

マウスに対するラウレス硫酸ナトリウム吸入の生体影響について

東 恵美子* 中島 孝江*

シャンプーに使用されているラウレス硫酸ナトリウムを鼻部から吸入した場合に卵白アルブミン(OVA)によるアレルギー反応を増強するか否かを調べた。アレルゲンとして OVA を用いて作製したアレルギーモデルマウスにシャンプー時の曝露濃度レベルのラウレス硫酸ナトリウムを OVA と同時に吸入させた後、インターロイキン 4(IL-4)、OVA 特異的免疫グロブリン E(IgE 抗体)および OVA 特異的免疫グロブリン G1(IgG1 抗体)の測定、病理組織学的検査等を行った。

その結果、OVA と同時にラウレス硫酸ナトリウムを吸入させたマウスで、アレルギー症状を増悪させるような生体への影響は見られなかった。

キーワード：マウス、アレルギー、卵白アルブミン、吸入、陰イオン界面活性剤

Key words: mouse, allergy, ovalbumin, inhalation, anion surfactant

近年、アレルギー疾患が増加している。その要因として遺伝要因と環境要因が考えられるが、遺伝子の変異が短期間で生じたことによるものとは考えにくく、急激に大きく変化している環境要因が重要ではないかと考えられている。生活環境中に存在する化学物質の種類と使用量が増加している¹⁾ことから、化学物質の特異的抗体産生に関与する可能性を検討することは重要である。その中でも界面活性剤の生産量は年に約100万トンで推移しており、食器洗い、洗濯、掃除、洗顔、手洗い、洗髪等の生活関連用品においても広く使用されている。

洗髪に使われるシャンプーにも界面活性剤^{2,3)}が使われている。シャンプーを使用する場合、原液を泡立てて頭髮に付け、洗髪することから、シャンプー成分である界面活性剤が頭皮と鼻部の両方から吸収される可能性が考えられる。

一方、洗髪習慣は50年間で大きく変化している。以前は固形石鹼の使用が一般的であり、洗髪回数も週に2~3回程度であったが、近年はほとんどの人が合成界面活性剤を主成分とする液体シャンプーを使用してお

り、50歳代以下の人はほぼ毎日洗髪をしている。

アレルギー疾患に、生活環境中で頻繁に使用される合成界面活性剤がリスク要因としてどの程度関与しているのかを検討した。

アレルギーの指標としてIL-4、OVA特異的IgE抗体、OVA特異的IgG1抗体、マスト細胞等がある。IL-4はT細胞やマスト細胞から分泌されるサイトカインでIgE産生細胞へのクラススイッチのほか、Th2細胞の誘導、B細胞の活性化(大きさの増加、MHCクラスII抗原発現の増加など)、局所へのT細胞、好酸球浸潤に重要な役割を果たす血管内皮細胞上のVCAM-1の発現を誘導するなど、アレルギー性炎症の発症に重要なサイトカインである。IgEの産生にとってIL-4は最も重要な因子であり、IL-4はIgEのほか、マウスではIgG1へのクラススイッチ因子としても働いている。マスト細胞は、IgE抗体に対する高親和性受容体を有し、アレルゲンの侵入によるIgEレセプターの架橋を経て、ヒスタミン等のメディエータを遊離し、即時型アレルギー反応を引き起こすことが知られている。そこで、IL-4、OVA特異的IgE抗体、OVA特異的IgG1抗体を測定し、マスト細胞の観察を行った。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 生活環境課
Effects of Sodium Laureth Sulfate on Mice by Inhalation Exposure
by Emiko AZUMA and Takae NAKAJIMA

実験方法

1. 試薬と器具

界面活性剤：陰イオン界面活性剤の「ラウレス硫酸ナトリウム」について調べた。化学式は $C_{12}H_{25}O(CH_2CH_2O)_nSO_3Na$ である。ラウレス硫酸ナトリウムは、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウムともいい、洗浄効果や起泡性にすぐれていることから、市販シャンプーの70%以上に使用されている。界面活性剤で配合率は10～20%である。実験にはラウレス硫酸ナトリウムを25%含有するシャンプー基材を用いた。

