

# 基礎的実験的研究報告書（案）について

（平成28年度から令和元年度まで）

東京都福祉保健局

# 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

- 平成27年度の環境基準達成率は、一般環境大気測定局で85%、自動車排出ガス測定局で40%と低い状況であった。

## PM<sub>2.5</sub>の主要成分

- 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いる。最も存在量の多い陰イオンの硫酸イオンと、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<sub>2.5</sub>の主要成分の一つと考えられる。

# 目的

## PM<sub>2.5</sub>について

- ・PM<sub>2.5</sub>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がある。
- ・PM<sub>2.5</sub>の主要成分の一つとして、硫酸アンモニウムが考えられる。

しかし…

- 環境省から示されているイオン成分測定法では、各イオンが形成する塩濃度を知ることは困難であり、PM<sub>2.5</sub>中の硫酸アンモニウムを測定した調査結果は報告されていない。
- 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、モルモットのぜん息を悪化させる、人のぜん息発作と関連が見られる等の報告がある。
- 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。

PM<sub>2.5</sub>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。

(報告書 1から2ページ)

# 調査実施概要 ①

## ● 都内大気中PM<sub>2.5</sub>中の硫酸アンモニウムの実態調査(平成28、29年度)【第2章】

都内大気中の硫酸アンモニウム濃度を把握するために、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確立し、実態調査を1年間実施した。自排局3局及び一般局3局において、濃度測定を毎月行った。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。

## ● 培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験(平成30、令和元年度)【第3章】

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。

# 調査実施概要 ②

## ● 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）【第4章】

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。

実験動物には、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、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、免疫学的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、気道抵抗測定を実施した。

## 第2章 都内大気PM<sub>2.5</sub>中の 硫酸アンモニウムの実態調査

# 実験の概要

- 硫酸アンモニウムの分別定量法の検討
- 都内大気PM<sub>2.5</sub>中の硫酸アンモニウムの  
実態調査



# 硫酸アンモニウムの分別法定量の検討

## 4種のアムモニウム塩の蒸気圧

アンモニウム塩	化学式	蒸気圧 (mmHg)
硫酸アンモニウム	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$1.3 \times 10^{-18}$ at 25 °C
硫酸水素アンモニウム	$(\text{NH}_4)\text{HSO}_4$	$1.9 \times 10^{-27}$ at 25 °C
硝酸アンモニウム	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$1.1 \times 10^{-5}$ at 25 °C
塩化アンモニウム	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$4.9 \times 10^{-5}$ at 35 °C

## 方 法

### 実験1

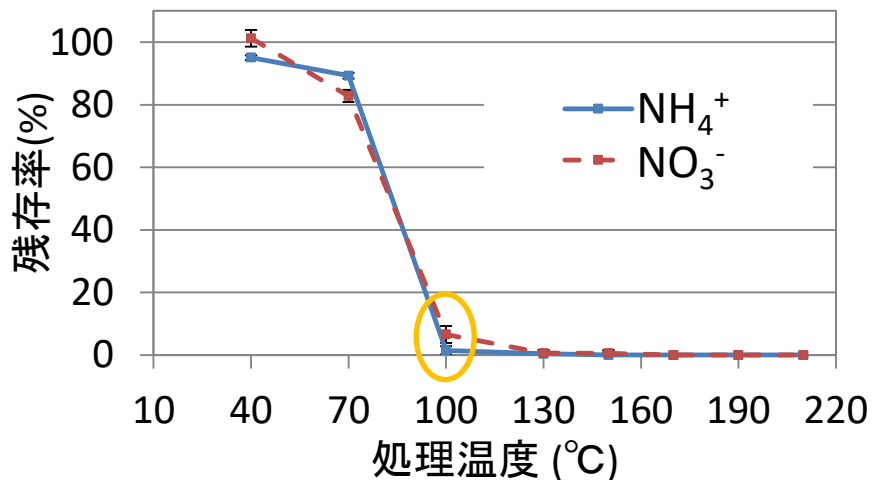
アンモニウム塩4種を各物質**単独**で石英繊維フィルターに添加、温度5段階で加熱処理

### 実験2

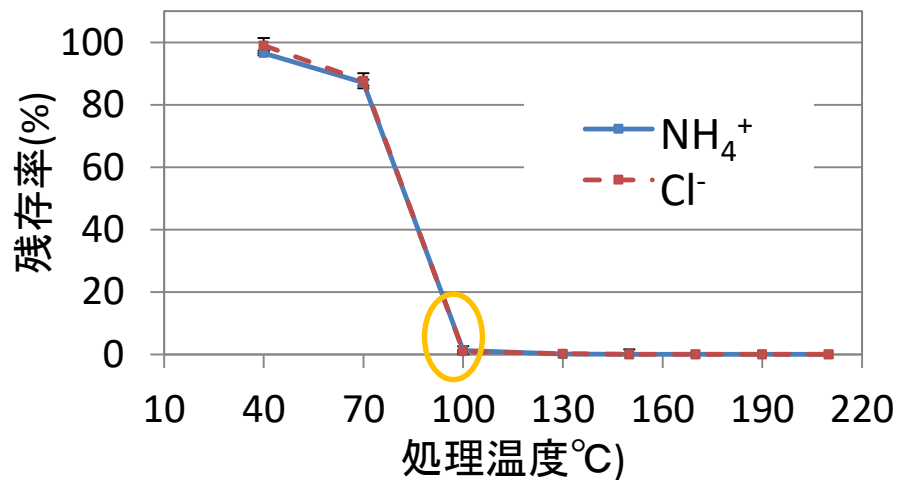
アンモニウム塩4種を各物質**混合**で石英繊維フィルターに添加、温度12段階で加熱処理

