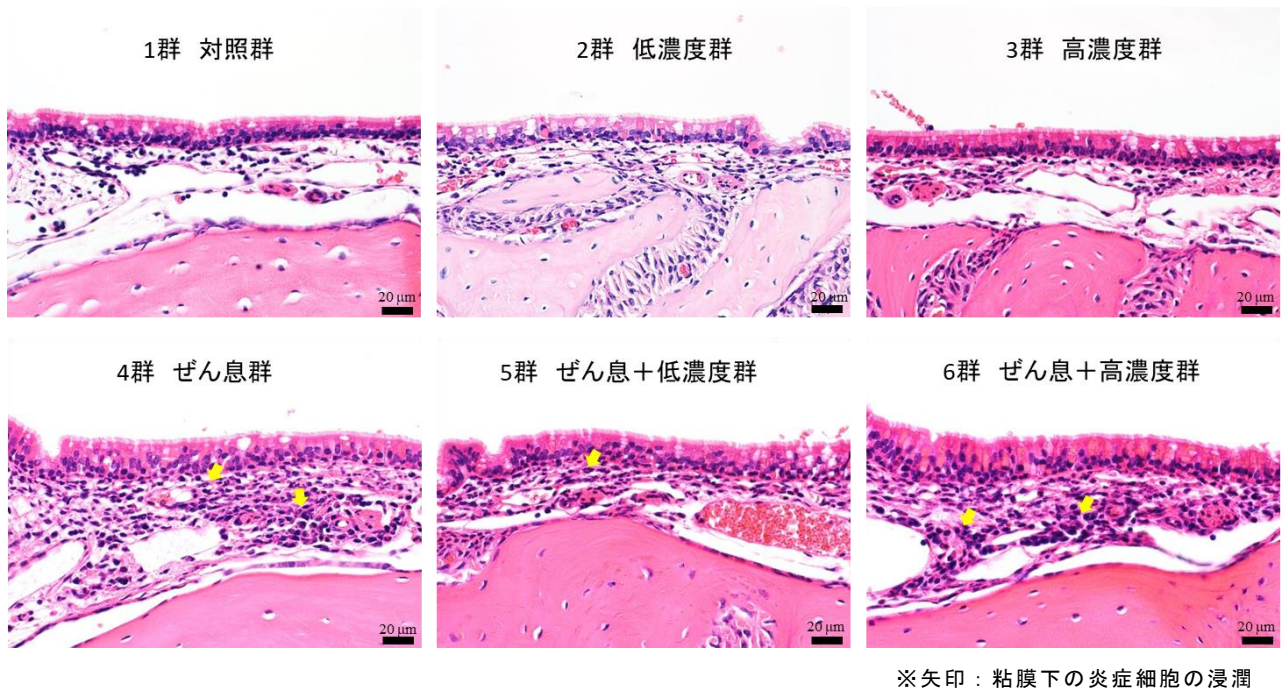


図 4. 鼻腔・部位 II の組織像 (H&E 染色)

肺実質では、4群から6群において、典型的なぜん息様の炎症像が広く観察された。肺内気管支及び細気管支において、気管支上皮や血管の周囲間質に好酸球及び形質細胞の浸潤が認められ、上皮細胞の肥厚が見られた。また、微弱な変化ではあるが、気管支周囲の平滑筋の肥厚も見られた(表6、図5)。肺胞内では、マクロファージの集簇及び多核巨細胞も見られた。ほぼ全ての項目が、1群に対して有意な変化であった(表6)。4群に対する5群及び6群の変化に注目すると、細気管支の気管支上皮の肥厚について、6群の有意なスコアの上昇と濃度依存的な増加傾向が見られたが、その他には硫酸アンモニウムによる増悪を明確に示す所見はなかった。

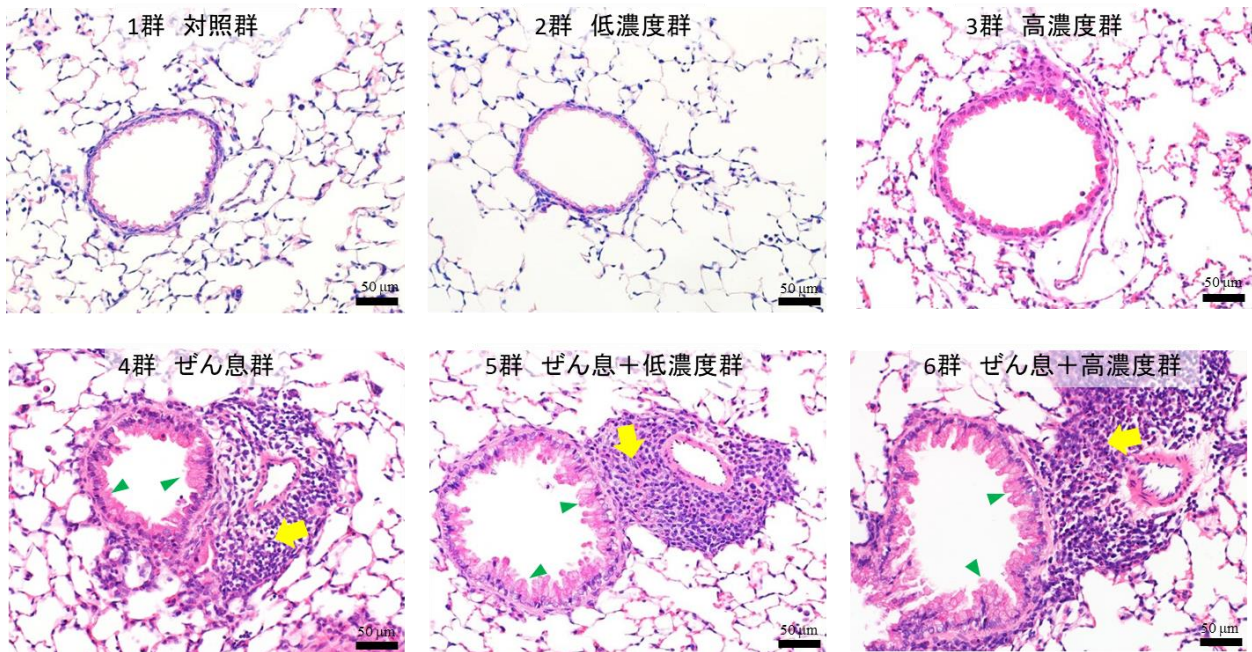
一方で、肺実質において1群から3群にも、細胞浸潤や上皮の肥厚等の所見がごくわずかに認められ、複数の所見について、病理所見のスコア値が、1群に比べて3群で有意に上昇しており、濃度依存的に上昇する傾向もあった(表6)。いずれの所見も、スコア平均値は、ほとんどが1以下の微弱な変化ではあった。