アレルゲン：OVA は、SIGMA Grade (V) を用いた。

霧化装置：喘息などの治療に用いられるタイプの超音波ネブライザー (オムロン NE-U17, 粒径 1～5 μ m) を使用した。

2. 予備実験

浴室での曝露濃度：ヒトが浴室で洗髪する時の浴室の陰イオン界面活性剤濃度を測定するために、浴室環境中の空気をインピンジャー (蒸留水、10ml) でサンプリング (3.2L/分) し、メチレンブルー活性物質として比色定量した。

被験者は女性2名 (A、B) で、空気吸引ポンプの吸入口を洗髪に近い場所に設置し、洗髪中の空気をサンプリングした。洗髪時間はA、B共に2～3分程度であり、6回のサンプリングで陰イオン界面活性剤の濃度は0.135～0.344 μ g/Lの範囲であった。

3. 吸入実験

実験動物と飼育条件：BALB/c オスマウス (SPF、日本エスエルシー、静岡) を5週齢で19匹購入し、4群に分け、飼育ケージには1匹ずつ入れた。水は水道水を与え、餌は自由摂取させた。週に1回飼育ケージの交換を行い、体重の測定を行った。

吸入装置の構成：吸入装置の構成を示す (図1)。超音波ネブライザーで試料液を霧化し、ポンプで吸引して吸入チェンバーに導入した。卵白アルブミン (OVA) を安全に廃棄するため、吸入チェンバーとポンプの間にバブリング用の水を入れたタンクを設けた。

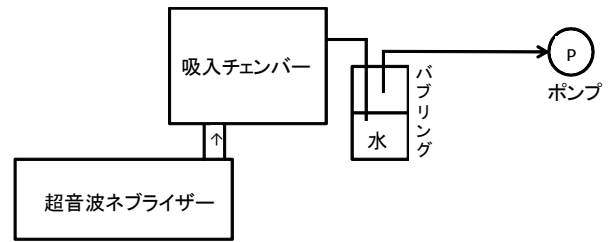


図1 吸入装置の構成

界面活性剤の濃度：超音波ネブライザーで泡立ちが見られずに霧化出来る10万倍希釈 ($\times 10^{-5}$) とした。

実験群：蒸留水を吸入させる「蒸留水群」、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤を吸入させる「界面活性剤群」、1%OVAを吸入させる「OVA群」、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤と1%OVAを同時に吸入させる「界面活性剤+OVA群」の4群で、1群5匹としたが、蒸留水群は4匹とした。

吸入チェンバー内の濃度： $\times 10^{-5}$ 界面活性剤を霧化させた時の吸入チェンバー内の濃度変化を調べた。蒸留水10mlを入れたインピンジャーを5分毎に交換して30分間ポンプで吸引 (3.2L/分) して通気した。結果を図2に示す。吸入チェンバー内の濃度は霧化直後から徐々に上昇し、26分後には最も高くなった。

この予備実験ではマウスは入れずに行った。

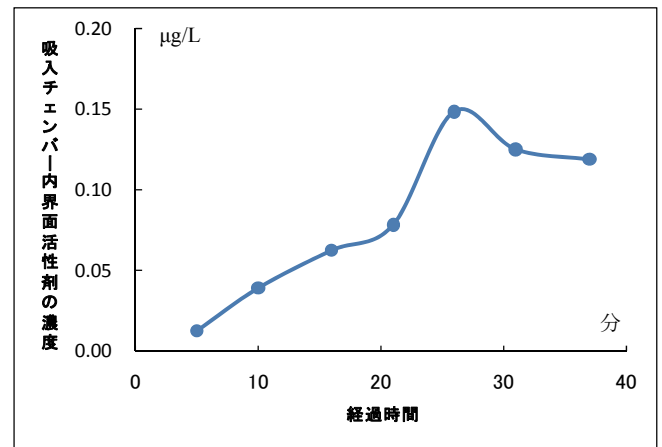


図2 吸入チェンバー内の界面活性剤濃度の時間変化

感作と吸入の方法：7週齢で全マウスに10 μ gのOVAを腹腔内に投与した。投与から2週後、3週後、4週後、5週後、6週後に計5回、蒸留水、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤、1%OVA、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤+1%OVAの50ml溶液を超音波ネブライザーで霧化して、それぞれの群のマウスに30分間吸入させた。