# 結果1 各塩を単独でフィルターに添加

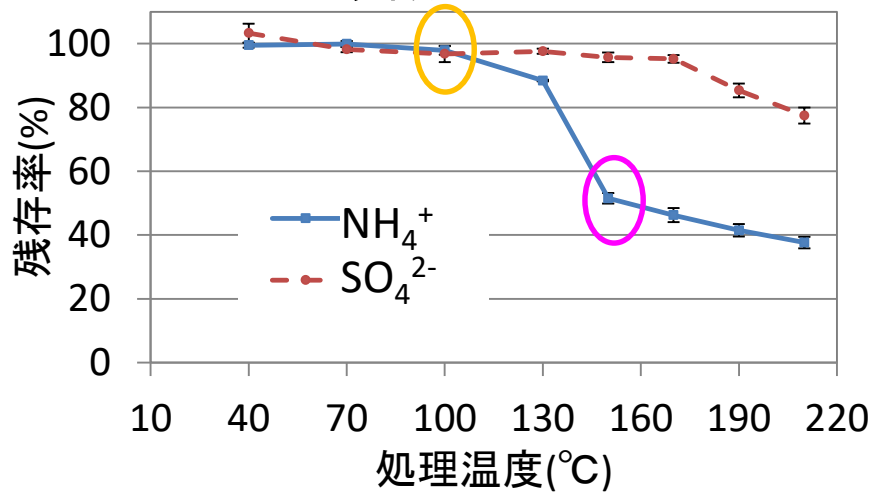
## 硝酸アンモニウム



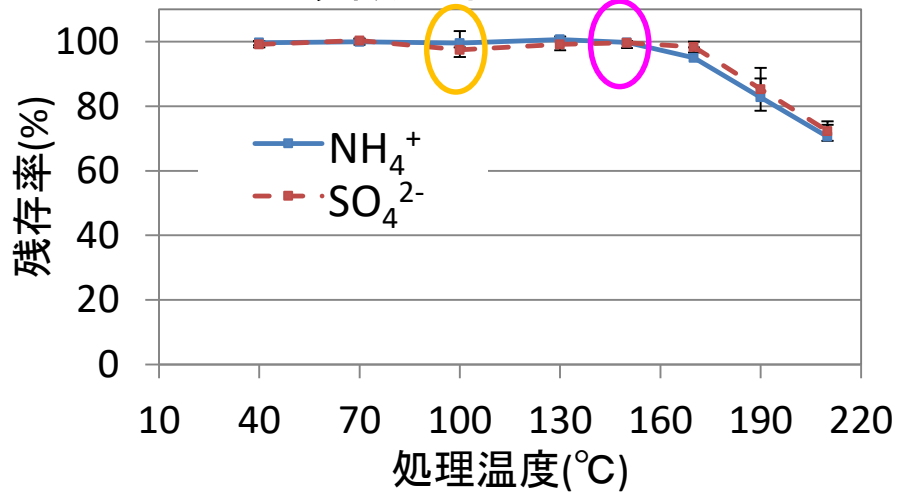
## 塩化アンモニウム



## 硫酸アンモニウム

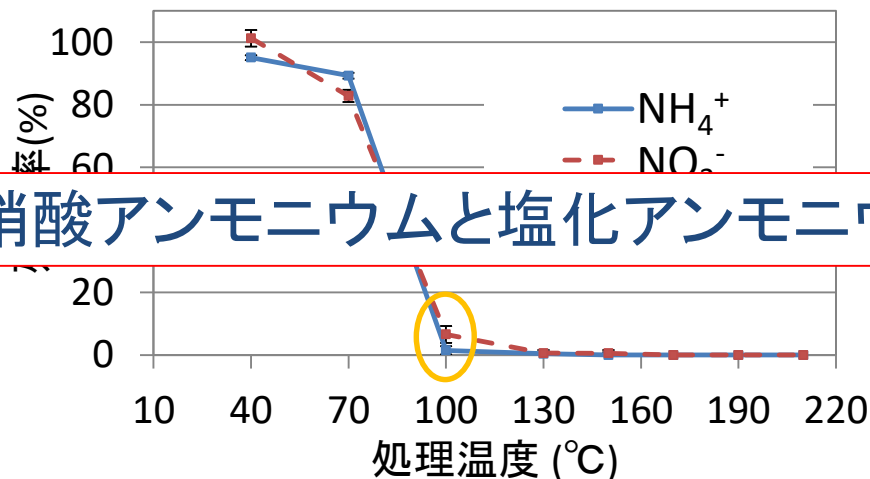


## 硫酸水素アンモニウム

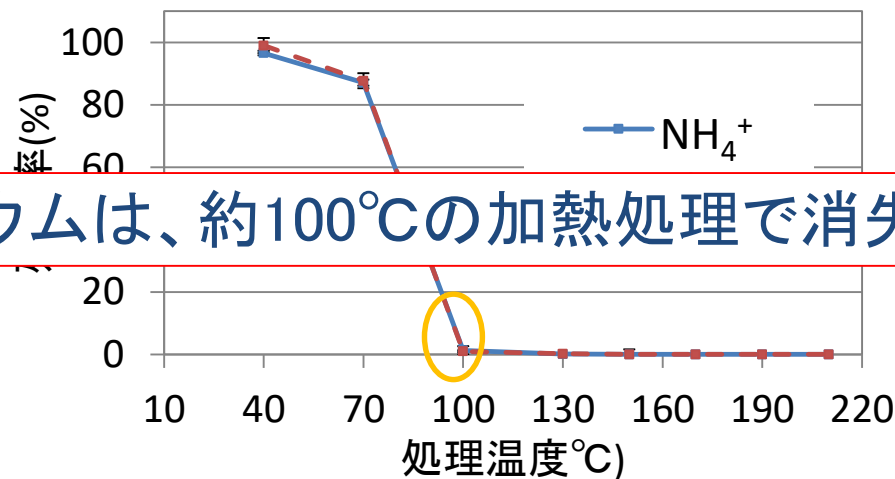


# 結果1 各塩を単独でフィルターに添加

## 硝酸アンモニウム

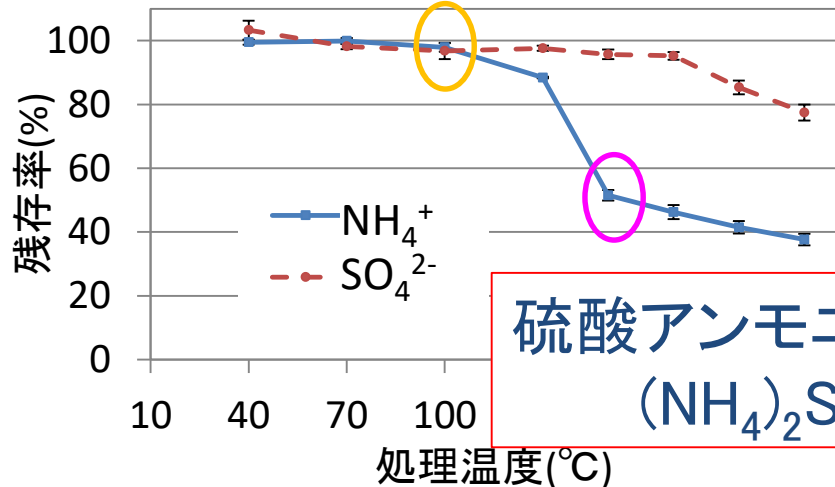


## 塩化アンモニウム

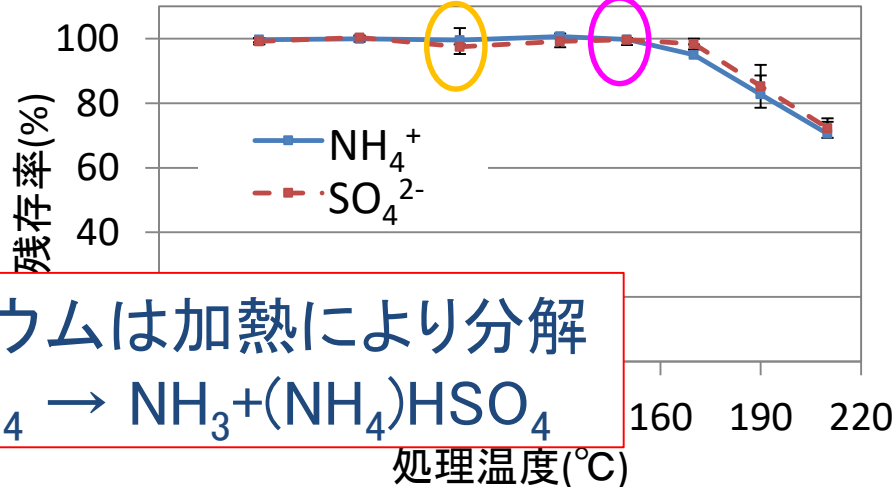


硝酸アンモニウムと塩化アンモニウムは、約100°Cの加熱処理で消失

## 硫酸アンモニウム



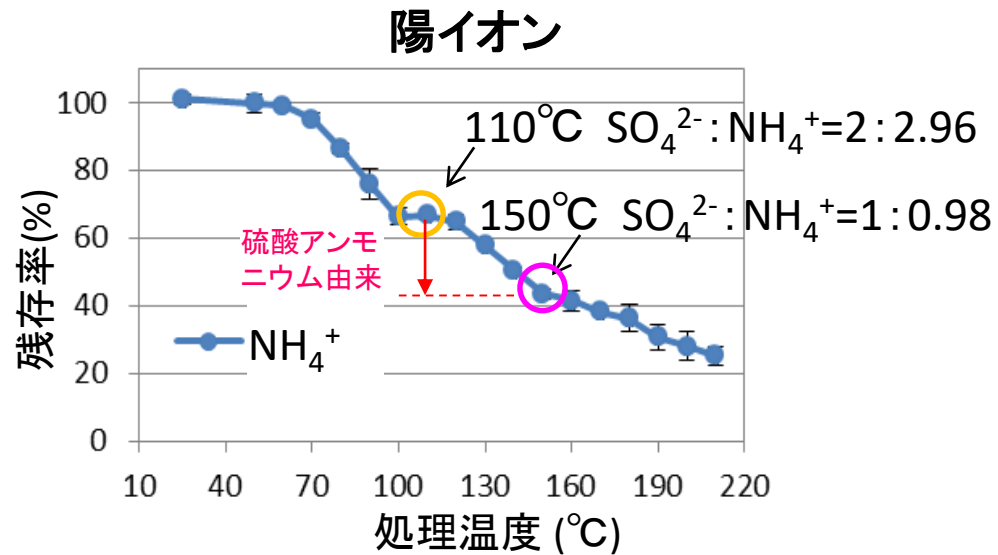
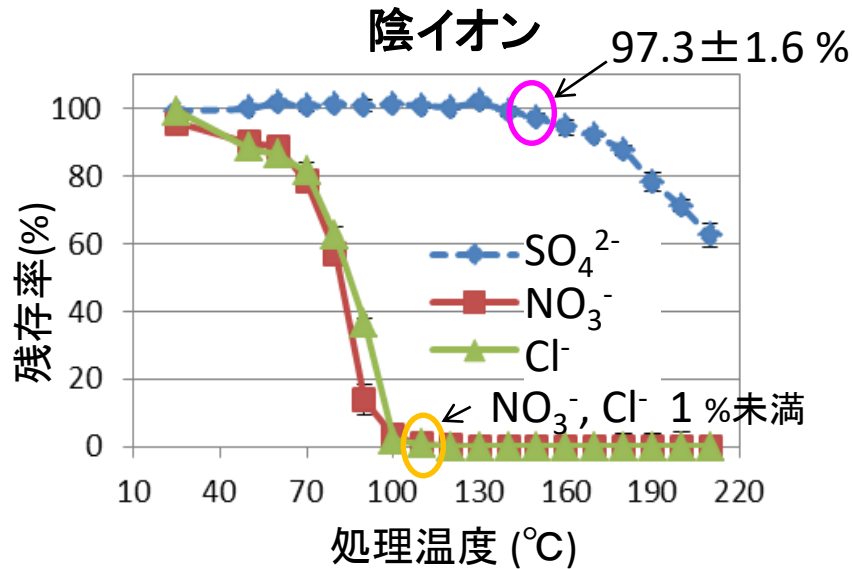
## 硫酸水素アンモニウム



