

令和元年度 環境保健対策専門委員会
大気汚染保健対策分科会（第1回）
会議録

令和元年6月26日
東京都福祉保健局

(午前 9時55分 開会)

○鮫島環境保健事業担当課長 おはようございます。定刻前ではございますが、先生方、皆様おそろいでございますので、これから始めさせていただきたいと思います。ただいまより、令和元年度東京都環境保健対策専門委員会第1回大気汚染保健対策分科会を開催いたします。

私は、福祉保健局健康安全部環境保健事業担当課長の鮫島でございます。よろしくお願いたします。議事に入りますまでの間、進行を務めさせていただきます。

まず、議事に先立ち、健康安全部長の高橋よりご挨拶を申し上げます。

○高橋健康安全部長 皆様、おはようございます。健康安全部の高橋でございます。本日は、令和元年度の第1回の大気汚染保健対策分科会にご出席賜りまして、誠にありがとうございます。

東京都では、皆様ご存じのように、大気汚染保健対策として、大気汚染物質の健康影響に関する調査・研究に取り組んでおりますが、平成28年度からは、PM_{2.5}の中の硫酸アンモニウムをテーマといたしまして、委員の皆様のご助言、ご教授いただきながら、4か年の計画ということで取り組んでまいりました。

今年度は、この調査・研究の最終年度ということでございまして、年度末には報告書をまとめるという予定になっているところでございます。

今回の分科会では、平成30年度、昨年度行った培養細胞ばく露実験とぜん息モデルマウス作製について、追加実験の結果のご報告と、それから今年度実施する研究計画をご説明させていただきたいと思っております。

あわせて、今後の研究計画の案についてもご説明させていただきたいと思っております。

限られた時間ではございますけれども、専門分野の皆様のお立場から活発なご意見、ご助言をいただければ幸いです。本日はどうぞよろしくお願い申し上げます。

○鮫島環境保健事業担当課長 それでは、委員のご紹介をいたします。お手元の資料で、次第の次に委員名簿を置いてありますので、そちらをご覧くださいと思います。

なお本日、武蔵野大学、山下委員につきましては、ご都合によりご欠席となっております。

試験研究担当及び事務局のご紹介につきましては、お手元の名簿、座席表に代えさせていただきます。

続きまして、配付資料を確認させていただきます。

まず、次第でございます。続きまして、委員等名簿、座席表、それから資料でございますが、資料1から資料5まででございます。参考資料につきましては、参考資料1から3まででございます。

お手元の資料、過不足等ございませんでしょうか。よろしいでしょうか。

(はい)

○鮫島環境保健事業担当課長 それでは、議事の進行につきましては、安達委員長にお願いしたいと思います。

安達委員長、どうぞよろしくお願ひいたします。

○安達委員長 それでは、ご協力よろしくお願ひいたします。

議事に入る前に、確認したいことがございます。東京都環境保健対策専門委員会設置要綱の第10によりますと、会議及び議事録等は原則公開となりますが、よろしいでしょうか。

(異議なし)

○安達委員長 異議なしということで、よろしくお願ひいたします。

それでは、議事に入らせていただきたいと思います。

まず、議事(1)ですが、大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究について、事務局から説明をお願ひいたします。

○島田課長代理 皆様、おはようございます。環境保健衛生課調査担当の島田と申します。私のほうからご説明をさせていただきたいと思ひます。着座にてご説明させていただきます。失礼いたします。

では、資料1に沿ひまして、ご説明いたします。基礎的実験的研究の概要についてでございます。この研究は、平成28年度から令和元年度までの4か年の計画となっております。

大気中のPM_{2.5}に含まれます硫酸アンモニウムにつきましては、大気中濃度の測定法が確立されておらず直接定量した事例がない上に、生体への影響が解明されていないということから、硫酸アンモニウムの実態を把握するとともに、ばく露実験を行ひまして、健康影響について調査を行うことを目的として研究を行っております。

2の実施内容につきましては、大きく2つに分かれております。まず1つ目は、都内大気PM_{2.5}中の実態調査でございます。

2つ目としまして、生体影響調査でございます。こちらは、2つに分かれておりまして、動物実験及び細胞ばく露実験でございます。

今年度、令和元年度におきましては、結果の検証を行ひまして、報告書を作成する予定となっております。

資料1の裏面に、4か年のスケジュールがございます。今年度につきましては、培養細胞に対するばく露実験とぜん息モデルマウスへの硫酸アンモニウムのばく露実験を行う計画となっております。秋ごろに実験を終了し、報告書を作成し、第2回の分科会で報告書の案につきましては、委員の皆様方にお諮りする予定になってございます。

説明は以上でございます。

○安達委員長 ありがとうございます。

では、引き続き、資料2の平成30年度結果報告及び令和元年度の予定について(

培養細胞ばく露実験)についてのご説明をお願いしたいと思います。よろしくどうぞ。

○小西環境衛生研究科長 東京都健康安全研究センター環境衛生研究科長の小西と申します。よろしくお願いたします。

資料2、培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験でございます。着座にて説明させていただきます。

平成30年度実験概要でございますが、平成30年度は2つの実験を行っております。まず一つが、ヒト肺上皮由来A549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。

もう一つは、今年度実施します、ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた硫酸アンモニウムばく露の予備実験でございます。こちらは、液相ばく露を行いました。

ばく露実験の概要は表に示しましたとおり、まず、気相ばく露はA549細胞を用い、ばく露濃度1、10、100mg/m³、清浄空気とし、これを低濃度群、中濃度群、高濃度群、及び対照群としました。流速1.0mL/minで、ばく露時間1、2、3時間で行いました。

次に、液相ばく露は、A549細胞及びCalu-3細胞について、ばく露濃度0.1、1、10mg/mL、対照群として精製水を用いました。Calu-3細胞については表にございますとおりです。ばく露時間は、24時間、ただし、HO-1は3時間としました。

測定項目は、表に示しましたとおりでございます。

A549細胞への気相ばく露実験は、写真に示しましたCultex-RFSを用いて行いました。気相化した硫酸アンモニウムを1.0mL/minの流速で導入し、ばく露します。

2基のCultex-RFSを用い、一方はばく露群、もう一方を対照群として活性炭を通過させた清浄空気を同様にばく露します。

それでは、A549細胞への気相ばく露結果でございます。

まず、細胞増殖能力は、全てのばく露群、時間で影響は見られませんでした。

LDHは、低濃度1時間ばく露で増加しました。IL-8産生は、影響は見られませんでした。IL-6は検出されませんでした。

下の段に参ります。HO-1は、高濃度ばく露群で約2倍増強しました。GSHは、中濃度の2、3時間ばく露で産生が増強されました。

次に、A549細胞への液相ばく露結果でございます。24時間ばく露では、10mg/mLで細胞増殖能力が抑制されました。10mg/mLでは、細胞へのダメージがあると考えられました。

LDHは、10mg/mLで細胞傷害率は増加しました。しかし、5.3%の増加でその作用は強くありませんでした。

IL-8産生に影響はありませんでした。IL-6は検出されませんでした。

下の段、HO-1産生は、影響はありませんでした。GSHは、1mg/mL以上で濃度依存的に減弱しました。

A549細胞への気相・液相ばく露実験の考察でございます。

まず、A549細胞への気相ばく露では、高濃度でHO-1の2倍程度の増強が見られ、中濃度でGSHの2倍程度の増強が見られました。これらの濃度は、平成29年度に実施しました大気中硫酸アンモニウム濃度調査結果の5千倍または5万倍となっており、通常環境では見られない濃度でした。

一方、気相ばく露の低濃度は、大気濃度に比べて500倍という高濃度ではありますが、影響は見られませんでした。したがって、大気中の濃度レベルでは影響は極めて少ないと考えられました。

次に、A549細胞への気相、液相ばく露では、炎症マーカーに変化がなく、炎症への作用は見られませんでした。今後、IL-8、IL-6以外の炎症因子についても調べ、炎症への作用を確認する必要があると考えられました。

次に、Calu-3細胞への液相ばく露実験結果でございます。

細胞増殖能力は、24時間ばく露しますと、0.1、1mg/mLでは、細胞増殖能力が促進され、5mg/mLでは抑制されました。

LDHは、1mg/mL以上で増加しましたが、10mg/mLで5%の増加であり、その作用は強くありませんでした。IL-8産生は、1mg/mL以上で減弱しました。

下の段、IL-6産生は、0.1mg/mL以上で減弱しました。HO-1は検出されませんでした。GSH産生は、0.1mg/mLで増強、1mg/mL以上で減弱しました。

Calu-3細胞への液相ばく露実験の考察でございます。

まず、Calu-3細胞への液相ばく露では、炎症マーカーのIL-8、IL-6ともに減弱が見られました。IL-8、IL-6以外の炎症因子についても調べ、炎症への作用を確認する必要があると考えられました。