表 6. 肺実質の病理検索結果

組織・部位	所見	1群	2群	3群	4群	5群	6群
		対照群 (n=10)	低濃度群 (n=10)	高濃度群 (n=10)	ぜん息群 (n=10)	ぜん息+ 低濃度群 (n=10)	ぜん息+ 高濃度群 (n=10)
肺内気管支	気管周囲 炎症細胞浸潤	0.10	0.17	0.22 ^{#,§}	1.51 ^{**}	1.24 ^{**}	1.66 ^{**}
	血管周囲 炎症細胞浸潤	0.04	0.07	0.06	1.37 ^{**}	1.28 ^{**}	1.50 ^{**}
	気管支上皮肥厚	0.11	0.13	0.40 ^{#,§}	1.82 ^{**}	1.65 ^{**}	2.01 ^{**}
	気管支平滑筋肥厚	0.63	0.44	1.05 ^{#,§}	1.17 ^{**}	1.04 [*]	1.07 [*]
細気管支	気管周囲 炎症細胞浸潤	0	0	0.01	0.59 ^{**}	0.39 ^{**}	0.83 ^{**}
	血管周囲 炎症細胞浸潤	0.01	0.03	0.05	1.69 ^{**}	1.53 ^{**}	1.91 ^{**}
	気管支上皮肥厚	0.01	0.04	0.19 ^{#,§}	0.75 ^{**}	0.68 ^{**}	1.10 ^{¶,§,**}
	気管支平滑筋肥厚	0.01	0.00	0.08 ^{#,§}	0.12 ^{**}	0.09 [*]	0.13 ^{**}
肺泡管～肺泡	多核巨細胞集簇	0	0	0	0.36 ^{**}	0.34 ^{**}	0.49 ^{**}
	マクロファージ集簇	0	0	0	0.25 ^{**}	0.26 [*]	0.30 ^{**}

スコア平均値＝スコア合計値/10匹

: p<0.05、Steel、硫酸アンモニウム単独の影響（1群との比較）
 § : p<0.05、Jonckheere、硫酸アンモニウム単独の影響（1から3群にかけての傾向）
 * : p<0.05、** : p<0.01、Steel、OVA感作の影響（1群との比較）
 ¶ : p<0.05、Steel、硫酸アンモニウムによる増悪の影響（4群との比較）
 § : p<0.05、Jonckheere、硫酸アンモニウムによる増悪の影響（4から6群にかけての傾向）