硫酸アンモニウムは加熱により分解



# 結果2 各塩を混合してフィルターに添加



- 硝酸アンモニウム及び塩化アンモニウムが消失する加熱温度 **110 °C**  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> と (NH<sub>4</sub>)HSO<sub>4</sub> が等量混合 → モル濃度比理論値 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> : NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 2:3
- 硫酸アンモニウムが硫酸水素アンモニウムに変化し、硫酸水素アンモニウムは変化せずに残存する加熱温度 **150 °C**  
(NH<sub>4</sub>)HSO<sub>4</sub> のみ → モル濃度比理論値 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> : NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 1:1

- ・110°C加熱と150°C加熱のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の差 → 硫酸アンモニウム濃度
- ・110°C加熱のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>から、硫酸アンモニウム分のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>を差し引く  
→ 硫酸水素アンモニウム濃度

# 都内大気PM<sub>2.5</sub>中の硫酸アンモニウムの実態調査

## 調査の概要

- 調査期間 平成29年4月から平成30年3月(毎月7日間)
- 採取場所 都内6か所の測定局
  - 一般局: 中野区若宮、町田市金森、中央区晴海
  - 自排局: 京葉道路亀戸、日光街道梅島、環七通り松原橋
- 採取装置 3段インパクトー(n=2)(NWPS-35H、柴田科学製)



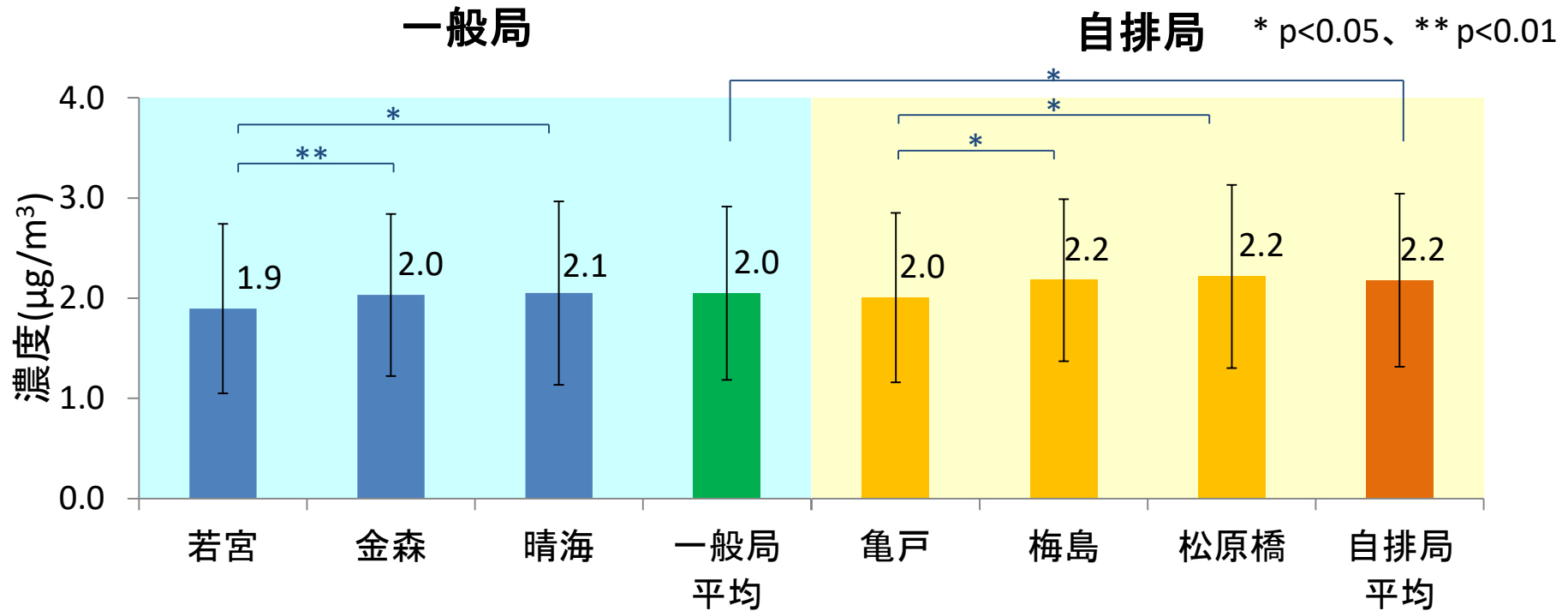
## 硫酸アンモニウムの粒径分布調査

- 調査期間 平成29年4月、7月、10月及び平成30年1月(年4回、各7日間)
- 採取場所 東京都健康安全研究センター
- 採取装置 Electrical Low Pressure Impactor(Dekati製、ELPI)



