

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 (第2報)

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(界面活性剤)を鼻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報告した。今回、前回の実験で得られた結果の再現性を確認する実験を行い、病理組織学的検査(右肺、胸腺、脾臓、肝臓)に鼻を追加した。

その結果、前回の実験でコントロール群(「蒸留水群」、「界面活性剤群」)と曝露群(「OVA群」、「界面活性剤+OVA群」)の間に有意差が見られた項目(左肺重量対体重比とOVA特異的IgG1濃度)に今回も有意差が見られたことから再現性のあることが確認された。しかし、これはOVAの吸入による生体への影響と考えられ、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、日本人の約2人に1人は何らかのアレルギー疾患に罹患していると報告¹⁾され、アレルギー疾患の増加が社会問題化している。急激に大きく変化している環境がその要因として重要ではないかと考えられている。環境要因には住環境の変化、室内空気の変化、スギなどの花粉の増加などが考えられるが、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²⁾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。

アレルギー疾患は多様性に富むが、これまでも石鹼やシャンプー、化粧品にアレルギーのある人が、石鹼などを使用した後に蕁麻疹や皮膚炎になるという現象はよく知られていた。しかし、2005年から2010年にかけて販売された「茶のしずく石鹼」を使用した人に、重いアレルギー症状が引き起こされる健康被害が社会問題となるまで、石鹼などにアレルギーのある人が食物アレルギーに関係するということは余り知られていなかった⁴⁾。

石鹼などの主成分は界面活性剤であり、皮膚などの

バリア機能を破壊しアレルギーが吸収されやすくなる可能性があることから、私達は、生活関連用品において広く使用されている界面活性剤に注目した。そして、アレルギー疾患にリスク要因としてどの程度関与しているのかを前回³⁾に引き続き検討することにした。

今回、病理組織学的検査に鼻を追加した。これは、鼻粘膜は粘膜下の毛細血管が豊富で物質の吸収性が高く、吸収された物質は直接全身循環血へ移行するため門脈系を経由しないと同時に呼吸器系への取りこみの入り口に当たる組織であることから、鼻への影響を確認することが必要であると考えたためによる。

実験方法

1. 試薬と器具

試薬と器具は、前回と同じものを用いた³⁾。

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。このことから、市販シャンプーの70%以上に使用されており配合率は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。

アレルギー: 卵白アルブミン(OVA)は、SIGMA製

*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 (II)
by Emiko AZUMA and Takae NAKAJIMA

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. 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31匹購入し、6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：吸入装置の構成を図1に示す。前回の実験に使用した吸入装置を用いた。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)を安全に除去するため、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。

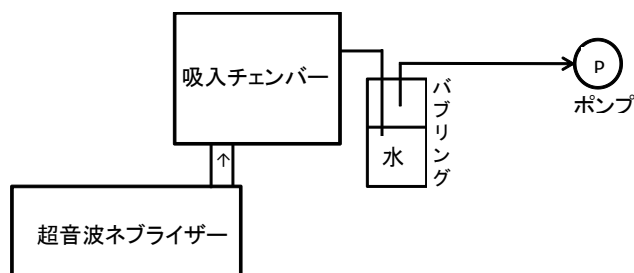


図1 吸入装置の構成

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100万倍希釈（ $\times 10^{-6}$ ）と10万倍希釈（ $\times 10^{-5}$ ）の2濃度とした。

実験群：蒸留水を吸入させる「蒸留水群」、 $\times 10^{-6}$ 界面活性剤を吸入させる「界面活性剤低濃度群」(L群)、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤を吸入させる「界面活性剤高濃度群」(H群)、1%OVAを吸入させる「OVA群」、 $\times 10^{-6}$ 界面活性剤と1%OVAを同時に吸入させる「界面活性剤低濃度+OVA群」(L+OVA群)、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤と1%OVAを同時に吸入させる「界面活性剤高濃度+OVA群」(H+OVA群)の6群で、1群5匹としたが、「H+OVA群」は6匹とした。