また、酸化ストレスマーカー（GSH）が0.1mg/mLで増強したことから、より低濃度のばく露を行い、詳細に検討する必要性が認められました。

Calu-3細胞へのばく露は予備実験の段階ではありますが、培養細胞実験では、ばく露方法、培養細胞の種類によって、硫酸アンモニウムが及ぼす影響は異なると考えられました。

昨年度の第2回の分科会では、これらの結果をご報告させていただきましたが、その際、幾つかの課題をいただきました。その結果を検討すべき事項として、ここに記載しました。

まず、実験精度について。気相ばく露時の湿度はどの程度か、また、気相ばく露濃度の変動が大きいのではないかと、とご意見をいただきました。これら気相ばく露条件を確認し、安定的なばく露条件を検討したいと思います。

次に、気相ばく露量がトータルでどのくらいなのかとのご質問をいただきましたので、気相ばく露量の推計を行いたいと思います。

炎症作用については、IL-8、IL-6以外にも炎症を引き起こすルートは幾つかございますので、複数の炎症関連因子の遺伝子発現を調べたいと思います。

最後に、液相ばく露では、硫酸アンモニウム濃度を10 mg/mLまで設定しましたが、細胞自体のダメージが大きく、またCalu-3細胞では、0.1 mg/mLでGSHが増強しました。そこで、液相ばく露実験について、0.1 mg/mL以下の濃度による低濃度液相ばく露（A549細胞、Calu-3細胞）の実験を行いたいと思います。

これらの課題を踏まえまして、令和元年度はこちらに示します実験を行います。

1つ目が、気相ばく露条件（湿度、濃度の安定性）の確認実験。2つ目、気相ばく露量の推計。3つ目、炎症関連因子の遺伝子発現実験。4つ目、ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム気相ばく露実験。そして、最後に、ヒト肺上皮由来A549細胞及びヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム低濃度液相ばく露実験の以上5つでございます。

このうち、1と2については、既に検討を開始いたしました。

検討に当たり、まず、1. 気相ばく露時の湿度条件について、他の気相ばく露実験で、どの程度の湿度で行っているのか、文献調査を行いました。ここには、A549細胞を用いたばく露実験を中心に記載しました。

記載のある論文では、湿度18%から75%以上となっていました。記載のない論文も幾つかありました。一番下段のZavalaらの報告では、湿度75%以上であれば、培養細胞への影響はなかったとの報告がありました。

これらを踏まえ、湿度について、まず、昨年度の方法を確認しましたところ、対照群は活性炭を通過させた室内空気を使用していたことから、湿度は室内と同じでした。ばく露群は、湿度85%でした。

そこで、安定的な湿度を維持するため、改良法を検討しました。対照群は、乾燥空気を150 mLの精製水の入ったインピンジャー2本に通過させ、加湿しました。ばく露群は、硫酸アンモニウム水溶液0.05 mL/minを乾燥空気中で気相化しました。

その結果、対照群、ばく露群とも73%から74%で、同じ湿度を維持することができました。

次に、気相ばく露条件の濃度の安定性の確認でございますが、昨年度の分科会では、硫酸アンモニウムばく露濃度の日変動が大きかったことを報告させていただきました。この濃度変動をできるだけ少なくするばく露条件を検討しました。

そして、改良法として、先ほど申しました硫酸アンモニウム水溶液を0.05 mL/minで乾燥空気中に気相化することで、安定した濃度を維持できるようになりました。なお、気相化する硫酸アンモニウム水溶液をこれまでの0.1 mL/minから半分の

0. 05 mL/minに変更するため、硫酸アンモニウム水溶液の濃度は2倍としております。よって、今年度の気相ばく露実験では、この条件で実験を行いたいと思います。

次に、2. 気相ばく露量の推計でございます。高濃度100 mg/m³の硫酸アンモニウムで気相ばく露実験を行い、ばく露後のインサートに精製水を加え、3回洗浄した試料溶液について、硫酸アンモニウム濃度を測定しました。対照群についても同様の実験を行い、値を差し引いて、ばく露量を求めました。

その結果、細胞へのばく露量は、表上段でございますとおり、1時間、2時間及び3時間で1.7、2.4及び5.6 μgでした。

表の下段でございますが、細胞表面上の水分の容量を3 μLと仮定して計算した場合、ばく露終了時の細胞表面上の溶液濃度は、1時間、2時間及び3時間ばく露で、0.57、0.8、1.9 mg/mLと推測されました。

次に、3. 炎症関連因子の遺伝子発現実験でございますが、液相ばく露によるA549細胞での炎症への作用を詳細に検証するため、炎症に関連する因子の遺伝子発現を網羅的に測定します。

実験条件でございますが、A549細胞について、こちらに示します実験条件で、これらの対象因子についてリアルタイムPCRを用いて網羅的に測定します。もし変化が見られれば、その因子についてさらに詳しく調べます。

続きまして、4. Calu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム気相ばく露実験でございますが、実験条件はA549細胞のときと同じ、ばく露濃度1、10、100 mg/m³及び清浄空気とし、ばく露時間1、2及び3時間で行います。

測定項目は、表でございますとおりです。

最後に、5. A549細胞及びCalu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム低濃度液相ばく露実験です。液相ばく露実験では、A549細胞、Calu-3細胞とも高濃度ばく露で細胞増殖能力に影響が見られたため、より低濃度でのばく露実験を追加で行います。

実験条件は、ばく露濃度を0.001、0.01、0.1及び1 mg/mL、対象として精製水。

測定項目は、表に示すとおりでございます。

以上で説明を終わらせていただきます。

○安達委員長 ただいまの内容について、ご意見、ご質問をお願いいたします。

○杉山委員 6ページの予備実験の結果のところのGSHのところは、少し変化があつて、おもしろい結果だったのですが、それを踏まえて11ページの5番の低濃度のいろんな濃度での実験を今後されるということだと思ふのですが、この6ページのGSHのところのnがここだけ4で少ないんですね。このn、ある意味ポジティブな結果が出ているところなんですけど、nが少ないので、本当かどうかということをおもいました。こういう結果が出たところは、やはりもうちょっと上のように8とか10とか、nを増やして、

本当かどうかというところをよく見たほうがよかったんじゃないかなと思います。それとともに、1とか10のところは傷害が強くて出なかったのだと思うので、0.1のところに興味があるわけですが、0.1でこういうふうに、有意差がついているような感じのときは、例えば0.2というのをやっていただいて、そこで、さらに上がるのかどうかとか、そういうようなのを見てもよかったんじゃないかなというふうに思います。

そういうことを踏まえて、11ページの5の今後、より低濃度の実験をされるときに、例えば0.001とか、0.01という濃度のところを、もし多少変化があるようだったら、その2番の量を0.002とか、0.02とか、そういうのを加えていただいて、濃度依存性があるかどうかは見ていただくと、濃度依存性があると、やっぱり本当かなというところもより思われるので、nの数を増やすこととともに、ご検討いただければなと思いました。

○小西環境衛生研究科長 ありがとうございます。私どものほうでも、若干、工夫の余地はあったかなと思うところがございますけれども、今度、再実験として、低濃度で行いますので、今、ご意見いただきましたとおり、基本的にはこの濃度で行いますけれども、ケース・バイ・ケースでその場に応じて濃度のほうも決めてnの数も増やしながらやっていきたいと思います。

○安達委員長 ほかにいかがでしょうか。

○柳澤委員 よろしいでしょうか。3ページ目なんですけれども、サイトカインの産生のところですが、こちらは培養上清における発現を見られているということでよろしかったでしょうか。

○大久保主任研究員 実験担当しています大久保です。

サイトカインとおっしゃるということは、IL-8。

○柳澤委員 そうですね。IL-8だったり、IL-6だったり。

○大久保主任研究員 そうです。上清をいわゆる培地の部分を測定しております。

○柳澤委員 測定している。これ、総タンパク量で、補正されていると思うんですけども、総たんぱく量自体は、各タイムコースで、特に増えるということは見られるのでしょうか。

○大久保主任研究員 はい。この実験の中では、全く時間差とか濃度差による変化はありませんでした。

○柳澤委員 なるほど。今の質問の意図としては、炎症が起きてくれば、当然、炎症性のタンパクというのが増えてくるので、総タンパク量自体も増えてしまうと、実際、IL-8が増えていたとしても、相殺されるんじゃないかなと思って、ご質問したんですが、じゃあ、タンパク量自体は変わらないということですね。