# PM<sub>2.5</sub>中硫酸アンモニウム濃度

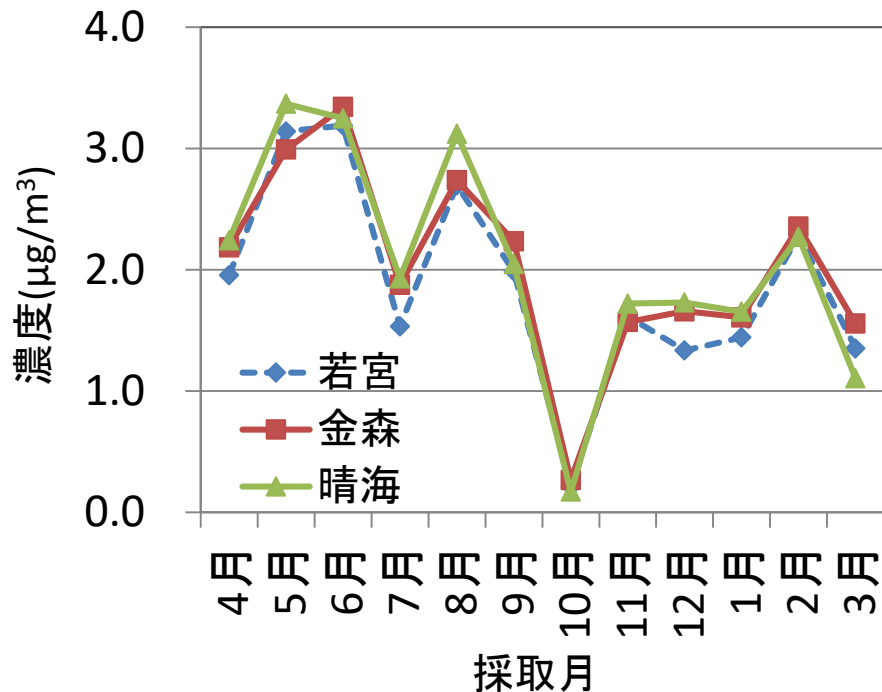
平成29年4月～平成30年3月平均値



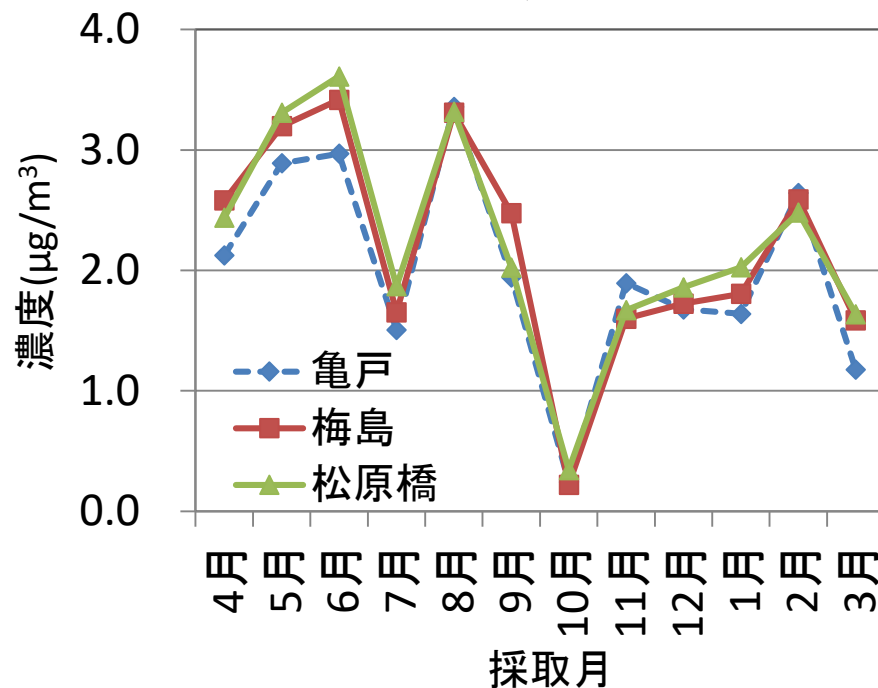
- PM<sub>2.5</sub>中硫酸アンモニウムの年間平均値は、一般局平均:  $2.0 \pm 0.86 \mu\text{g}/\text{m}^3$   
自排局平均:  $2.2 \pm 0.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$
- 一般局平均と自排局平均の比較では、**自排局の方が有意に高かった**
- 一般局では若宮、自排局では亀戸が、他に比べて有意に低かった

# PM<sub>2.5</sub>中硫酸アンモニウム濃度の月別推移

## 一般局

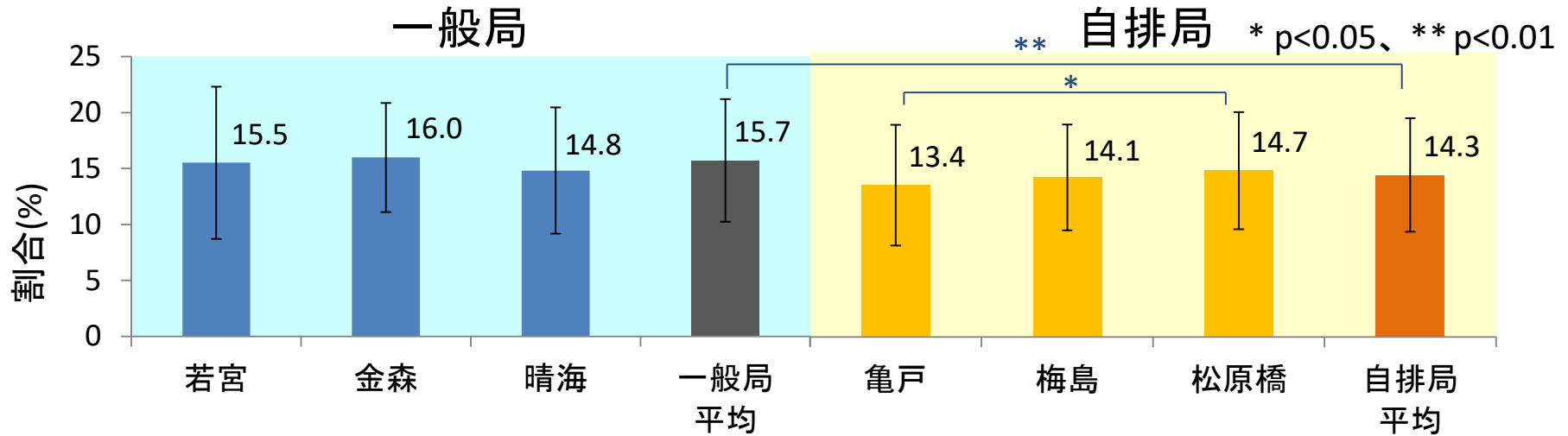


## 自排局



- PM<sub>2.5</sub>中硫酸アンモニウムは、5月、6月に高い傾向がみられた
- 7月、10月及び3月には、硫酸アンモニウム濃度が前月に比べて低下していた
- 特に10月は0.2から0.3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と、他の月に比べて約1/10の値であり、大気採取中(H29年10月19日~26日)に台風が関東を通過し、降水量が多かったことが一因と考えられた