なお、今回用いた $\times 10^{-5}$ 界面活性剤の濃度は、前回

の実験で用いた界面活性剤の濃度と同じである。

感作と吸入の方法：7週齢で全マウスに10 μ g OVA/0.5ml 生理的食塩水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、 $\times 10^{-6}$ 界面活性剤、 $\times 10^{-5}$ 界面活性剤、1%OVA、 $\times 10^{-6}$ 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、左肺中 IL-4 濃度の測定：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、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の冷却したリン酸緩衝生理食塩水を加えて肺ホモジネートを作製した。これを遠心（2000 $\times$ g、60分、4 $^{\circ}$ C）し、上清中のIL-4濃度をINSTRUCTIONS Mouse IL-4 ELISA Kit（Thermo SCIENTIFIC）で測定⁵⁾した。

血清中 OVA 特異的 IgE 濃度、OVA 特異的 IgG1 濃度の測定：OVA 特異的 IgE 濃度は、anti-mouse IgE（PHARMINGEN R35-72）、biotinylated OVA を用い、PCA タイター $\times 320$ のマウスプール血清を標準として ELISA 法で測定⁶⁾した。OVA 特異的 IgG1 濃度は、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⁷⁾した。

臓器の病理組織学的観察：気管から右肺（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、気管とともに固定した。胸腺、脾臓、肝臓、頭部も10%中性緩衝ホルマリン液に入れ固定した。右肺、胸腺、脾臓、肝臓は、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。頭部は鼻を2か所の部位で切り出し⁸⁾た後にエタノール・クロロホルム混液で脱脂してから脱灰を行い、その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HE染色を行った。染色後に、光学顕微鏡で臓器の観察を行った。

実験のプロトコールを図2に示す。鼻は図3のAとBの部位で切り出した。切片をそれぞれ「鼻A」、「鼻

B] とする。

動物: BALB/cオスマウス

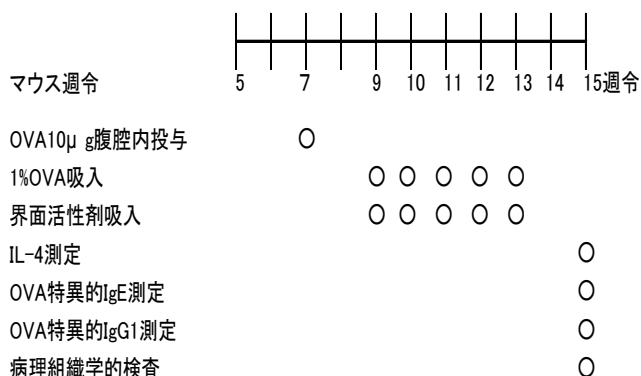


図2 実験のプロトコール

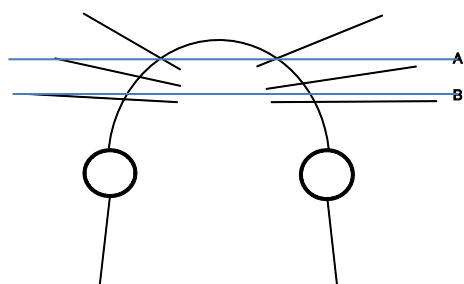


図3 鼻の切り出し部位

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」、「L群」、「H群」はそれぞれ「OVA群」と「L+OVA群」「H+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「L+OVA群」、「H+OVA群」の結果について主に比較した。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

OVAを投与してから8週間後におけるマウスの体重を図4に示す。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。

左肺重量対体重比を図5に示す。「OVA群」、「H+OVA群」の値が増加したことからそれぞれ「蒸留水群」、「H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。

