

# 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—  
(令和2年度から令和5年度まで)

東京都保健医療局

# 第1章 調査概要

# 背景

## PM<sub>2.5</sub>とは

粒径が2.5 μm以下の粒子の総称で、大気環境基準では「微小粒子状物質」と表記されている。



## 健康影響

- 微小粒子状物質への短期及び長期ばく露と循環器・呼吸器疾患死亡、肺がん死亡と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。（平成21年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）

## 環境基準達成状況

- 令和元年度の環境基準達成率は、一般環境大気測定局で98.7%、自動車排出ガス測定局で98.3%と改善した。

## 平成28年度から令和元年度の基礎的実験的研究報告書より

- 都内大気PM<sub>2.5</sub>中から硫酸アンモニウムだけでなく、硫酸水素アンモニウムが検出された。硫酸水素アンモニウムは、硫酸アンモニウムと同様に酸化硫黄とアンモニアから生成される物質であり、黄砂などの越境汚染による影響が示唆されているが、実態はほとんど報告されていない。

# 目的

## 硫酸水素アンモニウムについて

- ・硫酸水素アンモニウムは硫酸アンモニウムよりも酸性度が高い。
- ・硫酸アンモニウム系粒子によるぜん息発作への関連が報告されており、硫酸アンモニウムよりも呼吸器に強い影響を及ぼす可能性が考えられる。
- ・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あるいは感染症の増悪影響、気道粘液線毛のクリアランス効率や肺胞マクロファージの機能を検討した報告がある。

しかし…

- 一般毒性試験や、免疫系への詳しい影響調査、培養細胞を用いた実験は行われていない。
- 硫酸水素アンモニウムの呼吸器等への影響はほとんど明らかになっていない。
- 大気PM中の硫酸水素アンモニウム濃度を測定した報告は少ない。

都内大気PM中硫酸水素アンモニウム濃度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。

(報告書 1ページ)

# 調査実施概要 ①

- **都内大気PM中の硫酸水素アンモニウムの実態調査(令和4年度、令和5年度)【第2章】**  
硫酸水素アンモニウムは黄砂などに関連し、黄砂飛来時には粒径4  $\mu\text{m}$ 以上の粗大粒子が増加することから、PM<sub>2.5</sub>だけでなく、それ以上の粒子径についても測定対象とし、都内大気PM中の硫酸水素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。東京都健康安全研究センターにおいて1年間、大気中PMを1週間採取、測定を継続して行い、得られた硫酸水素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。
- **培養細胞への硫酸水素アンモニウムばく露実験(令和2年度から令和4年度)【第3章】**  
ヒト肺胞上皮由来A549細胞及びヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いて、硫酸水素アンモニウムを気相ばく露又は液相ばく露し、細胞傷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、還元型グルタチオン及び活性酸素種(ROS)、細胞膜間結合力を評価するための経上皮電気抵抗(TEER)等を測定することにより、生体への影響を考察した。

# 調査実施概要 ②

## ○ マウスへの硫酸水素アンモニウム吸入ばく露実験(令和3年度から令和5年度)

### 【第4章】

硫酸水素アンモニウムの一般毒性評価と、OVA感作による実験的ぜん息症状に及ぼす増悪影響を調べるために、正常マウスを用いた硫酸水素アンモニウムの単回及び28日間反復の吸入ばく露実験、及びぜん息モデルマウスへの2週間反復ばく露実験を行った。さらに、ぜん息患者の呼吸機能への影響が報告されていることから、呼吸機能解析装置を用いて、正常マウス及びぜん息モデルマウスに対する硫酸水素アンモニウム等をばく露した後の即時的な呼吸機能の評価、及びばく露後に気道収縮薬を投与した気道過敏性試験を実施した。

# 第2章 都内大気中PM中の 硫酸水素アンモニウムの実態調査

令和6年2月

# 調査の概要

1. 都内大気中PM中硫酸水素アンモニウムの連続測定
2. PM<sub>2.5</sub>中硫酸水素アンモニウムと大気汚染物質等との関連
3. PM<sub>2.5</sub>中硫酸水素アンモニウムと気象要素及び黄砂との関連

# 1. 都内大気中PM中硫酸水素アンモニウムの連続測定

- 調査の概要
- 硫酸水素アンモニウムの分別定量法
- PM中硫酸水素アンモニウム濃度の推移
- PM中硫酸水素アンモニウム濃度

# 調査の概要

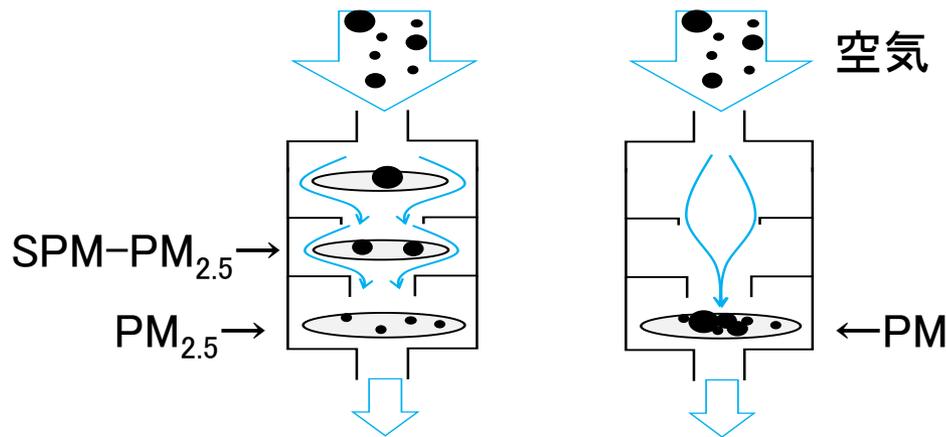
調査期間: 令和4年8月3日から令和5年8月2日

1週間毎にフィルターを交換し、連続して採取

採取場所: 東京都健康安全研究センター(新宿区)地上1か所

採取装置: 慣性衝突式分粒装置(NWPS-35HS、柴田科学社製)

採取方法:  $PM_{2.5}$  及びSPM採取法(図左) 及びPM採取法(図右)



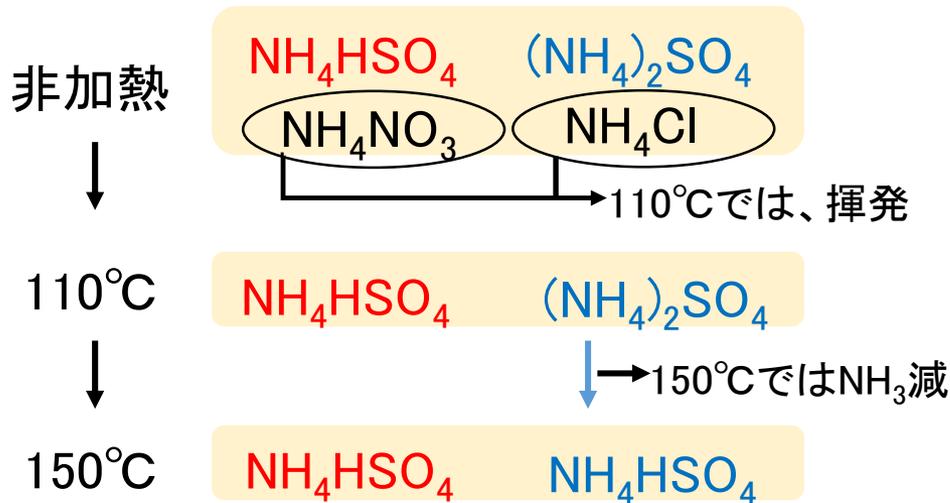
慣性衝突式分粒装置の構成図

# 硫酸水素アンモニウムの分別定量法

	粒子粒径	前処理
大気採取後の フィルター	PM <sub>2.5</sub>	フィルターを1/2に切断：110℃用2枚、150℃用2枚
	SPM-PM <sub>2.5</sub>	フィルターを切断せず：110℃用1枚、150℃用1枚
	PM	フィルターを切断せず：110℃用1枚、150℃用1枚

各片を110℃又は150℃で30分加熱処理し、超純水で抽出後、アンモニウムイオン(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)濃度を測定し、1週間平均濃度を算出

〈各アンモニウム塩の加熱による変化〉

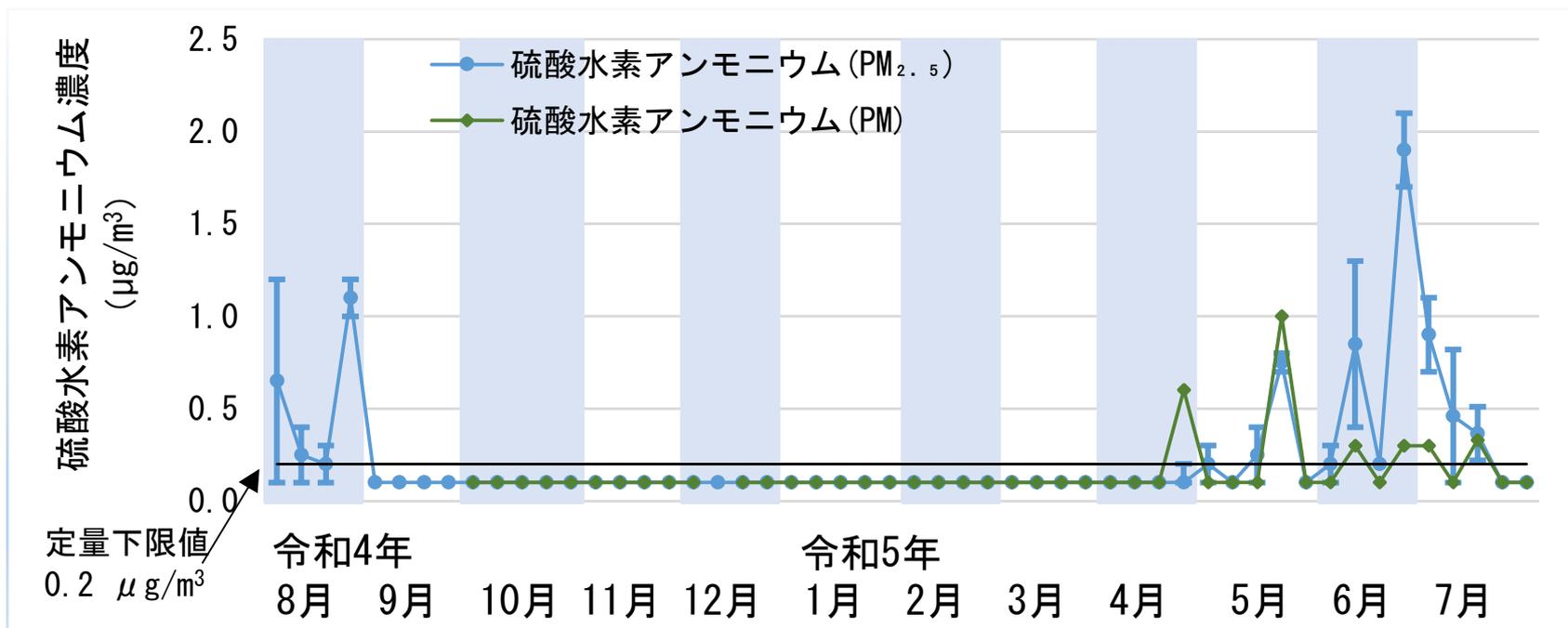


〈濃度の算出方法〉

- ① 110℃と150℃のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>量の差から、硫酸アンモニウム濃度を算出
- ② 110℃の残りのNH<sub>4</sub><sup>+</sup>量から、硫酸水素アンモニウム濃度を算出

(報告書 5ページ)

# PM中硫酸水素アンモニウム濃度の推移



- 濃度は週平均値
- PM<sub>2.5</sub>中濃度について、プロットはn=2の平均濃度、エラーバーはn=2の各濃度を示す
- PM<sub>2.5</sub>中濃度は、n=2のうちいずれかが定量下限値(0.2 µg/m<sup>3</sup>)以上、かつ平均濃度が定量下限値以上の場合を検出とした

- 令和4年8月及び令和5年5月から7月の春から夏に検出され、9月から3月には検出されなかった

# PM中硫酸水素アンモニウム濃度

	PM <sub>2.5</sub> **	SPM-PM <sub>2.5</sub>	PM
検出率	27% (14/52week)	0% (0/50week)	14% (6/43week)
平均濃度±標準偏差*	0.6±0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		0.5±0.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
最小-最大濃度*	0.2-1.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$		0.3-1.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

- 濃度は週平均値
- \*検出された14回又は6回の測定値を使用した
- \*\*PM<sub>2.5</sub>中濃度は、n=2のうちいずれかが定量下限値(0.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )以上、かつ平均濃度が定量下限値以上の場合を検出とした

- 検出率は、PM<sub>2.5</sub>から27%、SPM-PM<sub>2.5</sub>から0%、PMから14%で、**主にPM<sub>2.5</sub>中に存在することが分かった**
- この結果より、以降の解析にはPM<sub>2.5</sub>中濃度を用いることとした

## 2. PM<sub>2.5</sub>中硫酸水素アンモニウムと大気汚染物質等との関連

- 大気汚染物質等との関連(単相関係数)

# 大気汚染物質等との関連(単相関係数)

	PM <sub>2.5</sub> 中硫酸水素アンモニウム濃度		PM <sub>2.5</sub> 中硫酸水素アンモニウム <sup>1)</sup>
	I	II	I
PM <sub>2.5</sub> 中硫酸アンモニウム	0.573 **	—	0.466 **
SO <sub>2</sub>	0.149	0.216	0.046
NO <sub>x</sub>	-0.251	-0.299 *	-0.417 **
O <sub>x</sub>	0.351 *	0.476 **	0.462 **
SPM	0.508 **	0.262	0.488 **
PM <sub>2.5</sub>	0.333 *	0.147	0.223

\*\* p<0.01、\* p<0.05

I 大気汚染物質濃度は1時間値の週平均値を使用

II 大気汚染物質濃度は1時間値の週最大値を使用

1) 硫酸水素アンモニウムの検出の有無との関連を見るため、定量下限値以上の濃度を1、定量下限値未満を0として解析。大気汚染物質濃度は1時間値の週平均値(I)を使用

※1 硫酸水素アンモニウム濃度及び硫酸アンモニウム濃度は週平均値

※2 大気汚染物質濃度は一般局(中野区若宮)の測定値を使用

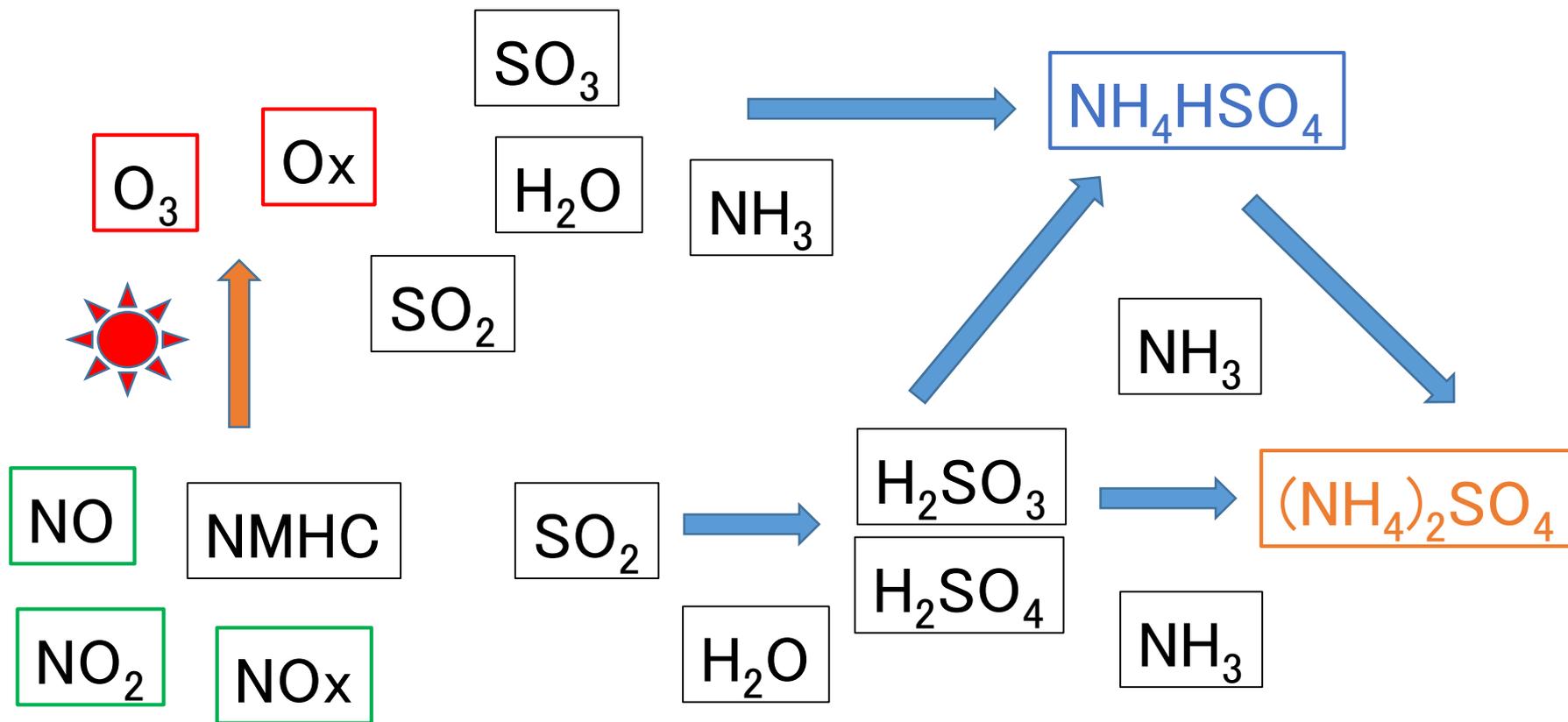
# 大気汚染物質等との関連(単相関係数)

	PM <sub>2.5</sub> 中硫酸水素アンモニウム濃度		PM <sub>2.5</sub> 中硫酸水素アンモニウム <sup>1)</sup>
	I	II	I
PM <sub>2.5</sub> 中硫酸アンモニウム	0.573 **	—	0.466 **
SO <sub>2</sub>	0.149	0.216	0.046
NO <sub>x</sub>	-0.251	-0.299 *	-0.417 **
O <sub>x</sub>	0.351 *	0.476 **	0.462 **
SPM	0.508 **	0.262	0.488 **
PM <sub>2.5</sub>	0.333 *	0.147	0.223

\*\* p<0.01、\* p<0.05

- 週平均値との関連は、硫酸アンモニウム、O<sub>x</sub>、SPM及びPM<sub>2.5</sub>との間に有意な相関
- 週最大値との関連について、週平均値との関連よりも相関が強くなったのは、NO<sub>x</sub>及びO<sub>x</sub>
- 検出の有無との関連について、硫酸アンモニウム、O<sub>x</sub>及びSPMとの間に、有意な正の相関。NO<sub>x</sub>との間に負の相関
- いずれの解析法でも、O<sub>x</sub>との間に有意な相関が見られた (報告書 9から10ページ)

# 【参考】硫酸水素アンモニウムの生成機序



出典

- 東京都環境局: 平成29年度 第2回大気中微小粒子状物質検討会、光化学オキシダントとその生成機序
- Li, L. et al.: Near-Barrierless Ammonium Bisulfate Formation via a Loop-Structure Promoted Proton-Transfer Mechanism on the Surface of Water

### 3. PM<sub>2.5</sub>中硫酸水素アンモニウムと気象要素 及び黄砂との関連

- 気象要素との関連(単相関係数)
- 黄砂との関連

# 気象要素との関連（単相関係数）

	PM <sub>2.5</sub> 中硫酸水素アンモニウム濃度		PM <sub>2.5</sub> 中硫酸水素アンモニウム <sup>1)</sup>
	I	II	I
気温	0.408 **	0.438 **	0.592 **
相対湿度	0.345 *	0.188	0.381 **
降水量	-0.050	—	0.179
風速	-0.228	-0.251	-0.171

