

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)

令和6年3月

東京都保健医療局

はじめに

東京都では、大気汚染保健対策事業の一環として、実験動物等を用いた基礎的実験的研究を実施し、大気汚染物質が生体に及ぼす影響について調査研究を行っています。昭和53年度の調査開始以降、都内の大気環境の変遷を踏まえ、窒素酸化物等の複合大気汚染、ディーゼル車排気ガス、大気中の微小粒子状物質などを対象とし、健康影響等の検討を行ってきました。

平成28年から令和元年度にかけては、微小粒子状物質であるPM_{2.5}に焦点を当て、都内大気中PM_{2.5}の主要成分の一つと推定される硫酸アンモニウムについて、都内における実態調査を実施しました。その結果、大気中からは硫酸アンモニウムのほか、より酸性度が高く、呼吸器に影響を及ぼす可能性が推測される硫酸水素アンモニウムが検出されました。

そのため、令和2年から令和5年度の研究では、硫酸水素アンモニウムを調査対象に選定し、東京都健康安全研究センター薬事環境科学部において、都内大気中の実態調査、ヒト気管支上皮由来細胞及びヒト肺胞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への吸入ばく露実験を実施しました。

この度、調査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で検討し、成果を報告書として取りまとめました。

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年度から令和5年度まで)

○令和6年3月現在

氏名	所属
安達 修一	相模女子大学 短期大学部 食物栄養学科 食品衛生学研究室 特任教授
石井 崇史 (令和5年9月就任)	東京大学 保健・健康推進本部 助教
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 名誉研究員
松木 秀明	東海大学 医学部 名誉教授
柳澤 利枝	国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康領域 病態分子解析研究室 主幹研究員

○令和5年3月まで

氏名	所属
山下 直美	武蔵野大学 薬学部 学部長・教授※

※令和5年3月時点

目 次

第1章 調査概要	1
I 背景及び目的	1
II 調査実施概要	2
III 文献	2
研究スケジュール	4
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	5
I 目的	5
II 方法	5
1 都内大気中 PM 中硫酸水素アンモニウムの連続測定	5
III 結果	7
1 都内大気中 PM 中硫酸水素アンモニウムの連続測定	7
2 PM _{2.5} 中硫酸水素アンモニウムと大気汚染物質等との関連	8
3 PM _{2.5} 中硫酸水素アンモニウムと気象要素及び黄砂との関連	11
IV 考察	14
V 文献	17
第3章 培養細胞への硫酸水素アンモニウムばく露実験	18
I 目的	18
II 方法	18
1 気相ばく露	18
2 液相ばく露	21
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	23
4 酸化ストレスを誘導する因子（ROS）の測定	26
5 Calu-3 細胞の細胞膜間結合力に関する測定	26
6 統計学的解析	27
III 結果	28
1 気相ばく露濃度	28
2 A549 細胞への気相ばく露	28
3 Calu-3 細胞への気相ばく露	29
4 A549 細胞への液相ばく露	29
5 Calu-3 細胞への液相ばく露	31
6 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	32
7 酸化ストレスを誘導する因子（ROS）の測定	33
8 Calu-3 細胞の細胞膜間結合力に関する測定	34
IV 考察	36
V 文献	38

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	40
第1節	単回ばく露実験及び28日間吸入ばく露実験	40
I	目的	40
II	方法	40
1	実験動物	40
2	吸入ばく露	40
3	単回ばく露実験	42
4	28日間反復ばく露実験	42
III	結果	45
1	単回ばく露実験	46
2	28日間反復ばく露実験	46
IV	考察	52
V	文献	54
第2節	ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露実験	56
I	目的	56
II	方法	56
1	実験動物	56
2	実験デザイン	56
3	体重・摂餌量の測定	58
4	剖検	58
5	病理組織学的解析	58
6	BALFの解析	59
7	免疫学的解析	59
8	分子生物学的解析	60
9	統計解析	60
III	結果	60
1	硫酸水素アンモニウムのばく露濃度	60
2	体重及び摂餌量	60
3	解剖時の体重・臓器重量	61
4	BALF中の白血球細胞の解析	62
5	BALF上清の生化学的解析	63
6	病理組織学的解析	63
7	免疫学的解析	66
8	分子生物学的解析	67
IV	考察	69
V	文献	70

第3節	マウスの呼吸機能へ与える影響	72
I	目的	72
II	方法	72
1	実験動物及びぜん息モデル作製	72
2	単回吸入ばく露による気道過敏性の評価	73
3	気管内噴霧ばく露による即時影響評価	74
4	統計解析	77
III	結果	77
1	単回吸入ばく露による気道過敏性の評価	77
2	気管内噴霧ばく露による即時影響評価	78
IV	考察	80
V	文献	82
第5章	まとめ	83
I	各章のまとめ	83
II	総括	85
用語解説		87