臓器重量、左肺上清中IL-4の測定：OVAを腹腔内投与してから8週後にソムノペンチル麻酔薬腹腔内投

与 (60mg/kg) により麻酔を行った。体重測定後、開腹、開胸し心臓採血をした。胸腺、脾臓、肝臓の重量測定を行った。

左肺(左葉) は肺門部をクリップで留めて切断し、重量を測定した後、1ml の冷 PBS を加えて肺ホモジネートを作製した。これを遠心 (2000×g、60 分、4℃) し、上清中の IL-4 を INSTRUCTIONS Mouse IL-4 ELISA Kit (Thermo SCIENTIFIC) で測定⁴⁾した。

OVA 特異的 IgE、OVA 特異的 IgG1 の測定：血清中の OVA 特異的 IgE 抗体価は、anti-mouse IgE (PHARMINGEN R35-72)、biotinylated OVA を用い、PCA タイター ×320 のマウスプール血清を標準として ELISA 法で測定⁵⁾した。OVA 特異的 IgG1 は、HRP 標識した anti-mouse IgG1 (ZYM610120) を用い、Anti Ovalbumin mouse monoclonal antibody (ANTIBODY SHOP HYB 099-01) を標準として ELISA 法で測定⁶⁾した。

臓器の病理組織学的観察：右肺 (上葉、中葉、下葉、心葉) に 10%中性緩衝ホルマリン液を 20cm 水柱圧で注入し、気管とともに 10%中性緩衝ホルマリン液に入れ固定した。胸腺、脾臓、肝臓も 10%中性緩衝ホルマリン液に入れ固定した。固定後、通常の病理組織標本作製法により、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE) 染色を行った。中葉はマスト細胞の観察のために、トルイジンブルー(TB) 染色も行った。染色後、光学顕微鏡による観察を行った。

実験のプロトコールを示す (図 3)。

動物: BALB/c オスマウス

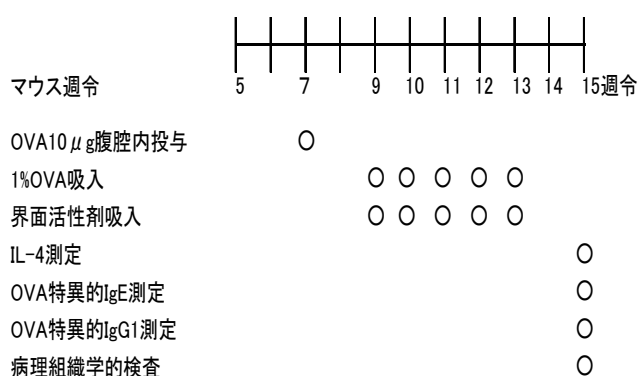


図3 実験のプロトコール

統計処理：統計解析用ソフト SPSS 12.0J (エス・ピー・エス・エス株式会社) を用いて行った。

結果

「蒸留水群」、「界面活性剤群」はそれぞれ「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」のコントロールである。この実験では、アレルギーモデルマウスである「OVA 群」と界面活性剤を追加した「界面活性剤+OVA 群」の結果を中心に比較した。検定はノンパラメトリックな方法である Mann-Whitney 検定で行った。

1. 体重と臓器重量対体重比

図 4 に OVA を投与してから 8 週間後におけるマウスの体重を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

図 5 に左肺重量対体重比を示す。「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の値が増加したことから「蒸留水群」、「界面活性剤群」との間には有意差が見られたが、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に差は見られなかった。

図 6 に胸腺重量対体重比を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

図 7 に脾臓重量対体重比を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

図 8 に 肝臓重量対体重比を示す。各コントロール群との間あるいは「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に有意な差は見られなかった。