※1 気温、相対湿度及び風速は1時間値の週平均値（I）  
又は週最大値（II）を、降水量は1週間の総量（I）を使用

\*\* p<0.01、\* p<0.05

※2 気象要素は健康安全研究センターの測定値を使用

- 週平均値との関連について、**気温及び相対湿度**との間に有意な相関
- 週最大値との関連について、週平均値との関連よりも相関が強くなったのは、**気温**（0.408→0.438）
- 検出の有無との関連について、**特に気温との関連が強くなり**、気温が高いほど検出率が増加することが示唆された
- **いずれの解析法でも、気温との間に有意な相関が見られた**

# 黄砂との関連

採取期間	PM <sub>2.5</sub> 中硫酸水素 アンモニウム	SPM中Ca <sup>2+</sup>	黄砂 飛来日
R4, 8/3-8/10	0.7	0.09	
R4, 8/10-8/17	0.3	0.25	
R4, 8/17-8/24	0.2	0.20	
R4, 8/24-8/31	1.1	0.31	
R5, 4/12-4/19	ND	0.75	4/13~4/14
R5, 4/26-5/3	0.2	0.41	
R5, 5/10-5/17	0.3	0.27	
R5, 5/17-5/24	0.8	0.52	5/22~5/23
R5, 5/31-6/7	0.2	0.32	
R5, 6/7-6/14	0.9	0.23	
R5, 6/14-6/21	0.2	0.36	
R5, 6/21-6/28	1.9	0.29	
R5, 6/28-7/5	0.9	0.26	
R5, 7/5-7/12	0.5	0.40	
R5, 7/12-7/19	0.4	0.40	
平均濃度±標準偏差		0.32±0.14	

ND：定量下限値未満、単位 (μg/m<sup>3</sup>)

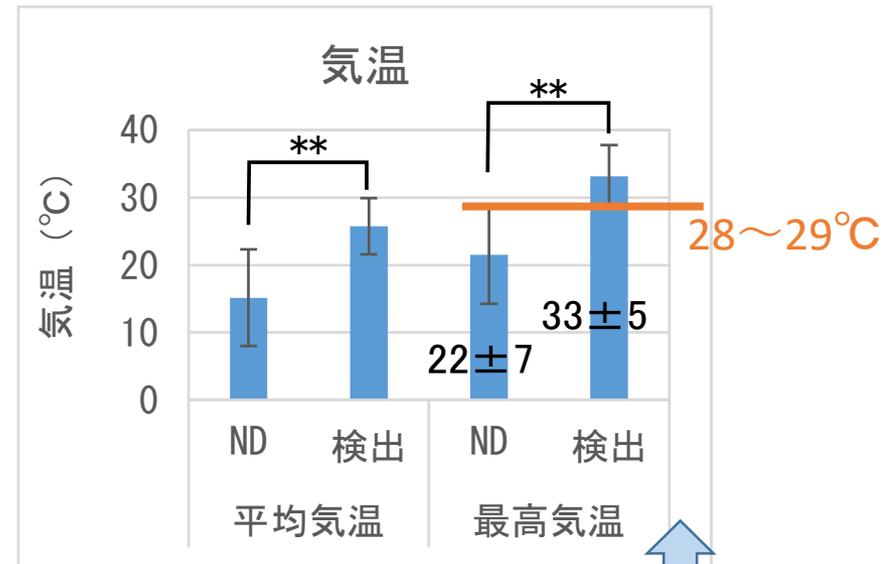
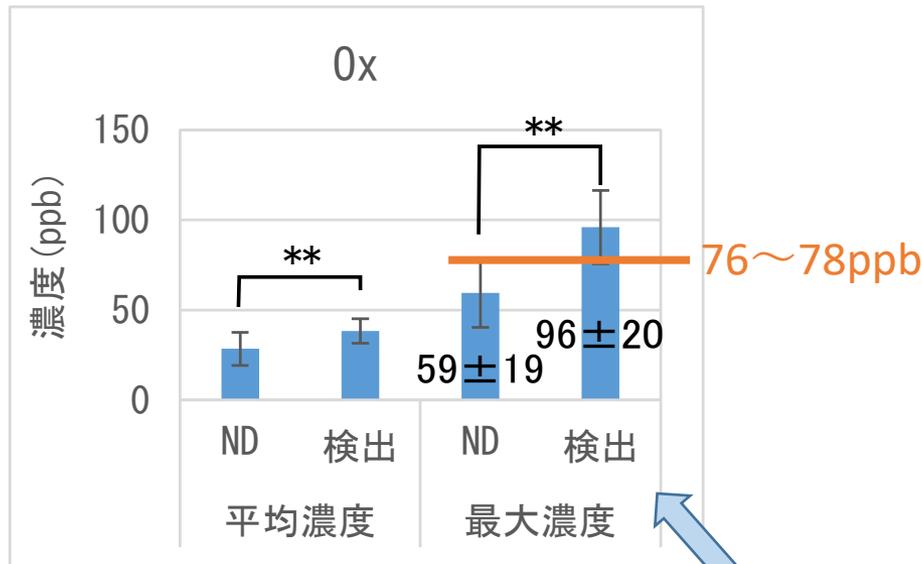
- 4月の黄砂飛来時はND、5月は0.8 μg/m<sup>3</sup>検出
- 硫酸水素アンモニウムが検出された14回中13回のSPM中Ca<sup>2+</sup>濃度は、黄砂飛来時(0.52又は0.75 μg/m<sup>3</sup>)に比べて低い
- 黄砂飛来時の硫酸水素アンモニウム濃度は、特に高くなかった

※SPM中Ca<sup>2+</sup>濃度は週平均値

(報告書 13から14ページ)

# 考察

- PM<sub>2.5</sub>中硫酸水素アンモニウムとの間で、特に関連が見られたのはOx濃度及び気温で、特に**最大値の影響が大きい**と示唆された(相関係数が上昇)
- 検出の有無(ND又は検出)における各測定値との関連を調査した結果、**Ox濃度最大値が約77ppb、最高気温が約28°Cを超えると検出率が増加する傾向が見られた**



	Oxの最大濃度 (ppb)		最高気温 (°C)	
	<77は33回	≥77は19回	<28は33回	≥28は19回
検出率(%)及び回数	9.1 (3回)	<b>57.9</b> (11回)	6.1 (2回)	<b>63.2</b> (12回)

※Ox濃度及び気温は、1時間値の週平均値又は週最大値で解析 (報告書 15から16ページ)

# まとめ

- 硫酸水素アンモニウムについて、1年間の連続測定を実施した結果、5月から8月の春から夏に検出され、検出率は約27% (14/52週)、主にPM<sub>2.5</sub>に存在することが分かった。
- 大気汚染物質等との関連について、硫酸アンモニウム、O<sub>x</sub>、SPM及びPM<sub>2.5</sub>との間に有意な正の相関が見られた。
- 気象要素との関連について、気温との間に有意な正の相関が見られた。黄砂飛来時の硫酸水素アンモニウムは、特に高濃度ではなかった。
- 硫酸水素アンモニウムの生成については、O<sub>x</sub>濃度及び気温との関連が強く、さらには週平均値よりも週最大値の影響が大きいと示唆された。
- O<sub>x</sub>濃度最大値が約77ppb、最高気温が約28°Cを超えると検出率が増加する傾向が見られた。

# 第3章 培養細胞への 硫酸水素アンモニウムばく露実験

# 実験内容

1. 気相ばく露
2. 液相ばく露
3. 感受性を高めた(炎症状態にある)A549細胞への液相ばく露
4. 酸化ストレスを誘導する因子 活性酸素種(ROS)の測定
5. Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定

# ばく露実験の概要

実験条件-1	
ばく露方法	気相ばく露 流速1.0 mL/min
培養細胞	A549細胞、 Calu-3細胞
ばく露濃度	1.0、10、100 mg/m <sup>3</sup> 、清浄空気
ばく露時間	1、2、3時間
実験条件-2	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	A549細胞、 Calu-3細胞
ばく露濃度	0.0001mg/mLから3mg/mLの範囲、超純水
ばく露時間	24時間(HO-1は3時間)
測定項目	
細胞傷害作用	細胞増殖能力、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)
網羅的遺伝子発現	IL-8、IL-6、CCL2(MCP-1)、MUC5AC 等

## 感受性を高めた(炎症状態にある)A549細胞への液相ばく露

実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	A549細胞
IL-1 $\beta$ 濃度	0.03、0.1 ng/mL、超純水
ばく露濃度	0.001、0.01、0.1、1、10 mg/mL、超純水
ばく露時間	3時間+24時間
測定項目	
細胞傷害作用	細胞増殖能力、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1
遺伝子発現	<i>IL-8</i> 、 <i>IL-6</i> 、 <i>CCL2</i> ( <i>MCP-1</i> )、 <i>MUC5AC</i>

# 酸化ストレスを誘導する因子（細胞内ROS）の測定

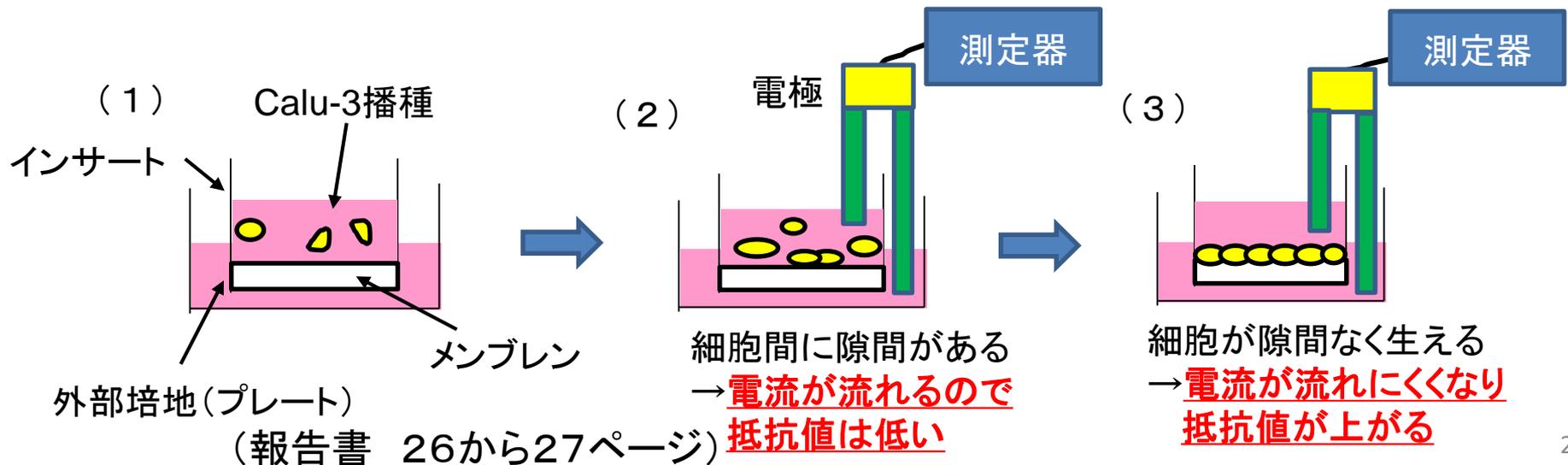
実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞
硫酸水素アンモニウム濃度 (富士フィルム和光純薬一級98%)	0.001~1 mg/mL、超純水
ばく露時間	30分から3時間、24時間、及び7、17時間
測定項目	Total ROS（過酸化水素、ヒドロキシラジカル、t-ブチルヒドロペルオキシド）
解析方法	
硫酸水素アンモニウムを細胞へばく露した時の測定値について、対照群の測定値に対する比を算出した。	

# Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定

実験条件	
培養細胞	ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度(液相ばく露)	0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/mL、超純水
ばく露時間	24時間(1,3,6,24時間後に測定)
陽性コントロール	酸化チタン 50 $\mu\text{g/mL}$
測定項目	TEER(経上皮電気抵抗)

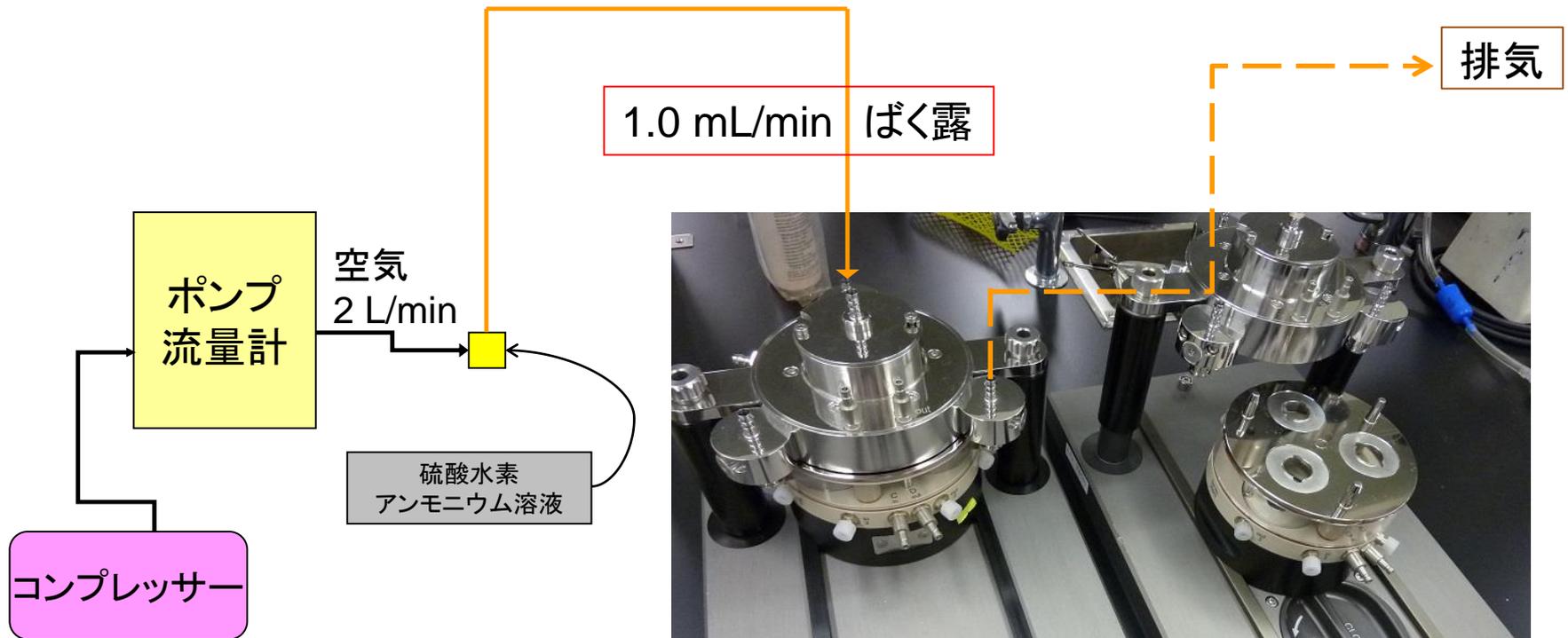
## TEER算出方法

細胞を播種したインサートの測定値から、培地のみを播種した(細胞を含まない)インサートの測定値を減算した値に、インサートの面積を乗じた単位膜面積抵抗( $\Omega\text{cm}^2$ )とした。



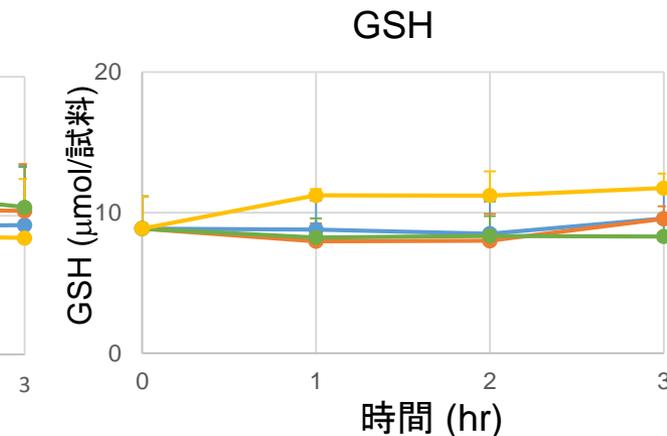
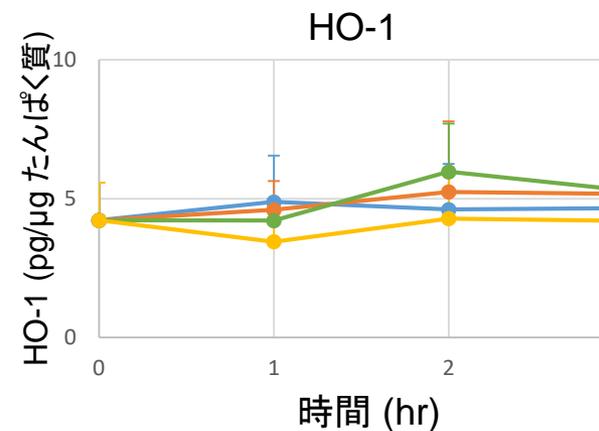
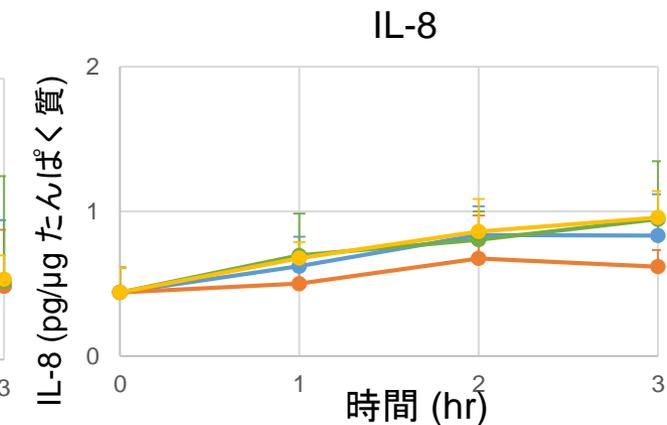
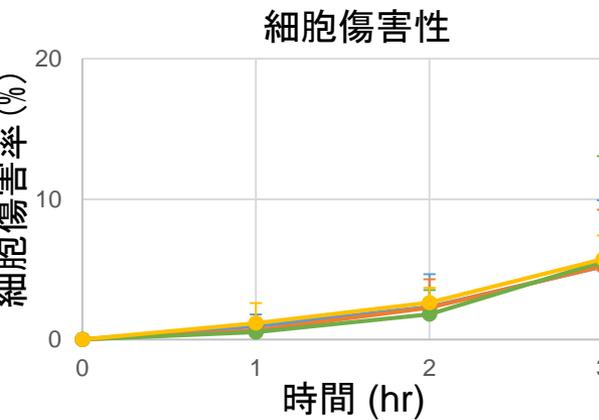
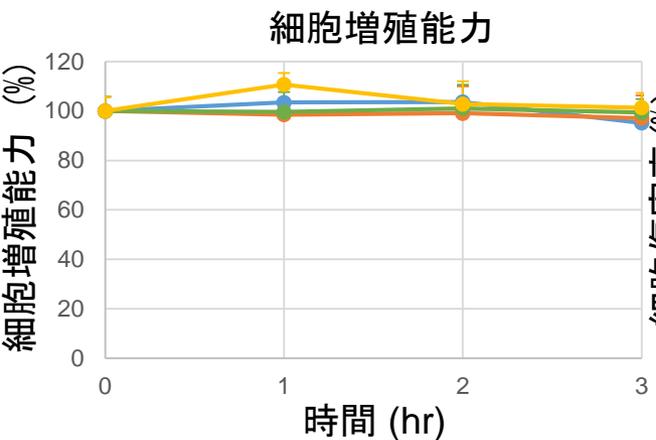
# 気相ばく露実験について

