硫酸水素アンモニウムの28日間反復吸入ばく露によるマウス呼吸器への影響評価

雑賀　絢[a]，北條　幹[a]，生嶋　清美[a]，前野　愛[a]，野村　紗希子[a]，簱岡　恭子[a]，中村　麻里[a]，
平松　恭子[a]，湯澤　勝廣[a]，長澤　明道[a]，坂本　義光[a]，山本　行男[a]，海鉾　藤文[b]，多田　幸恵[b]，
大貫　文[c]，五十嵐　剛[c]，牧　倫郎[d]，堀内　詩歩[d]，前田　恭兵[d]，鈴木　仁[a]，猪又　明子[e]，守安　貴子[f]

PM2.5などの大気中の微粒子に含まれる無機成分のうち，硫酸は動物及びヒトでのばく露実験で明らかな影響を及ぼすことが報告されているが，硫酸塩の生体影響に関するデータは乏しい．硫酸水素アンモニウムは，環境中の濃度は低いが，酸性度が高く，呼吸器上皮への刺激作用・障害作用が比較的高いことが推測されることから、マウスを用いて呼吸器に対する亜急性毒性を調べた．

8週齢の雌雄BALB/c系マウスに0.5，5及び50 mg/m^{3}の濃度設定で鼻部吸入ばく露装置により毎日3時間，28日間連続で硫酸水素アンモニウムのエアロゾルをばく露した．各濃度のばく露条件における硫酸水素アンモニウムのエアロゾルの最頻粒子径は，それぞれ0.32，0.50及び0.50 μmであった．最終ばく露の翌日に剖検し，臓器重量測定，病理組織学的解析，血液学的解析及び生化学的解析を実施したが，ばく露による顕著な影響は認められなかった．

今回，文献値に比べて，10倍程度の高濃度での反復ばく露であったが，マウスに対する器質的な影響は認められなかったことから，硫酸水素アンモニウムのエアロゾル吸入毒性は非常に低いことがわかった．これまで，マウスの反復ばく露による詳細な試験結果は報告されておらず，本結果は有用な情報提供となる．

キーワード：硫酸水素アンモニウム，PM2.5，28日間反復吸入ばく露，BALB/c系マウス

は　じ　め　に

PM2.5とは，粒径が2.5 μm以下である粒子の総称であり，大気環境基準では「微小粒子状物質」と表記されている．都内大気中PM2.5の主要な成分として，有機炭素や元素状炭素など炭素成分の他に，硫酸イオン，アンモニウムイオン，硝酸イオンなどの無機水溶性成分の存在が知られている．その中でも，硫酸あるいは硝酸系の成分の健康影響への寄与が疑われている．過去の疫学研究[1,2]から，大気中の微小粒子物質の中で，硫酸塩が心疾患や死亡率の増加に関連する可能性が示され，その毒性が注目されてきたが，反証を示す研究も多い[3,4].また，呼吸器毒性の有無については，硫酸ガスが動物実験及びヒトの実験から明らかな影響を及ぼすことが多数報告されている一方で[5-9]，硫酸塩のデータは限られている[10,11]．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いるが，一般的な毒性試験の報告はない．硫酸塩の中でも，硫酸水素アンモニウムは，環境中の濃度は低いものの，酸性度が高いことから，マウスの呼吸器上皮への刺激作用・障害作用が比較的高いことが推測される．硫酸水素アンモニウムの作用については，モデルマウスを用いたぜん息[12]あるいは感染症[13]の増悪影響，また気道粘液線毛（mucociliary）のクリアランス効率[14]や肺胞マクロファージ[15]の機能を検討した報告があるが，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，濃度設定を十分に設けた反復ばく露による詳しい影響調査は行われていない．そこで，本研究ではマウスを用いて硫酸水素アンモニウムの亜急性の吸入毒性を評価することを目的とした．なお，本研究は健康安全部環境保健衛生課の大気汚染保健対策基礎的実験的研究事業として実施された．

実　験　方　法

1. 硫酸水素アンモニウム水溶液濃度とばく露チャンバー内濃度の関係

エアロゾル発生発生装置（シンファクトリー製）を用いて，硫酸アンモニウム濃度を0.0009 g/Lから5.5 g/Lまで変えてエアロゾルを発生させ，流量0.2 L/minで，石英フィルターで粒子を捕集した後，蒸留水で抽出し，イオンクロマトグラフ（ICS-1000, Thermo Fisher Scientific製）で測定することにより，チャンバー内濃度を算出した．

[a] 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
[b] 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科
[c] 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
[d] 健康安全部環境保健衛生課
163-8001 東京都新宿区西新宿二丁目 8-1　東京都庁第一本庁舎 30 階北側
[e] 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
[f] 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