胸腺重量対体重比を図6に示す。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。

脾臓重量対体重比を図7に示す。「蒸留水群」と「界面活性剤+OVA群」の間に有意な差が見られたが、「OVA群」と「界面活性剤+OVA群」の間に差は見られなかった。

肝臓重量対体重比を図8に示す。各コントロール群との間に差は見られなかったが、「OVA群」と「L+OVA群」の間に有意な差が見られた。

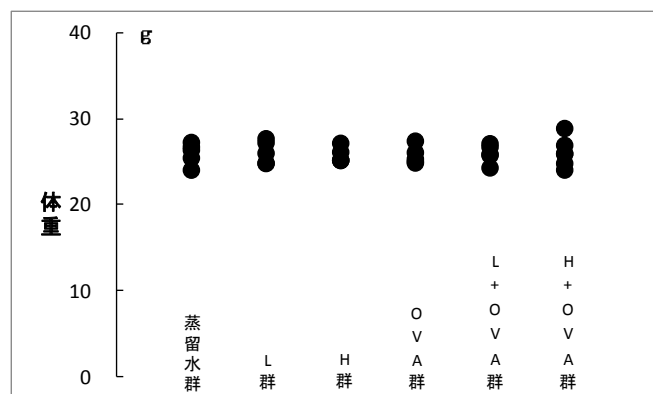
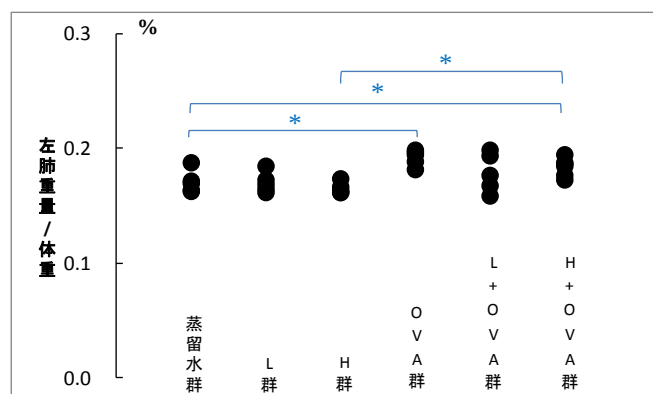


図4 体重の比較



*p<0.05

図5 左肺重量対体重比の比較

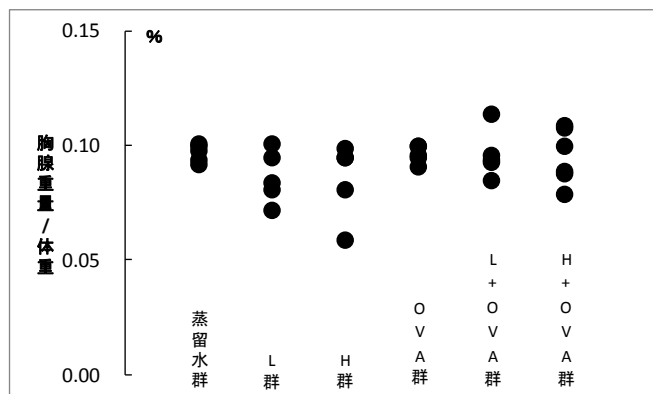
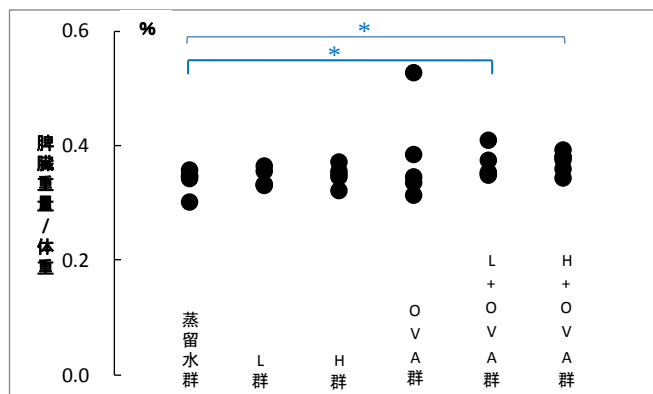
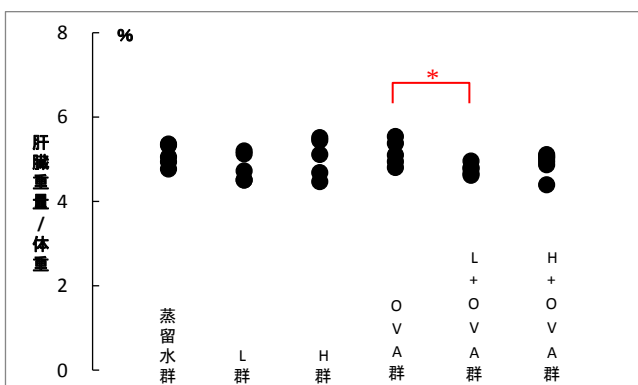