## 気相ばく露装置模式図



培養細胞ばく露装置 Cultex® RFS

# A549細胞への気相ばく露結果



IL-6; 不検出

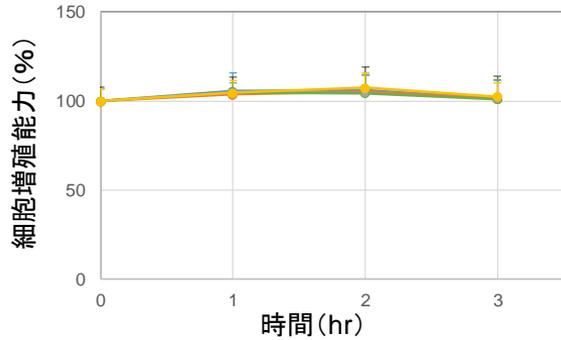
全項目で変化なし

●; 対照群、●; 低濃度群(1 mg/mL)、●; 中濃度群(10 mg/mL)、●; 高濃度群(100 mg/mL)

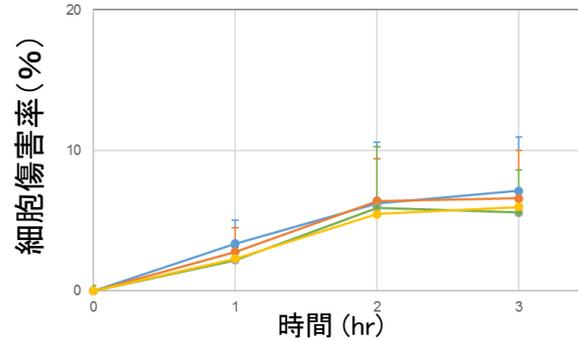
(n=9)

# Calu-3細胞への気相ばく露結果

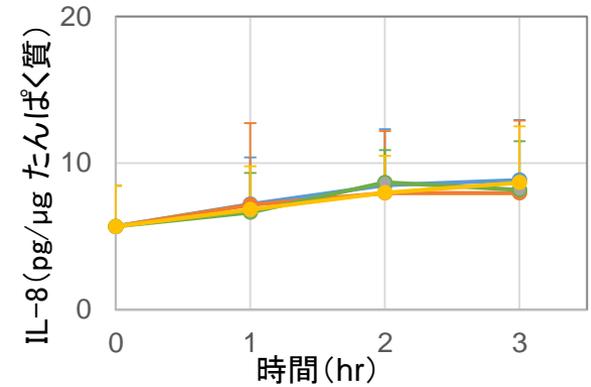
細胞増殖能力



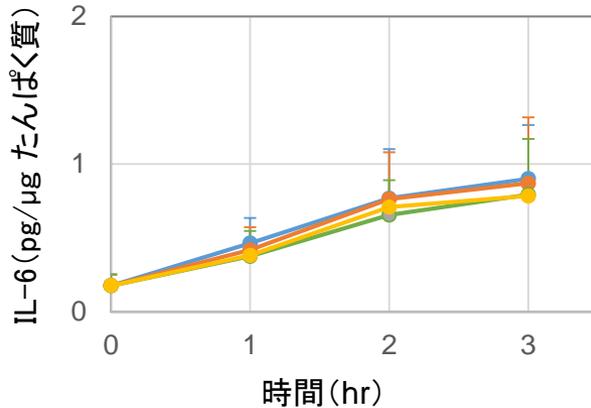
細胞傷害性



IL-8

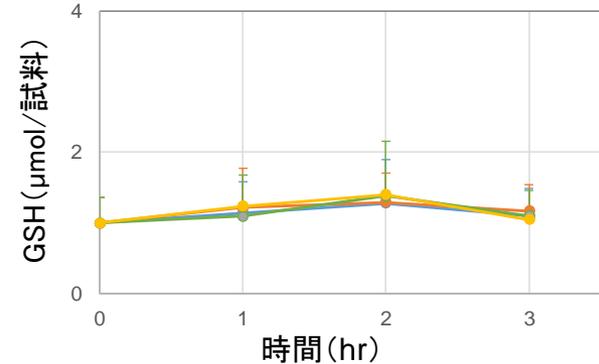


IL-6



HO-1; 不検出

GSH

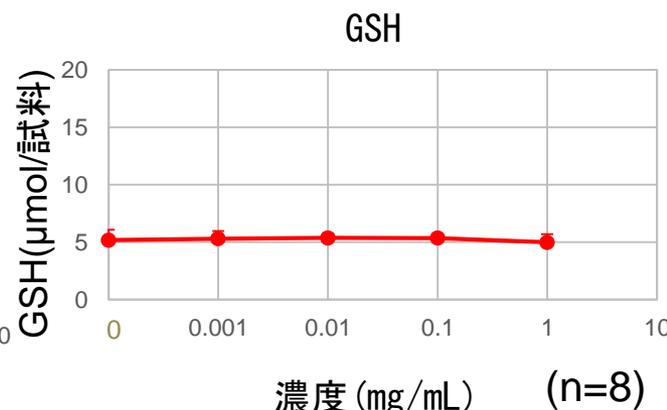
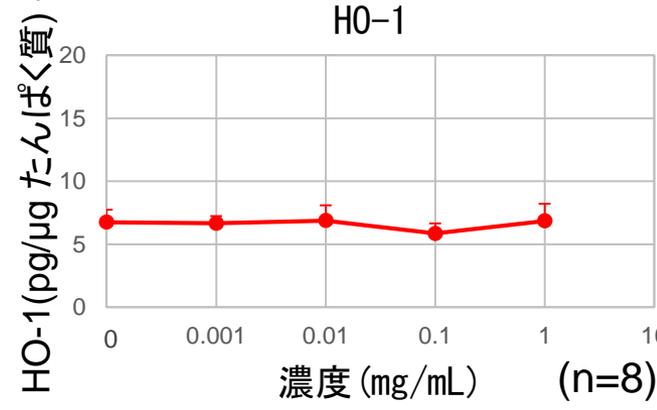
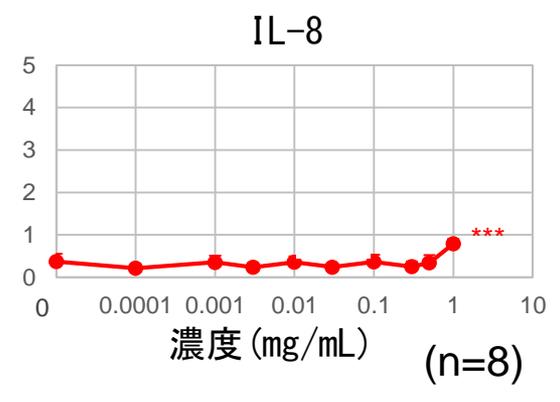
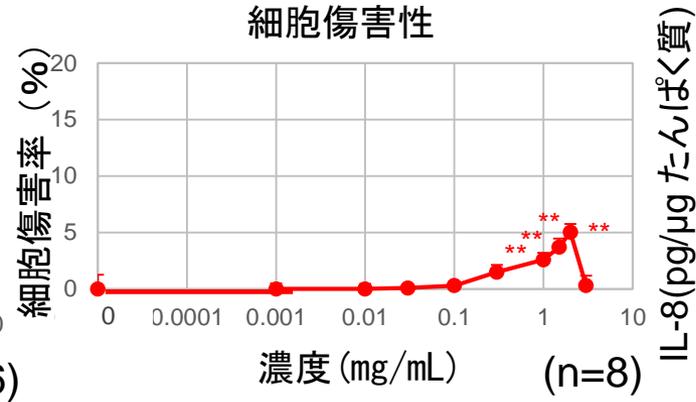
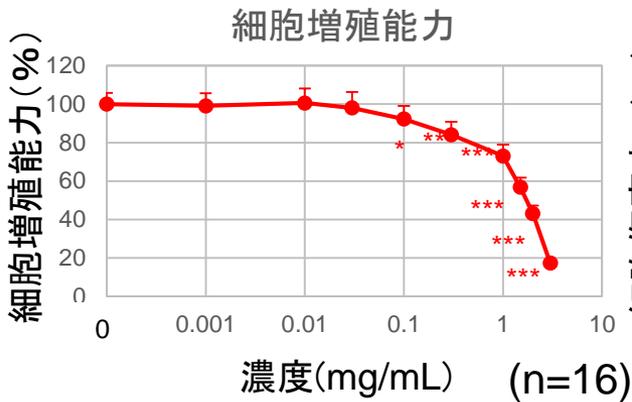


(n=9)

全項目; 変化なし

●; 対照群、●; 低濃度群(1 mg/mL)、●; 中濃度群(10 mg/mL)、  
●; 高濃度群(100 mg/mL)

# A549細胞液相ばく露実験結果(1)

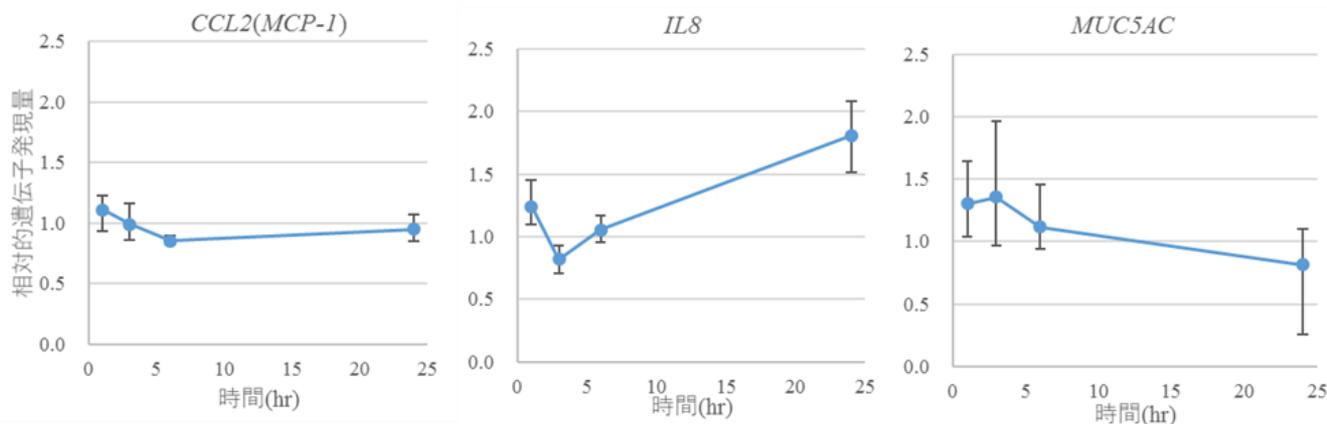


IL-6; 不検出

細胞増殖能力; 0.1 mg/mL以上で減弱  
 細胞傷害性: 0.3 mg/mLから2 mg/mLで増強、3 mg/mLで減弱  
 IL-8: 1 mg/mLで増強  
 HO-1、GSH: 変化なし

\*\*; p<0.01、  
 \*\*\*; p<0.001

## A549細胞液相ばく露実験結果(2)



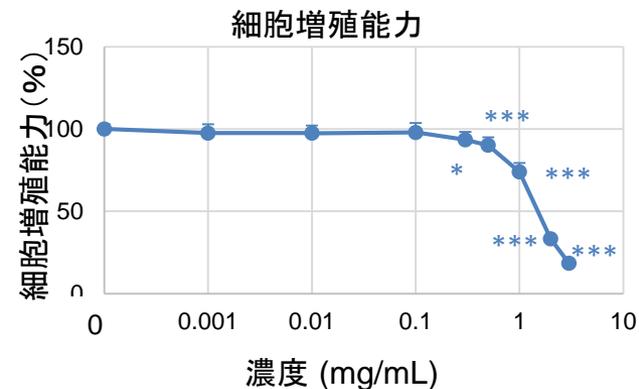
(n=3)

0.3 mg/mL硫酸水素アンモニウムをばく露

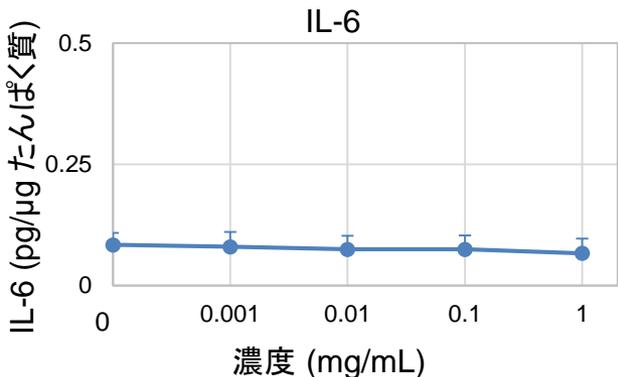
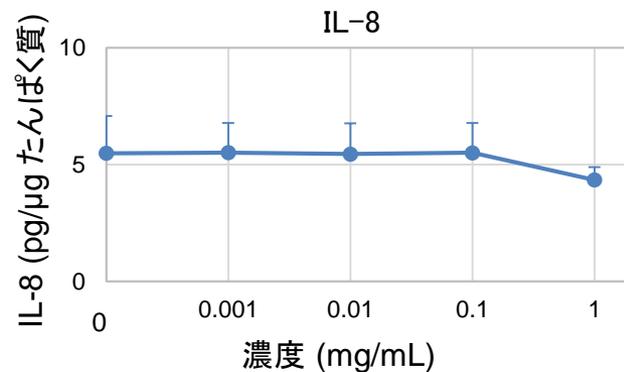
- *IL-8* : 24時間ばく露で発現量が約2倍に増強  
→ たんぱく質の発現と同様の傾向
- *MUC5AC* 及び *CCL2(MCP-1)* : 大きな変化なし
- これら以外の遺伝子 (*IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-13*, *IL-25*, *IL-33*, インターフェロン $\gamma$ , *TSLP*) は変化なし

(報告書 30ページ)

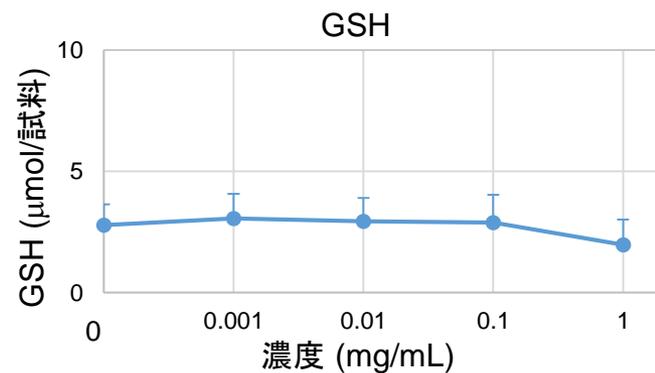
# Calu-3細胞液相ばく露実験結果(1)



LDH; 不検出



HO-1; 不検出

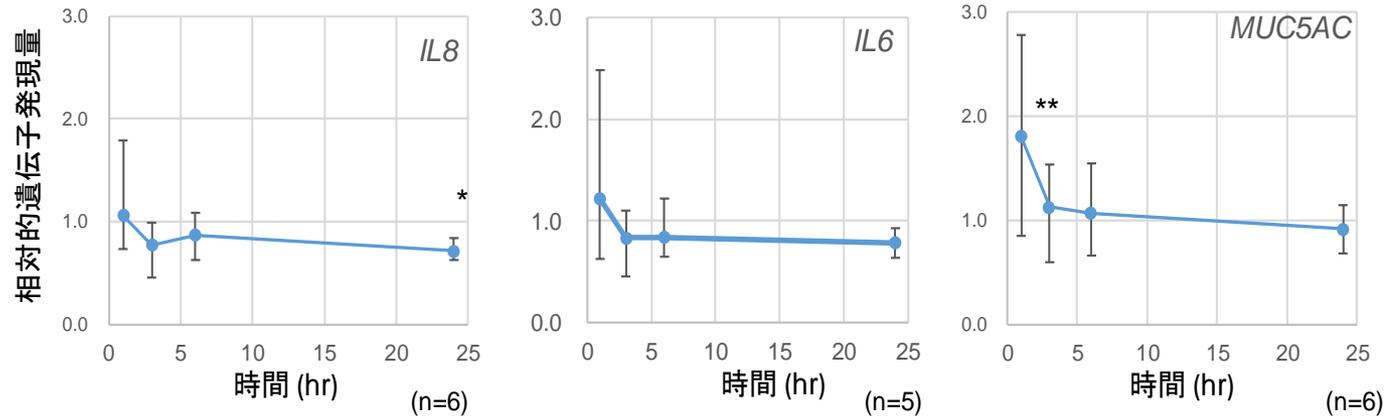


(n=12)

細胞増殖能力; 0.3 mg/mL以上で減弱  
IL-8、IL-6:、GSH; 変化なし

\*; p<0.05、\*\*\*; p<0.001

## Calu-3細胞液相ばく露実験結果(2)

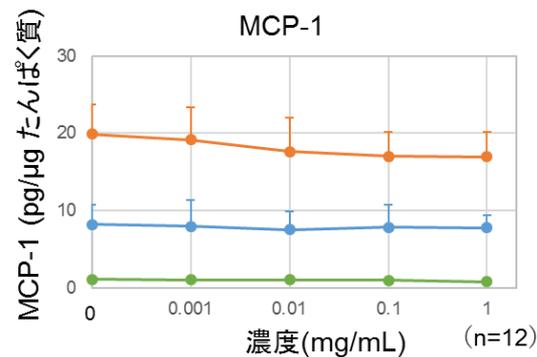
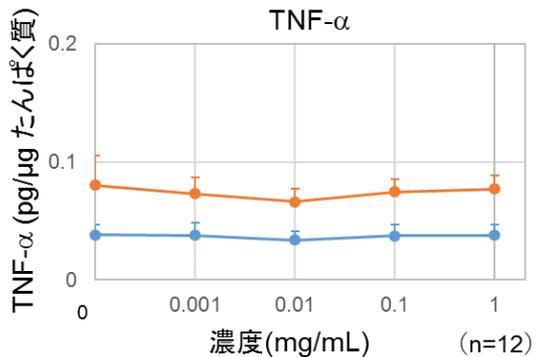
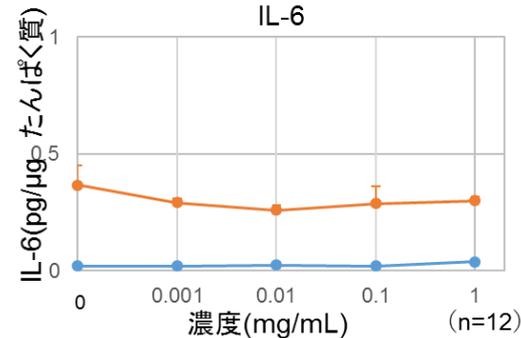
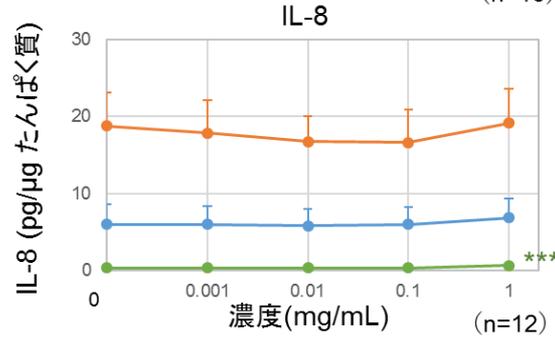
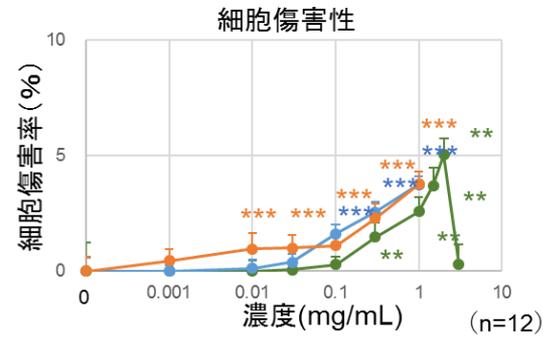
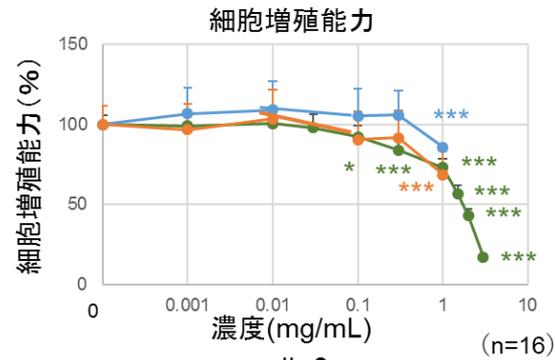