2. 硫酸水素アンモニウムの粒子径分布測定

粒子状物質を除去したチャンバー（容積：366 L）内に，2台のエアロゾル発生装置（シンファクトリー製）で発生させた硫酸水素アンモニウムのエアロゾルを放出し，12段のステージを備える空気採取装置（Electrical Low Pressure Impactor；以下ELPIと略す，デカチ製）でチャンバー内空気を粒子放出開始直後から30分間採取した．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 mg/m^3（0.07 g/L溶液），5 mg/m^3（0.54 g/L溶液）及び50 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，粒子径分布を求めた．

3. 28日間の反復ばく露実験（亜急性毒性試験）

1) 実験動物

6週齢のBALB/cAnNCrlCrljの雌雄のマウスをジャクソン・ラボラトリー・ジャパンから購入し，馴化飼育後，発育良好なマウスを，層別化ランダム法により，雌雄各群6匹ずつ，対照群，低濃度群，中濃度群及び高濃度群の4群に分け，1ケージ当たり3匹で飼育した．吸入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．

その他，飼育及び動物実験は当センター動物実験実施規定に基づいて，動物実験委員会の事前審査及び承認を受け，その管理の下で実施された．

2) 吸入ばく露

吸入ばく露は，コンプレッサー（IAC製）とフィルター・ドライヤー（IAC製）に，鼻部吸入ばく露システム4式（シンファクトリー製）を接続した設備で行った（Fig. 1）．各システムの構成は，コンプレッサー，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，インピンジャー，排気系フィルター，排気流量コントローラー，排気ポンプからなっている．エアロゾル発生装置に，対照群には超純水を入れ，ばく露群には、目標濃度が0.5，5及び50 mg/m^{3}になるように，低濃度群には0.07 g/L，中濃度群には0.54 g/L及び高濃度群には4.50 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製）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．チャンバー内の給気流量は各群ともマウス1匹当たり0.3 L/minとなるように設定した．

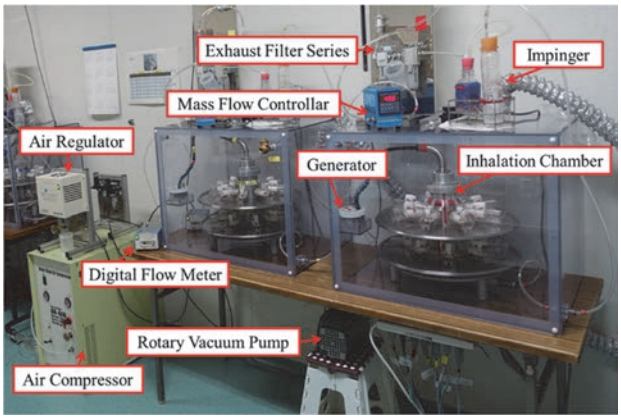

Fig. 1. Inhalation Exposure Chamber

3) チャンバー内の硫酸水素アンモニウム濃度

チャンバー内濃度の測定は毎日，ばく露開始前に実施した．最初の4日間は，ばく露終了後にも実施し，ばく露期間28日間に合計32回実施した．ばく露システムを10分間稼働した後に，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，20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，イオンクロマトグラフで分析することによりばく露濃度を算出した．

4) 体重

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．ばく露実施日はばく露直前に測定した．

5) 剖検

最終ばく露の翌日に，イソフルラン吸入麻酔下で，動物を腹大動脈から全採血により安楽死させた後，解剖した．全血は抗凝固剤EDTA-2Kを入れた試験管に採取した．全ての動物から，鼻腔，気管，肺，脳，脊髄，肝臓，胃，腸管，腎臓，心臓，脾臓，副腎，胸腺，大腿骨，精巣，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，副葉を分子生物学的解析用とし，右葉は気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid；以下BALFと略す）の採取に用いた．副葉を除く全葉を，病理組織学的解析に用いた．

6) 臓器重量

臓器摘出後に，肺，脳，肝臓，腎臓，心臓，脾臓，副腎，胸腺，精巣，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，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．

7) 病理組織学的解析

摘出した臓器を10 % 中性緩衝ホルマリン溶液中で固定した．ただし，肺は，30 cmH_2Oの圧力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解析を行った．観察部位は，各臓器の最大割面を中心に，肺は，各葉1枚以上について，鼻腔は，前方から、鼻腔先端部，切歯の後端部，切歯乳頭部及び第一臼歯前端部の4か所について行った．