○大久保主任研究員 変わらなかったです。

○柳澤委員 わかりました。

- 中井委員 すみません、2点、教えていただきたいんですけど、1点目は8ページ目の下のほうの湿度の確認実験の結果のところなんですけど、73%、74%ぐらいということなんですけど、この条件で今後やるというふうに解釈してよろしいのかということとあわせて、上のスライドで、75%より大きいと影響がなかったということの関係を少し簡単にご説明いただければと思うんですけど、それは1点目です。
- 齋藤副参事研究員 現在の計画では、検討して、これなら安定であろうという73、74%というものをを用いる計画にしております。ただ、ご指摘いただきましたように、文献のほうでは75%以上では安定というところで、75%に少し届かないところが大丈夫なのだろうかというご心配をいただいてのご意見だというふうに認識しております、ただ、75%以上で大丈夫の次が、55%では、やはり影響があるというもので、では、73%や、74%でどうかという情報が残念ながら載っていないというところがございます。私どもが一番、実験条件として大切だというふうに考えておりますのは、対照群とばく露群で、ほぼ同じ湿度でばく露を行うというところが最も大事だということを考えておまして、対照群とばく露群で影響がありそうな湿度であるならば、もう少し工夫をすれば75%より上に上げることは可能でございますので、実験の結果の様子を見ながら、その辺はきちんとデータが得られる実験条件にしていきたいというふうに考えております。
- 中井委員 もう一個よろしいですか。10ページの上の結果ですけど、どういうふうに解釈していいかわからないので教えていただきたいのですが、結果だけだからわからないだけかもしれないのですが、1時間の値、2時間の値、3時間を見ていると、1時間と3時間の値は結構、きれいな結果に見えるのですが、つまり多分、同じ量が増えてくるだけなので、積み重ねで増えてくるので、1と3時間は、3倍になっていると、きれいに3倍になって見えるんですけど、2時間だけ、何かちょっと変わった動きをしているような気がするのですが、この辺、ちょっと教えていただけませんか。
- 齋藤副参事研究員 私ども、2は少し少なかったというところは認識しております、これは実験のn数が2でございまして、その平均で、ちょっと差があったものを平均したものですから、ちょっと低目になっておまして、ばく露がもしかしたら、このとき、ちょっと少な目だった可能性があるというふうに考えております。
- ただ、量的には順々に増えておりますので、吹きつけ方によって、ダイレクトに細胞に乗っているか、その周りのインサートについてのもあったのかというふうなところで、少し変動が出たのではないかとというふうに考えております。
- 安達委員長 ほかにいかがでしょうか。
- 私も、10ページの上のほうのスライドですが、こちらの判断の仕方というんですかね、これを求めることによって、液相ばく露との関連性を相対的にわかるのかなというふうに思うのですが、そもそも数字が思ったよりも100mg/m³のばく露に対して、細胞が受け取る量が非常に少ないなとは思いますが、液相との比較というのは可

能なんでしょうか。

○齋藤副参事研究員 表のほうでは、細胞を表面上の水分を $3\mu\text{L}$ と仮定して、濃度を出させていただきました。ただ、この仮定がどうなのかというところを突き詰めますと、何とも言えないというところがあるのは事実でございます。

ただ、液相ばく露と気相ばく露で濃度の濃さといえますか、それを比較するために何とか比較ができないかというところを出したものでございます。

高濃度3時間のばく露で $1.9\text{mg}/\text{mL}$ になるだろうということを考えますと、液相のばく露では $10\text{mg}/\text{mL}$ でばく露しておりましたので、それに比べれば、気相ばく露のほうが濃度的には低かったということにはなるのだろうと思います。

ただ、気相ばく露のほうで、HO-1やGSHの影響が見られていたのに対し、液相ばく露では影響が見られなかったのはなぜかというところが、また大きな疑問になってくるのですけれども、文献を種々調べました結果、このような気液の細胞ばく露で、粒子をばく露したもの、それからエアロゾルをばく露したもの、それから溶液でばく露したもの、それぞれの物質の負荷量を同じくして、ばく露をした結果、粒子でばく露したものが一番取り込み量が多いという文献がございまして、やはり、どのような形で細胞にばく露するかによって、量的には同じでも取り込む機構というのが違うのであろうという考察がございました。詳しいメカニズムについては、ちょっと、まだなかなかわかっていないところがあるのですけれども、同じ量であっても、やはり、ばく露形態によって取り込み量が違い、影響が変わってくるというところは、あるのだなということ認識して、実験結果をしっかり考察してまいりたいと考えております。

○安達委員長 実際の $\text{PM}_{2.5}$ という粒子のばく露を考えると、非常に大事なところかと思えます。よろしくをお願いします。

○齋藤副参事研究員 ありがとうございます。

○安達委員長 ほかにはありますか。

○内山委員 一つ教えていただきたいのですが、杉山先生のおっしゃった、nの数のことなんですけれども、例えば6ページの、先ほどのCa1u-3細胞のもので、この4つの因子は一つに細胞群に対して同時に測っているのではないのですか。

○大久保主任研究員 これは、IL-6に関しましたら同時というか、同じ培地を用いていますが、それ以外は全く別個に測定しております。

○内山委員 別個に測定しているのですか。

○大久保主任研究員 はい。

○内山委員 そうすると、最初からGSHは $n=4$ しかやらなかったということですか。

○大久保主任研究員 はい、今回は4しかやっておりません。

○内山委員 他の図を見てもGSHが一番数が少ないのですけれども、4でも有意差が出ると考えたのか、ほかの群よりnが少なくても何か影響が見られると考えたのか、そこら辺の理由があったら教えてください。

○大久保主任研究員 今回、予備実験ということもありまして、本実験、今年度に関しましては、もうちょっとnの数は増やしていきます。

○内山委員 できれば、同じ数に揃えたほうがいいと思います。この4つの結果を、1つの図で出されると、同時に測定していると考えて、4で有意差が出るものだけを集めて4にした。あとは、省いてしまったのか、あるいは欠測値が多かったのかなと思ってしまいます。本来はn=16やっていたのではないかととられかねないので、そこら辺のところは、できれば同じ数にされたほうがいいと思います。

○大久保主任研究員 どうもありがとうございました。

○安達委員長 ほかによろしいでしょうか。新田先生。

○新田委員 ちょっと話がまた気相ばく露量の推計の話に戻ってしまうのですが、これは、非常に重要な観点だなと思って、お聞きします。先ほども、ちょっと議論になりました細胞表面上の水分の容量を3 μ Lと仮定してというところですけど、こういう人とか動物とかの肺胞表面の水分量とかという、面積当たりとか、何かそういう基礎データというのはあるんですか。もう一つ同じ、類似の質問なんですけど、この水分というのは、細胞から浸潤というか、滲出してきた水分なんですかね。外からばく露したときの含まれている湿度の部分のことなんでしょうか。

○齋藤副参事研究員 まず、浸潤してきたものか、それとも外からのものかということですが、この実験では水分は確かに気中には含まれておりまして、湿度は75から80%近くのものでございますが、その細胞表面上に水滴が乗るような、そのような実験の条件ではございませんでした。

ばく露前の様子ですが、これはA549細胞で調べておりますので、液体中で培養しておいて、それを液から上げて、下の面だけを培養液につけた状態でばく露するというところで、細胞の表面にあった培地も吸引して取り除くのですが、その後、殊さらに空気を当てて乾かすようなことはしておりません。もともとを培養液に浸かっていたものから上げて、ばく露しているということで、わずかに細胞表面上には培地が、残っているだろうということを考えて、表面上にうっすら乗るとしたら、どれぐらいの液量なのだろうかということところで、あくまでも仮定でございまして、何らかの論文から引用したものではありません。

今のところ、細胞表面上の液体がどれくらいあるかということについては、詳しい情報は揃っておりませんが、例えば、これから使うCa1u-3なんかですと、気液の界面上で長時間ばく露すると粘液を産生して、その表面を守るような、そういう作用もあるようですので、細胞上の水分や粘液については、これからしっかり情報をつかんで実験のばく露の推計というのをしていきたいというふうに考えております。

○安達委員長 ありがとうございます。

では、次の、動物ばく露実験についてのご説明のほうにお願いしたいと思います。

○鈴木生体影響研究科長 健康安全研究センター生体影響研究科長の鈴木です。よろしく

お願いいたします。

それでは、ぜん息モデルマウスの作製・評価及びぜん息モデルマウスへのばく露試験について、ご説明させていただきます。着座にて失礼させていただきます。

では、初めに、30年度に実施しました、ぜん息モデルマウスの作製・評価についてご説明させていただきます。

目的ですが、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、軽度な症状のぜん息モデルを得るということで、前回の分科会での報告ですけれども、主な検討内容としましては、期間が短期モデルと長期モデル。それから、感作方法としましては、経鼻投与、それからネブライザー吸入、手法としましては、免疫学的解析と気道抵抗を測定してございます。

その結果、経鼻投与は炎症が激し過ぎたため、ネブライザー短期モデルを再検討し、今後の実験に採用することとさせていただいております。

実際、前回の結果ですけれども、こちらにまとめてございます。

作製方法としましては、BALB/cの♀マウス、8週齢、n=5で、OVAとアラムで免疫を3回、感作を6回、それにつきましてはOVAの経鼻投与とネブライザー吸入で比較しました。