0.3 mg/mL硫酸水素アンモニウムばく露

\*; p<0.05、\*\*; p<0.01

- *IL-8*は、ばく露24時間で発現量が減弱した。
- *MUC5AC*は、ばく露1時間で発現量が増強した。
- これら以外の遺伝子、*IL-4*、*IL-5*、*IL-13*、*IL-25*、*IL-33*、インターフェロン- $\gamma$ 、*TSLP* (*thymic stromal lymphopoietin*)、*CCL2* (*MCP-1*) は、変化なし。

# 感受性を高めた(炎症状態にある)A549細胞への液相ばく露

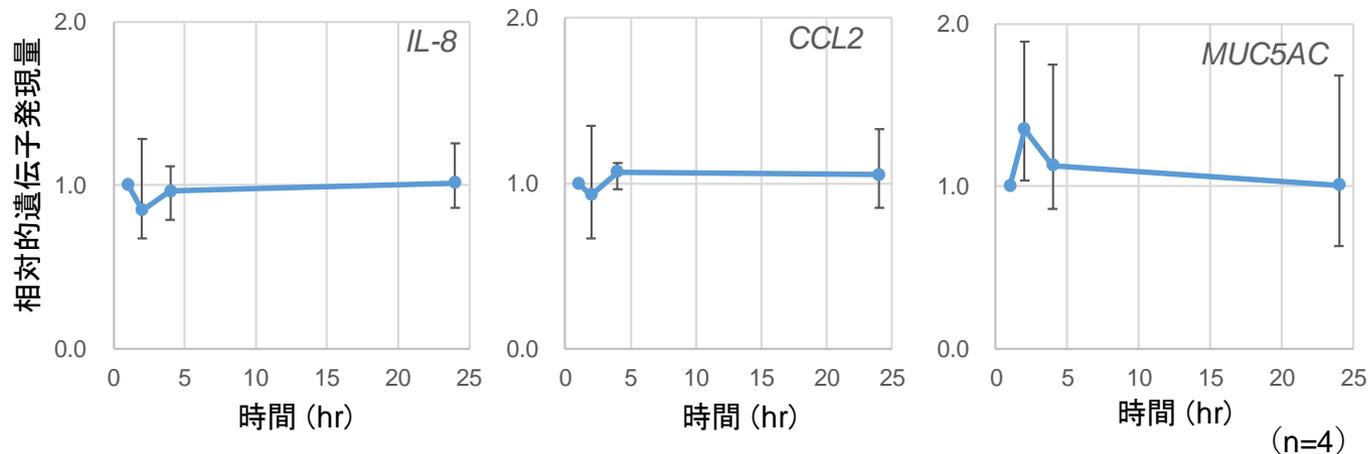


\*; p<0.05、  
 \*\*; p<0.01、  
 \*\*\*; p<0.001

- ; IL-1β 0 ng/mL、
- ; IL-1β 0.03 ng/mL、
- ; IL-1β 0.1 ng/mL

細胞増殖能力; 1 mg/mL以上で、IL-1β濃度に係わらず減弱  
 細胞傷害性; 0.03 ng/mL IL-1β ばく露では0.1 mg/mL以上、  
 0.1 ng/mL IL-1βばく露では0.01 mg/mL以上で減弱  
 IL-8、IL-6、TNF-α、MCP-1; 変化なし (報告書 32ページ) 36

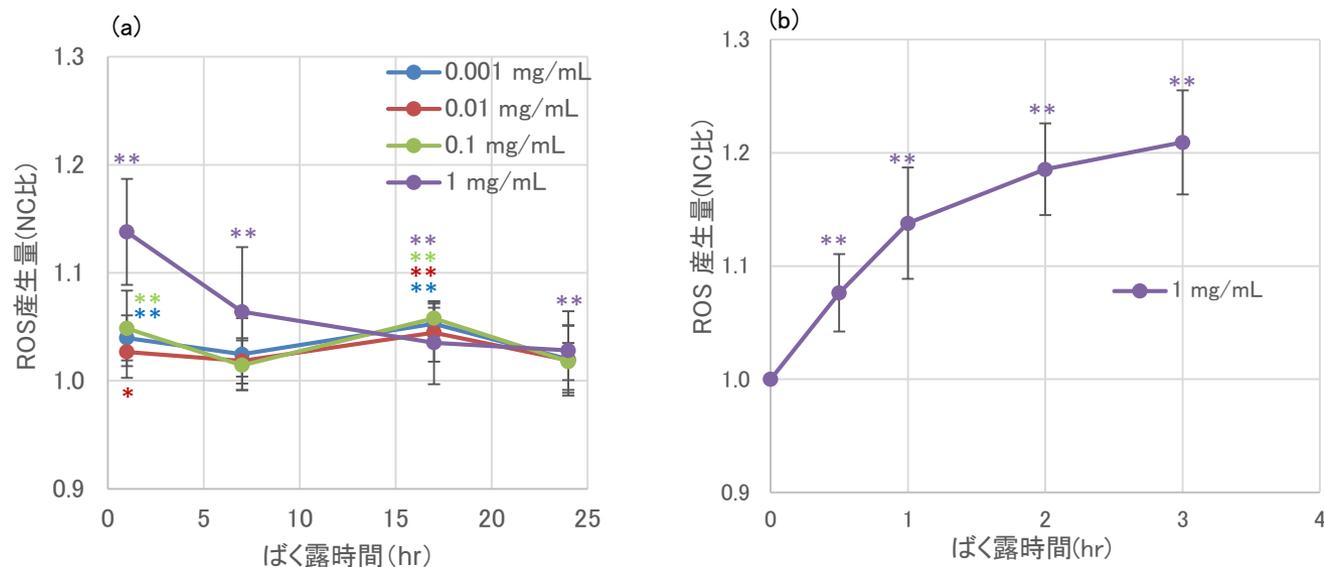
# 感受性を高めた(炎症状態にある)A549細胞への液相ばく露



0.03 ng/mL IL-1 $\beta$ をばく露後、  
0.3 mg/mL硫酸水素アンモニウムをばく露

全ての遺伝子で発現量に変化なし

# 酸化ストレスを誘導する因子 (ROS) の測定



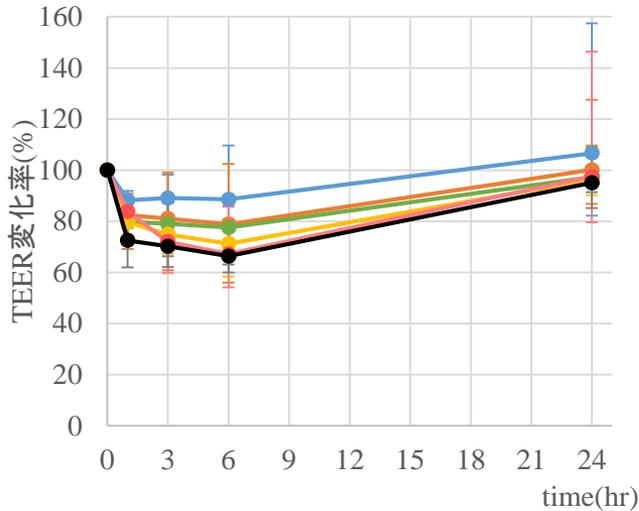
## 図(a)

- ・いずれのばく露濃度においても、ROS産生量のわずかな増加が見られた
- ・1 mg/mLについては、1時間及び7時間ばく露において、有意なROS産生量増加が確認された

## 図(b) (短時間ばく露における産生量の変化)

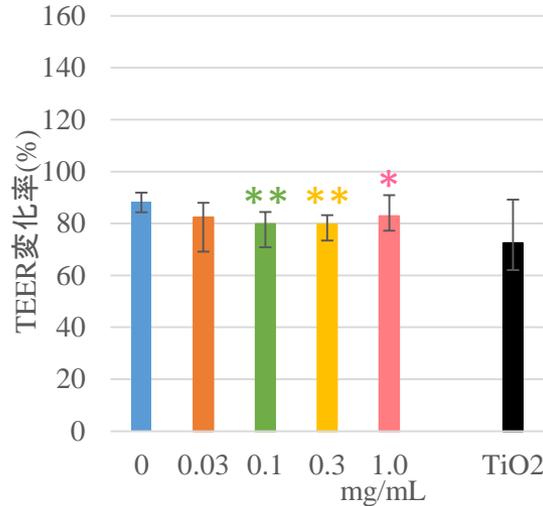
- ・1時間では1.0から1.14、2時間では1.14から1.19、3時間では1.19から1.21となった
- ・ばく露後2時間以降もROS産生が継続する
- ・ばく露直後(1時間以内)にROS産生量が多い

# Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定

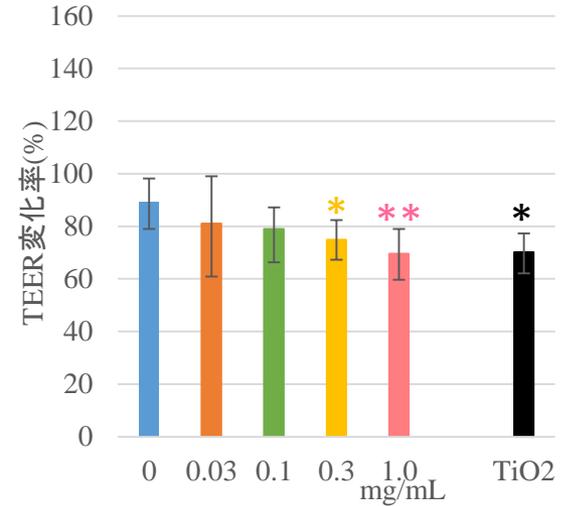


- ・時間経過により一過性にTEER低下
- ・低下割合は濃度依存傾向
- ・24時間後には回復(90~100%超)
- ・細胞膜間結合力に即時的な影響を及ぼす可能性

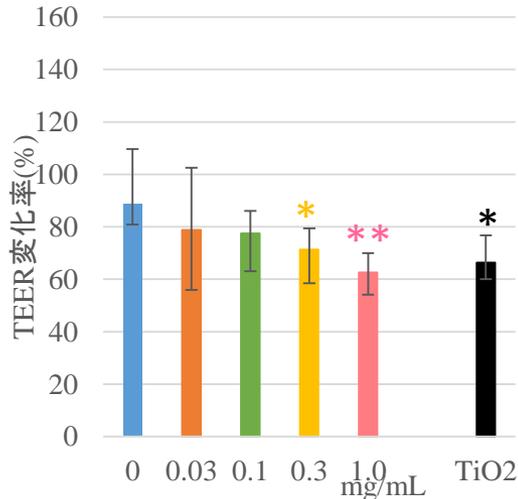
ばく露1時間



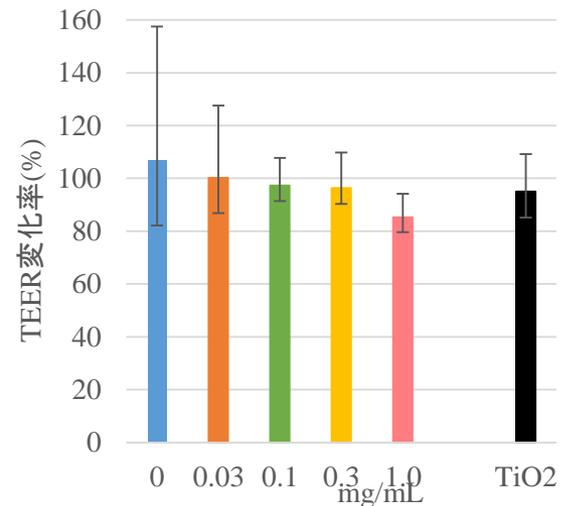
ばく露3時間



ばく露6時間



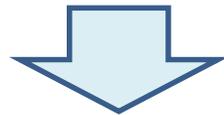
ばく露24時間



\*;p<0.05、\*\*;p<0.01 (n=5) (報告書 34から35ページ)

# 考 察

- ・気相ばく露において、高濃度(100 mg/m<sup>3</sup>、大気濃度の53,000倍)までばく露した結果、細胞増殖及び細胞傷害性、炎症、酸化ストレスに関与する全ての項目で変化がなかった。また、液相ばく露において、炎症及び粘液遺伝子発現に大きな変化はなかった。
- ・感受性を高めた培養細胞へ液相ばく露したが、炎症因子を増悪させる作用はなかった。
- ・A549細胞への短時間ばく露でROS産生増加が見られたが、細胞の生存に関与するレベルの増加ではないと推察した。
- ・Calu-3細胞への液相ばく露3時間及び6時間において、ばく露濃度に依存してTEERが低下する傾向が見られたが、ばく露24時間後にはTEERは回復した。



硫酸水素アンモニウムの大気濃度レベルでの培養細胞への影響は  
極めて少ないと考えられる

# 第4章 マウスへの硫酸水素アンモニウム吸入ばく露実験

## 第1節 単回ばく露実験及び28日間吸入ばく露実験

# 目的

- 1970年代から80年代にかけての疫学研究等から、硫酸塩に健康影響の疑いがあることが示されているが、硫酸塩のエアロゾル吸入の毒性研究についてはデータが限られている
- 硫酸水素アンモニウムは、酸性度が高いことから、動物の呼吸器上皮への刺激作用・障害作用が高いことが推測される。
- 呼吸器毒性については、ぜん息あるいは感染症の増悪影響、また、気道線毛のクリアランス効率や肺胞マクロファージの機能を検討した報告があるが、急性吸入毒性や3濃度以上を設定した一般的な吸入毒性試験の報告はなされていない。



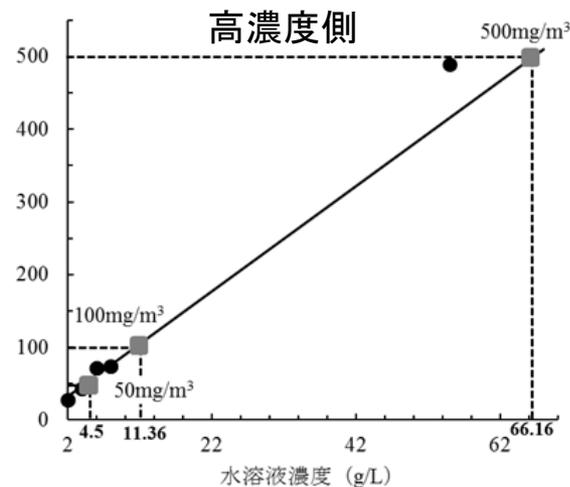
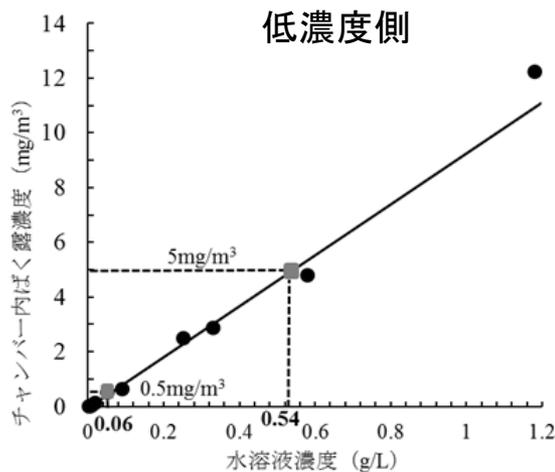
硫酸水素アンモニウムのマウスにおける詳細な吸入毒性データを取得するため、単回ばく露実験と28日間の反復ばく露実験を行った。

(報告書 40ページ)

# ばく露装置



## ばく露濃度の設定



(報告書 56から57ページ)

# 単回ばく露実験

動物	BALB/c マウス 8週齢 雌雄3匹ずつ
被験物質	硫酸水素アンモニウム (富士フィルム和光純薬：純度99.9%、014485-100、CAS：7803-63-6)
ばく露濃度	50 mg/m <sup>3</sup> (4.50 g/L) 100mg/m <sup>3</sup> (11.36 g/L) 500mg/m <sup>3</sup> (66.16 g/L)
ばく露条件	鼻部吸入ばく露 3時間/日 同じ動物に対して、順次濃度を上げてばく露 各濃度のばく露の間に7日間の回復期間 500 mg/m <sup>3</sup> のばく露翌日に剖検した
評価項目	急性症状の観察、病理組織学的解析、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の白血球細胞の解析

- 急性症状、その他の異常、死亡例は認められなかった。
- ばく露の影響を疑う体重の増減は認められなかった。
- BALF中の白血球の細胞分画の内訳は、大半がマクロファージであった。
- 鼻腔、気管及び肺実質の病理組織像は、過去の無処置マウスの検査結果と比べて著変はなく、ばく露の影響は認められなかった。  
(報告書 42、45、46ページ)

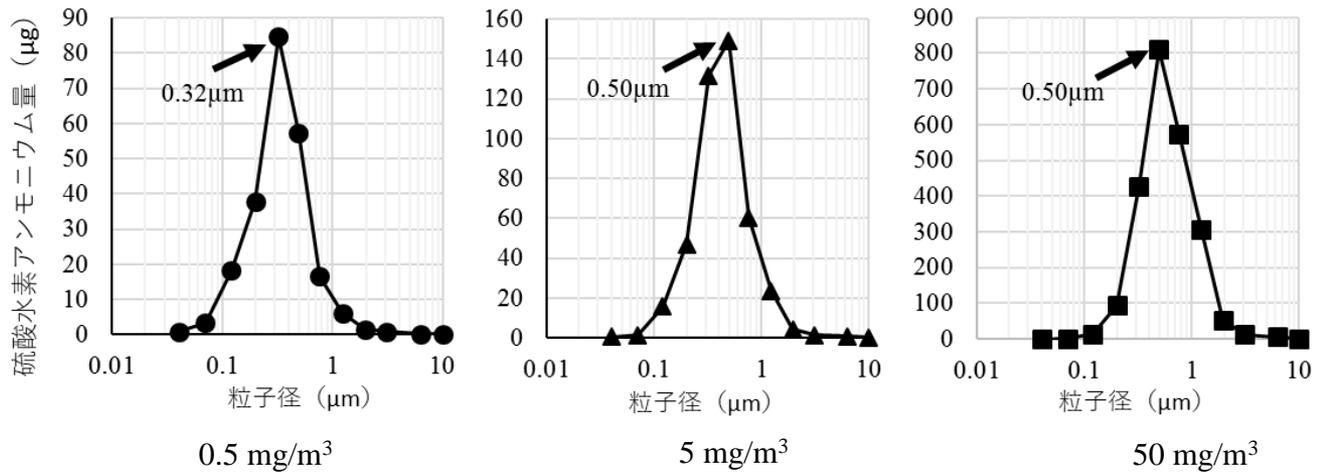
# 28日間反復ばく露実験

## 実験概要

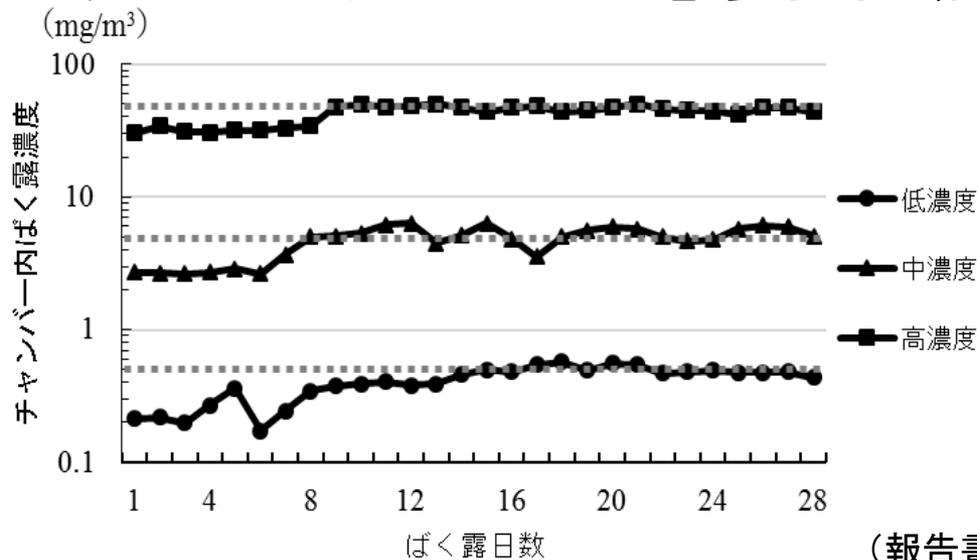
動物	BALB/c マウス 8週齢 雄24匹・雌24匹			
群構成	対照群	0 mg/m <sup>3</sup> (超純水)	雄 6匹	雌 6匹
	低濃度群	0.5 mg/m <sup>3</sup>	6匹	6匹
	中濃度群	5 mg/m <sup>3</sup>	6匹	6匹
	高濃度群	50 mg/m <sup>3</sup>	6匹	6匹
被験物質	硫酸水素アンモニウム (富士フィルム和光純薬：純度99.9%、014485-100、CAS:7803-63-6)			
ばく露条件	吸入鼻部ばく露、3時間/日、28日間連続ばく露 最終ばく露の翌日に剖検			