図6 胸腺重量対体重比の比較



*p<0.05

図7 脾臓重量対体重比の比較



*p<0.05

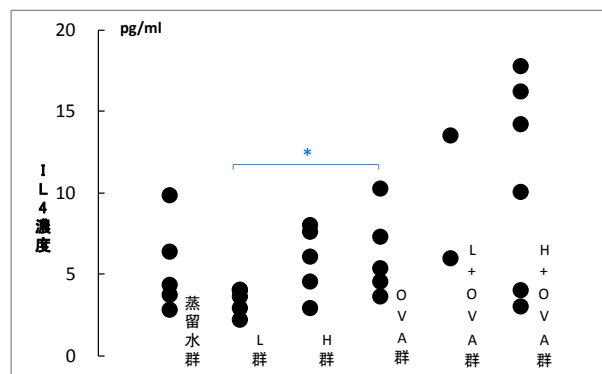
図8 肝臓重量対体重比の比較

2. 左肺中 IL-4 濃度と血清中 OVA 特異的抗体濃度

IL-4 濃度 : 左肺ホモジナイズ上清中 IL-4 濃度を図9に示す。「L 群」と「OVA 群」の間に有意差が見られたが、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」との間に差は見られなかった。

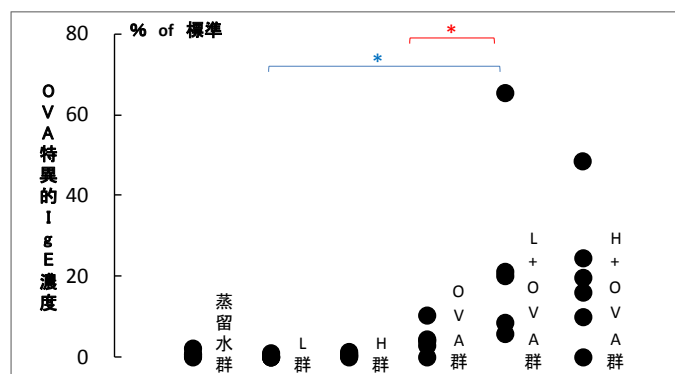
OVA 特異的 IgE 濃度と OVA 特異的 IgG1 濃度 : 血清中 OVA 特異的 IgE 濃度を図10に示す。縦軸は、陽性標準血清値を 100%とした場合の血清中 OVA 特異的 IgE 濃度である。「L 群」と「L+OVA 群」、「OVA 群」と「L+OVA 群」の間に有意差が見られた。

血清中 OVA 特異的 IgG1 濃度を図11に示す。「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」はそれぞれのコントロール群と比較して有意に高くなったが、「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 濃度 の比較



*p<0.05

図10 血清中 OVA 特異的 IgE 濃度の比較

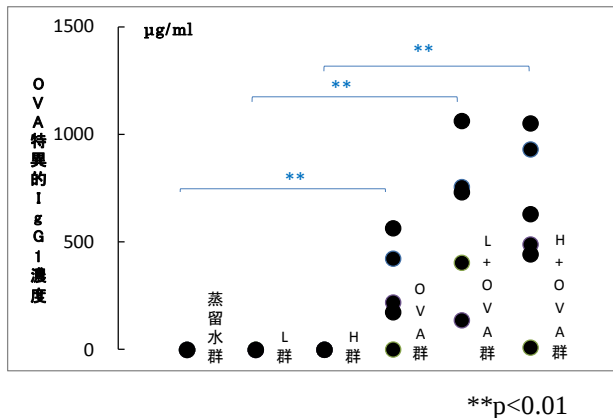


図 11 血清中 OVA 特異的 IgG1 濃度の比較

3. 病理組織学的検査

鼻：鼻 A の組織像を図 12 に示す。鼻腔は鼻中隔で左右に分かれており、側面からは甲介が突き出ているのが見られる。「蒸留水群」、「界面活性剤群」の鼻 A を図 13 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の鼻 A を図 14 に示す。鼻 B の組織像を図 15 に示す。ここでは、呼吸粘膜（多列線毛上皮細胞）が見られる。「蒸留水群」、「界面活性剤群」の鼻 B を図 16 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の鼻 B を図 17 に示す。