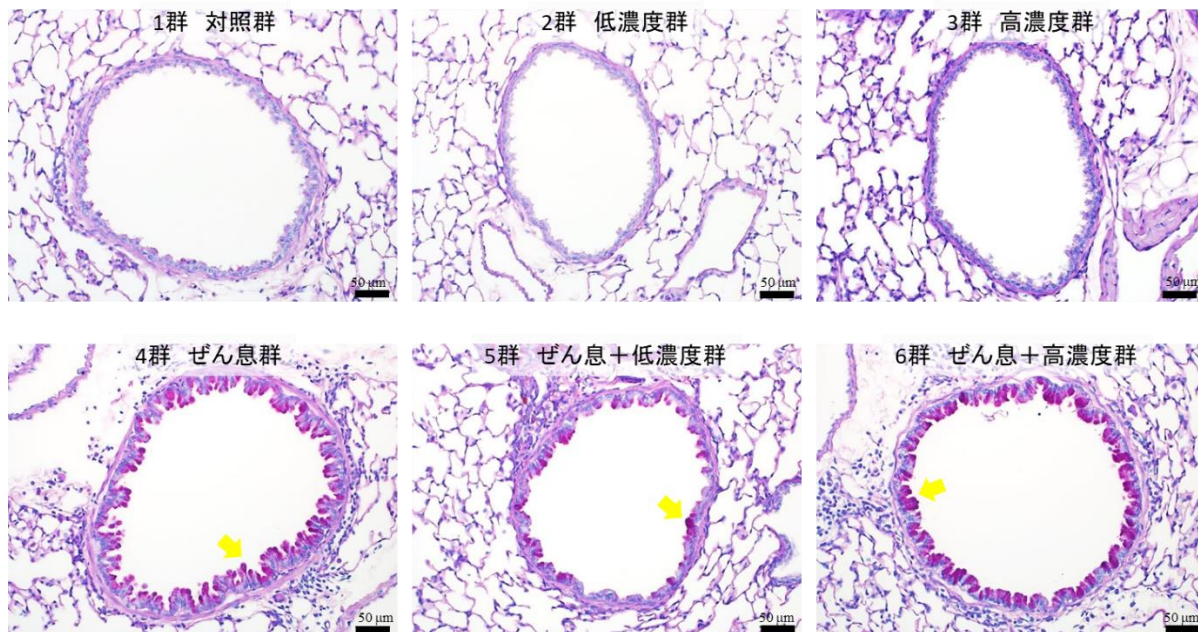


※矢印：細気管支及び血管周囲の炎症細胞の浸潤
 ※矢頭：気管支上皮の肥厚

図 5. 細気管支の組織像（H&E 染色）

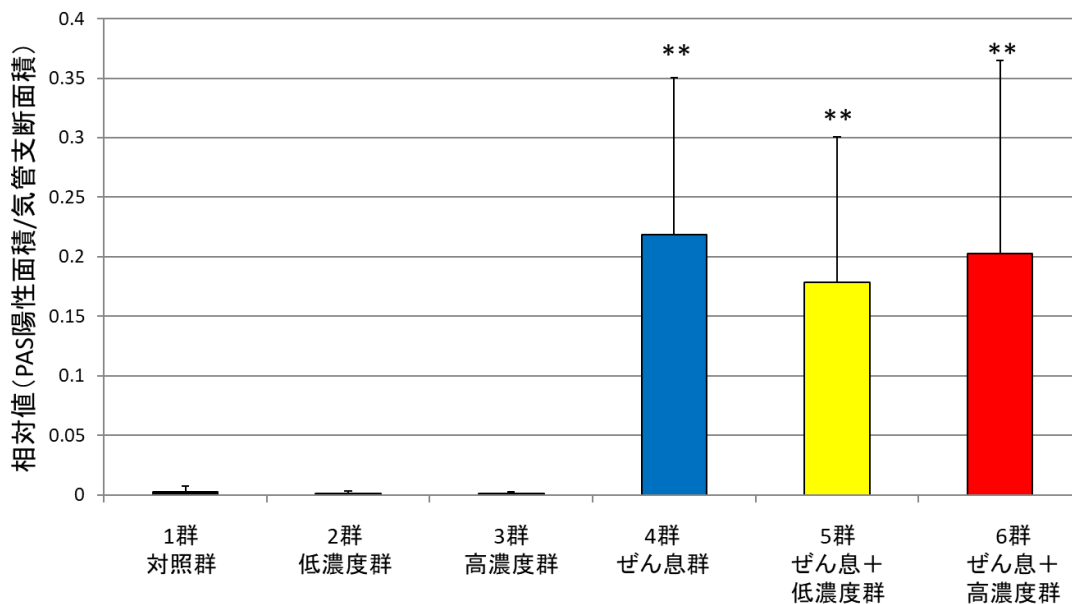
より定量的なぜん息症状の評価の一つとして、気管支上皮の杯細胞から分泌される粘液量を PAS 染色で計測した（図 6）。OVA 吸入を行った 4 群から 6 群で

は、1群に比較すると顕著な変化が認められたが、4群に対して5群及び6群に有意な変化は認められず（図7）、スコア平均値は、5群でやや低値であった（表6）。



※矢印：PAS 反応陽性領域

図6. 細気管支の組織像（PAS 染色）



** : $p < 0.01$, Steel, OVA 感作の影響 (1群との比較)

図7. 気管支内腔の粘液量（PAS 反応陽性面積）

他の主要臓器については、第1節と同様に、自然発生病変によると思われる所見が肝臓や腎臓でわずかに見られた。このうち、肝臓における炎症細胞の浸潤は4群から6群にかけて増加傾向が見られ、腎盂における炎症もやや強かった（表7）。また、免疫系の臓器である脾臓と胸腺で変化は認められなかった（表

7)。

表 7. 主要臓器の病理検索結果

組織・部位	所見	1群	2群	3群	4群	5群	6群
		対照群 (n=10)	低濃度群 (n=10)	高濃度群 (n=10)	ぜん息群 (n=10)	ぜん息+ 低濃度群 (n=10)	ぜん息+ 高濃度群 (n=10)
肝臓	好酸球浸潤	0	0	0	0.20	0	0.30 [*]
	好中球浸潤	0.10	0	0	0	0	0.20 [§]
	リンパ球浸潤	0.10	0.25	0.20	0.20	0.05	0.40 [§]
腎臓 腎盂	好酸球浸潤	0	0	0	0.50	0.10	0.30
	好中球浸潤	0	0	0	0.35	0.10	0.30
	リンパ球浸潤	0.30	0.05	0	1.40	0.60	0.30
胸腺 リンパ濾胞	肥大	0	0	0	0	0	0
	萎縮	0	0	0	0	0	0
脾臓 白脾髄	肥大	0	0	0	0	0	0
	萎縮	0	0	0	0	0	0