(報告書 42から43ページ)

# 硫酸水素アンモニウムの粒子径



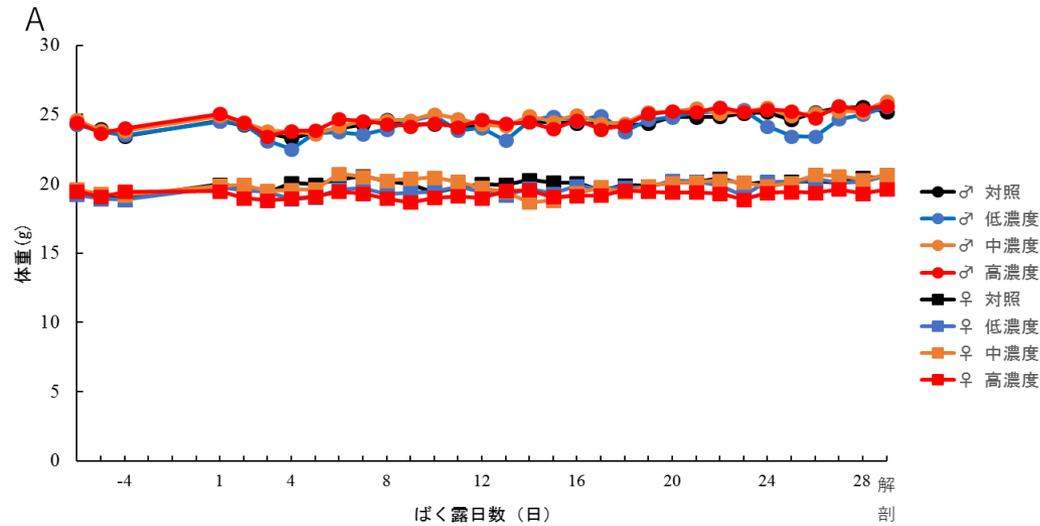
# チャンバー内のばく露濃度推移



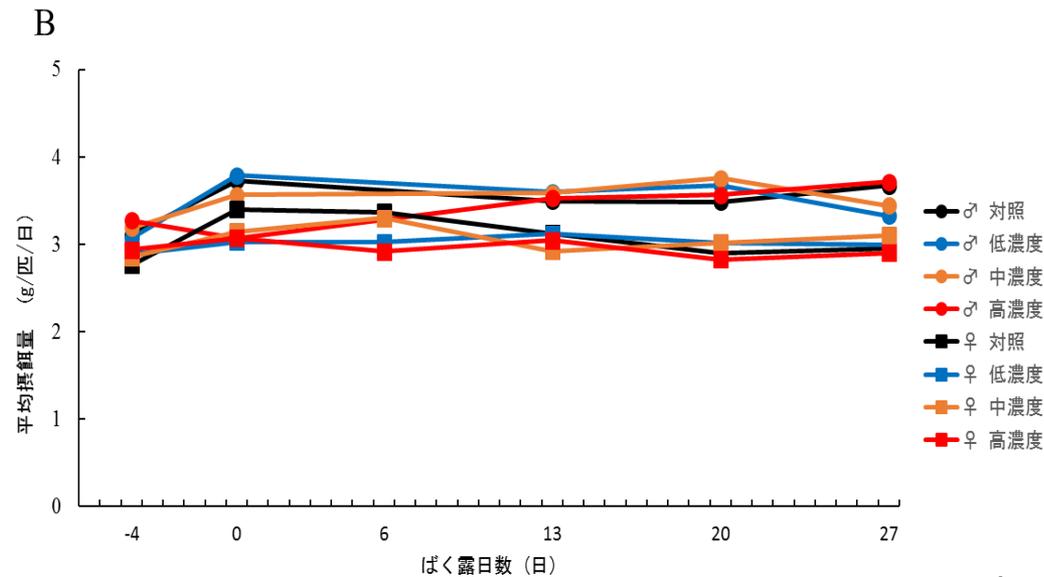
(報告書46から47 ページ)

# 実験中の体重及び摂餌量

体重



摂餌量



(報告書 47ページ)

# 解剖時の体重と臓器重量

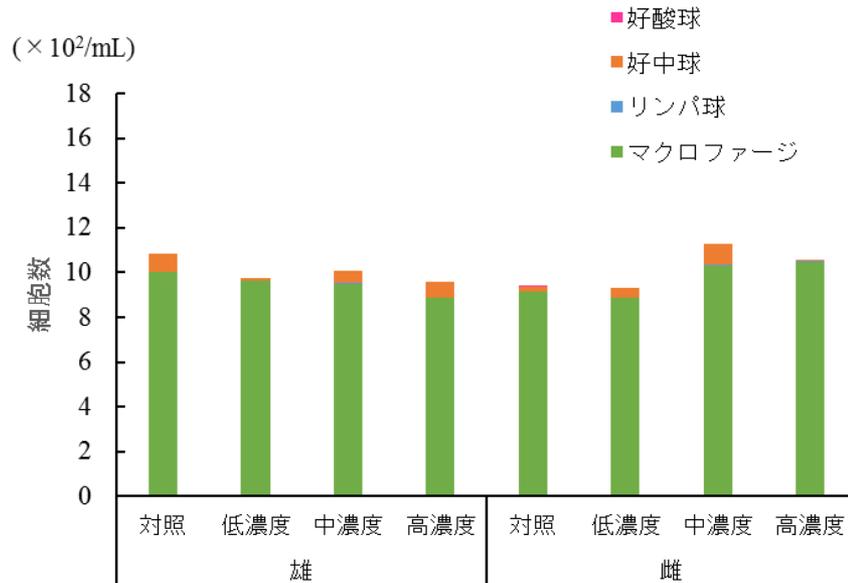
	対照	低濃度	中濃度	高濃度
<b>雄</b>				
最終体重 (g)	25.9 ± 1.5	25.4 ± 0.98	26.4 ± 1.2	25.6 ± 1.8
肺 (mg)	126.9 ± 11	129.2 ± 15	135.9 ± 9.6	140.0 ± 21
胸腺 (mg)	33.7 ± 6.5	29.8 ± 6.5	31.4 ± 5.0	29.1 ± 7.0
肝臓 (mg)	1336.5 ± 120	1337.0 ± 86	1408.5 ± 55	1330.6 ± 140
脾臓 (mg)	87.4 ± 14	84.4 ± 11	78.2 ± 6.6	88.7 ± 4.3
腎臓 (mg)	377.0 ± 22	382.9 ± 15	379.3 ± 10	387.5 ± 33
副腎 (mg)	4.6 ± 1.1	4.5 ± 0.82	4.1 ± 0.60	4.8 ± 0.64
心臓 (mg)	116.4 ± 6.6	118.1 ± 11.9	113.5 ± 6.4	113.4 ± 8.9
精巣 (mg)	157.1 ± 8.7	164.0 ± 10.3	168.9 ± 9.3	160.8 ± 11
脳 (mg)	428.9 ± 21	430.5 ± 7.0	419.3 ± 9.6	431.9 ± 10
<b>雌</b>				
最終体重 (g)	20.4 ± 1.4	20.4 ± 1.1	20.8 ± 0.7	19.6 ± 1.1
肺 (mg)	116.4 ± 4.5	111.8 ± 9.1	117.6 ± 13	112.3 ± 13
胸腺 (mg)	46.1 ± 7.1	41.4 ± 8.3	40.3 ± 6.9	37.5 ± 6.8
肝臓 (mg)	1007.6 ± 54	1041.6 ± 98	1048.3 ± 73	986.4 ± 34
脾臓 (mg)	85.1 ± 11	79.5 ± 8.8	77.0 ± 8.0	82.6 ± 8.4
腎臓 (mg)	273.0 ± 14	264.6 ± 28	269.9 ± 16	269.2 ± 14
副腎 (mg)	6.1 ± 0.46	6.5 ± 1.5	7.3 ± 0.52	7.3 ± 1.5
心臓 (mg)	94.4 ± 11	88.1 ± 7.6	90.5 ± 4.9	91.5 ± 7.0
卵巣 (mg)	6.6 ± 0.86	6.7 ± 1.4	6.0 ± 1.0	6.8 ± 1.7
子宮 (mg)	36.3 ± 14	41.9 ± 29	34.6 ± 12	36.6 ± 20
脳 (mg)	424.1 ± 16	421.7 ± 25	417.5 ± 16	414.1 ± 14

(平均値±標準偏差)

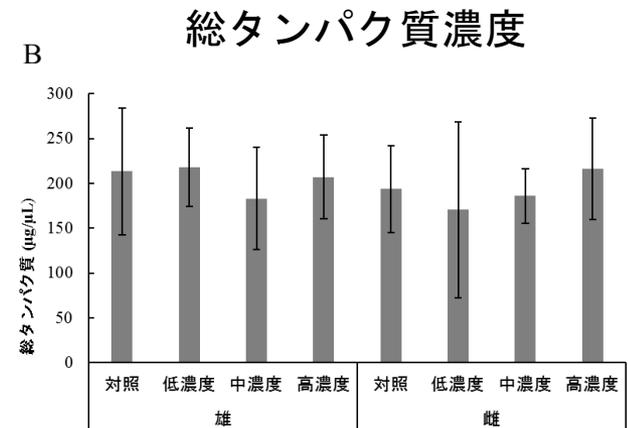
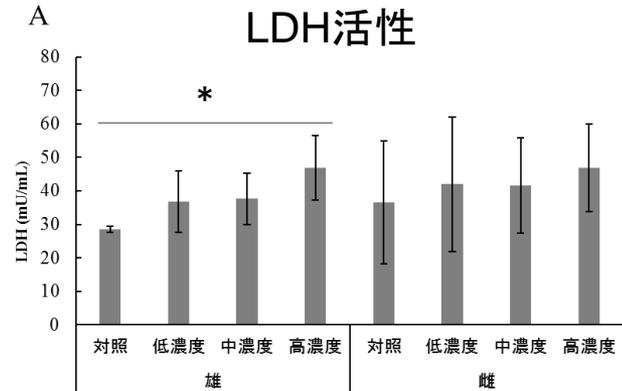
(報告書 49ページ)

# BALFの解析

## BALF中の白血球の解析



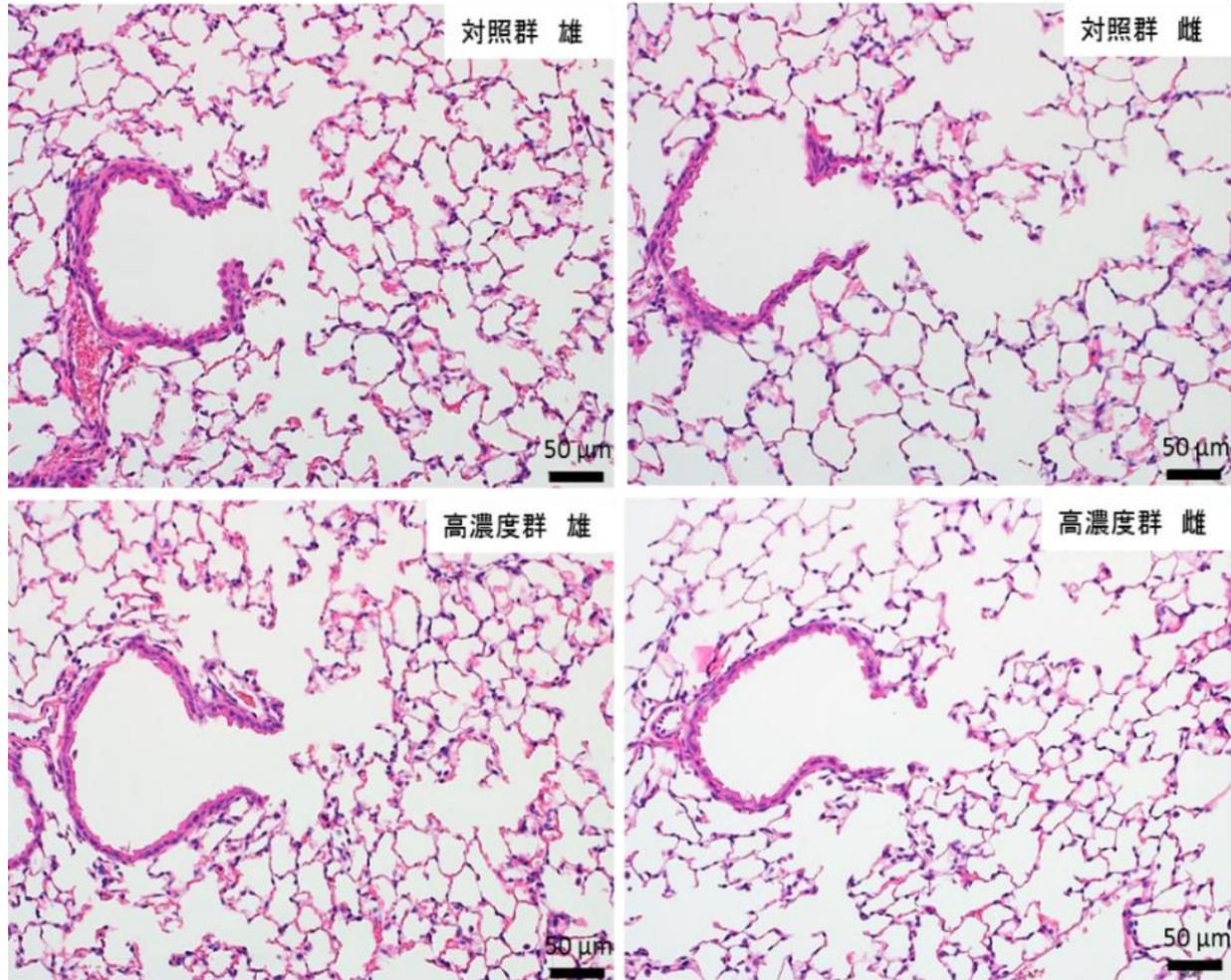
## BALF上清の生化学的解析



Dunnett Test \*:  $p < 0.05$

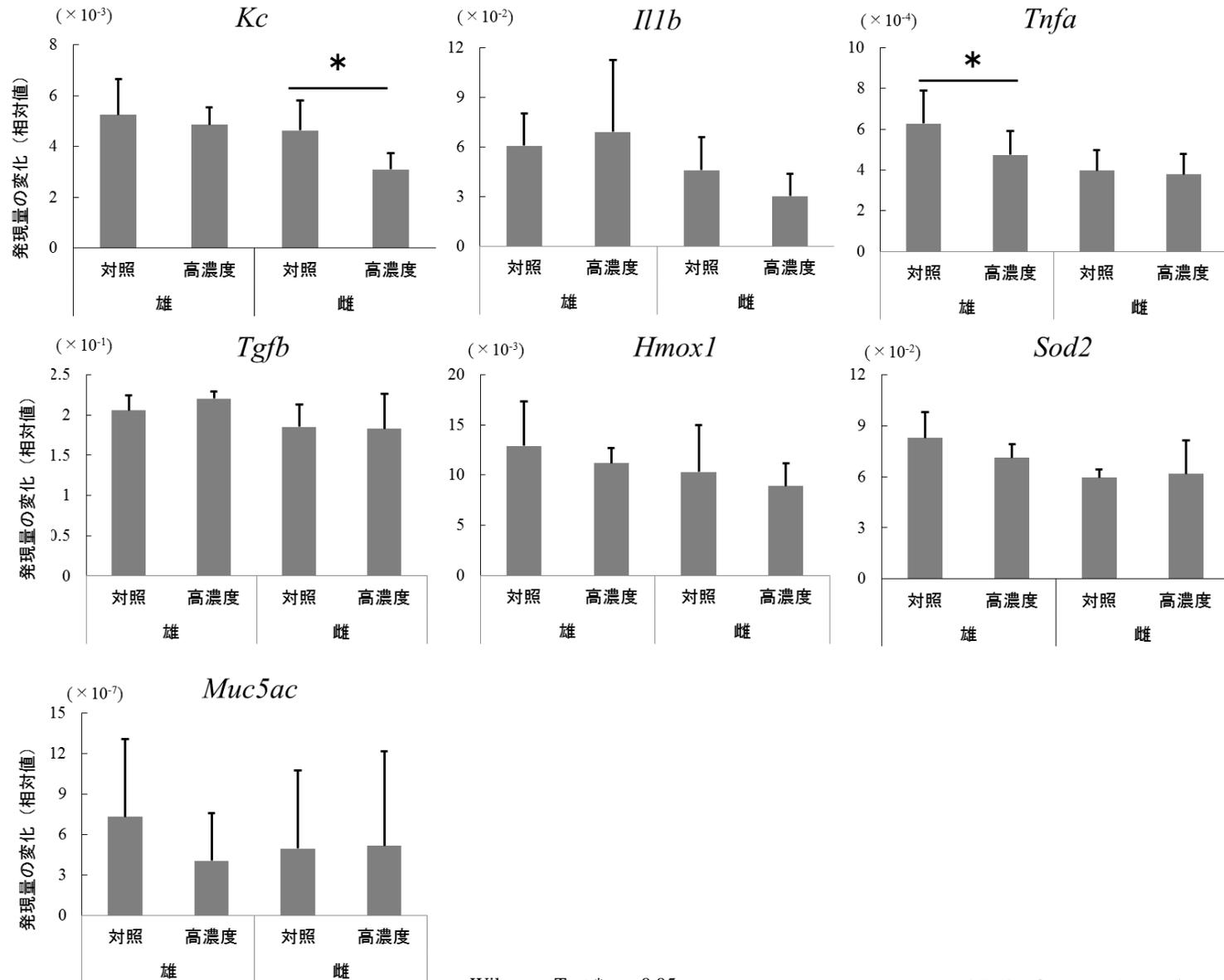
# 病理組織学的解析

28日間の反復ばく露後の肺実質（H&E染色）



(報告書 51ページ)

# 肺実質における各種遺伝子の発現解析



# 考察

- 雌雄のBALB/c系マウスに、最大500 mg/m<sup>3</sup>の3時間の単回ばく露、あるいは最大50 mg/m<sup>3</sup>の毎日3時間の28日間の硫酸水素アンモニウムの反復吸入ばく露を行ったが、その生体影響は非常に低いことが明らかとなった。
- 硫酸水素アンモニウムの酸性度は高いが（50 mg/m<sup>3</sup>群のばく露溶液のpHは1.8）、おそらくエアロゾルの粒子が呼吸器系の上皮に到達すると速やかに溶解し、希釈・中和され、恒常性が保たれたと推測される。
- 硫酸アンモニウムでは、モルモットで900 mg/m<sup>3</sup>のばく露で半数が死亡したとされているが、ラットでは急性毒性は観察されず、刺激に対する感受性の高いモルモット特有の変化であったと考えられる。
- 反復吸入ばく露の結果では、一部の項目で有意差の認められる結果もあったが、解釈が難しく、また、病理組織学的にこれらを裏付ける所見は認められなかった。