# 硫酸アンモニウムがPM<sub>2.5</sub>に占める割合



- 硫酸アンモニウムがPM<sub>2.5</sub>に占める割合

一般局平均: 15.7 ± 5.5%

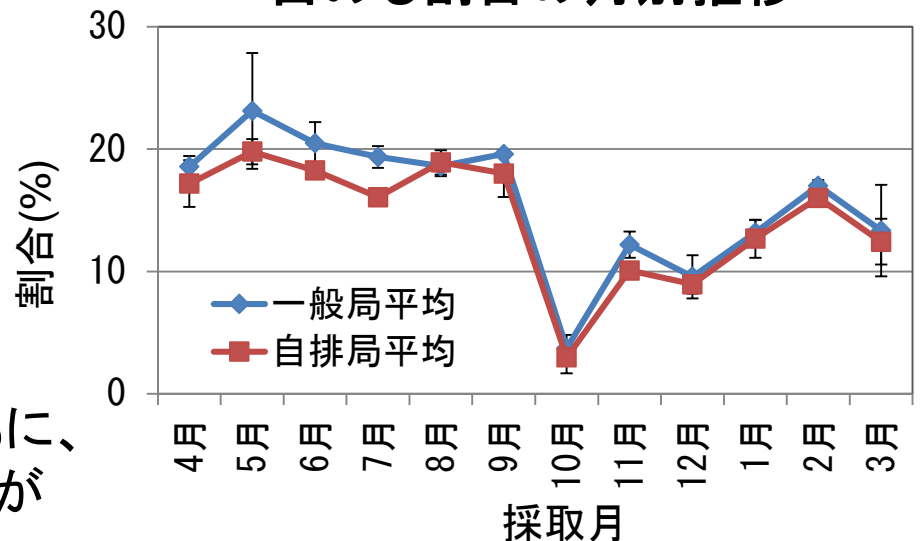
自排局平均: 14.3 ± 5.0%

一般局平均の方が有意に高かった

- 自排局では、元素状炭素や有機炭素が多いことから、相対的に割合が低くなった可能性

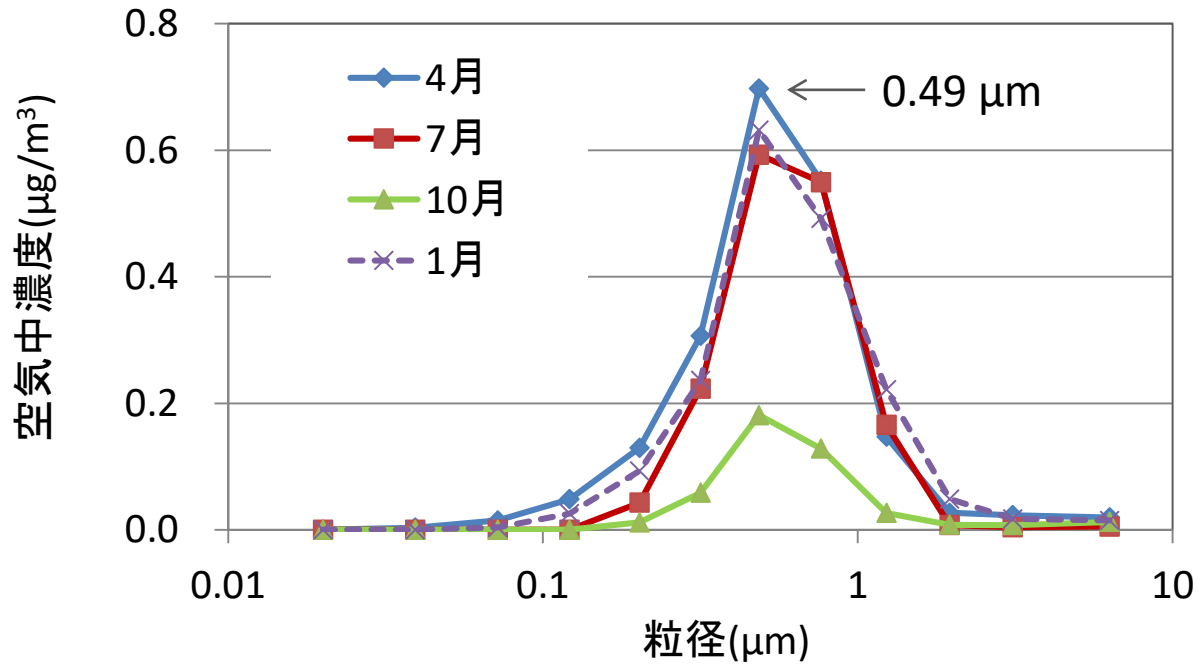
- 月別推移では、一般局、自排局ともに、5月の割合が最も高く、10月の割合が最も低かった

## 硫酸アンモニウムがPM<sub>2.5</sub>に占める割合の月別推移





# 大気中硫酸アンモニウムの粒径分布



- 10月は他の月に比べて濃度が低かったが、いずれの月も、**0.49  $\mu\text{m}$ 付近に最頻粒子径**を持つ分布を示した

# 月別のPM<sub>2.5</sub>中硫酸アンモニウムと 大気汚染物質との関連(単相関係数)

\* p<0.05, \*\* p<0.01

大気汚染物質 <sup>1)</sup>	PM <sub>2.5</sub>	SPM	SO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	Ox
一般局平均	0.722**	0.841**	0.700*	- 0.113	0.585*
若宮	0.443	0.840**	0.225	- 0.241	0.621*
金森	0.786**	0.851**	0.463	- 0.325	0.657*
晴海	0.733**	0.838**	0.739*	0.219	0.426
自排局平均	0.659**	0.838**	0.750**	0.540	— <sup>2)</sup>
亀戸	0.439	0.817**	0.734**	- 0.016	—
梅島	0.643**	0.798**	0.375	0.465	—
松原橋	0.752**	0.907**	0.794**	0.842**	—

1)東京都環境局 2)自排局ではOxは測定されていない

- 硫酸アンモニウムと有意な相関がみられたのは、主にPM<sub>2.5</sub>、SPM、SO<sub>2</sub>及びOx
  - 最も相関が高かったのはSPM(相関係数:0.798~0.907)
  - SO<sub>2</sub>は一般局では晴海のみ有意な相関(晴海はSO<sub>2</sub>が最も高値)
  - NO<sub>2</sub>は松原橋のみで有意な相関(松原橋はNO<sub>2</sub>が最も高値)
- (報告書 23ページ)

# 月別のPM<sub>2.5</sub>中硫酸アンモニウムと 気象要素との関連(単相関係数)

\* p<0.05, \*\* p<0.01

気象要素	気温 <sup>1)</sup>	相対湿度 <sup>1)</sup>	風速 <sup>1)</sup>	降水量 <sup>2)</sup>
一般局平均	0.393	0.022	- 0.649*	- 0.689*
若宮	0.459	0.045	- 0.516	—
金森	0.460	0.029	- 0.316	—
晴海	0.489	0.131	- 0.820**	—
自排局平均	0.358	- 0.136	- 0.324	- 0.708*
亀戸	0.373	- 0.122	0.031	—
梅島	0.440	- 0.187	- 0.609*	—
松原橋	0.435	- 0.029	- 0.719**	—

1)東京都環境局 2)気象庁 地上観測地点「東京」(千代田区北の丸公園)

- 風速及び降水量については、硫酸アンモニウムと有意な負の相関がみられた
- 気温及び相対湿度については、硫酸アンモニウムとの有意な相関はみられなかった

# 考 察

## PM<sub>2.5</sub>中硫酸アンモニウム濃度の年間平均値

一般局平均: 2.0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$     自排局平均: 2.2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$

有意差 ( $p < 0.05$ ) あり、濃度差は1.1倍

### <これまでの報告>

- 大気中における硫酸アンモニウムは、主にガス状物質の反応により生成する2次生成粒子
- 三元触媒あるいは尿素選択触媒を搭載した自動車は、走行条件や触媒の状態によって、多量のアンモニアを排出
- 燃料由来のイオウ分の存在を考え合わせると、自動車に由来する硫酸アンモニウム生成の可能性が推察された
- SO<sub>2</sub>と有意な相関があったことから、イオウ分を多く含む燃料の燃焼についても、硫酸アンモニウムとの関連が示唆された
- 一般局と自排局の濃度差は1.1倍であり、それほど大きい差ではなかった

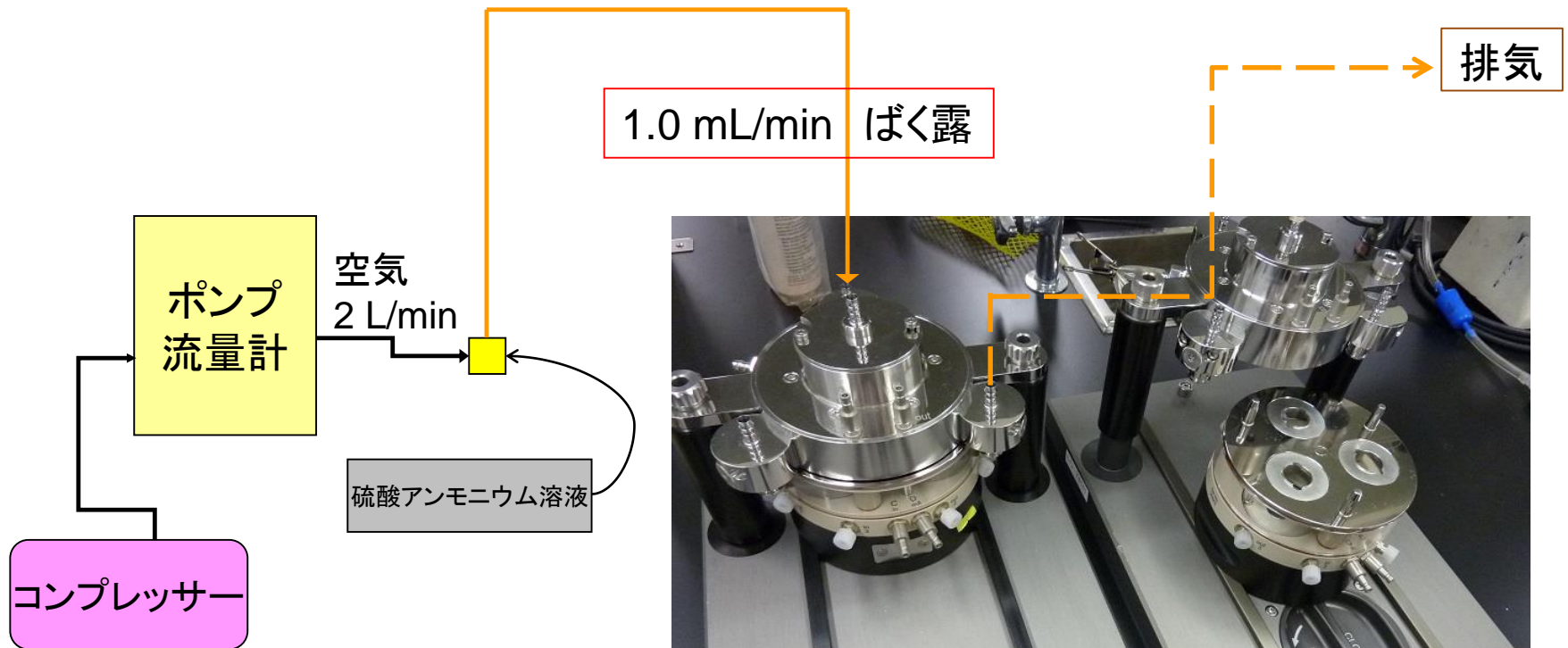
# 第3章 培養細胞への 硫酸アンモニウムばく露実験

# 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	0.001、0.01、0.1、1、10 mg/mL、超純水 (ただし、Calu-3細胞を用いた細胞増殖試験は 0.001、0.01、0.1、1、5 mg/mLとした)
ばく露時間	24時間(HO-1は3時間)
測定項目	
細胞障害作用	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)