第1章 調査概要

I 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、肺胞などへ到達可能な大きさであるため、特に呼吸器系へ影響を与えることが知られている^{1,2)}。ぜん息発作などに関連する成分としては、硫酸イオン、アンモニウムイオン及び多環芳香族炭化水素などが報告されている^{3,4)}。硫酸ガスは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⁵⁻⁹⁾一方で、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^{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^{12,13)}が、一般的な毒性試験の報告は無かった。

平成28年度から令和元年度に実施した本事業において、大気PM_{2.5}中の硫酸アンモニウム濃度について実態調査を行った結果、硫酸アンモニウムは都内の自動車排出ガス測定局（自排局）及び一般環境大気測定局（一般局）において1年を通して検出された¹⁴⁾。また、培養細胞を用いた硫酸アンモニウムの気相ばく露及び液相ばく露実験、マウスを用いた硫酸アンモニウムの3か月吸入ばく露実験及びぜん息モデルマウスによる増悪検討試験を実施した結果、著変は認められなかった¹⁴⁾。

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¹⁵⁾、黄砂などの越境汚染による影響が示唆されている¹⁶⁾が、実態はほとんど報告されていない。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く、大陸からの移流と考えられる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いる³⁾ことから、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た。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¹⁷⁾あるいは感染症¹⁸⁾の増悪影響、気道粘液線毛のクリアランス効率¹²⁾や肺胞マクロファージの機能¹⁹⁾を検討した報告がある。しかし、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、ばく露濃度を複数設定した一般毒性試験や、免疫系への詳しい影響調査は行われていない。

このように、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おらず、大気中の硫酸水素アンモニウム濃度を測定した結果もほとんど報告されていない。

そこで、都内大気中の硫酸水素アンモニウム濃度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毒性学的知見を得ることを目的に、本研究を実施した。

II 調査実施概要

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4年度、令和5年度）

硫酸水素アンモニウムは黄砂などと関連し、黄砂時には平均粒径 4 μm 以上の粗大粒子も増加する¹⁶⁾ことから、PM_{2.5}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大気中 PM を1週間連続採取で測定し、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。

第3章 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）

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（Reactive Oxygen Species、以下 ROS と略す）、細胞膜間結合力を評価するための経上皮電気抵抗（Trans-epithelial electrical resistance、以下 TEER と略す）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 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）

硫酸水素アンモニウムの一般毒性評価と、OVA チャレンジ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²⁰⁾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。

III 文献

- 1) 余田桂子, 高木 洋, 若松純子, 他: アレルギー, **64(2)**, 128-135, 2015.
- 2) 島 正之: 臨床環境医学, **23(2)**, 86-92, 2014.
- 3) 島 正之: 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に関する疫学調査研究 (1) 大気中粒子状物質及びオゾンの気管

支喘息発作への影響に関する疫学研究，平成 24 年度環境研究総合推進費終了
成果報告書，2013.

- 4) Yasuhiro, I., Thomas, H.S., Norman, Y. K., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **170(2)**, 404-414, 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., Macken, C. A.: *J. Toxicol. Environ. Health*, **8**, 31-45, 1981.
- 8) Kobayashi, T., Shinozaki, Y.: *J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 261-272, 1993.
- 9) Gearhart, J. M., Schlesinger, R. B.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **7**, 681-689, 1986.
- 10) Utell, M. J., Morrow, P. E., 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) Schlesinger, R.B.: *Environ. Res.*, **34(2)**, 268-279, 1984.
- 13) Amdur, M. O., Bayles, J., Ugro, V., *et al.*: *Environ Res*, **16**, 1-8, 1978.
- 14) 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），2020.
- 15) Li, L., Kumar, M., Zhu, C., Zhong, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 1816-1819, 2016.
- 16) 大平武俊，角田 寛，三原利之：岐阜県保健環境研究所報，**15**, 21-28, 2007.
- 17) Cassee, F.R., Dormans, J.A., van Loveren, H., *et al.*: *Report No. 650010 010; Nat. Inst. of Pub. Health and the Environ. (RIVM)*, 1999.
- 18) Schlesinger, R.B.: *Environ. Health Perspect.* **63**, 25-38, 1985.
- 19) Schlesinger, R.B., Chen, L.C., Finkelstein, I., Zelikoff, J.T.: *Environ. Res.*, **52(2)**, 210-224, 1990.
- 20) Utell, M.J., Morrow, P.E., Speers, D.M., *et al.*: *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128(3)**, 444-50, 1983.

基礎的実験的研究スケジュール

～令和2年度から令和5年度～