# 第4章 マウスへの硫酸水素アンモニウム吸入ばく露実験

## 第2節 ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露実験

# 目的

- 硫酸塩のぜん息の増悪影響に関する動物実験は、モルモットへの呼吸機能への影響を評価したものがほとんどで、組織学的・免疫学的に詳細に解析した報告は少ない。モルモットは気道過敏性が高い特性があるため他の動物での評価が重要だが、少数のラット・ウサギの報告しかないのが現状。
- マウスに関しては情報が少なく、ぜん息モデルに反復ばく露した実験一報のみで、最高濃度約 $1 \text{ mg/m}^3$ で4時間、3日間連続でマウスへばく露し、詳細に解析したが、増悪影響は認められなかった。
- 上記実験は当時のワーストケースをもとに、現実的なばく露濃度を設定したものであるが、第1節で述べたとおり、正常マウスへの作用が非常に弱いことを考慮すると、増悪影響の検討についても、ばく露負荷を高めて評価することが必要である。

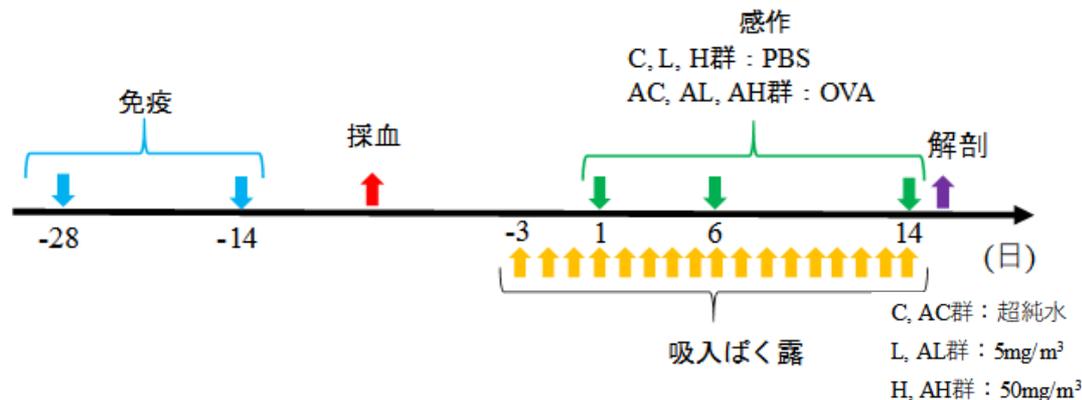


OVA誘導型ぜん息モデルマウスに対し、2つの濃度条件による2週間ばく露を行い、硫酸水素アンモニウムのぜん息増悪影響を調査した。

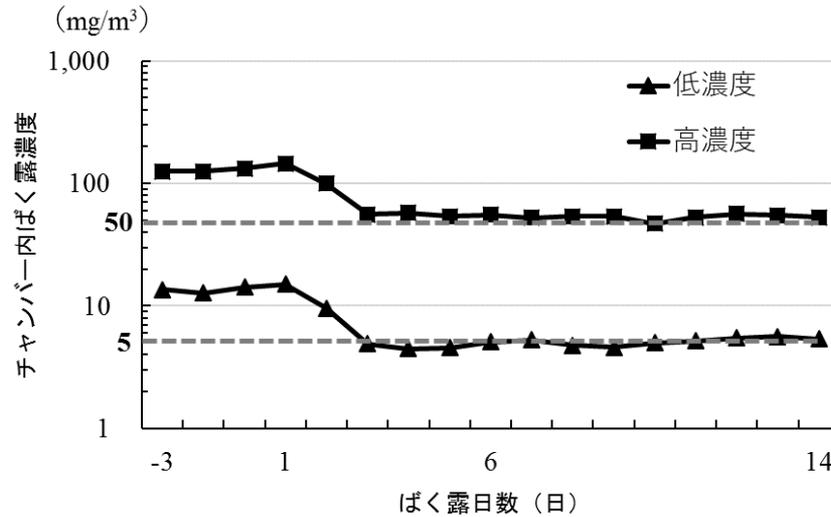
(報告書 56ページ)

# 実験概要

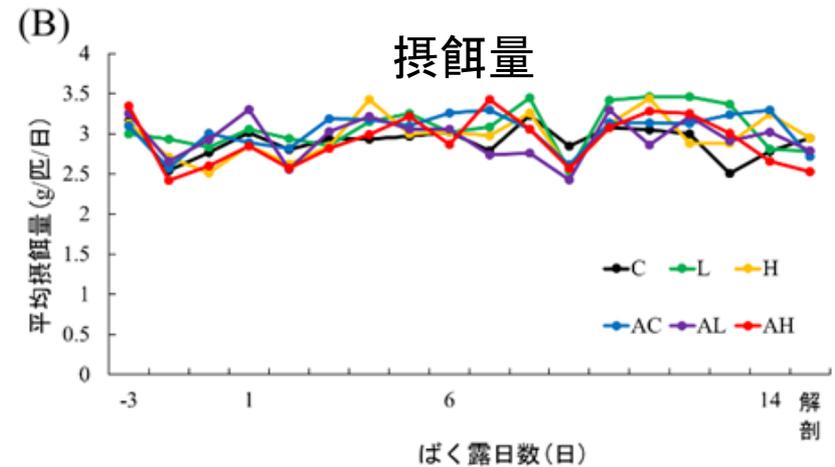
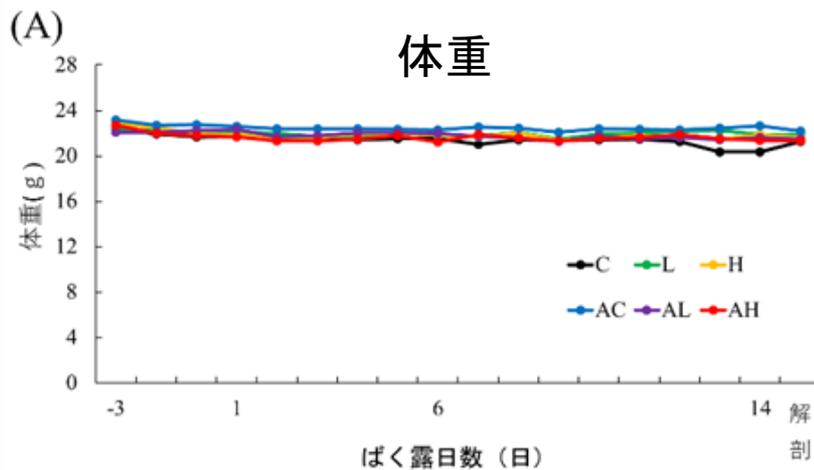
<b>動物</b>	BALB/cAnNCrIcrIj 雌性マウス、ばく露開始時：13週齢
<b>群構成</b>	C群 対照群：0mg/m <sup>3</sup> （超純水） L群 低濃度群：5mg/m <sup>3</sup> H群 高濃度群：50mg/m <sup>3</sup> AC群 ぜん息群：OVA AL群 ぜん息+低濃度群：OVA+5mg/m <sup>3</sup> AH群 ぜん息+高濃度群：OVA+50mg/m <sup>3</sup>
<b>ばく露条件</b>	吸入鼻部ばく露、3時間/日、直前に3日間の連続ばく露を実施した後、2週間ばく露を実施 最終ばく露の翌日に剖検
<b>被験物質</b>	硫酸水素アンモニウム （富士フィルム和光純薬：純度99.9%、014485-100、CAS:7803-63-6）
<b>OVAぜん息誘導</b>	免疫方法：OVA 2μg+硫酸カリウムアルミニウム（20mg/mL） 腹腔内投与2回 感作方法：0.01% OVA/PBS 20μL 経鼻投与 約1週間おきに3回（硫酸水素アンモニウムばく露後に実施）



# チャンバー内のばく露濃度推移



# ばく露期間中の体重及び摂餌量



# 解剖時の体重と臓器重量

項目		C群	L群	H群	AC群	AL群	AH群
解剖時体重	(g)	21.2 ± 0.77	21.9 ± 0.87	21.6 ± 1.2	22.2 ± 1.3	21.5 ± 0.79	21.3 ± 0.78
胸腺	(mg)	24.0 ± 5.8	21.9 ± 6.4	24.4 ± 4.9	32.5 ± 6.1 *	25.4 ± 4.0 #	25.7 ± 3.3 #
肝臓	(mg)	1133.9 ± 70	1159.3 ± 89	1188.4 ± 47	1201.7 ± 88	1156.6 ± 54	1132.9 ± 57
脾臓	(mg)	92.0 ± 12	99.1 ± 29	91.9 ± 4.5	110.8 ± 13	95.3 ± 7.1 #	97.8 ± 5.9 #
腎臓 (左右)	(mg)	295.0 ± 13	282.6 ± 21	299.4 ± 10	293.7 ± 22	299.0 ± 14	313.2 ± 20
副腎 (左右)	(mg)	7.2 ± 1.2	6.7 ± 0.76	7.5 ± 2.0	7.2 ± 1.3	7.0 ± 1.0	8.2 ± 1.3
心臓	(mg)	89.6 ± 5.4	91.0 ± 7.0	91.2 ± 4.5	91.2 ± 7.8	92.7 ± 5.2	89.8 ± 4.3
卵巣 (左右)	(mg)	12.9 ± 7.4	8.4 ± 3.1	10.0 ± 3.9	8.9 ± 2.8	10.1 ± 2.9	11.9 ± 1.8
子宮	(mg)	45.6 ± 11	42.7 ± 28	59.5 ± 52	60.3 ± 27	43.4 ± 14	50.4 ± 13
脳	(mg)	89.6 ± 5.4	91.0 ± 7.0	91.2 ± 4.5	91.2 ± 7.8	92.7 ± 5.2	89.8 ± 4.3
肺 (左葉のみ)	(mg)	78.6 ± 7.8	75.5 ± 4.8	79.7 ± 6.6	81.3 ± 7.4	83.0 ± 7.9	85.1 ± 3.8

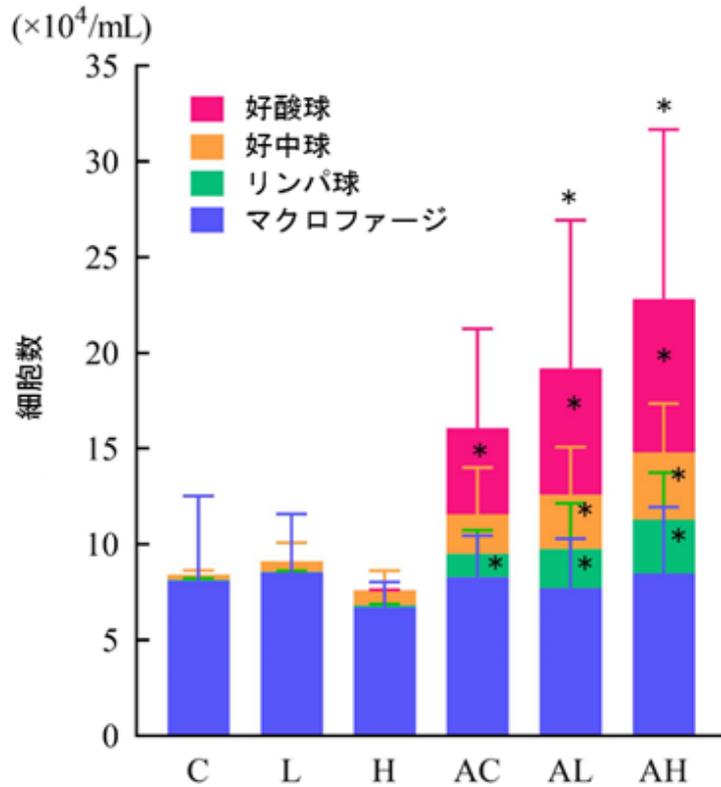
(平均値±標準偏差)

Dunnett Test \*:  $P < 0.05$  C群  
#:  $P < 0.05$  AC群

(報告書 62ページ)