Table 1. Real-Time PCR Primers

Gene name	Fwd primer（5'→3'）	Rvs primer（5'→3'）
h2a	CGTATCACCCCTCGTCACTT	TCAGCGATTTGTGGATGTGT
kc	TGTCAGTGCCTGCAGACCAT	CCTCGCGACCATTCTTGAGT
il-1β	CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGA	TGTGCTCTGCTTGTGAGGTGCTG
tgf-b	CACCGGAGAGCCCTGGATA	GCCGCACACAGCAGTTCTT
tnf-a	CACCACGCTCTTCTGTCT	GGCTACAGGCTTGTCACTC
ho-1	CACTCTGGAGATGACACCTGAG	GTGTTCCTCTGTCAGCATCACC
sod-2	TAACGCGCAGATCATGCAGCTG	AGGCTGAAGAGCGACCTGAGTT
muc5ac	CAGGACTCTCTGAAATCGTACCA	AAGGCTCGTACCACAGGGA

8) 血液検査

血液は，多項目自動血球計算装置（シスメックス製）により分析し，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，平均赤血球血色素量，平均赤血球血色素濃度及び血小板数を算出した．また塗抹標本を作製し，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・計数し，百分率を算定した．

9) 気管支肺胞洗浄液（BALF）の回収

気管を切開して針無しツベルクリン注射筒に18 G翼静針（テルモ製）を接続したものを挿管し，1.2 mLのリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate-buffered saline；以下PBSと略す）を3回に分けて注入し，およそ0.8 mLを回収した．回収したBALFを1500 rpmで10分間遠心分離（S500FR, KUBOTA製）した．上清を生化学的分析に用い，沈殿は2%ウシ血清アルブミンを含むPBSで再懸濁させ，細胞診断に供した．

10) BALF中の細胞診断

BALFの再懸濁液をチュルク液で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白血球数を計数した．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製）により2000 rpmで5分間遠心分離し，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・計数した．

11) 分子生物学的解析

凍結した肺の副葉を凍結粉砕機（安井器械製）で粉砕し，組織片からスピンカラム抽出法（RNeasy；キアゲン製）により，total RNAを抽出した．逆転写キット（SuperScriptⅢ；インビトロジェン製）を用いてtotal RNAから1st standard cDNAを得た．*h2a*，*kc*，*il-1β*，*tnf-α*，*taf-β*，*ho-1*，*sod-2*及び*muc5ac*に特異的なオリゴプライマーセットを作製し（Table 1），リアルタイムPCRキット（Power SYBR；サーモフィッシャーサイエンティフィック製）を用いて，定量的RT-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．

12) 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製）を用いて作成した標準曲線をもとに，LDH Cytotoxicity Detection kit（タカラバイオ製）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（サイティバ製）によって測定した．

13) 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）との差異の検定にはDunnett法による多重比較検定を用いた．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0.05 %に設定し，統計ソフト（StatLight，ユックムス製）を用いて解析した．

結　　果

1. 硫酸水素アンモニウム水溶液濃度とばく露チャンバー内濃度の関係

硫酸水素アンモニウム水溶液濃度とチャンバー内の空気中の濃度の良好な相関関係が確認された（Fig. 2）．これをもとに，28日間の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．

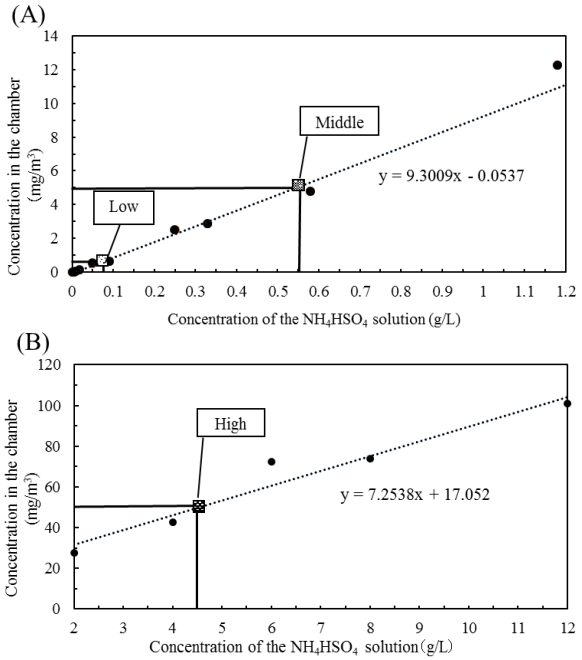

Fig. 2. Relationship between Concentration of Ammnonium Hydrogen Sulfate Solution and Concentration in the Inhalation Chamber　(A) Lower range, (B) Higher range

2. 硫酸水素アンモニウムの粒子径分布

0.5，5及び50 mg/m^{3}のエアロゾルにおける最頻粒子径は，それぞれ，0.32，0.50及び0.50 μmであり，肺の深部まで沈着する大きさであると考えられた（Fig. 3）．