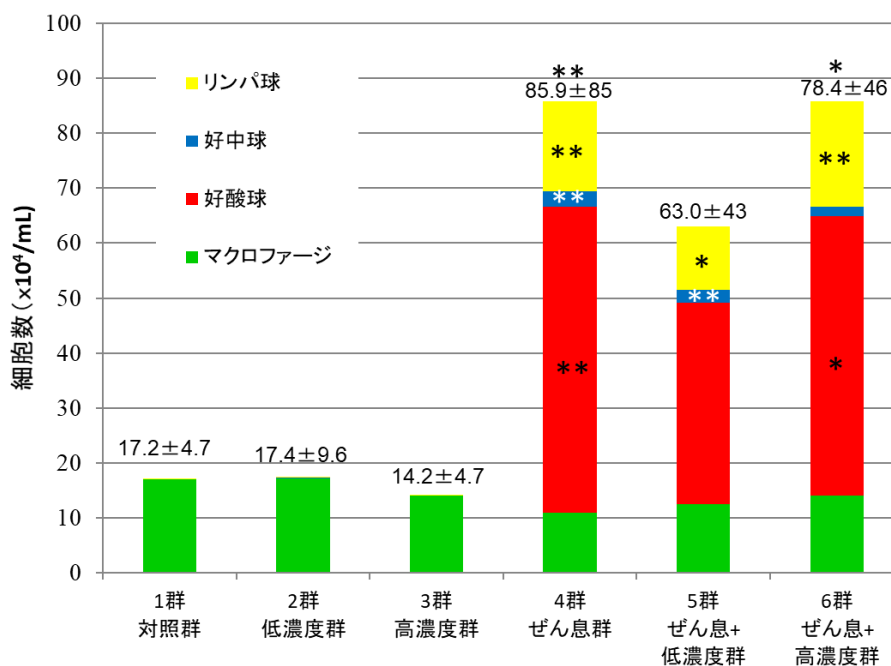
スコア平均値=スコア合計値/10匹

* : p<0.05、Steel、OVA 感作の影響 (1 群との比較)

§ : p<0.05、Jonckheere、硫酸アンモニウムによる増悪の影響 (4 から 6 群にかけての傾向)

(4) BALF 中の細胞数

BALF 中の細胞数は 1 群から 3 群の間に差は認められず、細胞種は大半がマクロファージであった (図 8)。一方、1 群に比べて 4 から 6 群においては、総細胞数、好酸球、リンパ球及び好中球が顕著に増加していた。



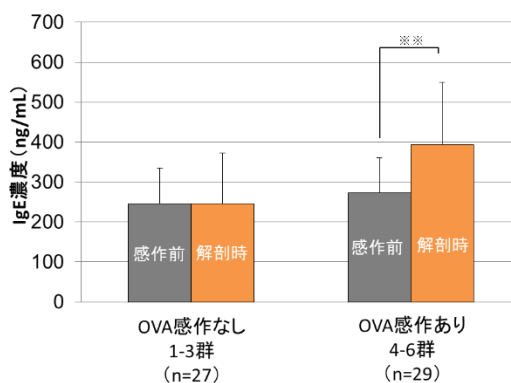
グラフ上部の数値は総細胞数の平均値±標準偏差

* : p<0.05、** : p<0.01、Steel、OVA 感作の影響 (1 群との比較)

図 8. BALF 中の細胞数

(5) 免疫学的解析

血中の IgE は通常検出下限値を下回るが、2 回の OVA の腹腔内投与後には (ばく露開始の 7 日前)、ほぼ全動物で検出され、その平均値は 259±89 ng/mL であった。その後、OVA 感作を行った 4 群から 6 群の動物においては、解剖時の IgE 値は、感作前に比べて有意に増加していた (図 9)。一方で、解剖時の IgE 値を群ごとに比較すると、1 群に対し、6 群のみ有意な上昇を認め、4 群に対して、5 群及び 6 群の間に有意な上昇は見られなかった (図 10)。



*** : p<0.01、paired t 検定、OVA 感作前後の差異

図 9. 血中の IgE 濃度 (感作前と解剖時の比較)

