

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)

令和 2 年 3 月

東京都福祉保健局

はじめに

東京都では、昭和 53 年度から大気汚染物質による健康影響調査のため、実験動物等を用いた基礎的実験的研究を実施しています。この間、硫黄酸化物や窒素酸化物、オキシダント、浮遊粒子状物質等、様々な大気汚染物質が社会問題となり削減のための取り組みが行われ、東京都内の大気環境も大きく変化してきました。こうした時代の流れに合わせ、これまで基礎的実験的研究では窒素酸化物やオキシダントを中心とした複合大気汚染物質やディーゼル車の排気ガス中に含まれる粒子状物質等を主たる対象として研究を実施してきました。

平成 28 年度から令和元年度の研究では、微小粒子状物質 $PM_{2.5}$ に着目し、 $PM_{2.5}$ 中に含まれる硫酸アンモニウムの健康影響を明らかにするため、東京都健康安全研究センター薬事環境科学部において、東京都内における大気中硫酸アンモニウムの実態調査とヒト肺胞上皮由来細胞及びヒト気管支上皮由来細胞へのばく露実験、正常マウス及びぜん息モデルマウスを用いた吸入ばく露実験を実施しました。この度、研究結果について、東京都環境保健対策専門委員会大気汚染保健対策分科会の意見を聞き報告書に取りまとめました。

本報告書が、大気汚染物質について関心のある都民の皆様に活用されるとともに、問題解決の一助になれば幸いです。

東京都福祉保健局健康安全部環境保健衛生課

東京都環境保健対策専門委員会大気汚染保健対策分科会 委員名簿

令和2年3月現在

氏名	所属
安達 修一	相模女子大学 栄養科学部 学部長・教授
内山 巖雄	京都大学 名誉教授
杉山 幸比古	練馬光が丘病院 呼吸器 COPD センター長 自治医科大学 名誉教授
中井 里史	横浜国立大学大学院 環境情報研究院 教授
新田 裕史	国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター フェロー
松木 秀明	東海大学 医学部 客員教授
柳澤 利枝	国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 主任研究員
山下 直美	武蔵野大学 薬学部 臨床薬学センター長・教授

目次

第1章 調査概要	1
1 背景及び目的	1
2 調査実施概要	2
3 文献	3
研究スケジュール	4
第2章 都内大気中 PM _{2.5} 中の硫酸アンモニウムの実態調査	5
1 目的	5
2 方法	5
(1) 大気中 PM _{2.5} 中硫酸アンモニウムの分別定量法の開発	5
(2) 大気中 PM _{2.5} 中硫酸アンモニウム等の測定	8
3 結果	9
(1) 大気中 PM _{2.5} 中硫酸アンモニウムの分別定量法	9
(2) 大気中 PM _{2.5} 中硫酸アンモニウム等の測定	15
(3) 大気汚染物質等との関連	20
4 考察	27
5 文献	30
第3章 培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験	32
1 目的	32
2 方法	32
(1) 気相ばく露	32
(2) 液相ばく露	36
(3) 統計学的解析	37
3 結果	38
(1) A549 細胞への気相ばく露	38
(2) Calu-3 細胞への気相ばく露	40
(3) A549 細胞への液相ばく露	41
(4) Calu-3 細胞への液相ばく露	42
4 考察	43
5 文献	46
第4章 硫酸アンモニウムばく露動物実験	47
第1節 正常マウスへの3か月吸入ばく露実験	47
1 目的	47
2 方法	47
(1) 実験動物	47

(2) 吸入ばく露	47
(3) 体重及び摂餌量	49
(4) 剖検	49
(5) 病理学的解析	50
(6) 血液検査	50
(7) 免疫学的解析	51
(8) BALF 中の細胞数	51
(9) 生化学的解析	51
(10) 分子生物学的解析	51
(11) 統計解析	52
3 結果	52
(1) 硫酸アンモニウムの水溶液中濃度とミスト中濃度の関係及び粒子径...	52
(2) 硫酸アンモニウムのばく露濃度	53
(3) 体重及び臓器重量	54
(4) 摂餌量	56
(5) 病理組織学的解析	57
(6) 血液検査	61
(7) 免疫学的解析	62
(8) BALF 中の細胞数	62
(9) 生化学的解析	63
(10) 分子生物学的解析	63
4 考察	64
5 文献	66
第2節 ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露実験	67
1 目的	67
2 方法	67
(1) 実験動物及び群構成	67
(2) 吸入ばく露	68
(3) OVA 誘導型ぜん息モデルマウスの作製	68
(4) 剖検	69
(5) 病理組織学的解析	69
(6) BALF 中の細胞数	69
(7) 免疫学的解析	70
(8) 生化学的解析	70
(9) 分子生物学的解析	70
(10) 気道抵抗の測定	71
(11) 統計解析	71