# 気相ばく露実験について

## 気相ばく露装置模式図

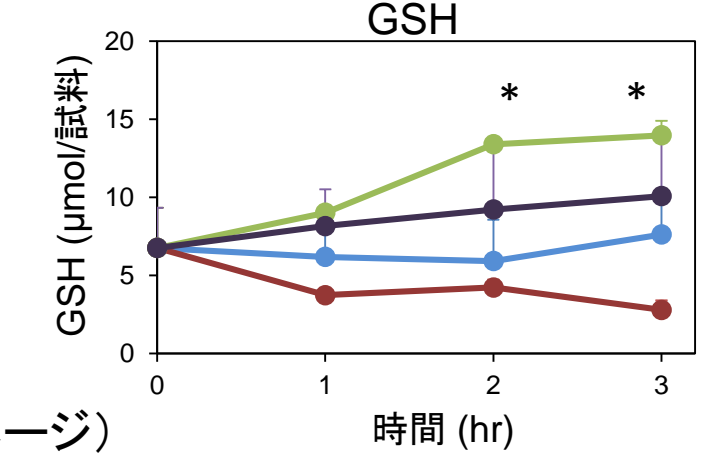
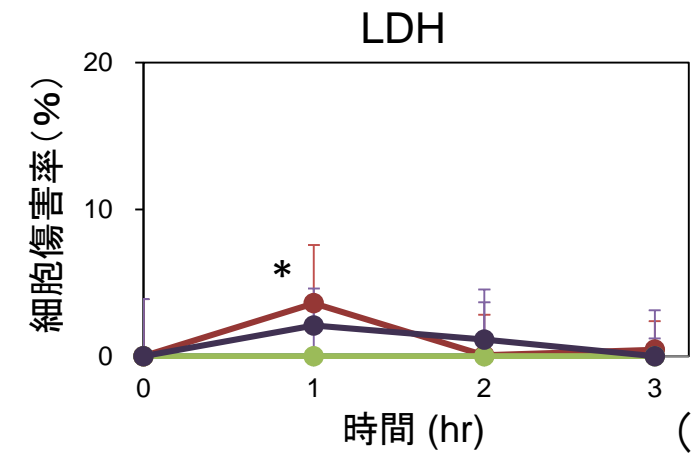
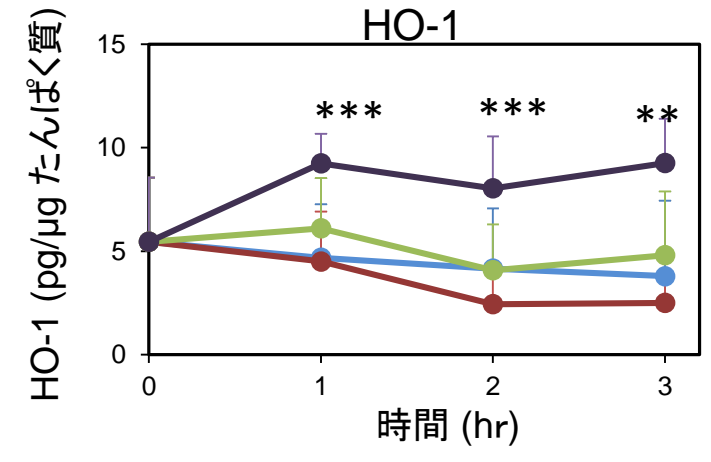
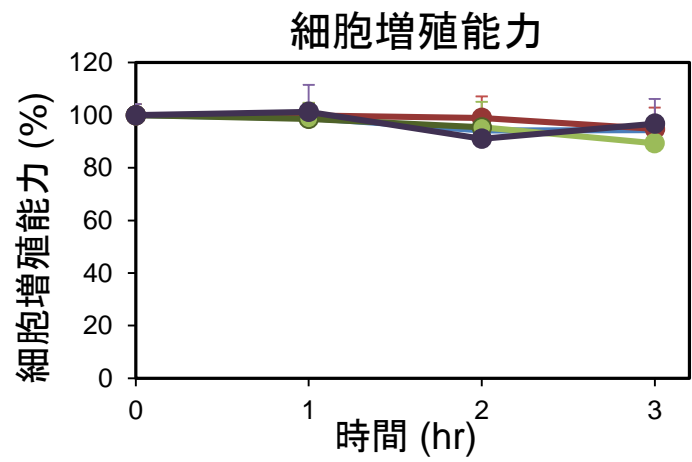
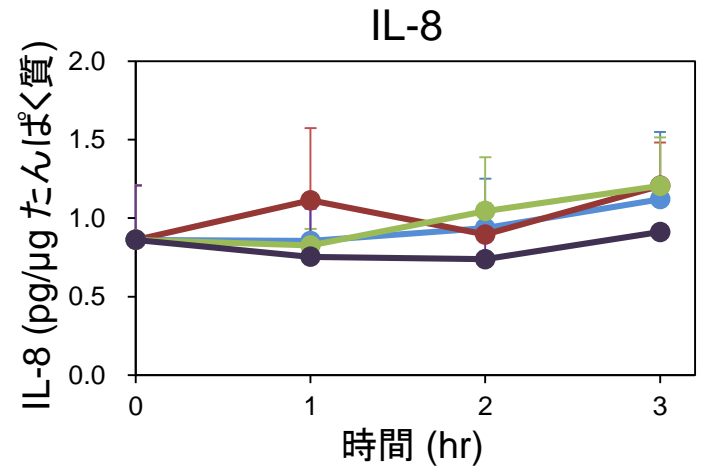


培養細胞ばく露装置 Cultex® RFS

# A549細胞への気相ばく露結果

●; 対照群、●; 低濃度群(1 mg/mL)、●; 中濃度群(10 mg/mL)、●; 高濃度群(100 mg/mL)  
 \*; p<0.05、\*\*; p<0.01、\*\*\*; p<0.001

細胞増殖能力: 変化なし、LDH: 低濃度群で増強  
 IL-8: 変化なし、IL-6: 不検出  
 HO-1: 高濃度群で増強  
 GSH: 中濃度群で増強