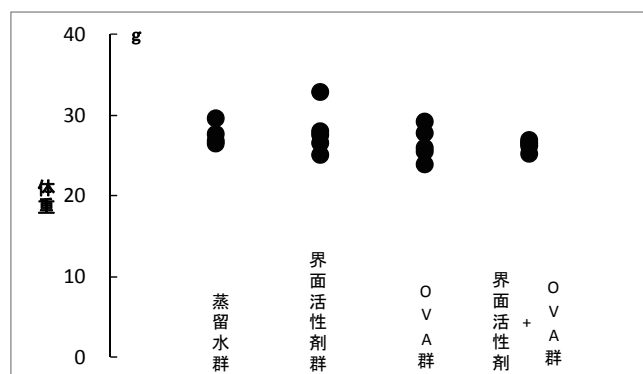
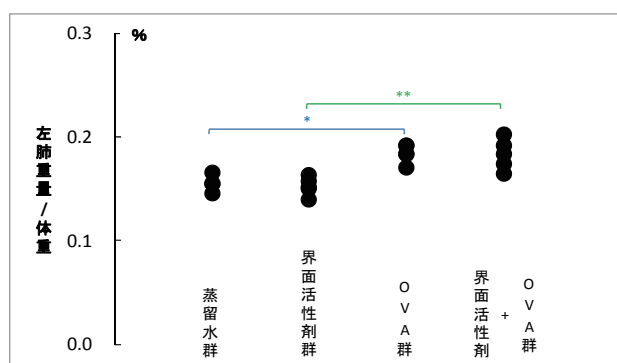