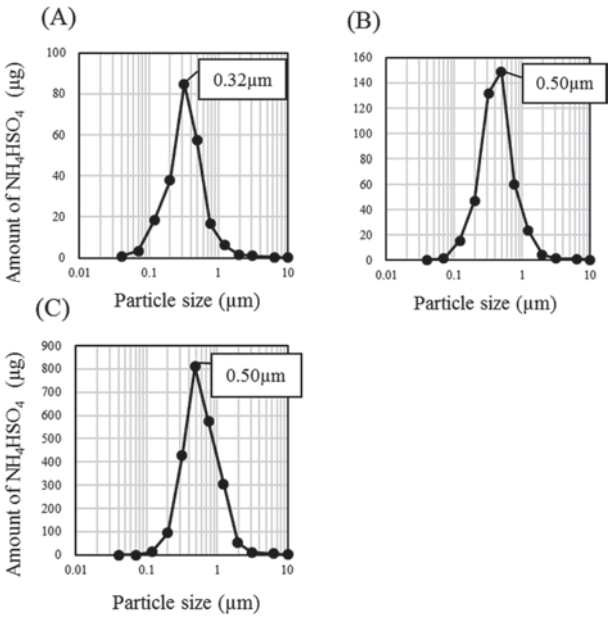

Fig. 3. Particle Size Distribution of the Ammonium Hydrogen Sulfate aerosol

(A) Low (0.5 mg/m^3), (B) Middle (5 g/m^3), (C) High (50 mg/m^3)

3. 硫酸水素アンモニウムのばく露濃度

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^3，4.7 mg/m^{3}及び42.6 mg/m^{3}であり，おおむね目標濃度を維持することができた（Table 2）．

Table 2. Exposure Concentration

	Concentration of the NH4HSO4 solution (g/L)	Target concentration (mg/m^3)	Concentration in the chambers during the experimental period mean ± SD (mg/m^3)
Low	0.07	0.5	0.4 ± 0.1
Middle	0.54	5	4.7 ± 1.3
High	4.5	50	42.6 ± 7.1

4. 体重の推移

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，ばく露28日間，硫酸水素アンモニウムばく露の影響を疑う体重変化は認められなかった．

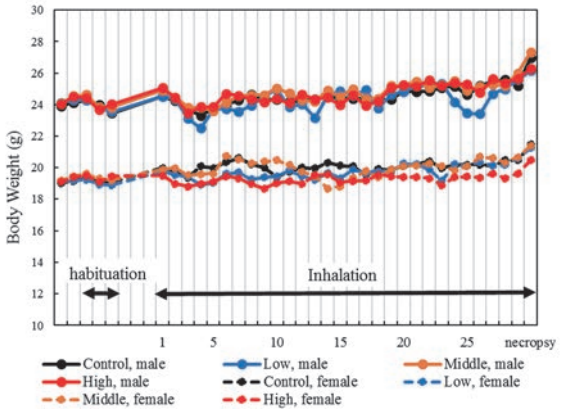

Fig. 4. Average Body Weight During Inhalation Exposure of Ammonium Hydrogen Sulfate

5 解剖時の体重と臓器重量

解剖時の体重に群間で有意差はなく，臓器の絶対重量に顕著な変化は見られなかった．雄の肺の絶対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（Table 3）．相対重量においても変化は見られなかった（Table 4）．

6. 血液学的解析

各ばく露群において，対照群と比較して，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（Table 5）．

Table 3. Body Weights and Absolute Organ Weights in BALB/c Mice Exposed Ammonium Hydrogen Sulfate (mg)

	Control	Low	Middle	High
Male				
Final Body Weight (g)	25.9 ± 1.5	25.4 ± 0.98	26.4 ± 1.2	25.6 ± 1.8
Lung	126.9 ± 11	129.2 ± 15	135.9 ± 9.6	140.0 ± 21
Brain	428.9 ± 21	430.5 ± 7.0	419.3 ± 9.6	431.9 ± 10
Liver	1336.5 ± 120	1337.0 ± 86	1408.5 ± 55	1330.6 ± 140
Kidneys	377.0 ± 22	382.9 ± 15	379.3 ± 10	387.5 ± 33
Heart	116.4 ± 6.6	118.1 ± 12	113.5 ± 6.4	113.4 ± 8.9
Spleen	87.4 ± 14	84.4 ± 11	78.2 ± 6.6	88.7 ± 4.3
Adrenal glands	4.6 ± 1.1	4.5 ± 0.82	4.1 ± 0.60	4.8 ± 0.64
Thymus	33.7 ± 6.5	29.8 ± 6.5	31.4 ± 5.0	29.1 ± 7.0
Testes	157.1 ± 8.7	164.0 ± 10	168.9 ± 9.3	160.8 ± 11
Female				
Final Body Weight (g)	20.4 ± 1.4	20.4 ± 1.1	20.8 ± 0.74	19.6 ± 1.1
Lung	116.4 ± 4.5	111.8 ± 9.1	117.6 ± 13	112.3 ± 13
Brain	424.1 ± 16	421.7 ± 25	417.5 ± 16	414.1 ± 14
Liver	1007.6 ± 54	1041.6 ± 98	1048.3 ± 73	986.4 ± 34
Kidneys	273.0 ± 14	264.6 ± 28	269.9 ± 16	269.2 ± 14
Heart	94.4 ± 11	88.1 ± 7.6	90.5 ± 4.9	91.5 ± 7.0
Spleen	85.1 ± 11	79.5 ± 8.8	77.0 ± 8.0	82.6 ± 8.4
Adrenal glands	6.1 ± 0.46	6.5 ± 1.5	7.3 ± 0.52	7.3 ± 1.5
Thymus	46.1 ± 7.1	41.4 ± 8.3	40.3 ± 6.9	37.5 ± 6.8
Ovaries	6.6 ± 0.86	6.7 ± 1.4	6.0 ± 1.0	6.8 ± 1.7
Uterus	36.3 ± 14	41.9 ± 29	34.6 ± 12	36.6 ± 20