結果を下に示しましたが、まず肉眼的観察ですけれども、経鼻投与のほうでは、炎症反応と、それから激しい出血斑が認められておりまして、それに対しまして、ネブライザーのほうは、比較的軽度であるということがわかります。

下、BALF中の細胞診につきましても、経鼻投与では好酸球が著しく増加しておりますが、ネブライザーでは経鼻投与に比べますと、弱いということがわかっておりまして、病理組織像につきましても、左、経鼻投与。下に拡大した図を示してございますが、ネブライザー投与のほうは経鼻投与よりも弱く、比較的均一な炎症反応が観察されております。

こちらが、短期モデルの再確認と、それから気道抵抗測定したプロトコールになります。基本的には、前のネブライザーと同じプロトコールで実施してございます。

作製方法としましては、BALB/cの♀6週齢、n=9で、免疫が2回、感作が6回です。

対照群につきましては、免疫後PBSをばく露して、それから、ぜん息群につきましては、免疫後OVAで感作、それから翌日に解剖ということをしております。

主な分析項目としましては、病理組織学的解析、BALFも細胞診断、それから気道抵抗を測定してございます。

これは、病理組織像ですが、左が対照群、右がぜん息です。

下の写真は、上の四角を拡大したものですけれども、前回と同様に、軽度なぜん息症状の誘導が観察されておりまして、それに細胞浸潤では、好酸球は細胞浸潤を認められていますし、気管支のところでは上皮の肥厚も認められております。

これは、BALF中の細胞診断の結果ですけれども、左が対照群、右がぜん息群です。これにつきましても、ぜん息群では好酸球の炎症反応が再確認されております。

これは、気道抵抗の測定の条件検討になりますけれども、点線で青色が対照群で、赤色がぜん息群ですけれども、赤いぜん息群で点線部分がありますけれども、これは最高濃度の測定途中で死亡してしまっていて、測定値は除外してございます。

ご覧のとおり、ぜん息群で気道抵抗の上昇が認められておりますが、過去の文献等と比較しますと、若干低目でありますので、メサコリン濃度の再検討が必要であると考えてございます。

30年度の結果をまとめますと、経鼻投与とネブライザー吸入による感作方法を検討し、ネブライザー吸入により、軽度なぜん息モデルを作製することができたと考えております。

また、新規に導入しましたemka社の呼吸機能解析装置により気道抵抗の測定が可能になりましたが、メサコリンの刺激の条件については再検討が必要かと思われま

また、同じ作製プロトコールで、現在まで4回の実験を実施しております、概ね同程度の症状、すなわち、比較的均一で軽度の症状が観察されております。

ここからは、ぜん息モデルマウスへの硫酸アンモニウム吸入ばく露試験の説明をさせていただきます。まず、予備実験を実施しています。

方法としましては、前回と同じようですが、BALB/c♀15週齢でn=7。

免疫を2回、感作6回で、ばく露量につきましては、硫酸アンモニウム10mg/m³、6回、1時間ばく露してございます。

この濃度は、都内の大気中の、PM_{2.5}中の硫酸アンモニウム濃度が約2μg/m³でありますことから、約5,000倍の濃度でばく露しているということになります。

1群につきましては、精製水をチャンバーでばく露した後に、PBSをネブライザー吸入ばく露しています。2群につきましては、精製水の後にOVAをばく露。3群につきましては、硫酸アンモニウムをばく露した後に、OVAをばく露ということで、いずれも翌日解剖です。

主な分析項目につきましては、下に示しますように、病理組織学的な解析と免疫学的解析、それから気道抵抗を測定してございます。

これは、BALF中の細胞診断の結果ですけれども、左から1群、2群、3群になっています。2群及び3群で軽度な好酸球性の炎症が確認され、3群において好酸球の増加がやや強く認められております。

これは、病理組織像ですけれども、左から1群、2群、3群です。下の写真は、上の四角を拡大したものです。

結果としまして、2群、3群で好酸球性の肺炎症が見られましたが、2群に比べ3群では顕著な増強は認められておりません。

これは、病理所見をまとめたものです。観察は気管支から終末気管支、それから肺胞

管から肺胞、それと終末気管支につきましては、近位と遠位について、分けて、それぞれスコアを出しております。

これを見ますと、遠位の部分の終末気管支におきまして、2群よりも3群で比較的強い反応が認められております。

これは気管支における粘液産生をPAS染色により調べたものです。左から1群、2群、3群です。赤紫色の部分が粘液になります。上の画像をパソコン上で画像処理して、面積を求めた結果を下にお示ししてございます。

左から1群、2群、3群ですけれども、2群及び3群で粘液産生の亢進が見られておりますけれども、2群と3群の間では差異は認められていません。

これは、肺組織の定量的なリアルタイムPCRの結果です。＊は1群に対する有意差があることを示しております、▲は1から3群全体での傾向検定をかけた結果で、傾向検定はヨンキーの傾向検定をかけております。

最上段は、OVA誘導のぜん息により、リンパ球集団がTh2に変化していることを示す、各種マーカーです。おおむね2群、3群で上昇しておりました。

一方、中段は、左端の*foxp-3*は、制御系リンパ球のマーカーで、残りの3つは一般的な炎症やTh1のマーカーで*tnf*は3群で増加していましたが、ほかは増加しておりませんでした。

最下段は、そのほかのぜん息マーカー、あるいは粘液産生や肺組織の修復にかかわる因子ですが、いずれも2群、3群で増加しておりました。

全体的に、ぜん息症状を示す遺伝子の発現パターンが見られました。これらが、3群で高く傾向検定の結果からも、増悪を示すデータも幾つかありますが、2群と3群の間には有意差は認められず、また、この予備試験では、 $n = 4$ と数が少ないということで、硫酸アンモニウムによる増悪かどうかというところは、明確ではありません。

これは、肺の従属リンパ節におけるリンパ球サブセットをまとめたものです。左からB細胞、キラーT細胞、ヘルパーT細胞になります。3群におきまして、B細胞とキラーT細胞の有意な増加が認められ、増悪の傾向も認められましたが、これにつきましても、 $n = 4$ でばらつきが大きいので、評価には注意が必要であると考えております。

これは、emka社の気道抵抗装置で、気道抵抗を測った結果を示したもので、これは全抵抗になります。

高濃度のメサコリン刺激による2群及び3群において、気道抵抗の有意な増加が認められ、増悪の傾向も見られましたが、 $n = 3$ でばらつきが大きいことから、こちらについても評価には注意が必要であると考えております。

また、2群と3群の間には有意差は認められておりませんでした。

これは、気道抵抗のうちの末梢気道抵抗について示したものですけれども、末梢抵抗につきましても、増悪の傾向を示しておりますけれども、全抵抗と同様にばらつきが大きい結果でありました。

予備実験の結果をまとめます。まず考察ですけれども、 $10\text{ mg}/\text{m}^3$ 、これは都内大気濃度の約5,000倍ですけれども、の硫酸アンモニウムばく露によるぜん息症状の顕著な増悪は認められませんでした。

また、幾つかの項目で、増悪を示す結果も得られましたが、2群と3群の間には有意な差は認められませんでした。

本試験では、動物数を増やすとともに、高濃度のばく露を行いたいと考えております。

こちらが現在、実施中の本試験の実験概要です。基本的には、前の予備実験と同じで行っています。

ただし、匹数につきましては、予備実験では7匹でしたけれども、本実験では16匹、それから、正常マウスにおける硫酸アンモニウムの影響を再確認するということと、あと、高濃度群の $100\text{ mg}/\text{m}^3$ を追加して行っております。

群としましては、6群、上の1から3が正常なマウスに硫酸アンモニウムをばく露していくと、4から6はぜん息症状のモデルマウスに硫酸アンモニウムをばく露しています。

下については、プロトコールを示してありますが、これは前の予備実験と同じでございます。

私からの説明は以上になります。

○安達委員長 動物ばく露実験についてのご説明をいただきました。

それでは、これについて、ご意見、ご質問をお願いします。

○杉山委員 全体を通して、何か非常におもしろい結果が出ているなど、私は思ったんですね。考察を伺うと、余り有意差がなかったということを強調されていましたが。これはもう私は有意差が出ないのはnが少ないからというその問題だけじゃないかと思えます。例えば8ページの遺伝子発現のところなんかを見ますと、1群、2群、3群で、右肩上がりにきれいに上がっていたりして、傾向は十分出ているので、nを重ねると、有意差がきれいに出来るんじゃないかなというふうに思って、非常に、ある意味すばらしいなと思いました。それはそれとして、非常に結構だと思ったのですが、根本的に本試験の今度、実験が現在実施中というところなんですけどね。

nを増やされるというところは、非常に結構だと思うんですけど、この実験を伺って思うのは、そもそも硫酸アンモニウムの濃度が大気中の5,000倍であるということ伺ったんですけども、ぜん息の患者さんというのは、気道過敏性というのを獲得していて、このネズミも結局、気道過敏性を獲得しているわけなんです。