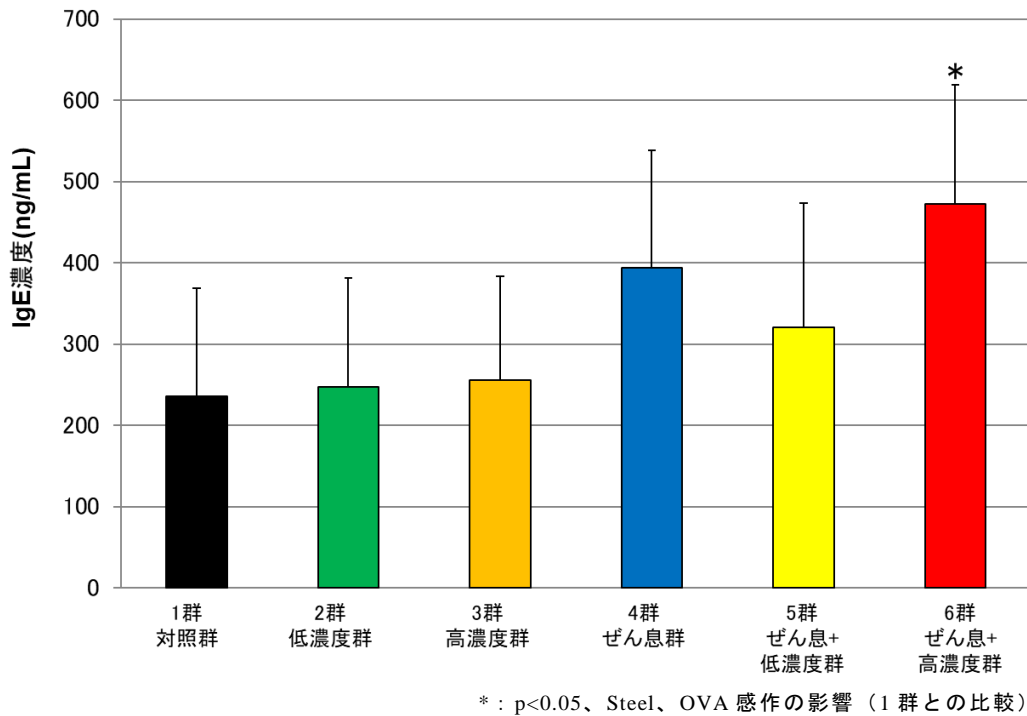


図 10. 血中の IgE 濃度

肺に関連するリンパ節において、1群に対して4群から6群では、白血球(CD45⁺)の数が有意に増加しており、B細胞(CD45⁺CD19⁺)及びT細胞(CD45⁺CD3⁺)についても数が増えていた(図11)。さらに、キラーT細胞(CD45⁺CD3⁺CD8⁺)、ぜん息症状の誘導に深く関連するヘルパーT細胞(CD45⁺CD3⁺CD4⁺)の集団も増加していた(図11)。しかし、4群に対して5群及び6群の有意な増減は見られず、増悪を示唆するものではなかった。いずれの項目についても1群から3群の順に平均値は高くなったが、1群に対する2群及び3群の差異は見られず、傾向検定でも有意な変化でなかった。

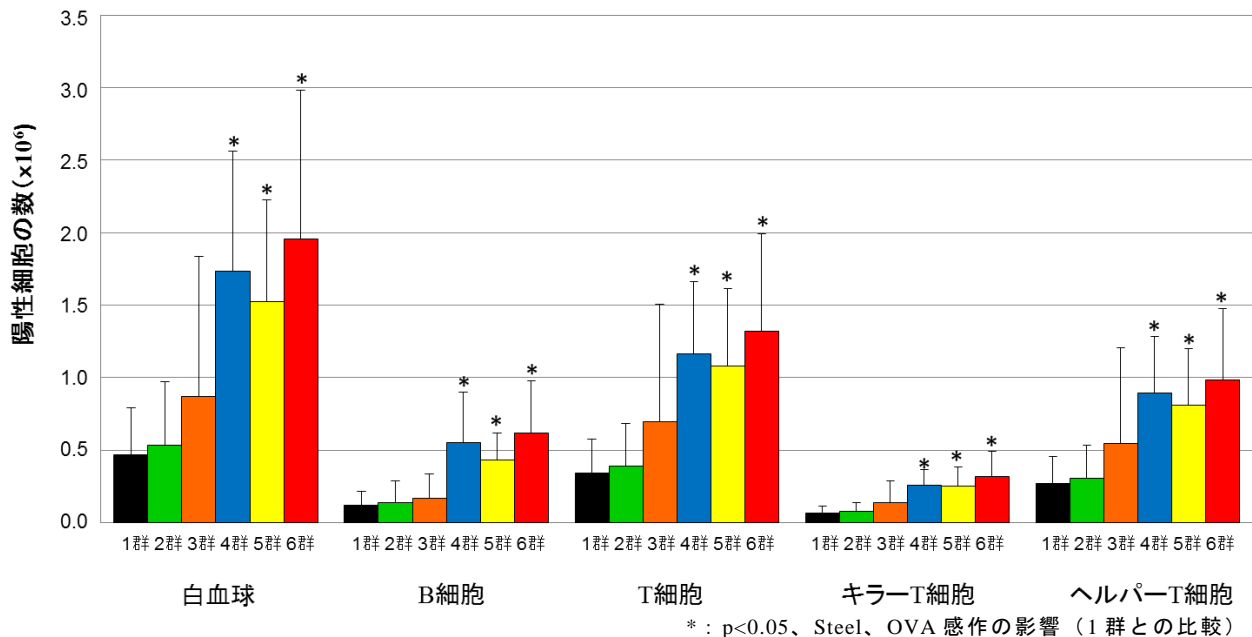


図 11. リンパ球サブセットの構成

(6) 生化学的解析

BALF の上清について、Th2 サイトカインの一つである IL-5 のタンパク質濃度を調べたところ、OVA 吸入をしていない 1 群から 3 群では 1 例を除き不検出であったのに対し、4 群から 6 群では検出された。ただし、5 群では 1 例のみの観察であった。1 群に対し、4 群から 6 群のうち、6 群でのみ統計学的に有意な上昇であったが、4 群に対し 5 群及び 6 群では有意差は見られなかった(図 12)。