mean ± SD

Table 4. Relative Organ Weight in BALB/c Mice Exposed Ammonium Hydrogen Sulfate (mg/100 g Body Weight)

	Control	Low	Middle	High
Male				
Lung	32.9 ± 3.5	32.7 ± 3.0	35.8 ± 2.5	35.7 ± 5.4
Brain	111.2 ± 9.5	109.4 ± 5.0	110.6 ± 5.5	110.4 ± 9.1
Liver	347.4 ± 46	340.2 ± 35	372.0 ± 29	341.9 ± 59
Kidneys	97.9 ± 9.8	97.4 ± 7.5	100.0 ± 5.0	99.5 ± 15
Heart	30.2 ± 3.4	30.0 ± 3.1	30.0 ± 2.8	29.1 ± 4.3
Spleen	22.6 ± 3.5	21.5 ± 3.2	20.6 ± 2.1	22.6 ± 1.6
Adrenal glands	1.2 ± 0.25	1.1 ± 0.25	1.1 ± 0.18	1.2 ± 0.16
Thymus	8.7 ± 1.8	7.6 ± 1.8	8.3 ± 1.4	7.5 ± 2.2
Testes	40.8 ± 4.3	41.7 ± 4.1	44.6 ± 3.9	41.1 ± 4.5
Female				
Lung	23.9 ± 2.2	22.9 ± 2.5	24.5 ± 3.4	22.2 ± 3.7
Brain	86.5 ± 8.6	86.3 ± 9.0	86.8 ± 5.9	81.4 ± 7.0
Liver	205.6 ± 23	213.7 ± 31	218.1 ± 23	193.9 ± 17
Kidneys	55.7 ± 6.6	54.3 ± 8.4	56.1 ± 5.1	53.0 ± 5.6
Heart	19.3 ± 3.5	18.1 ± 2.5	18.8 ± 1.6	18.0 ± 2.2
Spleen	17.5 ± 3.4	16.3 ± 2.0	16.0 ± 1.7	16.3 ± 2.4
Adrenal glands	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.3
Thymus	9.5 ± 2.0	8.5 ± 2.0	8.4 ± 1.6	7.4 ± 1.6
Ovaries	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3
Uterus	11.6 ± 10	8.7 ± 6.1	7.2 ± 2.5	7.3 ± 4.6

mean ±SD

Table 5. Hematology in BALB/c mice Exposed Ammonium Hydrogen Sulfate

		Control	Low	Middle	High
Male					
WBC	($x10^2$/μL)	37.2 ± 13	43.2 ± 12	44.7 ± 16	40.7 ± 12
RBC	($x10^4$/μL)	946.8 ± 60	973.2 ± 37	944.7 ± 27	962.8 ± 46
HGB	(g/dL)	13.8 ± 0.93	14.3 ± 0.35	13.9 ± 0.27	14.0 ± 0.59
HCT	(%)	46.8 ± 2.9	48.1 ± 2.1	47.0 ± 1.5	47.6 ± 2.7
MCV	(fL)	49.5 ± 1.4	49.5 ± 1.2	49.7 ± 1.4	49.4 ± 1.4
MCH	(pg)	14.6 ± 0.21	14.7 ± 0.18	14.7 ± 0.37	14.5 ± 0.35
MCHC	(g/dL)	29.5 ± 0.64	29.8 ± 0.81	29.5 ± 0.73	29.5 ± 0.93
PLT	($x10^4$/μL)	118.5 ± 9.2	116.5 ± 13	112.1 ± 7.1	113.9 ± 8.3
Female					
WBC	($x10^2$/μL)	37 ± 9.6	36.2 ± 8.5	40.0 ± 15.8	33.8 ± 8.4
RBC	($x10^4$/μL)	948.8 ± 63.6	930.8 ± 23.9	949.7 ± 33.1	934.0 ± 56.7
HGB	(g/dL)	14.1 ± 0.73	13.8 ± 0.43	14.0 ± 0.66	13.8 ± 0.82
HCT	(%)	47.3 ± 3.5	46.3 ± 1.8	47.2 ± 2.8	46.1 ± 3.0
MCV	(fL)	49.8 ± 1.1	49.8 ± 1.4	49.7 ± 1.6	49.4 ± 1.3
MCH	(pg)	14.9 ± 0.36	14.8 ± 0.19	14.8 ± 0.28	14.7 ± 0.19
MCHC	(g/dL)	29.8 ± 0.84	29.7 ± 0.77	29.8 ± 0.47	29.8 ± 0.84
PLT	($x10^4$/μL)	104.1 ± 9.7	113.2 ± 10.1	113.5 ± 14.7	105.0 ± 13.2