「蒸留水群」と「界面活性剤群」、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の 6 群のマウスの鼻 A、鼻 B の病理組織学的所見に差は見られなかった。

右肺：「蒸留水群」、「界面活性剤群」の肺気管支を図 18 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の肺気管支を図 19 に、「蒸留水群」、「界面活性剤群」の肺泡道を図 20 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の肺泡道を図 21 に、「蒸留水群」、「界面活性剤群」の肺泡を図 22 に、「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」の肺泡を図 23 に示す。

「蒸留水群」と「界面活性剤群」、「OVA 群」と「界面活性剤+OVA 群」の 6 群のマウスの肺気管支、肺泡道、肺泡の病理組織学的所見に差は見られなかった。

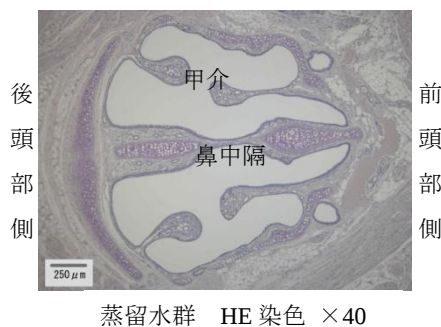


図 12 鼻 A の組織像

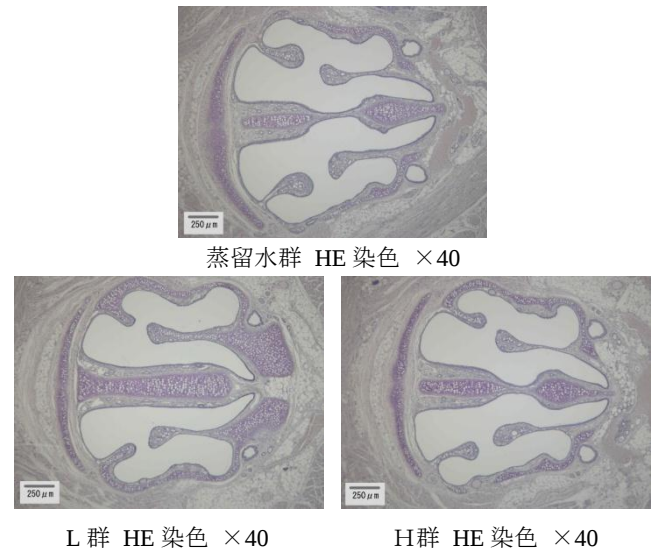


図 13 蒸留水群（上）、界面活性剤群（下左：L 群、下右：H 群）の鼻 A の光学顕微鏡写真

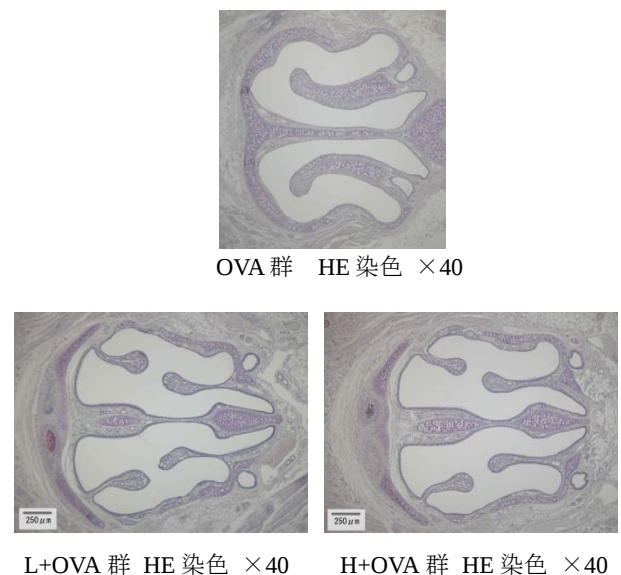


図 14 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右:H+OVA 群)の鼻 A の光学顕微鏡写真