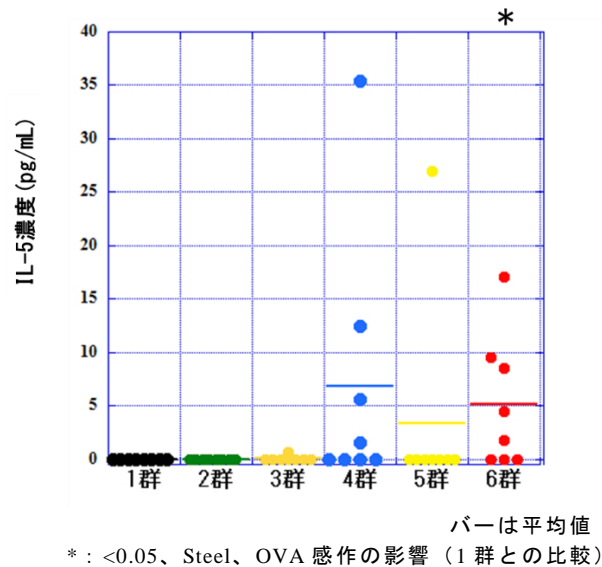
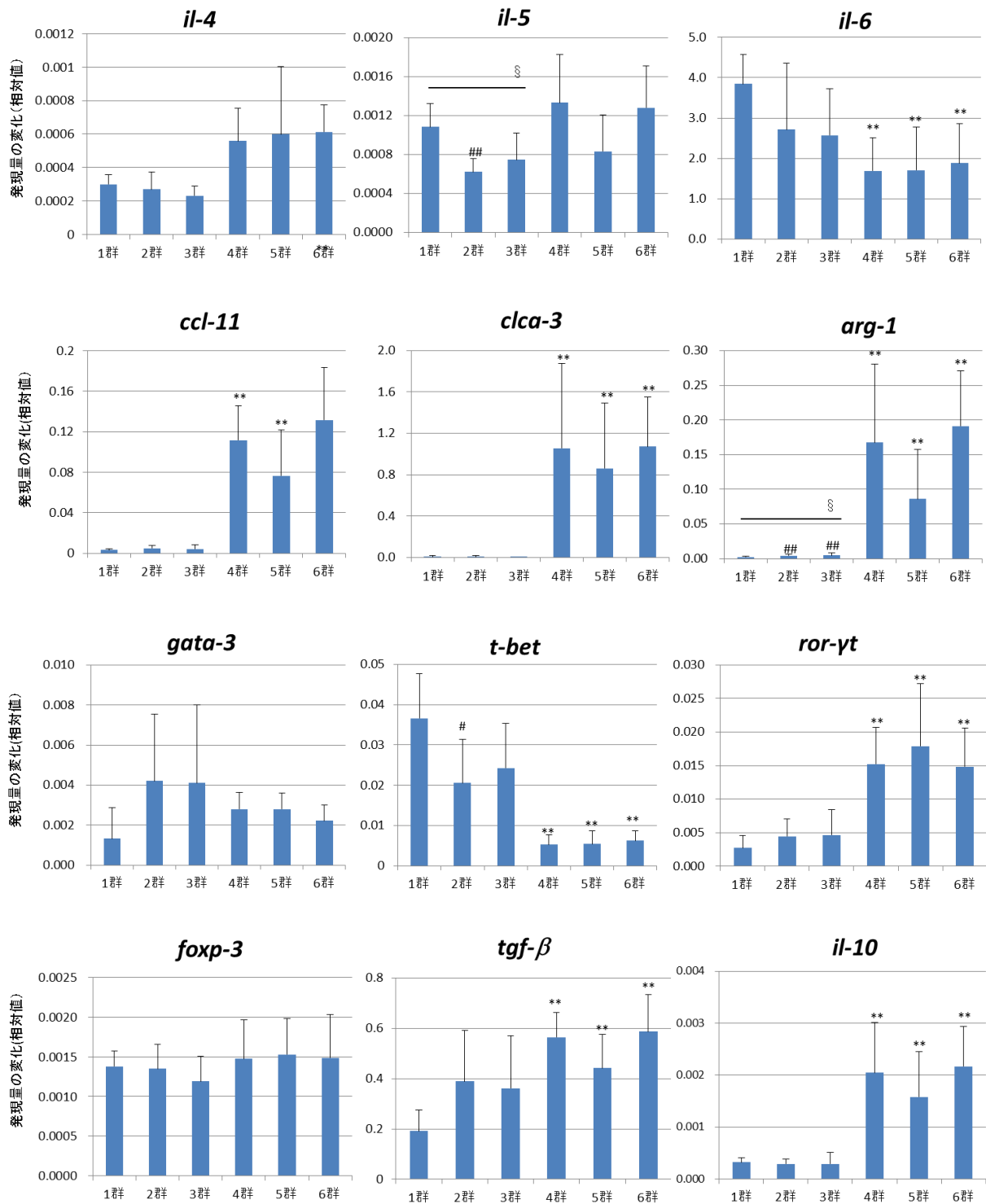


図 12. BALF 中の IL-5 の濃度

(7) 分子生物学的解析

各種遺伝子の発現より、1 群から 3 群とは異なり、4 群から 6 群では、明らかに OVA によるぜん息様症状が誘導されたことが示唆された(図 13)。まず、Th2 サイトカイン類の *il-4* 及び *il-5* は有意な増加はなかったが、4 群から 6 群でやや高値を示し、逆に炎症性サイトカインの *il-6* は有意に減少していた。好酸球の分子マーカーとして *ccl-11* を、また、杯細胞の分子マーカーとして *clca3* (*gob-5*) を測定したが、いずれも顕著な増加を示した。その他、L-アルギニン代謝に関わる酵素(アルギナーゼ 1)の *arg-1* 遺伝子の発現も顕著に増加していた。リンパ球の転写因子に注目すると、Th2 リンパ球の活性を反映する *gata-3* は有意な増加は見られないものの、Th1 リンパ球の指標である *t-bet* は有意に減少していた。また、Th17 リンパ球の指標である *ror- γ* が有意に増加した。免疫系の制御に関わる Treg 細胞の指標である *foxp-3* は増加しなかったが、免疫抑制的な状態を示す液性因子として *tgf- β* 及び *il-10* の有意な増加が見られた。



: p<0.05, ## : p<0.01, Steel, 硫酸アンモニウム単独の影響 (1群との比較)
 § : p<0.05, Jonckheere, 硫酸アンモニウム単独の影響 (1から3群にかけての傾向)
 * : p<0.05, ** : p<0.01, Steel, OVA 感作の影響 (1群との比較)