そうしますと、非特異的な刺激、物理的な刺激、例えば寒いところへ行くとか、冷たい空気を吸うとか、そういう物理的な刺激で、そういう反応が誘発されて、好酸球なんかも当然増えるんですね。ですので、5,000倍の濃度、つまり結構、硫酸アンモニウムの刺激の強いものになっていると思うのです。ですから、硫酸アンモニウムの特異的な反応を見ているわけではなくて、物理的な、つまり刺激を見ているだけという可能

性も僕はあると思うんですね。

ですので、先ほどは、結果として、非常にいい結果が出て素晴らしいという、逆のことをお話しして申し訳ないんですけど、むしろ僕は高濃度をやるというよりも、低濃度もやったほうがいいんじゃないかなと思うんですね。低濃度をやって、物理的刺激を減らして、硫酸アンモニウムの特異性というか、ぜん息誘発の特異性があるのかどうかと、そういうあたりを見るというほうが、むしろいいんじゃないかなというふうに感じました。

○北條主任研究員 実験担当、北條といいます。

先生おっしゃるとおりでございまして、非常に濃度が高いというのが、まずあります。今回、もともと、なぜこのぐらい高いかということですが、参考にしている古い論文ですけども、モルモットの論文で、最大10mg/m³までやっております、そこで、ぜん息の症状というのが明らかに増悪したというのを確認した上で、先の実験として、さらに濃度を下げていく、プロトコルを変えていくという方向性がありました。

それで、これに我々の10mg/m³については、おっしゃるとおり、遺伝子の結果なんかを見ますと、nが多ければつくのではないかというのがあるんですけども、病理を見る限り、はっきりとしたところはどうしても言えないというのがあります。そこが、一番今回、nが多かったので、全ての動物について組織は見ているんですけども、そこで、やはり積極的に増悪があったと言いたいがたいということがありましたので。まずマウスにおいて、もう少しはっきりとした結果をつかむことのほうが先かというふうに考えて、今回100mg/m³を考えていたところでございます。

基本的にマウスのほうがモルモットより、モデルがもともと違いますけれども、マウスのほうが症状が出づらいという話もあるので、今回、ちょっと上を試してみたいというふうに考えております。

○杉山委員 病理像に関しては、僕、病理像で差がつくぐらいというのは、なかなか難しいんじゃないかなとは思いますが、個人的に。病理像で差がつくぐらいだと、多分、死んじゃっていると思うんですね。そんな感じじゃないと、病理でぱっと見て、例えば2群と3群で違うとかというのは、なかなか難しいんじゃないかなというふうに思います。

○北條主任研究員 ありがとうございます。

○内山委員 私も全く賛成で、気道過敏性の評価は、機能的な反応を見ていると思うんですよ。病理は、もう器質的な変化を見ているので、むしろ、一時的に例えば硫酸アンモニウムの濃度が上がったときに、ぜん息のような発作なり症状が悪化するかというのを見たほうが、おもしろいかなと思います。病理組織変化が見られるというのは、それは、もうぜん息が増悪した結果ですので、何か、濃度がちょっと上がったときに、この物質が入っていれば、ぜん息の発作が誘発されるとか、そういうところのほうがおもしろいのではないかなという感じが私もしていますね。

それで、今年、本実験の時は、症例数を増やすとおっしゃっていますが、結局、気道過敏性は4例から5例に増えるだけですよね。

○北條主任研究員 過敏性については、最低でも5例というか、実施には6例を目指して、実験準備をしているところです。

○内山委員 ばく露は16例やるんだけれど、その中で気道抵抗を測定するのは、5例か6例ということですね。

○北條主任研究員 そうです。

○内山委員 気道抵抗を測定するのは、大変だということはわかるんですけど、逆に、もう病理は少し減らして、気道抵抗の症例を増やしたほうが、より低い濃度で何か出る可能性はあるということなのです。

先生おっしゃるように、病理で悪くなったというのは、器質的に変化が出てしまったということなので、いわゆる気道過敏性の、遺伝子発現を調べていけば、多少は、そこで何か活性化しているかということはわかると思うのですけれど。

○北條主任研究員 病理を増やしたというのもあるんですけども、気道過敏性を測定しますと、遺伝子の検査ができないということもあるので。

○内山委員 できないですね、それはわかるんです。実際には、6匹気道抵抗の測定に回せば、あとの病理は10匹になって、気道抵抗を増やせば、他は減らすしかないということですね。でも半々ぐらいでもいいような気がしています。

○北條主任研究員 そうです、はい。今回、正常マウスもやるというのがあるので、本当に限界で、この数になってしましまして、先生方おっしゃるとおり、少なくとも、この物質がそこまで器質的な変化というのは、もう、これまでの経験ではないと考えておりますので、今後の実験については、もう少しばく露直後の影響というか、浴びた直後の気道抵抗がどうなるかとか、そういうあたりに、もう少し注力していきたいと考えております。

○安達委員長 病理の話が出たので、ちょっと方法で、これまでも同じ方法でやられていると思うんですけども、肺の復元というんですかね、圧力のかけ方、ホルマリン固定する場合の方法はどんな方法でしたか。

○北條主任研究員 水柱圧を確認して注入するほどの正確にはしておりませんが、シリンジで決めたスピードで、手動ですけども、注入しているという方法です。

○安達委員長 例えば6ページとか、病理の写真を見ると、ちょっと肺実質の膨らみ方がちょっと気になって、できれば同じ水柱圧で復元したほうが、気道抵抗があるところに、それが液体の場合、どういう影響があるかわからないんですけども、肺実質の膨らみ方に影響していないといいなど。だから、ちょっと時間かけ、かかるかもしれないけど、一定の水柱圧で復元するというような方法をとられたほうが、多分、7ページの病理所見のまとめのところを見たときや写真を出したときに、ちょっと印象がやっぱり違うのかなというふうに思いました。コメントです。

- 北條主任研究員 ありがとうございます。
- 松木委員 すみません、ちょっと確認をさせていただきたいんですが、8ページのところで、さまざまな有意差検定をやっているんですけど、これはあれですか、どんな検定が使われたんですか、検定方法として。
- 北條主任研究員 これについては、このアスタリスクで示しておりますのは、シャーリー・ウィリアムズの検定、ノンパラメトリックの検定をしております。1群に対して2群、それから1群に対して3群。
- 松木委員 2群と3群の比較は何を。
- 北條主任研究員 2群と3群については、事前に別の方法として、スティール・ドゥワース法で、全群総当たり……。
- 松木委員 要するに、チューキーをやったということね。
- 北條主任研究員 そうです。チューキーと同じ考えです。
- 松木委員 はい、わかりました。オーケーです。ありがとうございます。
- 安達委員長 ほかによろしいでしょうか。
- じゃあ、柳澤先生。
- 柳澤委員 1点は、8ページのリンパ球のサブセットを見た実験で、これはFACSで解析されていると思うんですけど、抗原提示のサブセットは見られていますか。
- 北條主任研究員 見ていないです。ここで、今回、見ているのは。
- 柳澤委員 リンパ球だけですかね。
- 北條主任研究員 はい。
- 柳澤委員 そうですね、リンパ節なので、当然、抗原提示のほうの活性化というのもあると思うので、検討されてみてもいいのかなというふうに思いました。
- あとは、こちらのデータは細胞数で出していますけれども、蛍光強度としても上がっているというところは解析されていますか。
- 北條主任研究員 蛍光強度。
- 柳澤委員 多分、ポジティブの細胞の数で今出されていますけど。
- 北條主任研究員 はい、そうです。数です、はい。
- 柳澤委員 その細胞一つ一つで蛍光強度は変わってくるとおもうのですが、そちらの解析というのはされていないですか。
- 北條主任研究員 してあったはずですけども、ちょっと、そのまとめをしていないかもしれないです。すみません。
- 柳澤委員 わかりました。
- あと、ちょっと実験スケジュールが違うからなのかと思うのですが、2ページの短期モデルと、5ページと週齢が大分違うんですけども、これは。
- 北條主任研究員 おっしゃるとおりで、実は基本的に同じプロトコールでやりたかったんですけども、ここの年度末に何とか実験を組み込んだというのがあって、ここに間

があいてしまったんですね。人員の作業というか。

○柳澤委員 週齢が経ってしまったということですね。

○北條主任研究員 はい、経ってしまった。そのために、感作を始めるまでに時間が経っているのでは、そのせいもあってか、BALFの細胞診断なんか、弱目に出ている感じがあって。