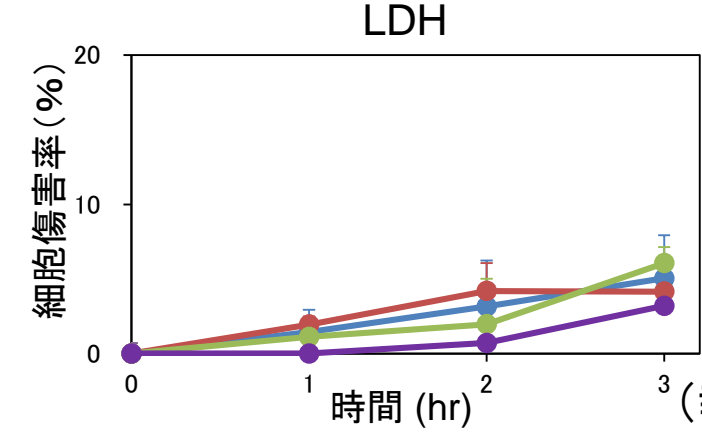
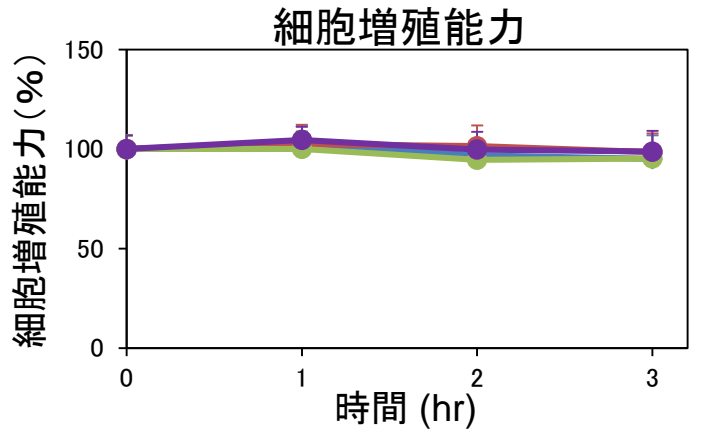
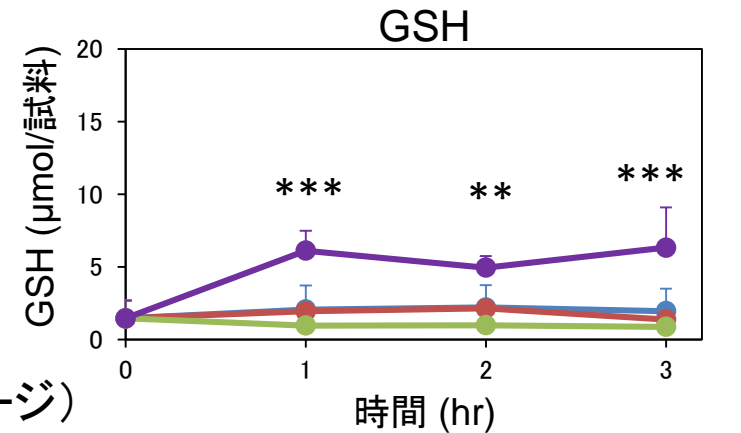
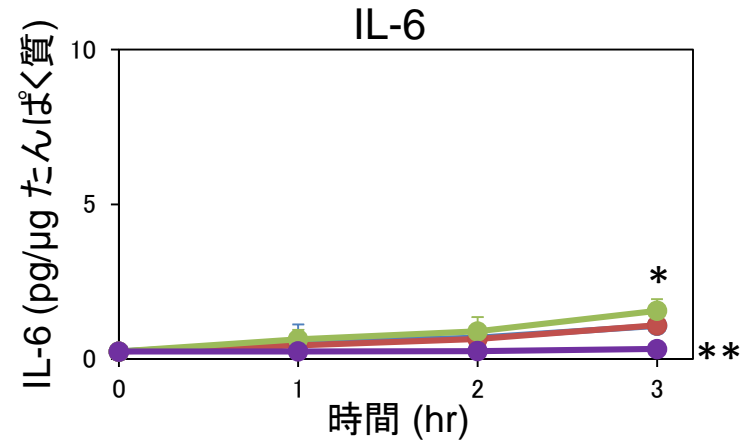
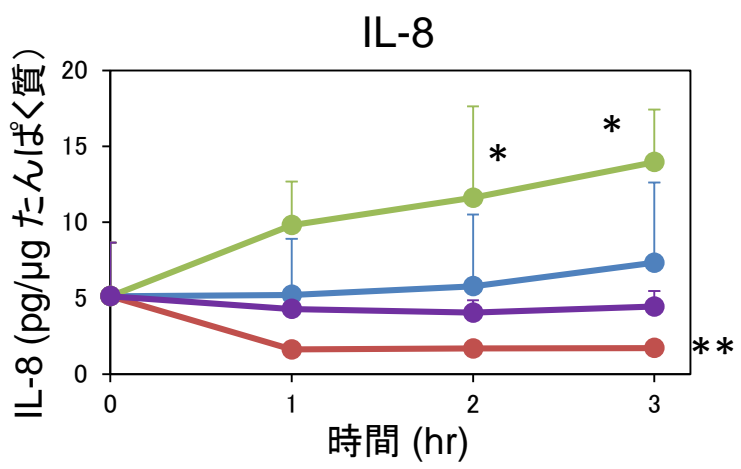




# Calu-3細胞への気相ばく露結果

●; 対照群、●; 低濃度群(1 mg/mL)、●; 中濃度群(10 mg/mL)、  
 ●; 高濃度群(100 mg/mL)  
 \*; p<0.05、\*\*; p<0.01、\*\*\*; p<0.001

細胞増殖能力、LDH: 変化なし  
 IL-8: 中濃度群で増強、低濃度群で減弱  
 IL-6: 中濃度群で増強、高濃度群で減弱  
 HO-1: 不検出  
 GSH: 高濃度群で増強



# 気相ばく露量の推計

**目的:** 気相ばく露での細胞表面上の硫酸アンモニウム濃度を調べる

**方法:** 高濃度(100 mg/m<sup>3</sup>)の硫酸アンモニウムをA549細胞へばく露し、ばく露後のインサートに超純水を加えて、洗浄液の濃度を測定した

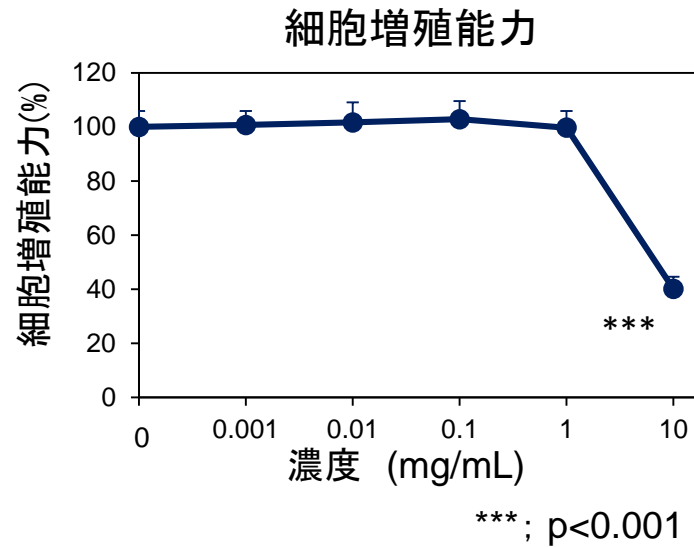
## 培養細胞へのばく露量及び推計した溶液濃度

ばく露時間	1時間	2時間	3時間
細胞へのばく露量(μg)	1.7	2.4	5.6
ばく露終了時の細胞表面上の溶液濃度(mg/mL)	0.57	0.80	1.9