図 13. 肺組織における遺伝子発現

一方、いずれのぜん息関連遺伝子も、4群に対して5群及び6群での有意な発現の増減は認められず、硫酸アンモニウムによるぜん息の増悪を疑わせる結果は得られなかった。ただし、多くの遺伝子について5群の発現が、4群と6群に

比べて低い値であった。

また、*il-5* は 1 から 3 群への減少傾向が、*arg-1* は 1 群に対して 2 群及び 3 群に有意な増加が見られ、濃度依存的な増加傾向も認められた。

(8) 気道抵抗の測定

全群において、メサコリン刺激により濃度依存的な気道抵抗の上昇が見られたものの、OVA 感作を実施した 4 群から 6 群において、1 群と比較して統計学的に有意な上昇は認められなかった (図 14)。4 群から 6 群の平均値は 1 群から 3 群よりも高値であり、特に 5 群の値が大きい。いずれもばらつきが大きかった。

また、1 群から 3 群の間、あるいは 4 群から 6 群の間にも統計学的な有意差は認められなかった。

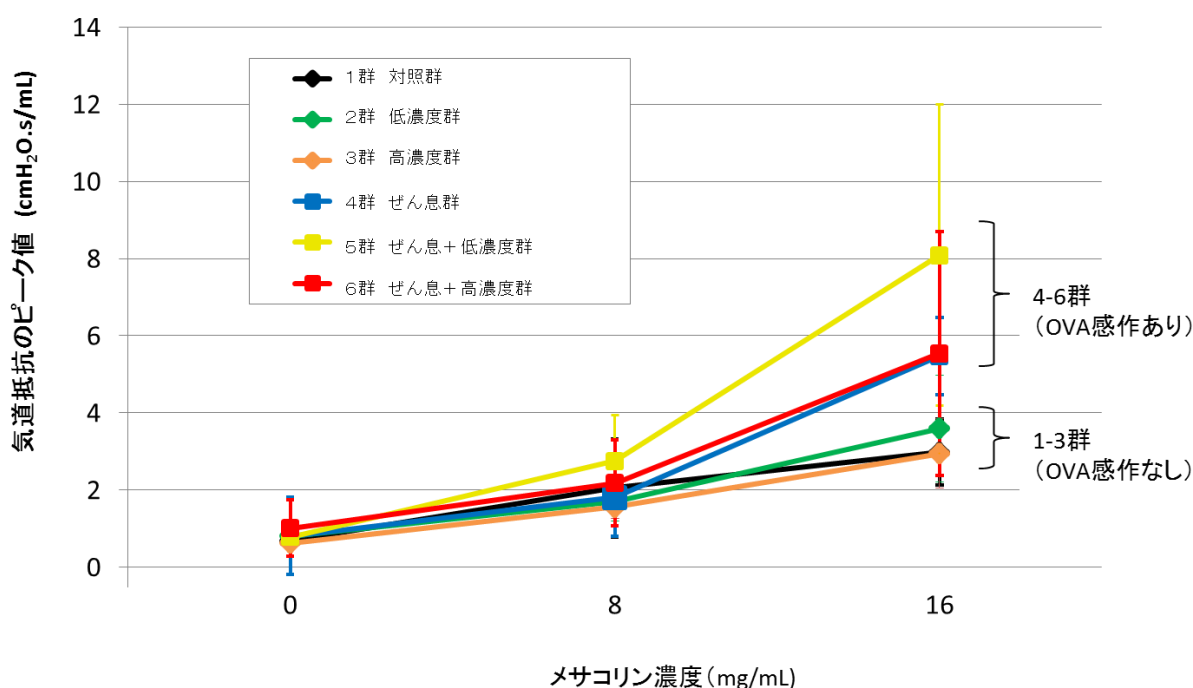


図 14. メサコリン刺激による気道過敏性試験

4 考 察

はじめに、OVA 感作を行っていない 1 群から 3 群の 3 者で比較すると、2 群及び 3 群において硫酸アンモニウムによる顕著な影響は認められず、おおむね第 1 節と同様の結果であったが、いくつか興味深い結果が得られた。病理組織学的に、微弱な変化ではあったが、気管支周囲の炎症細胞の浸潤や気管支上皮の肥厚及び平滑筋の肥厚等のスコアが 1 群と比べると上昇していた。また、リンパ節におけるリンパ球の数は有意差はないものの 1 群よりも 2 群及び 3 群の平均値が高かった。さらに、肺組織の *arg-1* 遺伝子の発現は、4 群から 6 群よりもかなり低レベルではあるが、1 群に比べて 2 群及び 3 群で有意に上昇し、濃度依存的な変化であっ

た。アルギナーゼ 1 は、L-アルギニンの代謝酵素であり、ぜん息患者やぜん息モデル動物の肺の上皮や粘膜下組織で特に強く発現し、NO の代謝を介して平滑筋の緊張に関与すると考えられている³⁾。そのため、この遺伝子のわずかな発現上昇は、病理組織学的に 2 群及び 3 群で認められた微弱な変化と関連している可能性がある。第 1 節で認められなかったこれらの変化は、全動物で OVA の腹腔内投与を行っていることが原因と思われる。