○柳澤委員 変わってくる。そうですね。週齢で多分、結構変わってくると思います。では、今後は6週齢をスタートとしてということですね。

○北條主任研究員 そうですね、はい。本実験はそれでやっております。

○柳澤委員 はい、わかりました。ありがとうございます。

○北條主任研究員 ありがとうございます。

○安達委員長 よろしいでしょうか。

それでは、議事の(3)になりますが、今後の基礎的実験的研究計画案について、入りたいと思います。事務局からご説明をお願いします。

○島田課長代理 調査担当、島田からご説明させていただきます。着座にてご説明させていただきます。失礼いたします。

今後の研究計画(案)につきまして、ご説明でございます。今後の基礎的実験的研究(案)。

目的としましては、PM中に含まれます硫酸水素アンモニウムにつきまして、その健康影響を解明するために、大気中実態調査やばく露実験を行いまして、その健康影響について、調査をいたします。

硫酸水素アンモニウムは、現在の研究テーマであります硫酸アンモニウムの前駆物質でありまして、その酸化作用は硫酸アンモニウムよりも強いと言われております。

また近年、水分子の表面で三酸化硫黄とアンモニアが反応いたしまして、水三分子を含む環状構造のクラスターを経て、硫酸水素アンモニウムを形成するメカニズムが発見されました。

この環状クラスターから硫酸水素アンモニウムへの変化は、反応エネルギー障壁がほぼゼロであり、大気中におけますアンモニウム塩形成の重要なメカニズムとして、注目されております。

硫酸水素アンモニウムにつきましての現状でございます。2ページ目です。平成29年度はPM_{2.5}の主要成分の中で、硫酸イオンが14.7%でございました。

また、硫酸水素アンモニウム生成を促進する物質であります光化学オキシダントは、平成29年度都内の測定局におきまして、環境基準を達成できてございません。

また、平成29年度の都内PM_{2.5}の環境基準達成率は、一般局で87%、自排局で79%でございました。

また、硫酸水素アンモニウムは、大陸からの越境汚染の程度を推察するための指標となることが示唆されてもおります。都内におきましても黄砂に付着して硫酸水素アンモ

ニウムが飛来している可能性があると言われておりますが、その実態は不明となっております。

硫酸水素アンモニウムについて、これまで研究されていることにつきましては、平成29年度、我々の実験におきまして、硫酸水素アンモニウムを分別定量する方法を開発いたしました。

平成29年度に実態調査しましたところ、硫酸水素アンモニウムが検出された時期は、黄砂が飛来する時期と重なっており、黄砂との関連が推察されております。

正常ラットやぜん息マウスに対しまして、大気環境レベルの濃度で、3日間ばく露を行ったところ、気道抵抗等の影響は見られなかったという報告はありますが、環境中ワーストケース、職業ばく露の濃度レベルでのヒトに対する吸入実験では、ぜん息患者で肺機能に影響を及ぼしたという報告もございます。

硫酸水素アンモニウムについてわかっていないこととしましては、培養細胞への気相ばく露、液相ばく露のデータは、これまでにはございません。実験動物を用いた報告例も少なく、ぜん息モデルを用いた評価は不十分であります。動物実験や培養細胞による解析が行われていないので、ぜん息症状の増悪メカニズムは不明となっております。

では、調査・研究計画の概要でございます。大きく3つの方法で行っていかうと思っております。

培養細胞ばく露実験、都内大気PM中硫酸水素アンモニウムの連続測定、動物ばく露実験、こちらの3つを考えてございます。

次に調査のスケジュールでございます。1年目に、ヒト肺胞上皮由来A549細胞におきまして、液相ばく露実験を行います。感受性を高めた細胞の液相ばく露実験の予備実験を1年目に行います。また、酸化ストレス能の測定もあわせて行っていく予定となっております。

2年目には、A549細胞におきまして、気相ばく露実験、あと、感受性を高めた細胞の液相ばく露実験の本実験を行います。引き続き、酸化ストレス能の測定も行ってまいります。

また、Calu-3細胞、ヒト気管支上皮由来の細胞につきまして、液相ばく露実験を行いますとともに、細胞膜間結合力の測定の予備実験を行う予定にしております。

2年目につきましては、動物ばく露実験も行いまして、2年目、正常マウスへのばく露実験を行ってまいります。

3年目につきましては、Calu-3細胞、ヒト気管支上皮由来の細胞につきまして、気相ばく露実験を行います。あと、細胞膜間結合力の本実験を行います。動物ばく露実験につきましては、ぜん息モデルマウスへのばく露の予備実験を実施いたします。

都内大気PM中の硫酸水素アンモニウムの測定につきましては、3年目の途中からサンプリングを開始いたします。

4年目につきまして、動物ばく露実験の本実験と、あと大気PM中の連続測定のサン

プリングとともに、分析についても行っていくという計画にしております。

計画の全体像は以上になります。

○齋藤副参事研究員 では、続きまして、硫酸水素アンモニウムの細胞培養ばく露実験についてご説明をいたします。着座にて失礼いたします。

目的は、PM_{2.5}の成分の1つであります硫酸水素アンモニウムの培養細胞への影響を調べることにあります。

実験計画としましては、まず1つ目が、気相ばく露条件の検討。2つ目が、A549細胞及びCa1u-3細胞への気相、液相ばく露実験。そして、次から3つが新しい試みとして実施する実験でございますが、酸化ストレス能（細胞内活性酸素種ROS）の測定。また、感受性を高めたA549細胞への液相ばく露実験。Ca1u-3細胞の細胞膜間結合力の変化の測定を予定しております。

この各項目についてご説明をいたします。

まず、気相ばく露条件の検討でございます。気相ばく露のための安定したばく露実施をするために、その条件の検討を行います。主には、気相ばく露濃度として1、10、100mg/m³を安定に発生するため、気相化に使用する、この硫酸水素アンモニウムの水溶液の濃度を中心に検討を行う予定でございます。

続きまして、A549細胞及びCa1u-3細胞への気相、液相ばく露実験です。

まず、気相ばく露では、ばく露の流速は1mL/minで行い、A549細胞、Ca1u-3細胞を用いまして、ばく露濃度は1、10、100mg/m³、対象には、清浄空気を用いまして、ばく露時間は1、2、3時間でございます。

次に、気相ばく露実験ですが、同様に2種の培養細胞を用いまして、ばく露濃度は0.001、0.01、0.1、1mg/mL、対照には精製水を用います。ばく露時間は24時間で、HO-1については、3時間で実施をいたします。

測定項目につきましては、表のとおりでございます。

続きまして、酸化ストレス能、これは新たな試みとして実験をする予定のものでございます。これまでは、HO-1やGSHを測定してまいりましたが、これらは酸化ストレスを受けて発生したROSの作用によって増強する因子でございました。今回は、細胞内に発生したROSを、試薬を用いて測定することで、より直接的な酸化ストレスの測定が可能でございます。これによって、HO-1やGSHの結果を補完できるというふうに考えております。

ROSの種類としましては、ヒドロキシラジカルでありますとか、スーパーオキシドアニオンなどを予定しております。

続きまして、感受性を高めたA549細胞への液相ばく露実験でございます。A549細胞にIL-1βを反応させることにより、IL-8やIL-6などの炎症因子が上昇したA549細胞を作製いたします。これが感受性を高めたA549細胞です。この細胞へ硫酸水素アンモニウムを液相ばく露して、炎症等が増悪するかについて、調査を

いたします。

最後に、C a l u - 3の細胞膜間結合力の変化の測定についてでございます。

C a l u - 3細胞は、細胞膜間結合力（タイトジャンクション）が強いという特徴を持った細胞でございます。しかし、この結合力が弱まりますと、化合物が細胞の間を通過し、基底膜や結合組織にまで浸透し、より深部にまでダメージを及ぼす可能性があります。

この実験では、硫酸水素アンモニウムがC a l u - 3の細胞膜間結合力に変化を及ぼす影響について、電気抵抗値などを測定することで判定し、細胞への傷害性を測定することができるという予定でございます。

以上が、培養細胞についての実験のご紹介でございます。

引き続きまして、都内大気PM中の硫酸水素アンモニウムの連続測定について、ご説明をいたします。

目的としましては、大気PM中に含まれる硫酸水素アンモニウムを1年間連続して測定し、PM中の濃度と黄砂や気象との関連を調査することでございます。

この大気調査の特徴としましては、都内に飛来する黄砂は非常に飛来の日数が少ないということがございますので、その影響を見るために、1年間、つまり7日間を52回連続して、大気を採取する予定にしております。そのため、測定地点としては、健康安全研究センター、1か所予定しております。

前回の調査では、PM_{2.5}のみを測定しておりましたが、今回は粒径が2.5 μmから10 μmの粒子についても測定を行う予定でございます。

では、前回行いました平成29年度の大気調査結果について、いま一度、ご説明をさせていただきます。

平成29年度は、6か所の測定局で大気採取を行いました。大気採取は、1か月当たり7日間実施しております。その中で、硫酸水素アンモニウムが検出されたのは、平成29年5月、6月、それから平成30年2月、3月の4回のみでございます。