図4 体重の比較



**p<0.01, *p<0.05

図5 左肺重量対体重比の比較

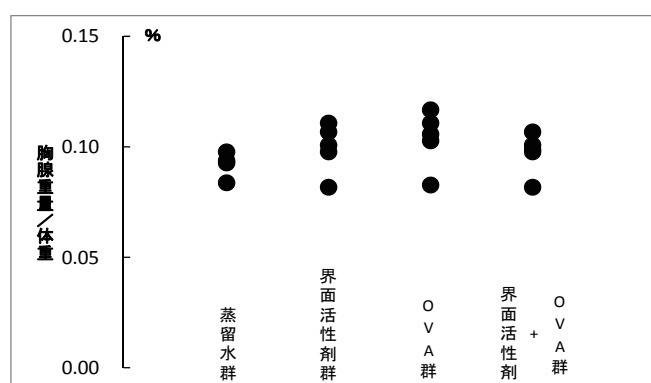


図6 胸腺重量対体重比の比較

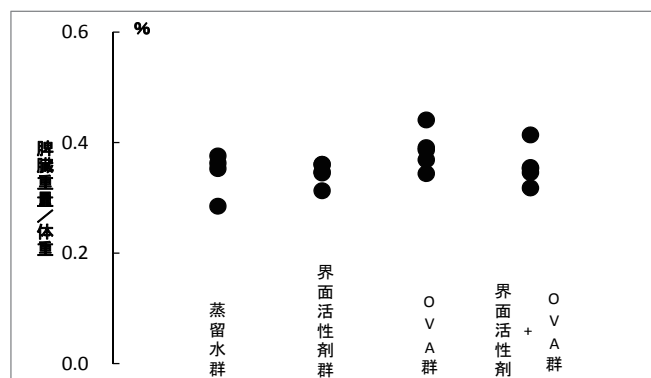


図7 脾臓重量対体重比の比較

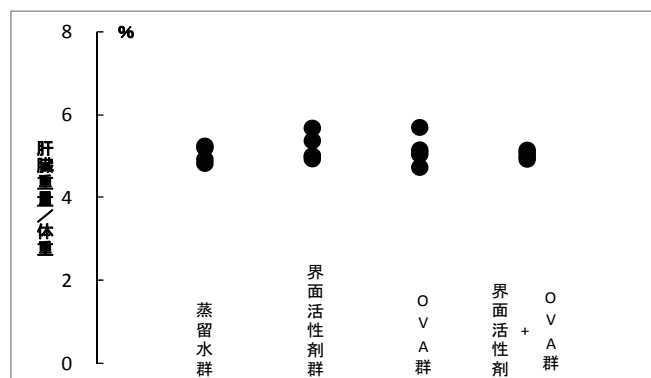


図8 肝臓重量対体重比の比較

2. 左肺上清中 IL-4 と OVA 特異的抗体

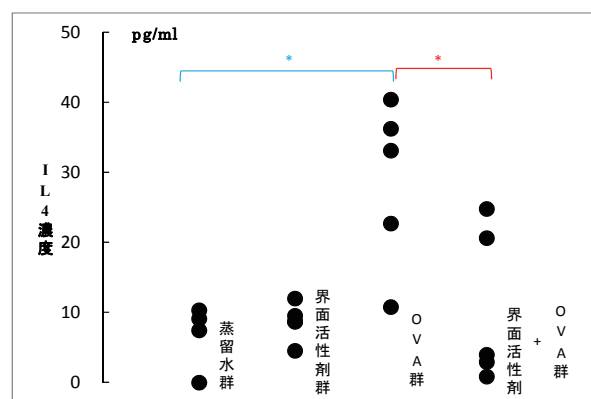
IL-4 : 図9に左肺ホモジナイズ上清中 IL-4 を示す。

「OVA 群」では、「蒸留水群」、「界面活性剤群」「界面活性剤+OVA 群」に比較して有意に高かった。

OVA-IgE と OVA-IgG1 : 図10に血清中 OVA-IgE 値を示す。縦軸は、陽性標準血清値を 100%とした場合の血清中 OVA-IgE 濃度である。

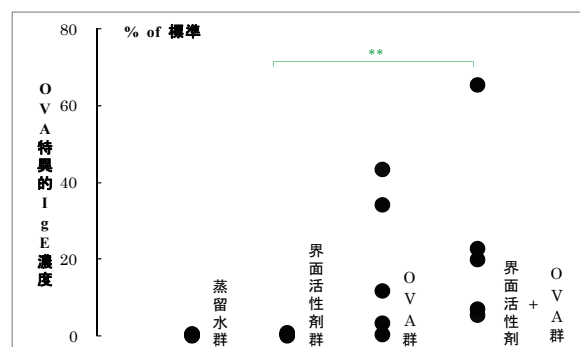
「界面活性剤+OVA 群」はコントロール群に比較して有意に高かった。「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の値は高くなったが、両群間に差は見られなかった。

図11に血清中 OVA-IgG1 値を示す。「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」はそれぞれコントロール群に比較して有意に高かったが、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の間に差は見られなかった。



*p<0.05

図9 左肺ホモジナイズ上清中 IL-4 の比較



**p<0.01

図10 血清中 OVA-IgE 値の比較

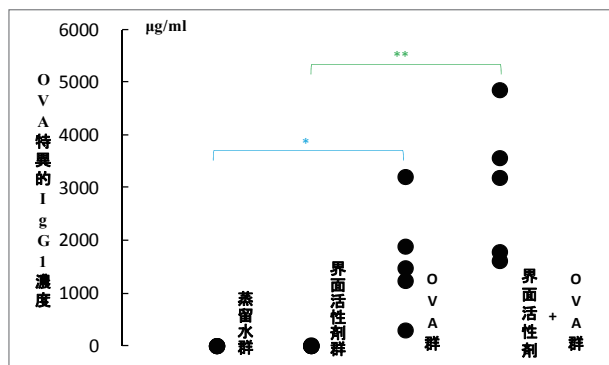


図 11 血清中 OVA-IgG1 値の比較

3. 病理組織学的検査

図 12 に右肺中葉の気管支、図 13 に肺胞道、図 14 に肺胞の光学顕微鏡写真を示す。「蒸留水群」と「OVA 群」、「界面活性剤群」と「界面活性剤+OVA 群」のマウス中葉の気管支、肺胞道、肺胞の病理組織学的所見に差は見られなかった。