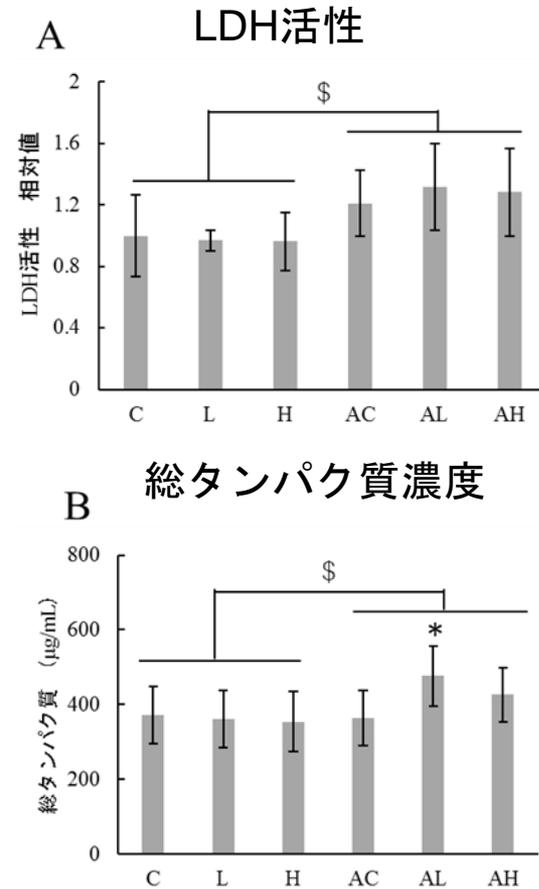
# BALFの解析

## BALF中の白血球の解析



Dunnett Test \*:  $p < 0.05$

## BALF上清の生化学的解析

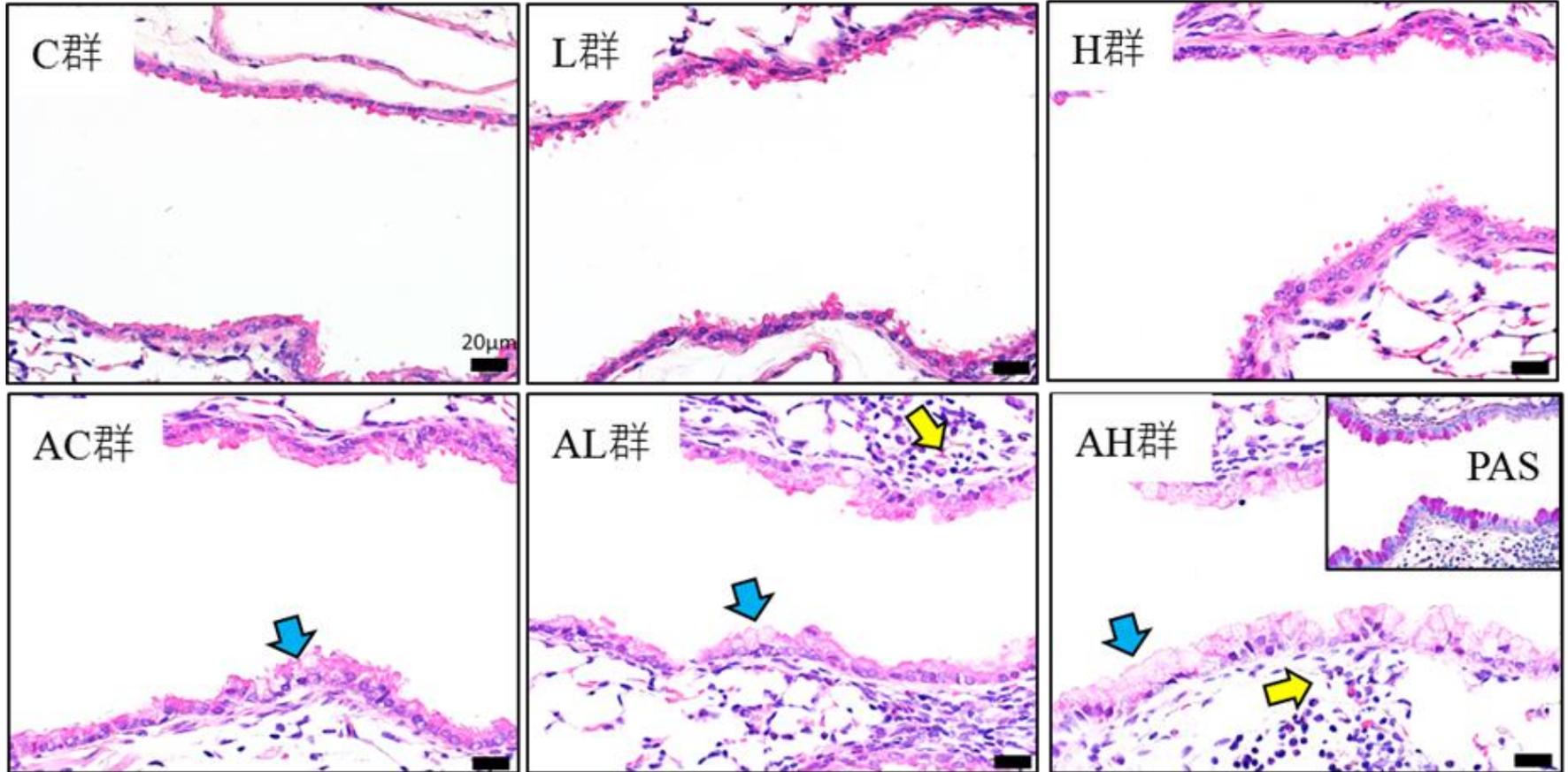


Dunnett Test \*:  $p < 0.05$

Student's t-test \$:  $p < 0.05$

# 病理組織学的解析

## 肺内気管支の組織像（H&E染色及びPAS染色）

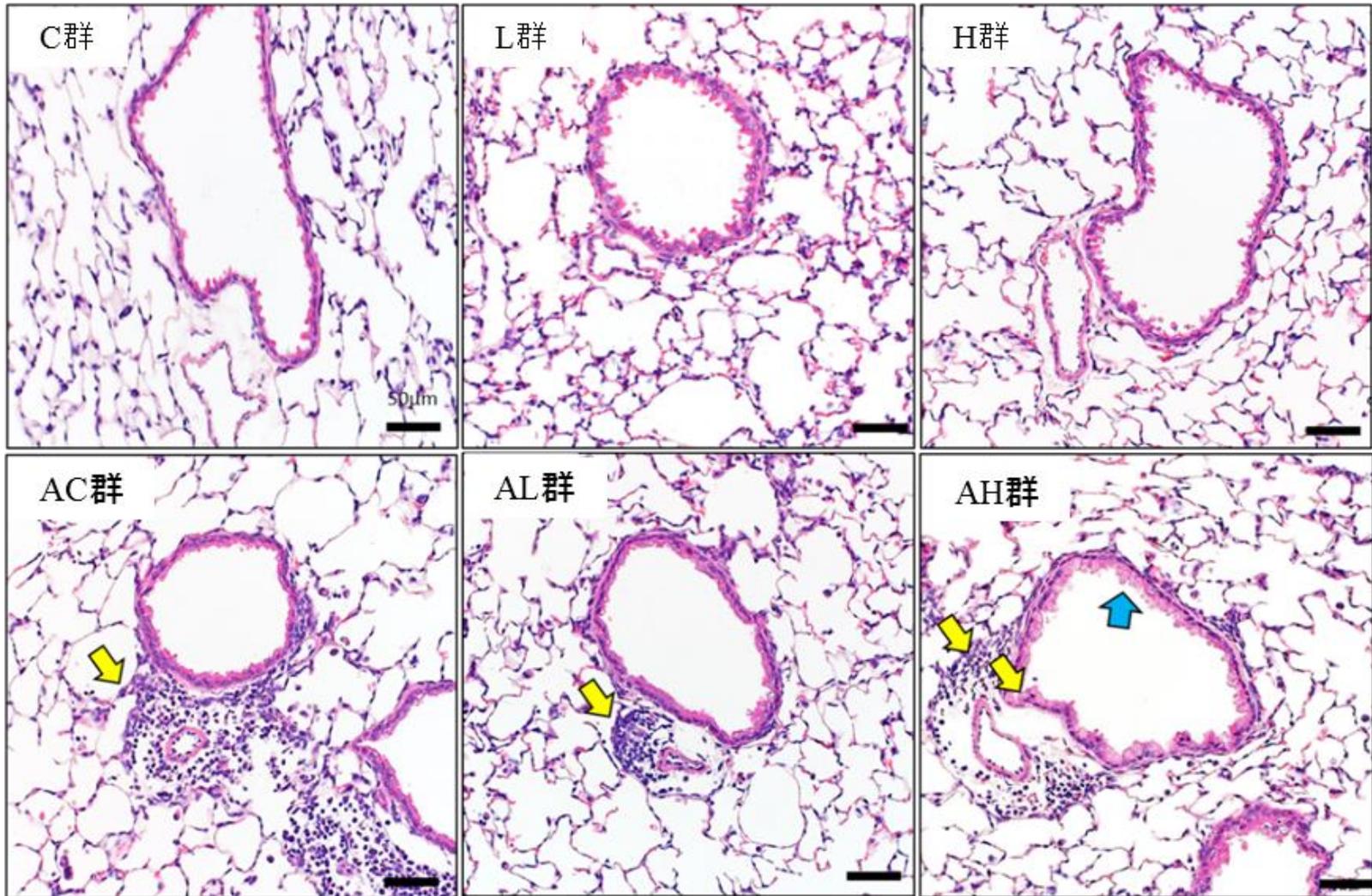


青色矢印：杯細胞

黄色矢印：好酸球等の炎症細胞の集簇

（報告書 63から64ページ）

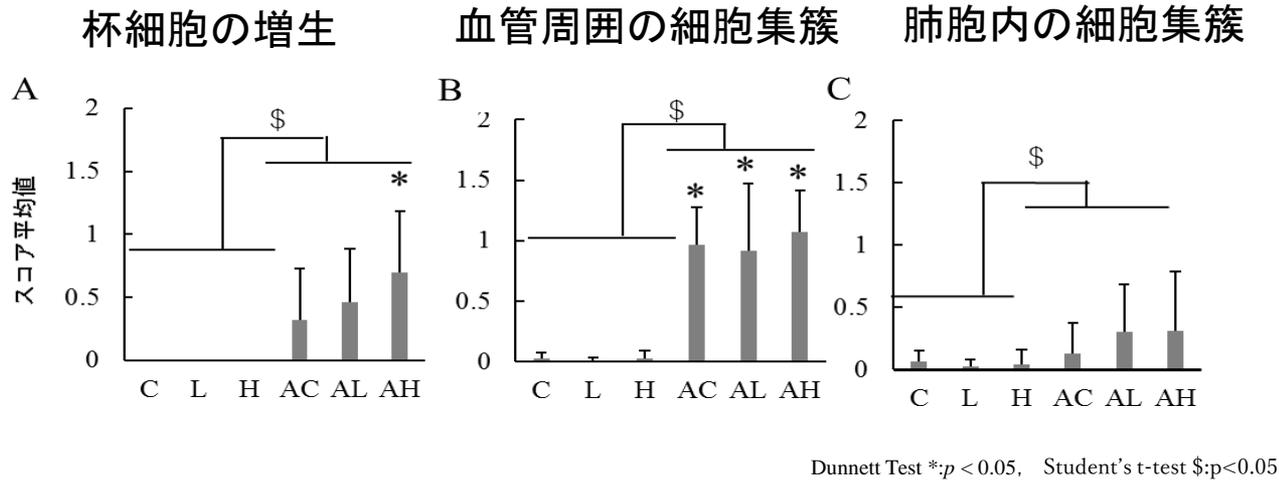
# 肺実質（終末細気管支）の組織像（H&E染色）



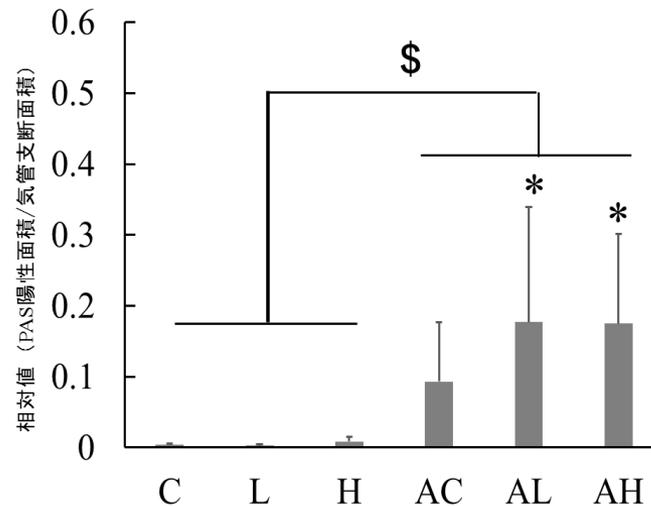
青色矢印：杯細胞  
黄色矢印：好酸球等の炎症細胞の集簇

（報告書 63から64ページ）

# 肺実質における病理検索結果のスコア



## 気管支内腔の粘液量 (PAS反応陽性面積)

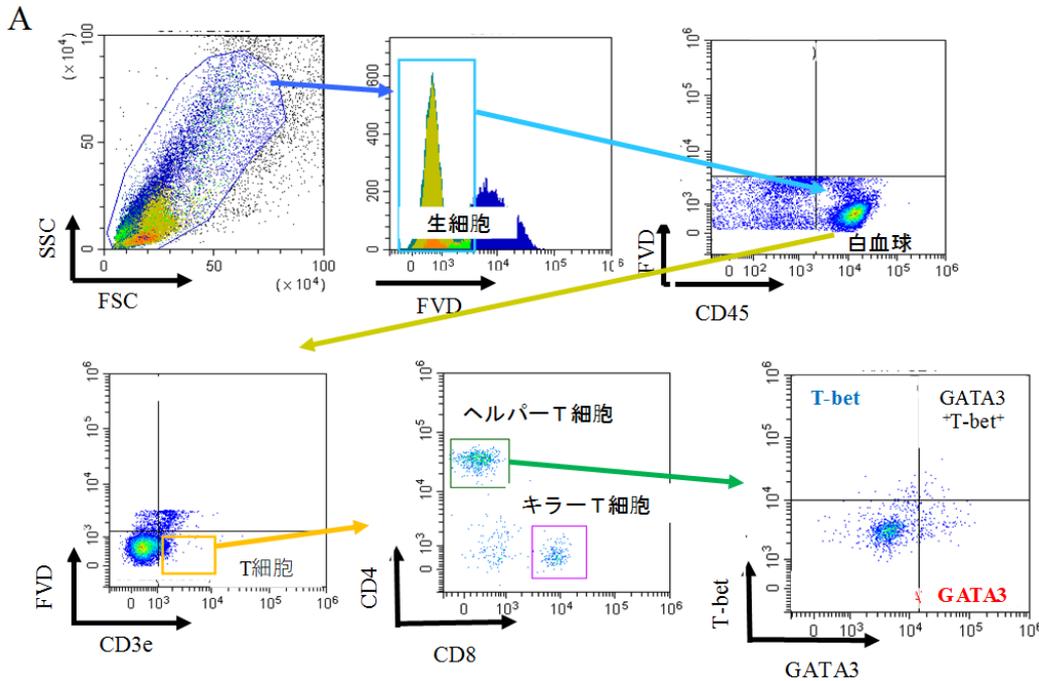


(報告書 65から66ページ)

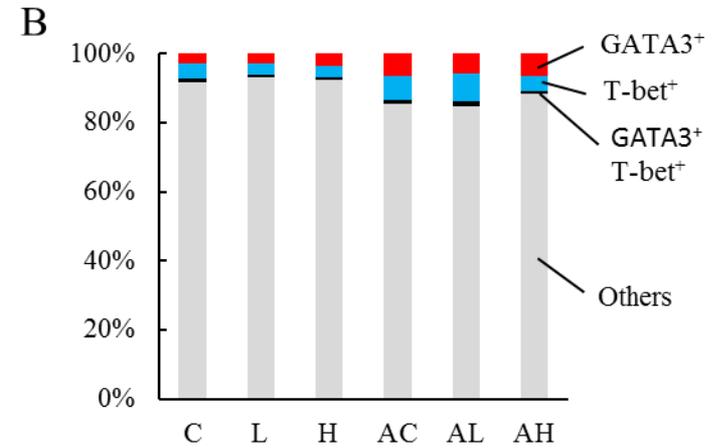
Dunnett Test \*:  $p < 0.05$ , Student's t-test \$:  $p < 0.05$

# 肺組織中のリンパ球の集団解析（フローサイトメトリー）

## ゲーティング方法

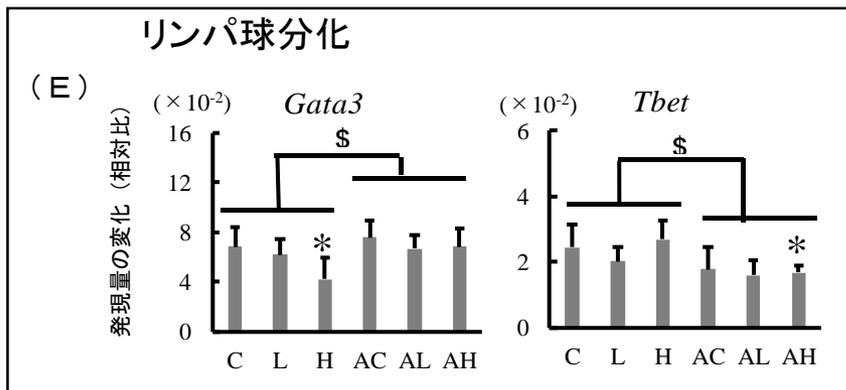
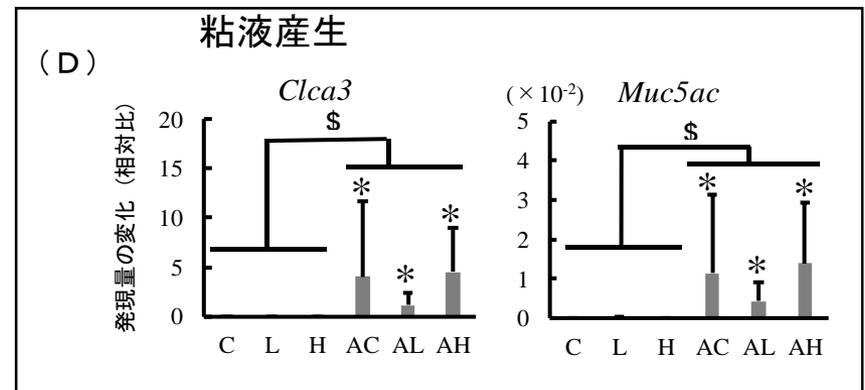
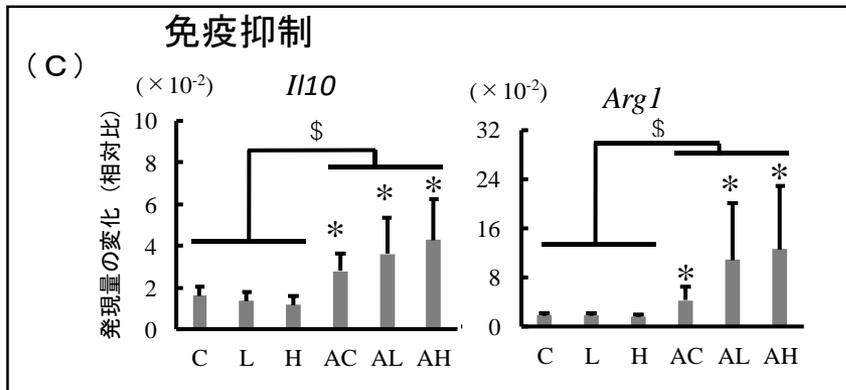
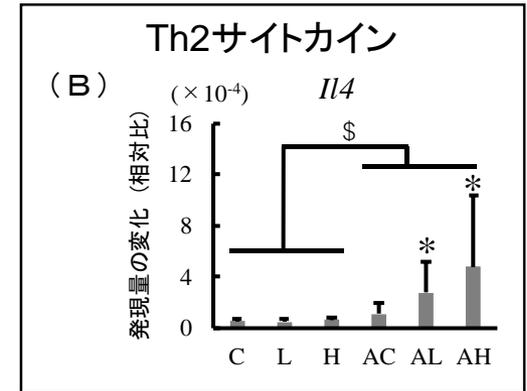
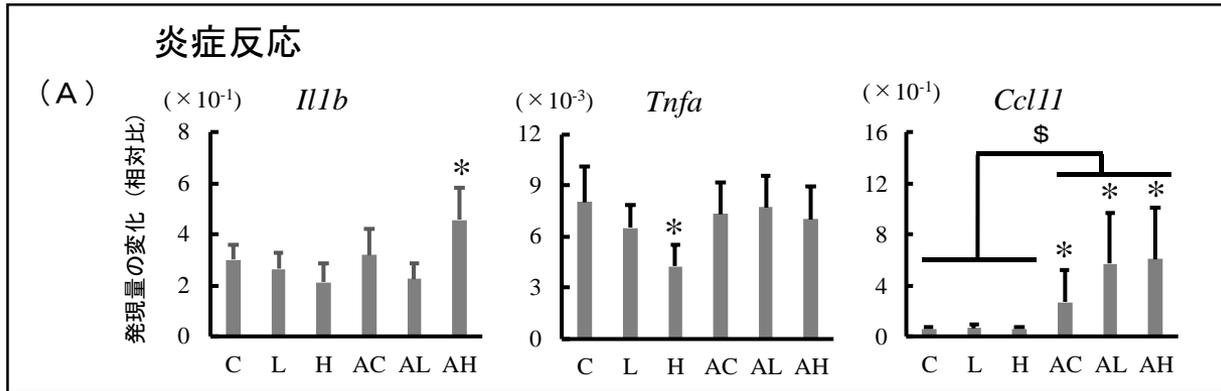


## CD4陽性細胞におけるGATA3陽性・T-bet陽性細胞の割合



(報告書 66ページ)

# 肺実質における各種遺伝子の発現解析 (qRT-PCR)



Steel Test \*:  $p < 0.05$ , Wilcoxon test \$:  $p < 0.05$

(報告書 67から68ページ)

# 考察

- OVA誘発性のぜん息モデルマウスへ、5及び50 mg/m<sup>3</sup>の硫酸水素アンモニウムを2週間反復ばく露したところ（Casseerら、1999年の既報の5倍及び50倍）、モデルマウスに顕著な作用は観察されなかったが、増悪影響を否定できない結果が得られた。
- 一部の解析では、ばく露による増悪を疑わせる結果が見られたが、基準となるぜん息様症状の個体差が大きく、増悪影響を相殺してしまった可能性が高い。バラツキはOVA感作を経鼻投与により実施したこと等に起因すると思われる。
- ぜん息モデルモルモットに硫酸アンモニウムを反復ばく露した実験では（吉田ら、1979年）ぜん息症状の増悪が観察された。本研究では、より酸性度の高い硫酸塩を用いたが、明確な影響は見られなかった。被験物質やばく露条件の違いだけでなく、種差によるところが大きいと推測される。
- Calu-3細胞の細胞膜間結合力が低下したように、呼吸器の上皮細胞のバリア機能が減弱し、アレルゲンが侵入しやすくなり、それが、ぜん息病態の開始・進行に寄与した可能性がある。酸性度の高い環境が上皮組織におけるタイトジャンクションの異常を起こすことが報告されている（Xuら、2013）。

# 第4章 マウスへの硫酸水素アンモニウム 吸入ばく露実験

## 第3節 マウスの呼吸機能へ与える影響

# 目的

- 硫酸塩の吸入ばく露により生体影響が認められた報告の多くは、ヒトあるいはモルモットの吸入ばく露後の呼吸機能を評価したものであった（気道コンダクタンスの減少、呼吸困難度の増強等）。
- マウスの呼吸機能への影響は、モルモットに比べれば弱いと思われるが、本事業においてマウスにおける硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露の総合的な影響を評価するためには、呼吸機能についても検討する必要がある。



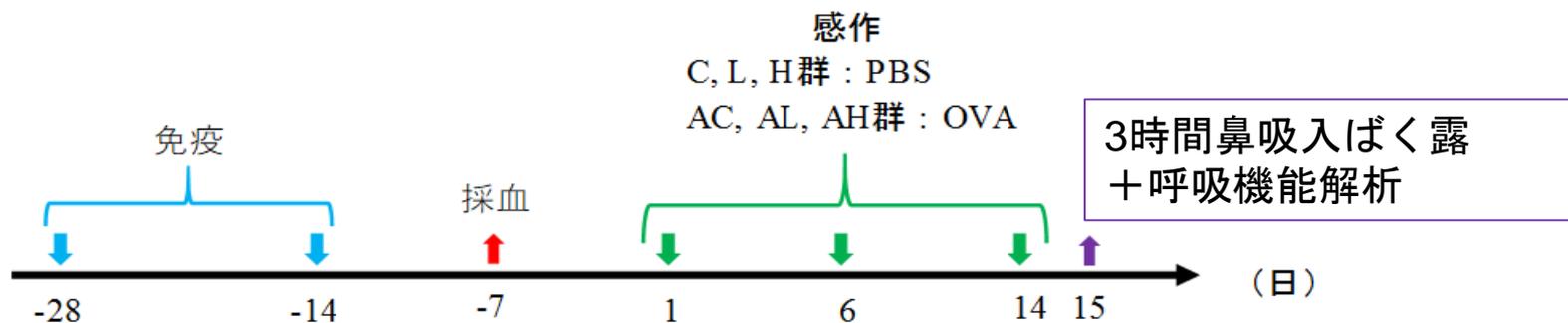
BALB/cマウスを用い、呼吸機能に与える影響を2つの実験デザインで評価した。

- 正常マウス・ぜん息モデルマウスに3時間の鼻部吸入ばく露を行った後に気道収縮薬を用いた気道過敏性試験を行う
- 呼吸機能解析装置に付属するエアロゾル発生装置により、正常マウス・ぜん息モデルマウスに対して気道内に短時間噴霧し、即時的な呼吸機能を調べる

# 単回吸入ばく露による気道過敏性の評価

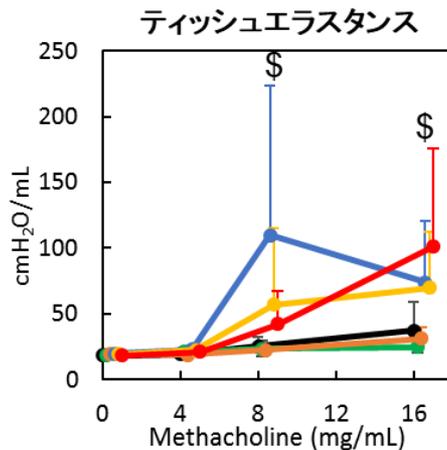
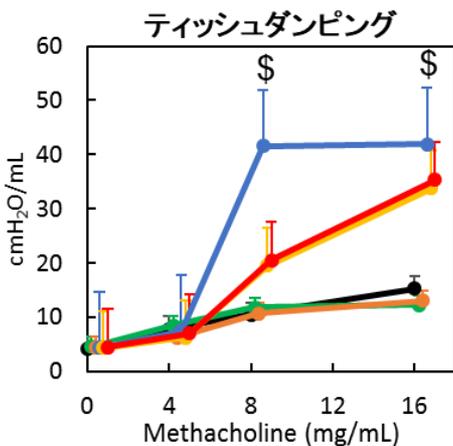
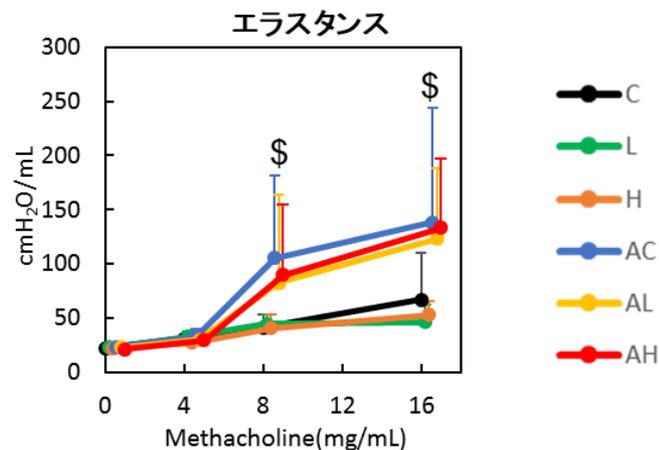
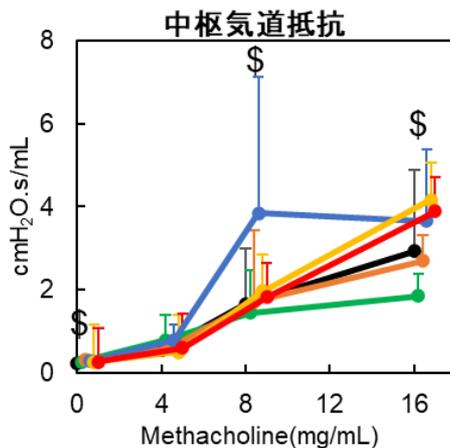
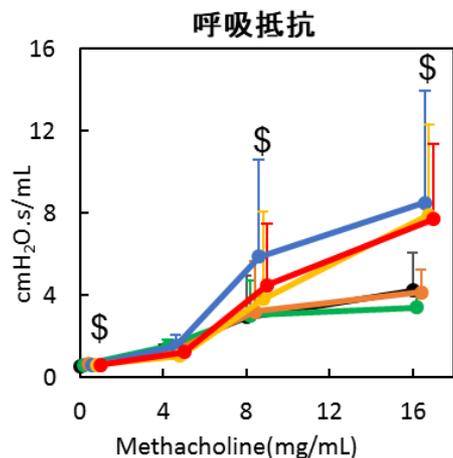
## 実験概要