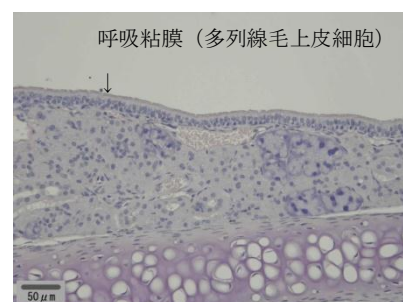
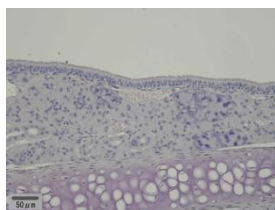
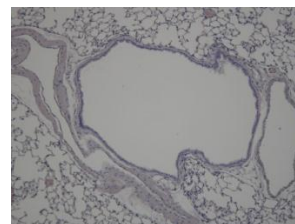


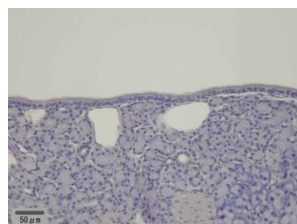
図 15 鼻 B の組織像



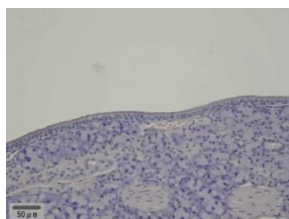
蒸留水群 HE 染色 ×200



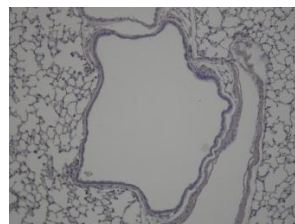
蒸留水群 HE 染色 ×100



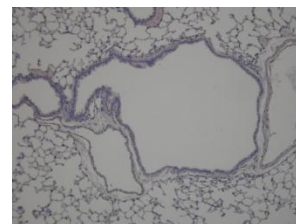
L 群 HE 染色 ×200



H 群 HE 染色 ×200



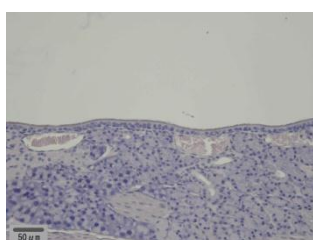
L 群 HE 染色 ×100



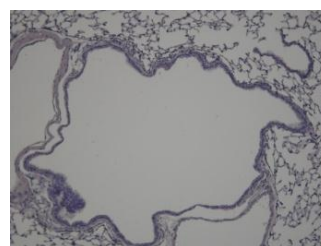
H 群 HE 染色 ×100

図 16 蒸留水群(上)、界面活性剤群 (下左 : L 群、下右 : H 群) の鼻 B の光学顕微鏡写真

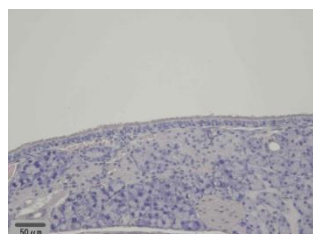
図 18 蒸留水群 (上)、界面活性剤群 (下左 : L 群、下右 : H 群) の肺気管支の光学顕微鏡写真



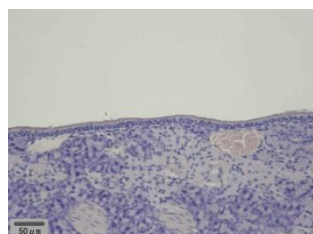
OVA 群 HE 染色 ×200



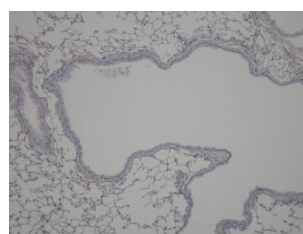
OVA 群 HE 染色 ×100



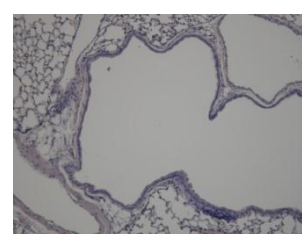
L+OVA 群 HE 染色 ×200



H+OVA 群 HE 染色 ×200



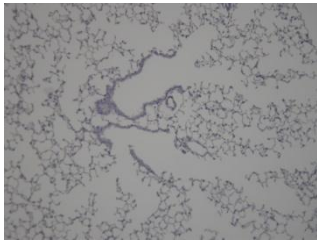
L+OVA 群 HE 染色 ×100



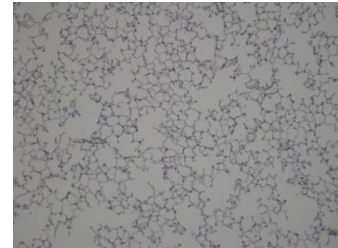
H+OVA 群 HE 染色 ×100

図 17 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右 : H+OVA 群) の鼻 B の光学顕微鏡写真