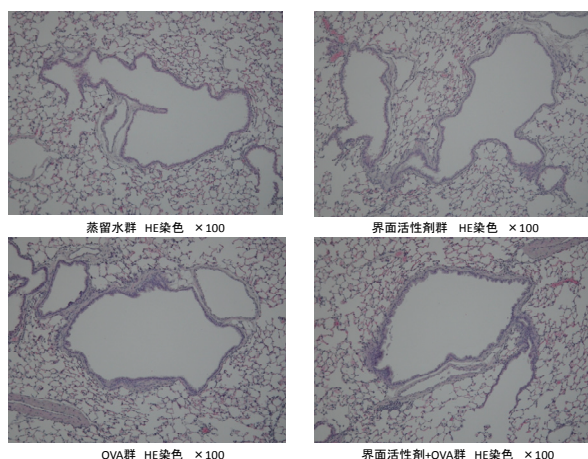


図 12 右肺中葉の気管支の光学顕微鏡写真

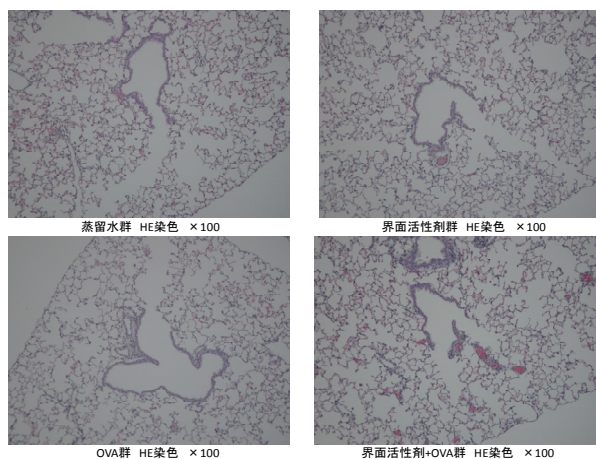


図 13 右肺中葉の肺胞道の光学顕微鏡写真

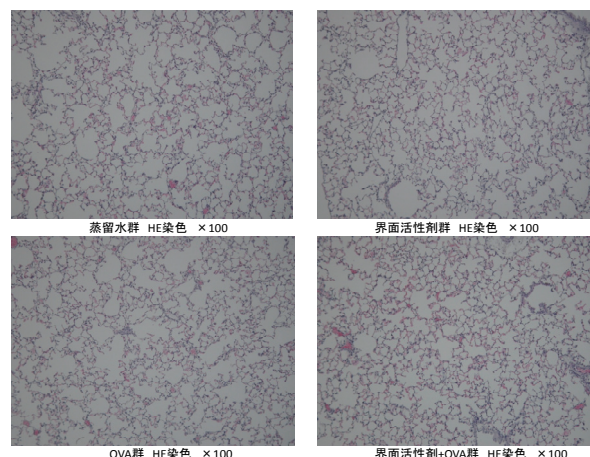


図 14 右肺中葉の肺胞の光学顕微鏡写真

図 15 に気管支や血管周囲にリンパ球が浸潤している肺病理標本の光学顕微鏡写真を示す。表 2 にリンパ球の浸潤が見られたマウスの割合を示す。

「蒸留水群」と「界面活性剤群」の右肺（上葉、中葉、下葉、心葉）の病理組織標本では、リンパ球の浸潤が見られないか見られてもわずかだったのに比べ、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」では、気管支や血管周囲にリンパ球の浸潤が多く見られた。

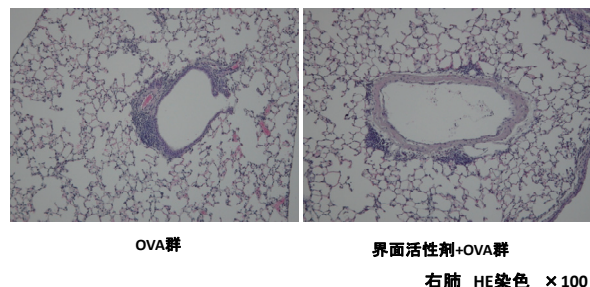


図 15 リンパ球の浸潤

表 2 右肺にリンパ球の浸潤が見られたマウスの割合

蒸留水群	界面活性剤群	OVA 群	界面活性剤+OVA 群
1/4	0/5	5/5	5/5

(リンパ球の浸潤が見られたマウスの数 / 匹数)