次に、OVA の吸入感作を行った 4 群から 6 群に関して、1 群と比較すると、どの群においても、T リンパ球の集団の変化や、Th2 サイトカイン類の増加傾向、好酸球の気道粘膜下への浸潤、上皮の粘液分泌の亢進等、ほとんどの評価項目において統計学的に有意な変化が認められ、ぜん息様症状が誘導されたことがわかる。ただし、今回、ぜん息モデルを軽度な症状を起こす条件で作製しており、そのことが、1 群に対して、4 群から 6 群の、気道抵抗が有意な上昇を示さなかったことや、Th2 サイトカインや転写因子の遺伝子発現上昇が顕著でなかったことの原因の一つと考えられる。事前の予備検討では、OVA の感作により、今回の 4 群の結果よりも強い症状が出る条件も確認している。例えば、各病理所見のスコア値が 3 で、肉眼的に肺門部の膨隆や肺実質での出血が見られ、Th2 サイトカインや *ccl-11* の遺伝子発現は対照群の 10 から 20 倍程度まで上昇していた。

今回は、硫酸アンモニウム⁴⁾の生理作用が弱いことを前提に、ばく露による症状の悪化を検出しやすいように、基準となるぜん息様症状は軽度なものとした。このような条件において、硫酸アンモニウムをばく露した 5 群及び 6 群を、4 群と比較しても、顕著な影響は見られなかった。病理組織学的解析においては、気管支上皮の肥厚が 5 群及び 6 群で増強されたため、若干の増悪が示唆された。リンパ球サブセット解析や遺伝子発現の一部、また、気道抵抗などの評価項目に関して、4 群より 5 群あるいは 6 群の平均値が高いものがあつたが、ぜん息様症状の増悪を示す変化は認められなかった。1 群から 3 群で注目した *arg-1* 遺伝子の発現も、5 群及び 6 群で有意な上昇を示さなかった。

OVA を動物に投与して免疫するモデル作製は広く用いられる手法であるが、OVA-IgE マウスや TNP-IgE マウス等の遺伝子組み換え動物に比べると、ばらつきが出やすいと考えられている^{4) 5)}。これは腹腔内投与された OVA への免疫応答に個体差があることが原因と考えられる。本研究においても、IgE の産生に個体差が認められ、ぜん息の評価項目としては、特に、気道抵抗や遺伝子発現、BALF 中の細胞数等の群内でのばらつきが大きかった。このことが、ぜん息の増悪を示す指標の検出を阻んだ可能性があるが、各群で最大 10 匹の動物について実験を行っているため、モデルのばらつきは変化を検出できなかったこと的主要原因ではないと考える。

吉田らの OVA 誘導型のぜん息モデルモットに 10 mg/m³ の硫酸アンモニウムを 5 回ばく露した実験では、死亡例が半数に上るほど強い症状が出た²⁾。また、同じグループの北畠らによる、2 及び 0.4 mg/m³ の長期反復ばく露実験においても、呼

吸困難度による評価により、明らかなぜん息の増悪を観察した⁶⁾。従来からモルモットはラットやマウスと比較して、呼吸器への被験物質の影響が出やすい動物と言われている。本研究では、吉田らが設定した10倍の濃度のばく露で増悪が見られなかったが、これは種差によるものと考えられる。

第1節でも議論したとおり、硫酸アンモニウムの毒性の作用点は不明であり、同様にぜん息増悪の機序もわかっていない。既報の硫酸及び各種の硫酸塩を用いたヒトや動物の吸入ばく露及び*in vitro*試験の結果からは、酸性度が高いことが気道に作用する⁷⁾、繊毛運動によるクリアランス機能を低下させる^{8,9)}、炎症の惹起やROSの発生を起こす¹⁰⁾、肥満細胞の脱顆粒の誘導^{11, 12)}等の機序が考えられている。しかし、硫酸アンモニウムについては、これらを明確に示す*in vivo*の結果は得られていない。本研究においても、これらの機序を示唆するような変化は正常動物(第1節)とOVAで感作した動物(第2節)の両方で認められなかった。

以上、今回のぜん息モデルマウスを用いた実験の結果から、硫酸アンモニウムの吸入ばく露によるぜん息症状の増悪への影響は極めて弱いと結論される。

5 文 献

- 1) 北畠正義, 今井正之, 富田泰子, 他: 大気汚染学会誌, **16**, 239-243, 1981.
- 2) 吉田克己, 今井正之, 北畠正義, 他: 三重大学環境科学研究紀要, **4**, 1-11, 1979.
- 3) North, M. L., Khanna, N., Marsden, P. A., et al.: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **296**, L911-920, 2009.
- 4) Sato, E., Hirahara, K., Wada, Y., et al.: *J Allergy Clin Immunol*, **111**, 143-148, 2003.
- 5) Matsuoka, K., Taya, C., Kubo, S., et al.: *Int Immunol*, **11**, 987-994, 1999.
- 6) 北畠正義, 今井正之, 小林 勇, 他: 大気汚染学会誌, **14**, 8-15, 1979.
- 7) Utell, M. J.: *Environ Health Perspect*, **63**, 39-44, 1985.
- 8) Schlesinger, R. B.: *Environ Health Perspect*, **79**, 121-126, 1989.
- 9) Vollmuth, T. A., Schlesinger, R. B.: *Fundam Appl Toxicol*, **4**, 455-464, 1984.
- 10) Yun, Y., Gao, R., Yue, H., et al.: *Environ Sci Technol*, **51**, 11401-11411, 2017.
- 11) 片岡裕美, 中村智美, 田鶴谷(村山) 恵子, 他: 大気環境学会誌, **52**, 12-18, 2017.
- 12) Charles, J. M., Menzel, D. B.: *Arch Environ Health*, **30**, 314-316, 1975.