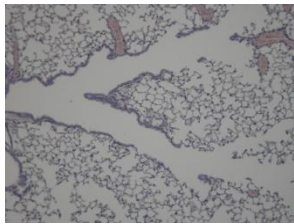
図 19 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右 : H+OVA 群) の肺気管支の光学顕微鏡写真



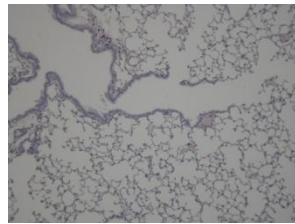
蒸留水群 HE 染色 ×100



蒸留水群 HE 染色 ×100



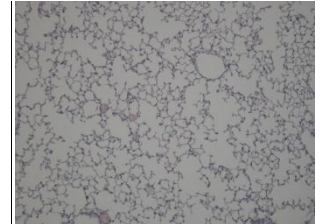
L 群 HE 染色 ×100



H 群 HE 染色 ×100



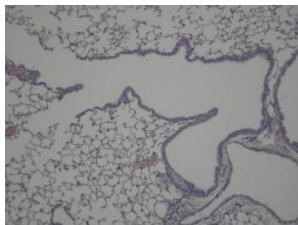
L 群 HE 染色 ×100



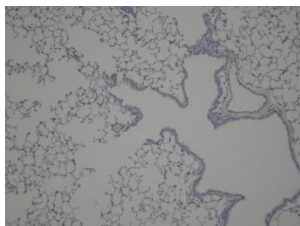
H 群 HE 染色 ×100

図 20 蒸留水群（上）、界面活性剤群（下左：L 群、下右：H 群）の肺胞道の光学顕微鏡写真

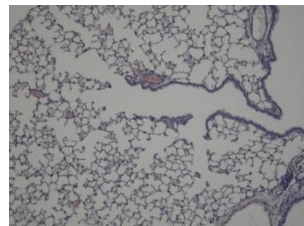
図 22 蒸留水群（上）、界面活性剤群（下左：L 群、下右：H 群）の肺胞の光学顕微鏡写真



OVA 群 HE 染色 ×100

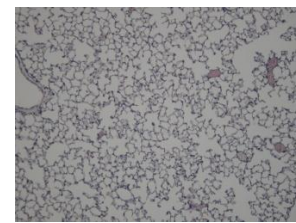


L+OVA 群 HE 染色 ×100

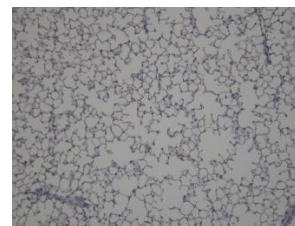


H+OVA 群 HE 染色 ×100

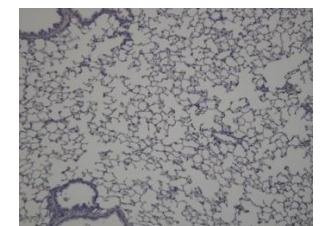
図 21 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右：H+OVA 群)の肺胞道の光学顕微鏡写真



OVA 群 HE 染色 ×100



L+OVA 群 HE 染色 ×100



H+OVA 群 HE 染色 ×100

図 23 OVA 群(上)、界面活性剤+OVA 群(下左:L+OVA 群、下右：H+OVA 群)の肺胞の光学顕微鏡写真

右肺にリンパ球の浸潤が見られたマウスの割合を表 1 に示す。「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であった。しかし、「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図 24 に示したように多く見られた。