mean ±SD

7. BALF中の白血球の細胞診断

BALF中の白血球数や細胞種について，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（Fig. 5）．細胞種の構成はほとんどがマクロファージであった．

8. 生化学的解析

BALF上清の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、また、濃度依存的な上昇を認めた（Fig. 6）．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（Fig. 7）．

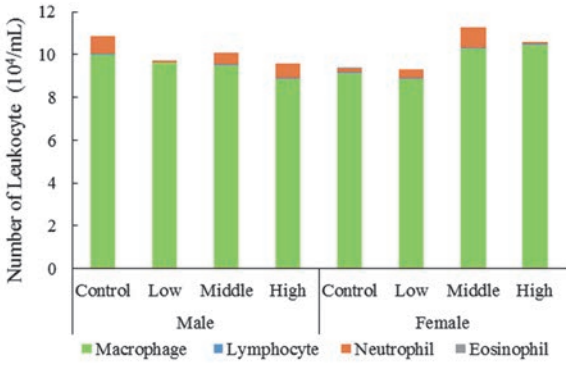

Fig. 5. Number of Leukocytes in the BALF

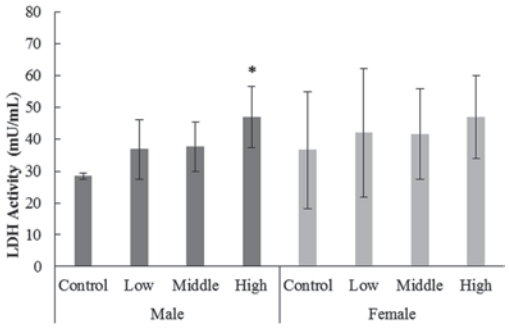

Fig. 6. LDH Activity in the BALF

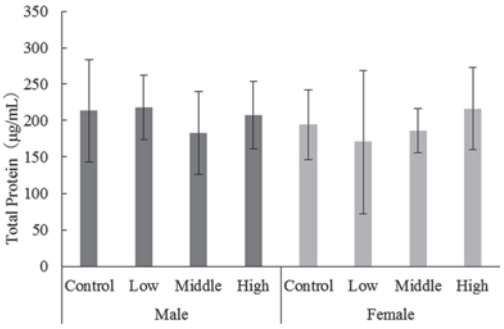

Fig. 7. Total Protein Concentration of the BALF

9. 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面積等について着目したが，ばく露の影響を疑う組織の障害や炎症反応は認められなかった（Fig. 8）．高濃度群の1例で，細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等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．

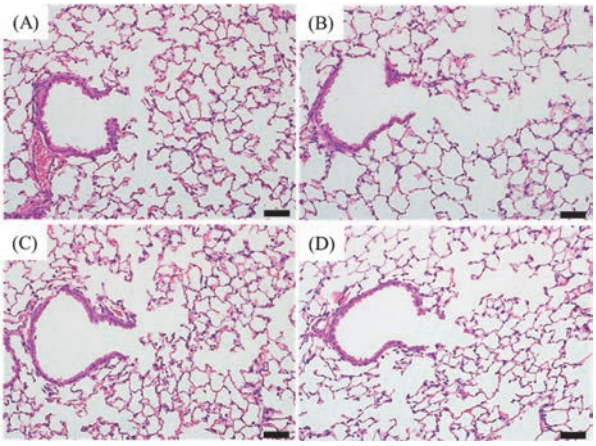

Fig. 8. Lung Tissue Histrogy from BALB/c mice
(A) Control, (B) Low, (C) Middle, (D) High of perivascular
Scale bar = 50μm