いずれも、黄砂の飛来があろうというふうに推定される時期でございましたので、気象庁の黄砂のデータを確認しましたところ、目視の観測では、大気採取期間中に黄砂は観測されておりませんでした。ライダーによる観測では、5月と、それから2月と3月に、わずかな量が観測されておりました。

黄砂の飛来により、硫酸イオン濃度が上昇するということが報告されておりますので、硫酸水素アンモニウムについても黄砂の何らかの影響を受けている可能性が示唆されました。

これは、実際に硫酸水素アンモニウムが検出された月の黄砂の観測状況をお示したものです。大気採取中の7日間の中に、6月を除きまして1日から2日、時間にしますと10時間から21時間程度の黄砂の飛来が観測されておりましたが、濃度は大変低く、0.1 mg / m³というのが検出下限値といえますか、最低の濃度でございまして、これ

をわずかに超えるぐらいの濃度の飛来であったということでした。

なお、ライダーというのは、レーザー光を用いたレーダーで、上空を通過する黄砂をリアルタイムで計測できる機器でございます。

また、黄砂の観測なのですが、これらの月以外に4月にも観測はされておりましたが、4月には硫酸水素アンモニウムは検出されておりました。

この理由としましては、4月の黄砂飛来時間が6時間と短かったことが原因ではないかというふうに推察されております。また、6月につきましては、黄砂の飛来がなかったにもかかわらず、硫酸水素アンモニウムが検出されましたので、この原因について、大気汚染物質や気象要素との関連を考察いたしました。

硫酸アンモニウムにつきましては、 SO_2 と相関があるということがわかっておりますので、 SO_2 の濃度に着目いたしましたところ、6月は SO_2 濃度が最も高かったということがわかりました。

SO_2 の発生源として、不定期なものには火山の爆発などもあるのですが、この時期の火山の噴火があった、あるいはガスが流れてきたという情報はなく、火山の影響は、この月の SO_2 の上昇には寄与していなかったというふうに考えられました。

そこで、その他の大気汚染物質について、 NO_2 や $\text{PM}_{2.5}$ の濃度変動を見ましたところ、やはり6月には、それぞれ濃度が上昇しておりましたので、この6月には SO_2 を含む燃焼系の排出ガスの濃度が上昇したのではないかと推察されました。

次に、風向、風速について見ますと、6月の風向は南から東の風が卓越風でございまして、風速を見ますと6月は非常に弱かったということがございます。これらのことから考え合わせますと、気象条件としても逆転層の発生により、排ガスの拡散が抑えられやすい気象条件があったのではないかと推察されます。

そこで、風向を見ますと南から東という方向でございましたので、都内から見ますと、ちょうど東京湾岸の方向になりますので、船舶の排ガスでありますとか、東京湾岸の石油コンビナートの排ガスなど、 SO_2 を比較的多く含む燃焼系の排ガスの流入によって、この6月の SO_2 濃度が上昇していたのではないかと推察されました。

したがって、この SO_2 の濃度と硫酸水素アンモニウムの濃度が関連あるとすれば、自動車排ガス以外にも、そういった排ガスの影響を受ける可能性があるのではないかと推察を行いました。

では、大気調査の概要についてご説明いたします。採取場所は、先ほどご紹介いたしましたとおり、私どもの研究センターで行いまして、1年間連続で策定を行います。

採取装置としましては、3段インパクターを使用しまして、中段の 2.5 から $10\ \mu$ のところと、下段の $2.5\ \mu$ 以下、つまり $\text{PM}_{2.5}$ の両方を測定いたします。

この中段のところは、黄砂の粒径が $4\ \mu\text{m}$ ということをお察しますと、恐らく黄砂の多くは、この中段のほうに捕集されるであろうというふうに考えております。

フィルターは石英線維フィルターを用いまして、7日ごとにインパクターを交換し、

5 2回連続して採取いたします。

測定対象としましては、硫酸水素アンモニウムと硫酸アンモニウム、この両方を測定する予定で、この中段と、それから下段の濃度を比較することにより、黄砂の影響で濃度が上昇したのか、そのほかの排ガスの影響で濃度が上昇したのかというところを考察してまいりたいと考えております。

以上でございます。

○鈴木生体影響研究科長 では、続きまして、動物実験について、ご説明させていただきます。

目的としましては、硫酸水素アンモニウムがマウス呼吸器、特にぜん息の増悪に及ぼす影響を調べるということで、これまで硫酸水素アンモニウムに関する報告を見てみますと、3論文を示してございますけれども、ラットに対するオキシダントと混合ばく露による気道や肺組織への障害作用を見たもの。それから、肺のクリアランス機能の低下を報告したもの。さらに、ぜん息患者に対する気道コンダクタンスの低下ということがありますけれども、右側に抜粋してございますが、値が大きいほうが、作用が強いということになります。左から3つ目の硫酸水素アンモニウムにつきましては、硫酸に次いで作用が強いということが示唆されております。

ですが、ぜん息モデル動物を用いました実験はほとんどなく、詳細な検討は行われていないというのが現状でございます。

ただ、一つだけ、ぜん息モデルマウスを用いた動物実験がございまして、1999年のものですが、免疫を7回行って、OVAを毎日5分8回、それに硫酸水素アンモニウムを当てた結果ですけれども、この結果によりますと、ばく露で血中のIgEの濃度がわずかに変化したのみで、ばく露による増悪は認められなかったということです。

それで、硫酸塩がぜん息を増悪するメカニズムにつきましては、下に示しますような仮説が幾つか提唱されております。

過去の報告や昨年までの硫酸アンモニウムの結果を踏まえまして、現況計画につきましては、ばく露プロトコールと剖検のタイミング、今、翌日、影響を見ていますが、ばく露直後の影響も検討するなど、注意して実験を行っていきたいと考えております。

具体的には、2年目には正常マウスへの硫酸水素アンモニウム、3年目、4年目にはぜん息モデルマウスへの硫酸水素アンモニウムのばく露ですとか、3年目が予備実験、4年目は本実験ということで、期間と規模につきましては、左から2週間から1カ月、3年目には2週間程度、4年目には2週間程度ということを予定しております。

主な分析項目につきましては、これまでと同じような項目でございます。

3年目のばく露のプロトコールにつきましては、基本的にはこれまで行ってきた方法で実施したいと思っておりますけれども、そのほかに①②③、硫酸水素アンモニウムのばく露回数を増やす。それから、事前にばく露する。あと免疫の際にもばく露するというようなことも考えてございます。

以上でございます。

○安達委員長 ありがとうございます。

ただいまご説明いただいた、今後の基礎的実験的研究計画について、ご意見、ご質問をお願いします。

○杉山委員 大気中の硫酸水素アンモニウムの連続測定というところなんですけども、非常におもしろいというか、興味ある点だと思うのですが、臨床医としては、黄砂が来るとぜん息の患者さんは発作を起こすことがあり得るかなというところは思うのです。

これは、とても難しいとは思いますが、興味としては、この測定すると同時に、例えば幾つかの医療機関と連携して、そこの定期外受診のぜん息患者の数を把握できないかなとか、そういうのはちょっと思うんですね。

定期外に発作を起こした人の数が増えると、やっぱり黄砂の飛来と、ぜん息発作との関係というのは、より出てくるかなと思います。これはなかなか難しいと思うのですが、臨床側としては、そういう興味はどうしても出てくる場所ではあります。

○齋藤副参事研究員 ご意見ありがとうございます。確かに、黄砂の影響は非常に大きいものがあるだろうというふうに思っております。硫酸水素アンモニウムだけではなくて、最近、注目されているのは、付着している微生物が持つβグルカンなどが非常に大きな影響を及ぼすのではないかなというふうに報告もかなり増えております。

○鮫島環境保健事業担当課長 医療機関の関係でございますけれども、分析して、どれぐらい多かった少なかったという結果が、1年後以降という形に、結果的になるのだと思います。

そういう中で、細かい受診状況とかをいただける病院がそもそもあるのかという問題が、比較的リアルタイムで、月の翌月とかにいただくような形というのは、多分とれないと思うので、なかなかちょっと病院のほうは難しいのかなと、今、お話を伺っていて感じたところでございますので、その辺は、いろいろ検討はしてみたいと思いますが、なかなか難しいのではないかなと今の印象でございます。

○安達委員長 あと、ほかには。

新田先生、お願いします。

○新田委員 ただいまの杉山先生のご意見についてですけども、ちょっとコメント的なものなんですけど、今のご指摘のようなことは、国際的にはたくさん行われてはいる。黄砂は、ちょっと限られていますけど、PM_{2.5}との関係とか。

ただ、やっぱり日本国内ですと、継続的にぜん息患者さんの受診数とかをデータを収集している地域は非常に限られていて、東京都はそういう仕組みや、国全体もあんまり持っていないというような状況で、やっぱりデータ収集の仕組みが難しいんじゃないかなと思います。