3	結果	72
	(1) 硫酸アンモニウムのばく露濃度	72
	(2) 体重及び摂餌量	72
	(3) 病理組織学的解析	73
	(4) BALF 中の細胞数	78
	(5) 免疫学的解析	79
	(6) 生化学的解析	81
	(7) 分子生物学的解析	81
	(8) 気道抵抗の測定	83
4	考察	83
5	文献	85
第5章 まとめ		86
1	各章のまとめ	86
2	総括	87
用語解説		89

第1章 調査概要

1 背景及び目的

PM_{2.5}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。PM_{2.5}の環境基準値は、平成21年に「1年平均値が15 μg/m³以下であり、かつ、1日平均値が35 μg/m³以下であること。」と策定された¹⁾。これは、平成21年の中央環境審議会微小粒子状物質環境基準専門委員会報告で、「微小粒子状物質への短期ばく露及び長期ばく露と循環器・呼吸器疾患死亡、肺がん死亡との関連に関する疫学的証拠には一貫性が見られることから、これらの健康影響の原因の一つとなりうると考えられる。」と評価されたためである²⁾。

本研究を開始する前年度の平成27年度には、東京都では、二酸化窒素、浮遊粒子状物質、二酸化硫黄及び一酸化炭素の環境基準は100%達成されていたが、微小粒子状物質（以下PM_{2.5}と略す）の達成率は、一般環境大気測定局（以下一般局と略す）においては85%であったが、自動車排出ガス測定局（以下自排局と略す）においては40%と低い状況であった³⁾。

都内大気中PM_{2.5}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ほかに、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⁴⁾。PM_{2.5}の成分に関する調査では、水溶性成分の中で硫酸イオンが最も多く、次いで硝酸イオン及びアンモニウムイオンが多いことが報告されており^{5,6)}、最も存在量の多い陰イオンである硫酸イオンと、陽イオンのアンモニウムイオンから成る硫酸アンモニウムは、PM_{2.5}の主要成分の一つと考えられる。大気中における硫酸アンモニウムの生成には、二酸化硫黄が水分やOHラジカルと反応して亜硫酸や硫酸となり、さらにアンモニアと反応して生成する過程が支配的であると考えられている⁷⁾。

大気中のイオン成分の測定には、PM_{2.5}を水で抽出したのちイオンクロマトグラフで分析するイオン成分測定法が環境省から示されている⁸⁾。この測定結果は、各イオン濃度として得られることから、それぞれのイオンが形成する塩濃度についての情報を得ることができていないため、PM_{2.5}中の硫酸アンモニウムを測定した調査結果はこれまで報告されていない。

また、硫酸アンモニウムの呼吸器への影響に関するデータは極めて少ないが、各種の硫酸塩をばく露した動物実験の結果が報告されている⁹⁾。昭和50年代から60年代にかけて、大気汚染物質の一つとして硫酸アンモニウムに着目した実験がいくつか行われ、正常なラットを用いた硫酸アンモニウムの吸入ばく露実験では、ほとんど影響がないことが報告された^{10,11)}。一方、モルモットを用いた吸入ばく露実験では、ぜん息を増悪することが示唆され^{12,13)}、ぜん息患者に硫酸アンモニウムをばく露した実験においても、ごくわずかな増悪が指摘された¹⁴⁾。しかし、その作用機序は明確でなく、硫酸アンモニウムが気道に傷害を与えることが原因

と推測されているが、これまでマウスを用いた免疫学的な詳細な解析はほとんど行われていない。培養細胞を用いた実験では、硫酸アンモニウムがマスト細胞株の脱顆粒を引き起こすとの報告がある¹⁵⁾が、その他の報告は見当たらない。一方で、疫学調査により、人のぜん息発作と硫酸アンモニウム系のPM_{2.5}濃度とに関連が見られることが報告されている¹⁶⁾。

このように、硫酸アンモニウムは都内大気中PM_{2.5}の主要成分の一つと推定されるが、その呼吸器等への影響はほとんど明らかになっておらず、PM_{2.5}中の硫酸アンモニウム濃度を測定した結果も報告されていない。

そこで、PM_{2.5}中の硫酸アンモニウム濃度測定法を検討し、都内での実態調査によりその現状を把握すること、実験動物及び培養細胞へのばく露実験によりその毒性学的知見を得ることを目的に、本研究を実施した。

2 調査実施概要

第2章 都内大気中PM_{2.5}中の硫酸アンモニウムの実態調査（平成28年度、29年度）

PM_{2.5}中の硫酸アンモニウム測定方法を開発するために、各種アンモニウム塩の揮発性の違いを利用した硫酸アンモニウムの分別定量法を検討し、確立した。

確立した硫酸アンモニウム測定法を用いて、都内大気PM_{2.5}中の硫酸アンモニウム濃度を把握することを目的として、実態調査を1年間実施した。自排局3か所及び一般局3か所において大気中PM_{2.5}採取を毎月行い、得られた硫酸アンモニウム濃度と大気汚染物質濃度等との関連について解析を行った。また、硫酸アンモニウムの粒径分布調査を実施し、最頻粒子径を求めた。