10. 分子生物学的解析

肺組織における各種遺伝子の発現を，対照群と高濃度群について，定量的PCRで調べた．その結果，炎症反応に関わる*kc*，*il-1β*，*tnf-α*，繊維化や組織修復に関わる*tgf-β*，酸化ストレス関連因子の*ho-1*や*sod-2*，粘膜分泌に関わる*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．*kc*及び*tnf-α*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（Fig. 9）．

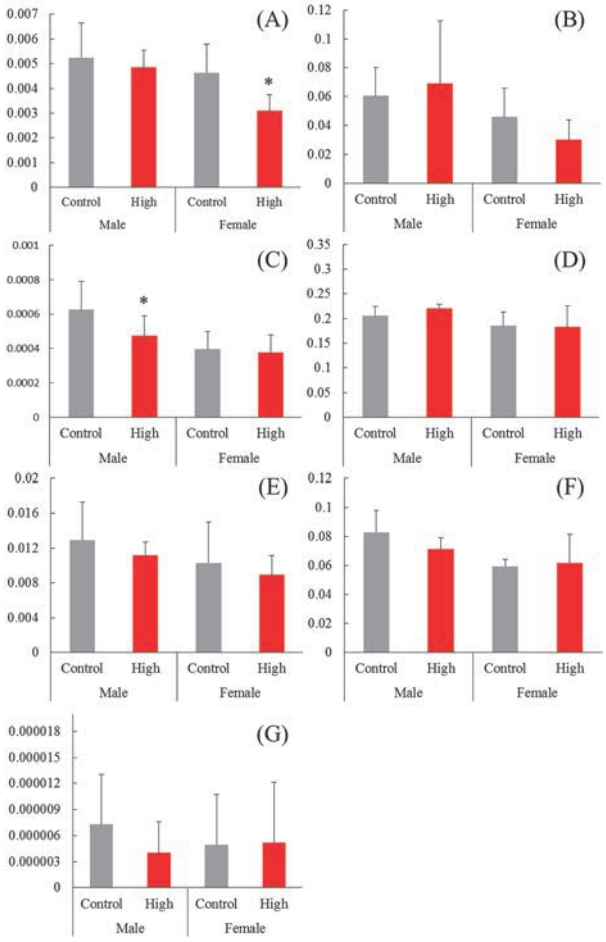

Fig. 9. Gene Expression of Lung Tissue
(A) *kc*, (B) *il-1β*, (C) *tnf-α*, (D) *tgf-β*, (E) *ho-1*, (F) *sod-2*, (G) *muc5ac*

考　　察

0.5，5及び50 mg/m^{3}の硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露による28日間の試験を実施し，様々な評価を実施したが，雌雄のマウスに顕著な影響は認められなかった．硫酸塩の毒性の有無及び作用機序は不明瞭であり，作用があるとすれば，硫酸イオンやアニオンは問題にならず，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[3,4]．今回，用いた硫酸水素アンモニウム水溶液は50 mg/m^{3}ではpHが1.8であり，酸性度が高かったにもかかわらず，エアロゾルの吸入による呼吸器への影響が見られなかった．エアロゾル粒子が呼吸器系の上皮に到達しても速やかに溶解し，希釈・中和され，恒常性が保たれたことが推測される．

病理組織学的解析では，酸性物質や刺激性物質で予想されるような，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所見は認められず，反復ばく露による器質的な影響はなかった．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あるいはモルモットへの反復ばく露では，肺胞拡張[16]や上皮の過形成[17]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H&E標本では変化は見いだせなかった．単に被験物質の違いとも考えられるが，我々が過去に報告したとおり，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ことから[18]，むしろ動物種の違いである可能性もある．

呼吸器上皮の細胞障害の指標として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ため，ごくわずかな影響があったとも考えられるが，雌では見られないこと，また総タンパク質濃度には変化が見られなかったことからも，影響はごく軽微なものと考える．また，肺組織における分子レベルでの変化も見られなかった．

一方で，粒子のクリアランス[14]や肺胞マクロファージの機能[15]にわずかに影響を与えることが動物実験で示唆されており，また，ぜん息患者への吸入実験では16分間のばく露で呼吸機能への影響があったことも報告されている[19]．これら呼吸器の機能に関連する指標については，本研究では検討できていないため，今後マウスを用いた検討が必要である．

ま　と　め

本研究では、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50 mg/m^{3}の濃度設定で毎日3時間の28日間の反復吸入ばく露を行ったが、影響はほとんど認められなかった。酸性度が高いにもかかわらず、硫酸水素アンモニウムのエアロゾル吸入毒性は非常に低いことがわかった。

これまで，マウスの反復ばく露による詳細な試験結果は報告されておらず，本研究の結果は，PM2.5の健康影響や，呼吸器疾患の増悪影響などを評価する上で，有用な情報となることが期待される．