群	ばく露濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	マウス	動物数
C群 (対照)	0	正常	6 (4)
L群 (低濃度)	5	正常	6
H群 (高濃度)	50	正常	6
AC群 (ぜん息・対照)	0	ぜん息	6
AL群 (ぜん息・低濃度)	5	ぜん息	6 (4)
AH群 (ぜん息・高濃度)	50	ぜん息	6 (5)



(報告書 72から74ページ)

# 気道過敏性試験の結果



Student's t-test \$  $p < 0.05$   
(C, L, H vs AC, AL, AH)

# 気管内噴霧ばく露による即時影響評価 実験概要

## 正常マウス

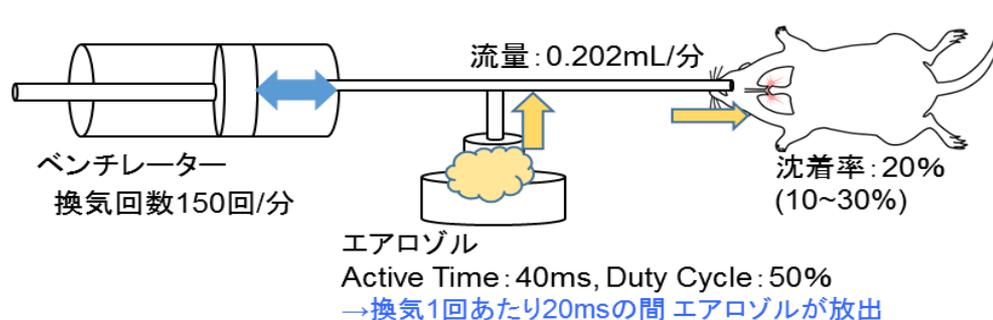
群	水溶液濃度 (g/L)	推定沈着量 (μg/lung)	動物数
C群 (対照)	0	0	6
L群 (低用量)	0.05	0.303	6
M群 (中用量)	0.5	3.03	6
H群 (高用量)	5	30.3	6
硫酸アンモニウム群 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	30.3	4
塩化ナトリウム群 NaCl	4.5	27.27	4(3)

## ぜん息モデルマウス

群	水溶液濃度 (g/L)	推定沈着量 (μg/lung)	動物数
C群 (対照)	0	0	6
L群 (低用量)	0.05	0.303	6
M群 (中用量)	0.5	3.03	6
H群 (高用量)	5	30.3	6(5)

(モデル作製方法はスライド27と同じ)

## 気管内噴霧ばく露実験における3分間の沈着量の推定

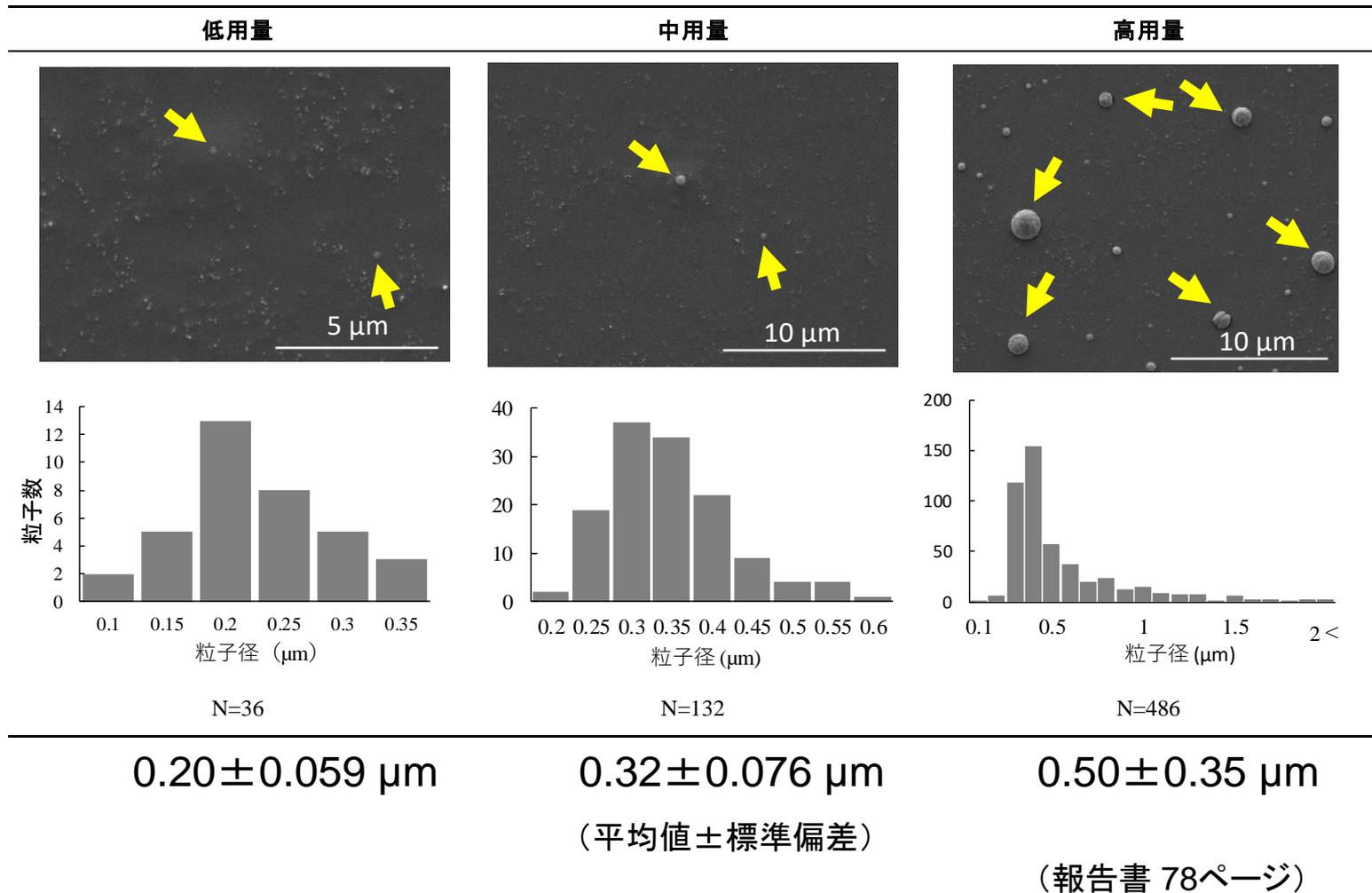


$$\text{低用量群の推計} \quad \frac{20}{60000} \times 150 \times 0.202 \times 3 \times 0.05 \times 0.2 = 0.000303 \text{ mg (0.303 } \mu\text{g)}$$

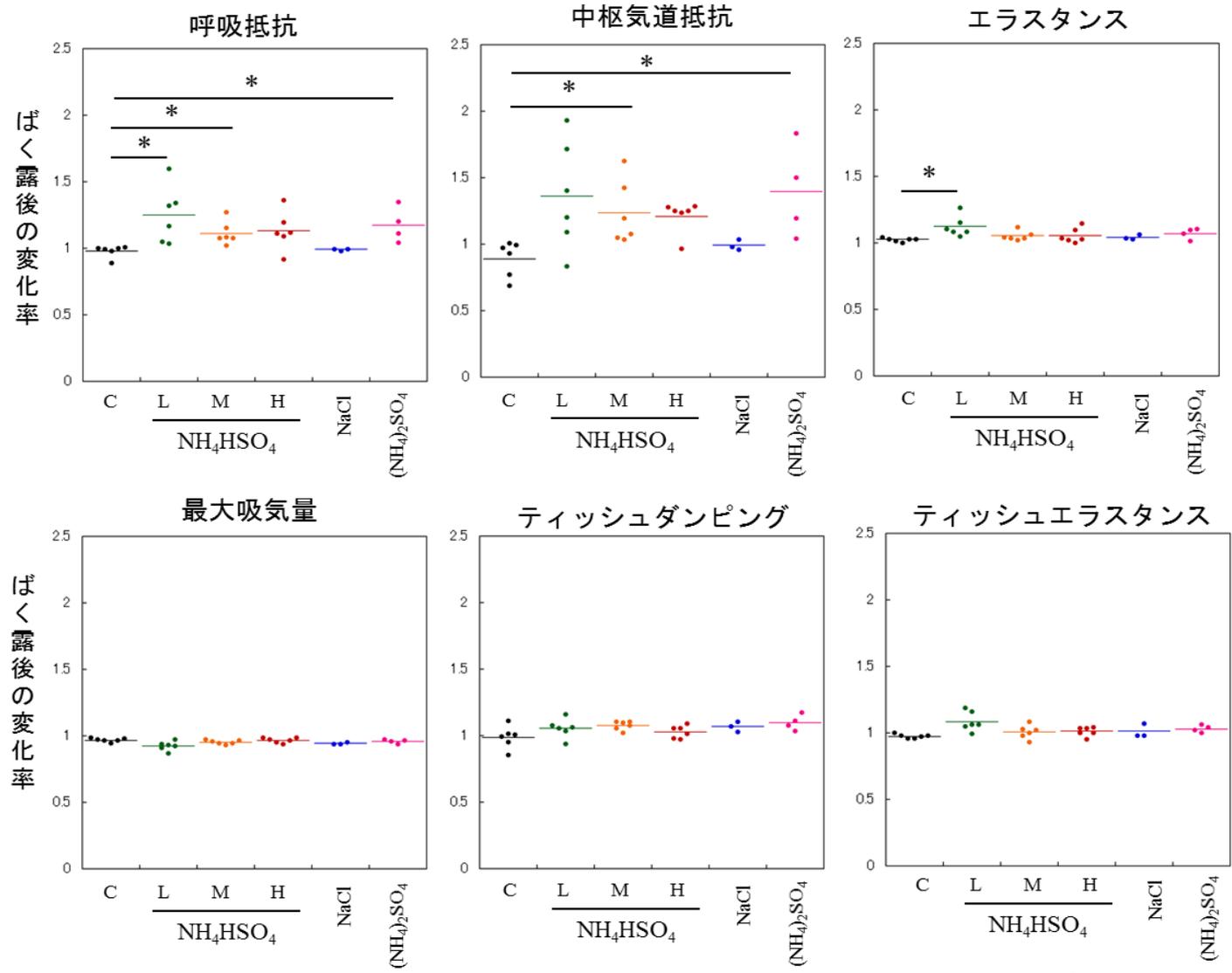
(報告書 74から76ページ)

# ネブライザーで発生させたエアロゾルの粒子径

各用量の水溶液（0.05、0.5及び5 g/L）をネブライザーに容れ、カニューレから噴霧されるエアロゾルをサンプルテープ上に60秒間捕集し、走査電子顕微鏡で観察した

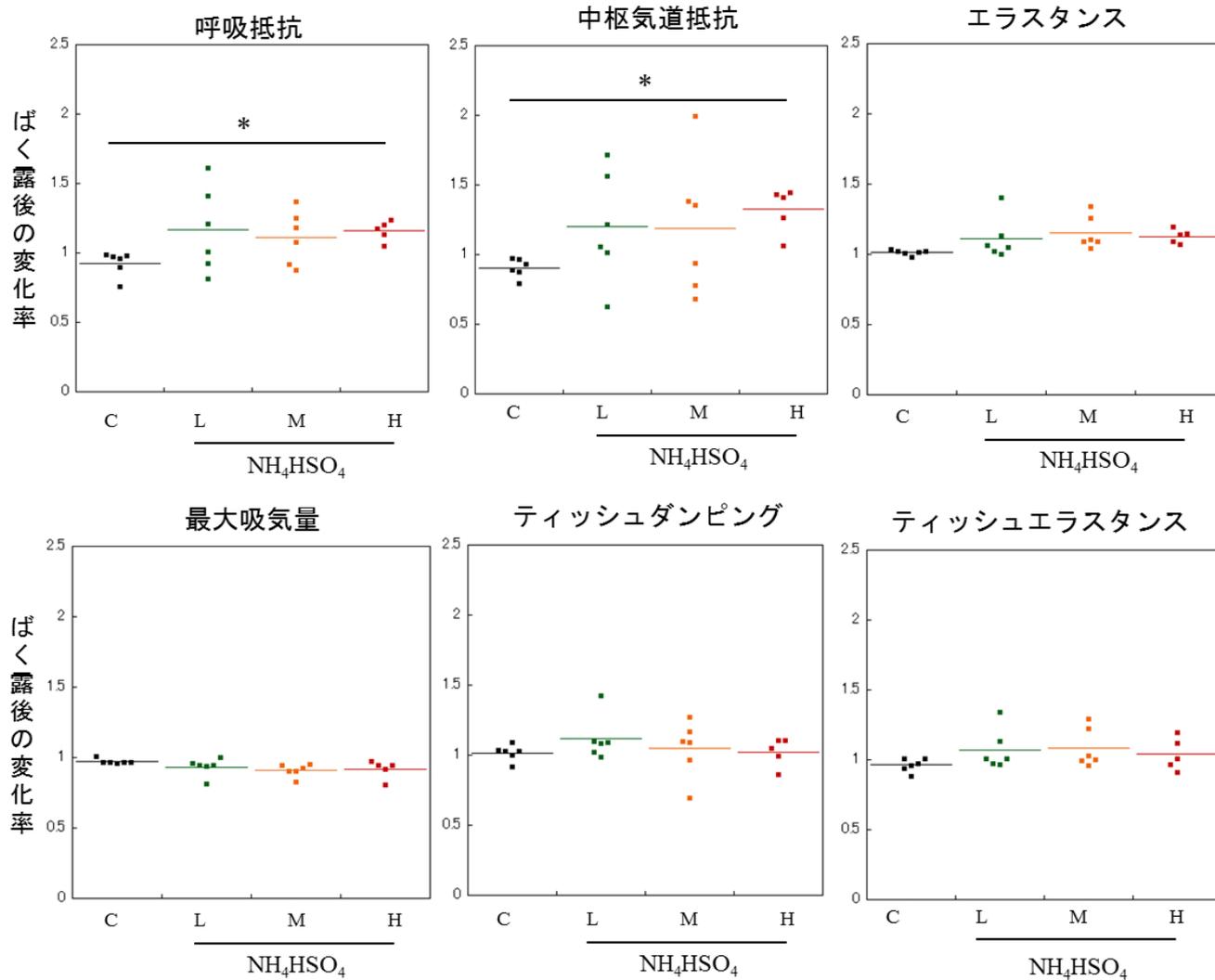


# 正常マウスの呼吸機能への即時影響評価



(報告書 79ページ)

# ぜん息モデルマウスの呼吸機能への即時影響評価



(報告書 79から80ページ)

# 考察

- 硫酸水素アンモニウムのマウス呼吸機能への影響は、わずかだが、ばく露直後の短時間に観察された。硫酸塩の即時影響をモルモット以外の実験動物で示したのは初めてのことである。
- 鼻部ばく露後の気道過敏性試験については、ぜん息モデルマウスでは有意に過敏性が増加したが、ばく露の影響は認められなかった。モデルの個体差が大きかったことや、実験デザイン（ばく露後の回復期間のバラツキ）が原因である可能性も否定できない。
- 気管内噴霧ばく露については、ぜん息患者への吸入実験で影響が見られるレベル（Utellら、1983年）のばく露負荷により、マウスの呼吸機能への即時影響を及ぼすことが示された。呼吸抵抗の変化は主に気道の収縮であり、化学的な刺激により、神経や気管支周囲の平滑筋を刺激したものと推測される。
- 気管内噴霧ばく露の実験では、正常マウス・ぜん息モデルマウスの両者で同様の結果が得られたが、正常マウスに関して用量依存性の変化は観察されなかった。

# 第5章 まとめ

# 各章のまとめ

## 都内大気中PM中の硫酸水素アンモニウムの実態調査

- 新宿区の地上一か所で1年間の調査を実施したところ、硫酸水素アンモニウムは主にPM2.5中に存在しており、その平均濃度は $0.6 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、検出率は約27%、検出時期は春から秋であることが明らかとなった。
- 大気汚染物質や気象要素との関連について、主に、硫酸アンモニウム、Ox及び気温との間に有意な相関が見られた。なお、黄砂飛来時の硫酸水素アンモニウムは、特に高濃度ではなかった。

(報告書 83ページ)

## 培養細胞への硫酸水素アンモニウムばく露実験

- 気相ばく露、液相ばく露において、炎症、酸化ストレスに関与する全ての項目で変化はなかった。
- 感受性を高めたA549細胞に液相ばく露した結果、炎症因子を増悪させる作用はなかった。
- ROS産生増加が見られたが、細胞の生存に関与するレベルではないと推察した。
- 3時間及び6時間ばく露において、ばく露濃度に依存してTEERが低下する傾向が見られたが、24時間後にはTEERは回復した。

## マウスへの硫酸水素アンモニウムばく露実験

- 高濃度の単回ばく露及び28日間の反復ばく露を行ったが生体影響は認められなかった。
- ぜん息モデルマウスにする約2週間の反復ばく露では、統計学的に有意な変化は見られなかったが、増悪を疑わせる結果が複数の項目で認められた。
- 3分間、高濃度の気管内噴霧ばく露後には気道収縮に起因すると思われる即時的な呼吸機能への影響が認められた。

(報告書 83から85ページ)

# 総括

- 硫酸水素アンモニウムの大気中の実態調査はほとんど行われておらず、本研究により、都内大気のア平均濃度（PM2.5では0.6  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）や、検出時期（春から夏）、大気汚染物質や気象要素との関連について、有用な情報提供ができた。また、越境汚染の影響が疑われている中で、黄砂飛来時の濃度は、特に高い値ではなかった。
- 細胞レベルのばく露の影響として、酸化ストレスや細胞膜間結合力に一過性の影響を与えうるという新しい知見を得ることができた。
- 動物実験では、初めてマウスの詳細な吸入毒性のデータを取得することができた。正常なマウスに対して、高濃度のばく露でも、単回あるいは反復ばく露により影響は観察されず、吸入毒性が弱いことが明らかとなった。一方、顕著な変化ではないが、ぜん息増悪の影響を疑う結果や、呼吸機能に及ぼす有意な即時影響が観察された。
- ばく露実験から、毒性指標を算出することができないが、仮に5  $\text{mg}/\text{m}^3$ をぜん息増悪影響の疑いのある濃度とし、都内大気中の最大濃度1.9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と比較すると、ばく露マージンは、 $5,000 \div 1.9 \approx 2,630$ 倍と計算され、都内の大気環境中における硫酸水素アンモニウムの健康影響は無いあるいは極めて弱いと考えられる。