図 16 にマスト細胞を観察するために右肺中葉のパラフィン切片を用いて TB 染色を行い、光学顕微鏡による観察を行ったものを示す。TB 染色ではほとんどの細胞は青く染まるが、マスト細胞は顆粒が赤〜赤紫色に染まる（メタクロマジー）ため、観察することが

出来る。マスト細胞の増加や顆粒の放出などが見られる群はなかった。

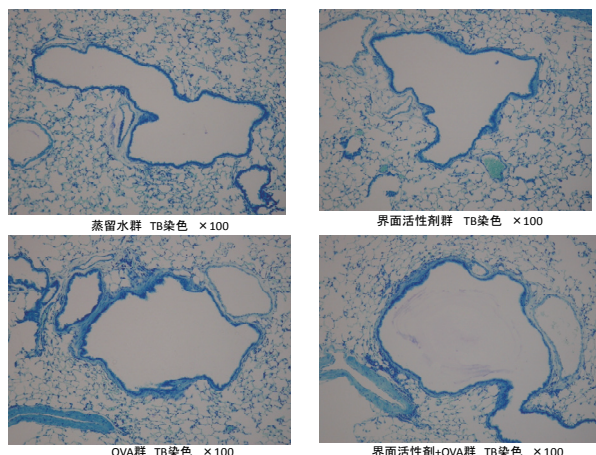


図 16 右肺中葉の気管支の光学顕微鏡写真

図 17 に胸腺、図 18 に脾臓、図 19 に肝臓の光学顕微鏡写真を示す。4 群の胸腺、脾臓、肝臓の病理組織学的所見に差は見られなかった。

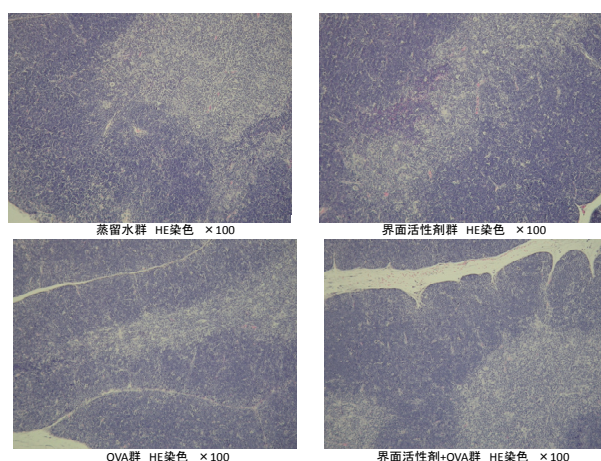


図 17 胸腺の光学顕微鏡写真

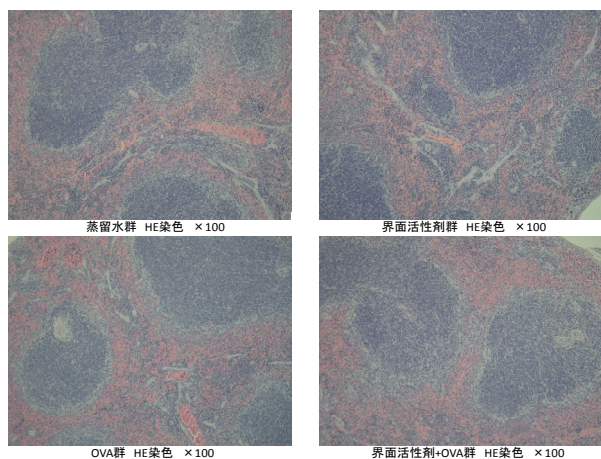


図 18 脾臓の光学顕微鏡写真

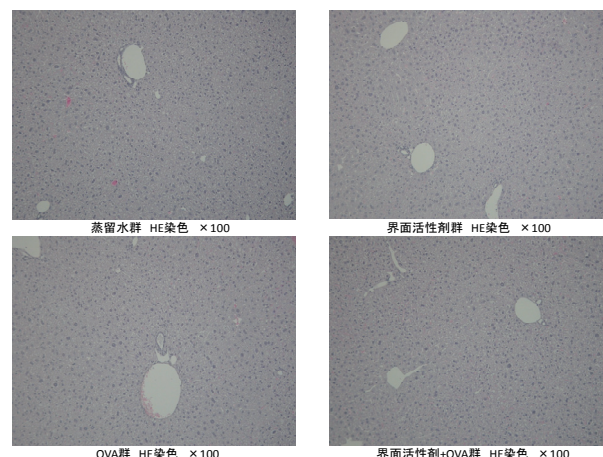


図 19 肝臓の光学顕微鏡写真

考察および結論

予備実験と吸入実験の陰イオン界面活性剤の濃度については、ほぼ同じような値であった。

吸入実験の「蒸留水群」、「界面活性剤群」と「OVA群」、「界面活性剤+OVA群」を比較すると、

- 1) OVA を吸入した群で、左肺重量の増加が見られた。
- 2) OVA を吸入した群で、右肺の気管支や血管周囲にリンパ球の浸潤が多く見られた。
- 3) 「OVA 群」で左肺上清中の IL-4 値の上昇が見られた。
- 4) OVA を吸入した群で、血清中の OVA 特異的 IgE と OVA 特異的 IgG1 値の上昇が見られた。

また、

- 1) 全群にマスト細胞の増加や顆粒の放出等は見られなかった。
- 2) 右肺 (上葉、中葉、下葉、心葉)、胸腺、脾臓、肝臓の病理組織学的所見は全群に差は見られなかった。

アレルギーモデルマウスである「OVA 群」と界面活性剤を吸入させた「界面活性剤+OVA 群」を比較すると、

- 1) 体重や臓器 (左肺、胸腺、脾臓、肝臓) 重量、臓器重量対体重比に差は見られなかった。
- 2) 左肺上清中の IL-4 の測定値に有意差が見られたが、値は「OVA 群」の方が高かった。
- 3) 血清中の OVA 特異的 IgE と OVA 特異的 IgG1 の測定値に差は見られなかった。

I 型アレルギーは、①アレルゲンの感作によって IgE が産生される。②IgE がマスト細胞や好塩基球の表面に結合し、さらに抗原と反応してこれらの細胞を活性化させる。③活性化の結果、各種の炎症を起こす化学伝達物質が放出されてアレルギー反応が起こる。ことで成立するとされる。

OVA を吸入させると、I 型アレルギー成立過程の第①段階に影響が見られたが、OVA と同時に界面活性剤を吸入させたマウスで、アレルギー症状を増悪させるような生体への影響は見られなかった。