データを取れると、ご指摘のように、非常に重要なデータになり得るということで、いろいろ私ども関係者も努力はしているんですけど、データ収集は、皆さん、特に国内

では苦勞しているという状況かと思ひます。

○安達委員長 ほかにかがでしようか。ないようでしたら、次の議事に移らせていただきたいと思ひますが、それでは、議事の（４）になりますけれども、令和元年度の大気汚染医療費助成制度の患者データ解析についてに入りたいと思ひます。

事務局から、ご説明をお願いいたします。

○前田課長代理 事務局の健康安全部環境保健衛生課の前田と申します。よろしくお願ひいたします。

それでは、資料５について説明させていただきたいと思ひます。着座にて失礼いたします。

資料５の令和元年度大気汚染医療費助成制度の患者データ解析についてでございます。この解析については、例年とほぼ同じでございます。表側、保健医療分野に関する分析、それから裏面、めくっていただきまして、生活環境分野に関する分析をそれぞれ実施いたします。

実施する目的については、医療機関受診状況・救外受診状況を把握し保健指導方法を検討する。それから、服薬状況・自己管理手段の利用状況などについて、患者の実態を把握し、保健指導を強化すべき階層を分析する。喫煙と重症度、ステロイド用量及びQOLスコアに与える影響を評価する。受動喫煙についての状況を把握するというのが保健医療分野に関する分析でございます。

裏面、めくっていただきまして、生活環境分野に関する解析でございます。この状況もほぼ同じなんですけれども、参考資料の１と２が、それぞれ質問後に関するものとして、参考にお示ししているものでございまして、主治医診療報告書、それから健康・生活環境に関する質問票となっております。

保健医療部門に関する質問については、質問１から１９、裏面の生活環境分野については、質問２０から２３となっております。

生活環境分野の（４）の検討課題の部分について、簡単にご説明させていただきます。

昨年も変更の議題として挙げさせていただきましたが、質問２１と２２の生活環境整備の状況に関する回答、これにばらつきがといますか、矛盾ですとか、そういったものが起きないようにするために、設問の方法をこれまで検討してまいりました。昨年のご意見なども踏まえまして、以下のとおり、微修正を行いたいと考えております。

設問の修正でございます。現行は、環境整備を行ってから、発作回数の減少など、効果があったと感じられますかという問いだったのに対して、今回、修正する内容としては、ぜん息と診断されてから、ご家庭での生活環境の整備をしたことで、症状の回数が減少したなど、効果があったと感じられますかという形で、趣旨を変えないような形で少し丁寧の説明するといったふうに設問を変えました。

それから、回答欄ですね、１、２、３と３番のこれまでであったのに対して、３番を削りまして、単純に１と２、「はい」か「いいえ」かだけで回答をしてもらおうという形に

したいと思います。

私のほうからは、以上になります。

○安達委員長 今、ご説明いただいた内容についてのご質問、ご意見、よろしく願います。

特に、環境のところ、設問の修正ということで案が示されております。

今までの中で、生活環境の整備を行ってからの設問であるのにもかかわらず、3の選択があったということなんですね。

○前田課長代理 はい、おっしゃるとおりでございまして、やや設問21と22の回答状況に矛盾が起きていたというところで、今回の議題につながっているということになっています。

○松木委員 この案であれば、前みたいな誤解というか、何か変な回答が出てこないと思いますので、ぜひよろしく願いたいと思います。

○前田課長代理 ありがとうございます。

○内山委員 今回の改正とはちょっと違う、別のことでコメントなんですけど、先ほど杉山先生からも、それから新田先生からもお話しあった、大気環境とぜん息の発作の誘発の関係の問題です。せっかく東京都は、毎年、患者データを解析していらっしゃるんですが、この診療報告書のほうは、ほとんど項目を変えることが難しいという話は伺っているのですが。

これは、現在は定期外受診は週何回とか、月何回とかしか書いていただけないのですが、本来はカルテを見て、ここが何月何日に来ましたということ、医者がちょっと面倒を厭わず書いてくだされば、もう全て医療扶助を行っている患者の全ての定期外受診に来られた日がわかると思います。なかなか、この様式は変えられないということなので、できれば質問票のほうでわかったら教えてくださいというような形で、ぜひ定期受診、定期通院以外に、病院にかかった月日を書いていただければいいと思います。1年間の振り返りになるので、不正確だと言われるかもしれないんですが。

ぜん息日誌等を持っていらっしゃる方が多いと思うので、それで見ればある程度正確な情報が得られると思います。それと、こちらの大気環境濃度とか、黄砂が来たときの月日を合体させれば、非常に貴重なデータにはなると思います。こちらの質問用紙のほうは、ある程度、変えられることができると思いますが、今でも質問数が多いので、減らそうという方向かもしれないのですが。

今までずっと同じことはやってきていただいているので、少し視点を変えるというのもおもしろいかなと思います。

○安達委員長 ありがとうございます。

○杉山委員 よろしいですか。

○安達委員長 杉山先生、どうぞ。

○杉山委員 先ほどの黄砂あるいはPM_{2.5}とぜん息の患者さんの数のことなのですが、

もちろん厳密な調査をやろうと思うと、定期外受診と定期受診とドクターは判別して、報告してもらわないといけないとか、そういうところがあって、難しいのですが、例えば都立病院の毎月のぜん息の患者さんの受診の数だけを調べても、おもしろいことはわかる可能性はあるんじゃないかなとは思いますが。そういう簡単なことでも、ぜん息の受診者数なんていうのは、保険の請求のこととかで、すぐわかるはずで、そういうデータなんかすぐ出るんじゃないかとは、僕は思いますけどね。そこから、どういうことがわかるかは、また、なかなか難しい点はあるのですが。

○安達委員長 ほかによろしいでしょうか。

新田先生、じゃあ。

○新田委員 ちょっと昨年度も同じようなことを申し上げて、何か少しこだわっているみたいなんですけど、喫煙のことなんです。先ほども解析項目のことをご質問いただきましたけども、こちらの生活環境の質問票でも、たばこについてという質問があるんですが、現在、やはりいわゆる紙巻きたばここと匹敵するぐらいのシェアが電子たばことか、加熱式たばこはあります。この質問14のたばこを吸ったことがありますかというのに、加熱式たばこかを使われている方がどう答えるかというところですね。今、シェアはかなり増えているというお話というか、そういう状況を聞いているので、また先ほど、内山先生、お話のように、質問が複雑になる方向に行くので、ちょっと難しいなと思いつつながら、何か工夫をされてはどうかというふうに思います。

○前田課長代理 ありがとうございます。昨年もそういったご意見いただいておりまして、たばこの中に加熱式たばこも現在、当然、たばことして入っています。

○新田委員 一番懸念するのは、多分、カートリッジを使った加熱式のものは、たばこの葉がそのものにあるので、恐らくたばこを吸っていますかというのと、「はい」と答えるだろうというふうに。

あと、電子たばこの分類自体を一般の方がどう認識されているのか、しかも次から次へといろんな新製品が出るというような状況で、健康影響のことも、いろいろ検討されている状況で、まだはっきりしていない部分はたくさんあるとは思いますが、やはりここ最近急に、この1、2年でというか、数年で大きく変化している状況なので、ちょっと注意しながら、この質問をとらえた方がいいですね。今すぐ何かがこう変えたほうがいいというような案があるわけじゃないんですけども、注意しながら見ておく必要があるのかなということでも申し上げました。

○安達委員長 調べてないんでわかんないですけど、紙巻きたばこの喫煙に調査は定期的に行っていると思うんですけど、ああいうもの、加熱式たばこ、電子たばこについては、どういう聞き方をしているんでしょうね。

そこら辺のことを、ある程度、参考にするのもありかなと思うんですけども、実態がないとわからないというか、そこら辺の問題があるかと思えます。

国がやっているのと、会社がやっているのと、国民健康医療調査とか、そういった中

でもあると思うので、参考にするのかなというふうに思います。

ほかにご意見、ご質問等はよろしいでしょうか。

(なし)

○安達委員長　それで、これをもちまして、予定した議題は終了いたしました。

委員の皆様方から、ほかにもまとめて何かご質問やご意見等がございますでしょうか。

特にご意見がないようですので、ご協力ありがとうございました。

それでは、事務局にお返ししたいと思います。

○鮫島環境保健事業担当課長　本日は、お忙しい中、長時間にわたり、貴重なご意見をいただきましたこと、どうもありがとうございました。

本日の議事録につきましては、後日、委員の皆様にご確認をいただきますので、よろしくお願いたします。

それでは、これをもちまして、令和元年度東京都環境保健対策専門委員会第1回大気汚染保健対策分科会を終了させていただきます。

次回の分科会につきましては、2月ごろを予定しておりますので、日程につきましては、また改めてご連絡を申し上げますので、よろしくお願いたします。

本日は、どうもありがとうございました。

(午前 11時49分 閉会)