文　　献

1) Dockery, D.W., Pope, C.A.3rd., Xu, X., *et al*.: *N. Engl. J. Med.*, **329**, 1753–1759, 1993.
2) Pope, C.A.3rd., Rodermund, D.L. and Gee, M.M.: *Environ. Health Perspect.*, **115**, 679–683, 2007.
3) Schlesinger, R. B.: *Inhal. Toxicol*., **15**, 197–235, 2003
4) 嵯峨井勝：日本衛生学会誌，**74**, 1–11, 2019.
5) Stacy, R. W., Seal, E. Jr., House, D. E., *et al*.: *Arch. Environ. Health*, **38**, 104–115, 1983.
6) Avol, E. L., Linn, W. S., Whynot, J. D., *et al*.: *Toxicol. Ind. Health*, **4**, 173–184, 1988.
7) Silbaugh, S. A., Mauderly, J. L. and Macken, C. A.: *J. Toxicol. Environ. Health*, **8**, 31–45, 1981.
8) Kobayashi, T. and Shinozaki, Y.: *J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 261–272, 1993.
9) Gearhart, J. M. and Schlesinger, R. B.: *Toxicol. Sci.*, **7**, 681–689, 1986.
10) Utell, M. J., Morrow, P. E. and Hyde, R. W.: *J. Aerosol. Sci*., **14**, 202–210, 1983.
11) Avol, E. L., Jones, M. P., Bailey, R. M., *et al*.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, **120**, 319–327, 1979.
12) Cassee, F.R., Dormans, J.A.M.A., van Loveren, H., *et al*.: Report No. 650010 010 National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), 1999.
13) Schlesinger, R.B.: *Environ. Health Perspect.*, **63**, 25–38, 1985.
14) Schlesinger, R.B.: *Environ. Res.*, **34**, 268–279, 1984.
15) Schlesinger, R.B., Chen, L.C., Finkelstein, I., *et al*.: *Environ. Res*., **52**, 210–224, 1990.
16) Busch, R.H., Buschbom, R.L., Cannon, W.C., *et al*.: *Environ. Res.*, **33**, 454–472, 1984.
17) Loscutoff, S. M., Cannon, W.C., Buschbom, R.H., *et al*.: *Environ. Res.*, **36**, 170–180, 1985.
18) 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）
19) Utell, M. J., Morrow, P.E., Speers, D.M., *et al*.: *Am. Rev. Respir. Dis*., **128**, 444–450, 1983.

Evaluation of pulmonary effects of ammonium hydrogen sulfate (ammonium bisulfate) in mice following 28-day inhalation exposure

Aya SAIGA[a], Motoki HOJO[a], Kiyomi IKUSHIMA[a], Ai MAENO[a], Sakiko NOMURA[a], Kyoko HATAOKA[a], Mari NAKAMURA[a], Kyoko HIRAMATSU[a], Katsuhiro YUZAWA[a], Akemichi NAGASAWA[a], Yoshimitsu SAKAMOTO[a], Yukio YAMAMOTO[a], Fujifumi KAIHOKO[b], Yukie TADA[b], Aya OHNUKI[a], Tsuyoshi IGARASHI[a], Michiro MAKI[c], Shiho HORIUCHI[c], Kyohei MAEDA[c], Jin SUZUKI[a], Akiko INOMATA[a], and Takako MORIYASU[b]

Of the inorganic components in fine particulate matter (PM2.5) in the atmosphere, sulfuric acid has been reported to affect animal and human exposure experiments, but very little data is available on the biological effects of sulfate. Ammonium hydrogensulfate has a low concentration in the environment but is highly acidic, and it is estimated to have a relatively high stimulating/damaging effect on the respiratory epithelium. Therefore, the subacute toxicity of ammonium bisulfate on mice was investigated in this study.

First, an aerosol was generated by changing the concentration of ammonium hydrogensulfate using an aerosol generator, and the concentration in the exposure chamber was calculated. Based on this, 8-week-old male and female BALB/c mice were exposed to ammonium hydrogensulfate for 3 h/day for 28 days at the concentration of 0.5, 5, and 50 mg/m^3 by using a nasal inhalation exposure device and mode particle sizes of the aerosols at each concentration of exposure were 0.32, 0.50, and 0.50 μm, respectively. Autopsy was performed the day after the final exposure and no significant adverse effects were observed despite of the exposure concentration being about 10 times higher than the reported value. The aerosol inhalation toxicity of ammonium bisulfate was found to be very low despite its high acidity. Detailed studies based on repeated exposure of mice have not been reported; therefore, these results provide useful information.

Keywords: ammonium bisulfate, PM2.5, 28-day repeated inhalation study, BALB/c mice

[a] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan
[b] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out
[c] Bureau of Social Welfare and Public Health, Tokyo Metropolitan Government,
2-8-1, Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, Japan