第3章 培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験（平成30年度、令和元年度）

ヒト肺胞上皮由来A549細胞（以下A549細胞と略す）及びヒト気管支上皮由来Calu-3細胞（以下Calu-3細胞と略す）を用いて、硫酸アンモニウムを気相ばく露又は液相ばく露し、細胞障害作用を評価するための細胞増殖能力及び乳酸脱水素酵素、炎症因子としてIL-8及びIL-6、酸化ストレスマーカーとしてHO-1及び還元型グルタチオン等を測定することにより、生体への影響を考察した。

第4章 硫酸アンモニウムばく露動物実験（平成28年度から令和元年度）

平成27年度までの研究においては、ラットを実験動物として使用してきた。しかし、ラットによるぜん息モデル動物の作製は難しく、研究対象物質のばく露によるぜん息の増悪を評価することが困難であった。このため、本研究から、ぜん息モデルの作製に一般的に用いられているBALB/cマウスを用いることとした。

実験動物をラットからマウスへ変更するとともに、解析する項目も追加した。これまで実施してきた病理組織学的解析、血液学的解析及び生化学的解析に加えて、マウスのぜん息症状の免疫学的な評価項目として、肺胞洗浄液中の白血球の

細胞診断、肺組織における遺伝子発現解析及び免疫組織における白血球の詳細な分析を行った。さらに、ぜん息症状により気道過敏性が上昇することが知られており、評価指標の一つとなっていることから、気道抵抗測定を実施した。

正常マウスへの硫酸アンモニウムの長期的な毒性を評価するために、3 か月間の吸入ばく露による亜慢性毒性試験を実施した。また、硫酸アンモニウムがぜん息症状に与える影響を検討するために、症状の軽いぜん息モデルマウスを作製し、2 週間の吸入ばく露を行い、各解析項目について正常マウスと比較することにより、硫酸アンモニウムばく露によるぜん息の増悪を評価した。

3 文 献

- 1) 環境省：環境省告示第 33 号，微小粒子状物質による大気汚染に係る環境基準について，平成 21 年 9 月 9 日．
- 2) 独立行政法人環境再生保全機構：微小粒子状物質（PM2.5）の環境基準設定，https://www.erca.go.jp/yobou/taiki/rekishi/07_06.html（令和 2 年 3 月 10 日現在。なお本 URL は変更また末梢の可能性がある。）
- 3) 東京都環境局環境改善部大気保全課：環境資料第 28035 号，平成 27 年度大気汚染常時測定結果のまとめ，平成 28 年 12 月．
- 4) 東京都環境局環境改善部計画課：環境資料第 23022 号，東京都微小粒子状物質検討会報告書，平成 23 年 9 月．
- 5) 肥後隼人，山下紗矢香，木下 誠：福岡市保健環境研究所報，**38**，71-76，2012.
- 6) 石川千晶，多田有佑，宇部仁美，他：仙台市衛生研究所報，**45**，105-111，2016.
- 7) Seinfeld, J. H., Pandis, S. N.: Atmospheric chemistry and physics – From air pollution to climate change, 2006, John Wiley & Sons, New York.
- 8) 環境省：大気中微小粒子状物質（PM2.5）成分測定マニュアル「イオン成分測定法（イオンクロマトグラフ法）」，微小粒子状物質の成分分析第 2 版，2013.
- 9) Schlesinger, R. B. : *Inhal. Toxicol.*, 15, 197–235, 2003.
- 10) Busch, R.H., Buschbom, R.L., Cannon, W.C., *et al.*: *Environ. Res.*, **39**(2), 237-52, 1986.
- 11) Loscutoff, S.M., Cannon, W.C., Buschbom, R.L., *et al.*: *Environ. Res.*, **36**(1), 170-80, 1985.
- 12) 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**，1-10，1979.
- 13) 北畠正義，今井正之，小林 勇，他：大気汚染学会誌，**14**，408-415，1979.
- 14) Utell, M J., Morrow, P.E., Speers, D.M., *et Al.*: *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**(3), 444-50, 1983.
- 15) 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.
- 16) 島正之：環境省環境研究総合推進費 C-1005，大気中粒子状物質の成分組成及びオゾンが気管支喘息発作に及ぼす影響，2013.

平成28年度から令和元年度 研究スケジュール

実施内容		平成 28 年度				平成 29 年度				平成 30 年度				令和元年度			
		4~6	7~9	10~12	1~3	4~6	7~9	10~12	1~3	4~6	7~9	10~12	1~3	4~6	7~9	10~12	1~3
都内大気 PM _{2.5} 中の硫酸アンモニウムの実態調査		都内大気中の実態調査 (測定方法の検討)				都内大気 PM _{2.5} 中の 実態調査 (測定)											
生体影響調査	培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験									培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験							
	マウスの試験項目の検討	予備実験															
	ぜん息モデルマウスの作製・評価									ぜん息モデルマウスの作製・評価							
	マウスへのばく露実験					ばく露実験								ばく露実験			
		報告書のまとめ															