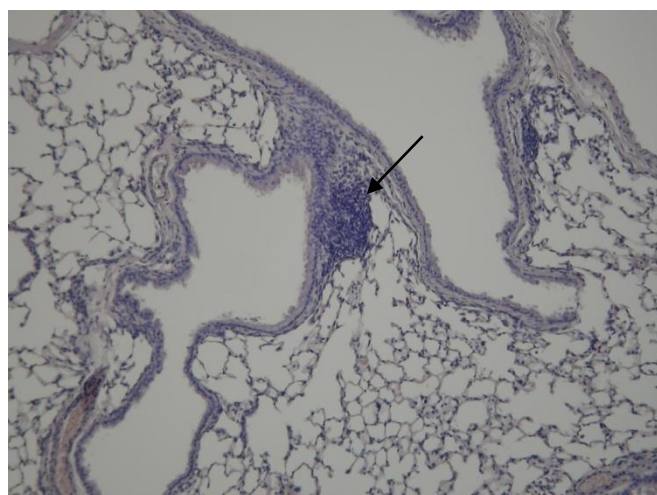


図 24 H+OVA 群のリンパ球浸潤 (←) HE 染色 ×100

表 1 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	L 群	H 群	OVA 群	L+OVA 群	H+OVA 群
0/5	2/5	1/5	2/5	3/5	4/6

(リンパ球の浸潤が見られたマウスの数/匹数)

他の臓器：光学顕微鏡写真で示していないが、6 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。

考察および結論

吸入実験の「蒸留水群」、「界面活性剤群」とそれぞれ「OVA 群」、「界面活性剤+OVA 群」とを比較すると、

- 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 濃度の上昇が見られた。

- 4) OVA を吸入した群で、血清中の OVA 特異的 IgE 濃度と OVA 特異的 IgG1 濃度の上昇が見られた。

また、

- 1) 6 群間の鼻 (A、B)、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 (左肺、胸腺、脾臓) に差は見られなかった。「OVA 群」と「L+OVA 群」の肝臓重量対体重比の間に有意差が見られたが、「L+OVA 群」の値の分散が他群と比べ小さかったためと考えられる。
- 2) 血清中の OVA 特異的 IgE 濃度は、「OVA 群」と「L+OVA 群」の間に有意差が見られたが、「L+OVA 群」の中に 1 匹だけ高い値を持つマウスがいたためと考えられる。
- 3) OVA 特異的 IgG1 濃度の測定値に差は見られなかった。

前回と今回の実験結果を比較すると、

- 1) 前回有意差が見られた項目 (左肺重量対体重比と OVA 特異的 IgG1 濃度) に今回の実験でも有意差が見られ再現性のあることが確認された。
- 2) IL-4 濃度、OVA 特異的 IgE 濃度、OVA 特異的 IgG1 濃度は今回の測定値の方が低くなった。「OVA 群」の IL-4 濃度が前回と比較して約 1/4~1/5 程度、「OVA 群」の OVA 特異的 IgE 濃度が前回と比較して約 1/4 程度、「OVA 群」と「H+OVA 群」の OVA 特異的 IgG1 濃度が前回と比較してそれぞれ約 1/6 程度、約 1/5 程度となった。これは実験に使用したマウスのロット差 (個体差) による感受性の違いによるものと推測された。
- 3) 前回と今回、ともに 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見られたが、今回の方が浸潤しているリンパ球の数が少なかった。このことも実験に使用したマウスのロット差 (個体差) による感受性の違いによるものと推測された。

前回の実験と同様に、今回の実験でも OVA の吸入による生体への影響が見られたが、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影響は見られなかった。

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) 厚生科学審議会疾病対策部会 リウマチ・アレルギー対策委員会：リウマチ・アレルギー対策委員会報告書、平成 23 年 8 月
- 2) 環境省：平成 13 年度版環境白書、平成 13 年 5 月
- 3) 東恵美子, 中島孝江：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, 大阪府立公衆衛生研究所報, 第 50 号, 38 - 44 (2012)
- 4) リウマチ・アレルギー情報センター：小麦加水分解物含有石鹼「茶のしずく」を使用したことにより発症する小麦アレルギーに関する情報センター, <http://www.allergy.go.jp/allergy/flour/001.html>
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 環境省：平成 13 年度本態性多種化学物質過敏状態の調査研究 研究報告書、平成 13 年 8 月