シャンプーに使用されるラウレス硫酸ナトリウムは、通常のシャンプー使用時の濃度レベルにおいて生体への影響はないと考えられた。

この研究は、大阪府立公衆衛生研究所の動物実験委員会の指針に従い、動物に不必要な苦痛を与えないように配慮して行った。

文 献

- 1) 環境省：平成 13 年度版環境白書，平成 13 年 5 月
- 2) Villar-Gómez A, Muñoz X, Culebras M, Morell F, Cruz MJ. : Occupational asthma caused by inhalation of surfactant composed of amines, Scand J Work Environ Health, 35 (6), 475-478(2009)
- 3) van Rooy FG, Houba R, Palmen N, Zengeni MM, Sander I, Spithoven J, Rooyackers JM, Heederik DJ. : A cross-sectional study among detergent workers exposed to liquid detergent enzymes, Occup Environ Med., 66 (11), 759-765(2009)
- 4) S. Konno, K. Asano, M. Kurokawa, K. Ikeda, K. Okamoto and M. Adachi : Antiasthmatic activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin: analysis of possible mechanisms in vitro and in vivo, Int Arch Allergy Immunol., 105, 308-316(1994)
- 5) T. Hirano, N. Yamakawa, H. Miyajima, K. Maeda, S. Takai, A. Ueda, O. Taniguchi, H. Hashimoto, A. Shirase, K. Okumura and Z. Ovary : An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-IgE antibody, Journal of Immunological Methods, 119, 145-150(1989)
- 6) H. Fujimaki, N. Ui and T. Endo : Induction of inflammatory response of mice exposed to diesel exhaust is modulated by CD4(+) and CD8(+) T cells, American Journal of Respiratory and Crit Care Med, 164, 1867-1873(2001)