細胞表面上の溶液濃度は、細胞表面上の水分量を3 μLと仮定して計算した

# 液相ばく露実験について

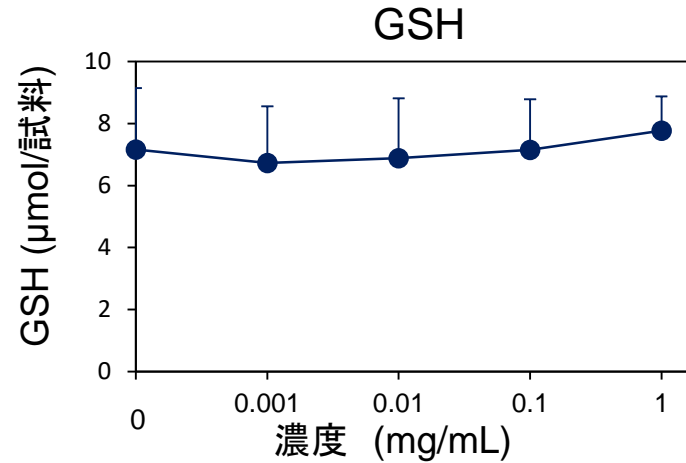
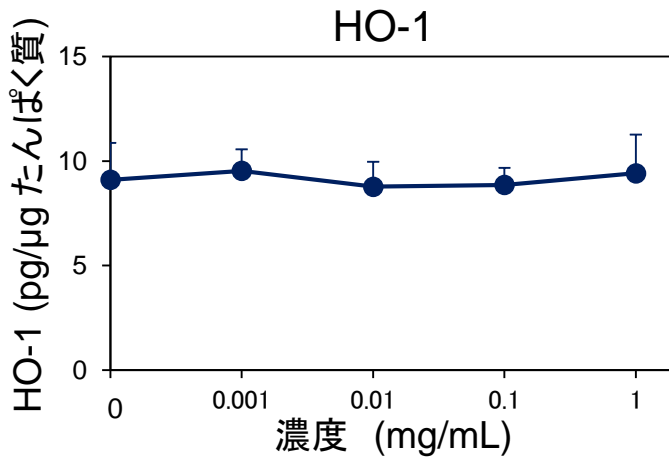
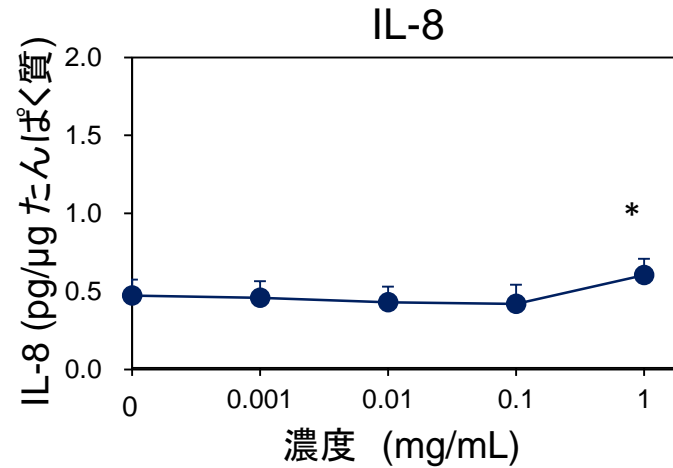
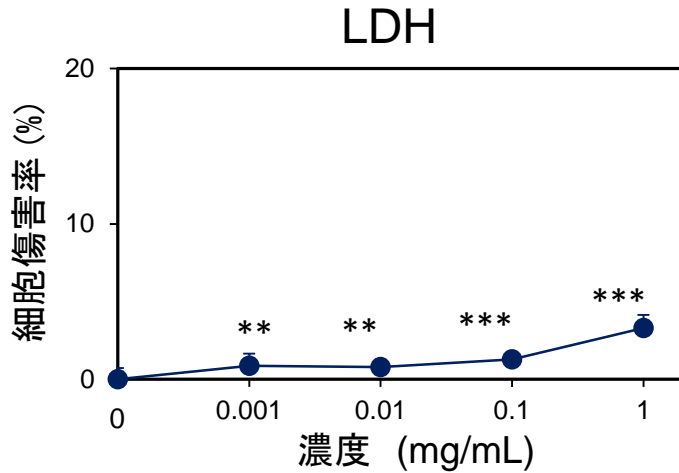
## A549細胞液相ばく露実験結果



10 mg/mLの硫酸アンモニウムばく露により、A549細胞自身にダメージがみられた

⇒その他の測定項目では、ばく露濃度の上限を1 mg/mLとした

# A549細胞液相ばく露実験結果

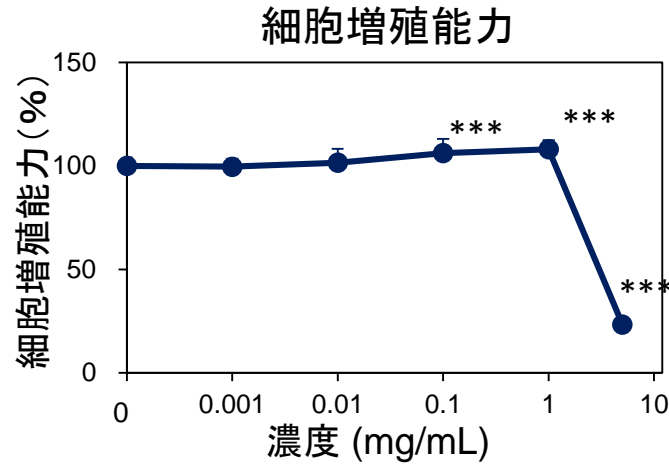


\*; p<0.05、\*\*; p<0.01、\*\*\*; p<0.001

LDH: 全濃度域で増加  
IL-8: 1 mg/mLで増強  
IL-6: 不検出  
HO-1、GSH: 変化なし

(報告書 41から42ページ)

# Calu-3細胞液相ばく露実験結果

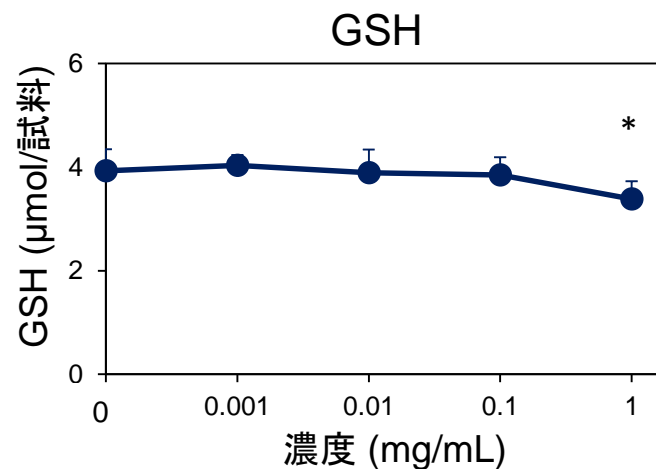
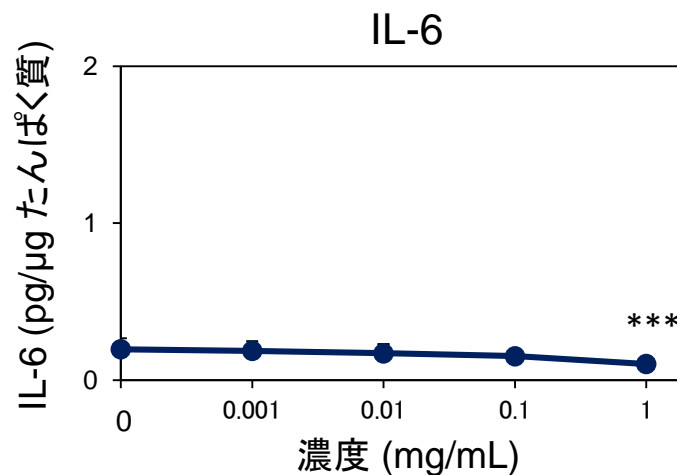
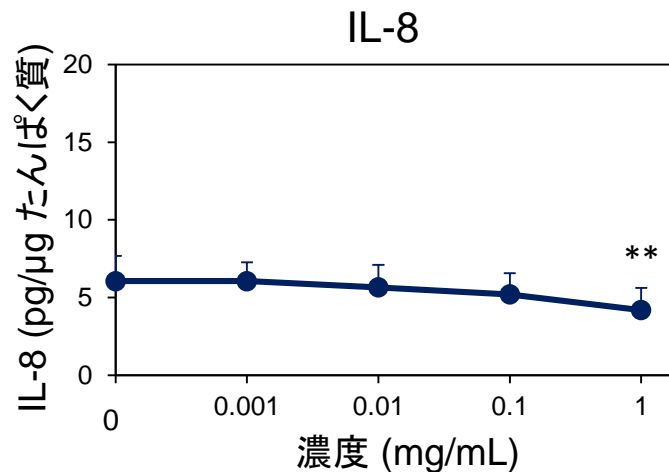
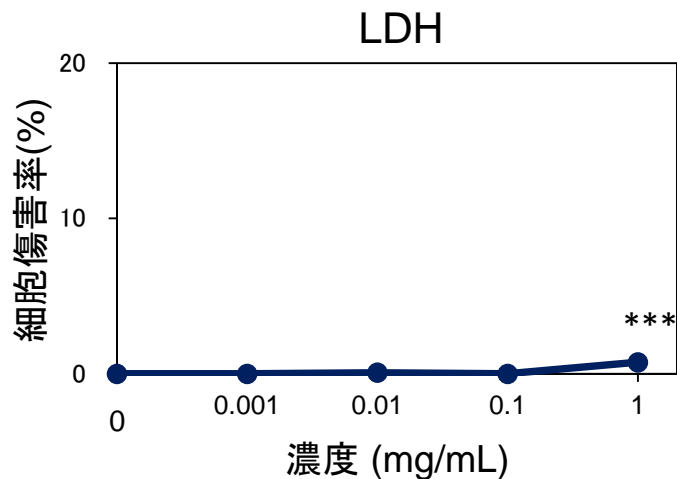


\*\*\*;  $p < 0.001$

5 mg/mLの硫酸アンモニウムばく露により、Calu-3細胞自身にダメージがみられた

⇒その他の測定項目では、ばく露濃度の上限を1 mg/mLとした

# Calu-3細胞液相ばく露実験結果



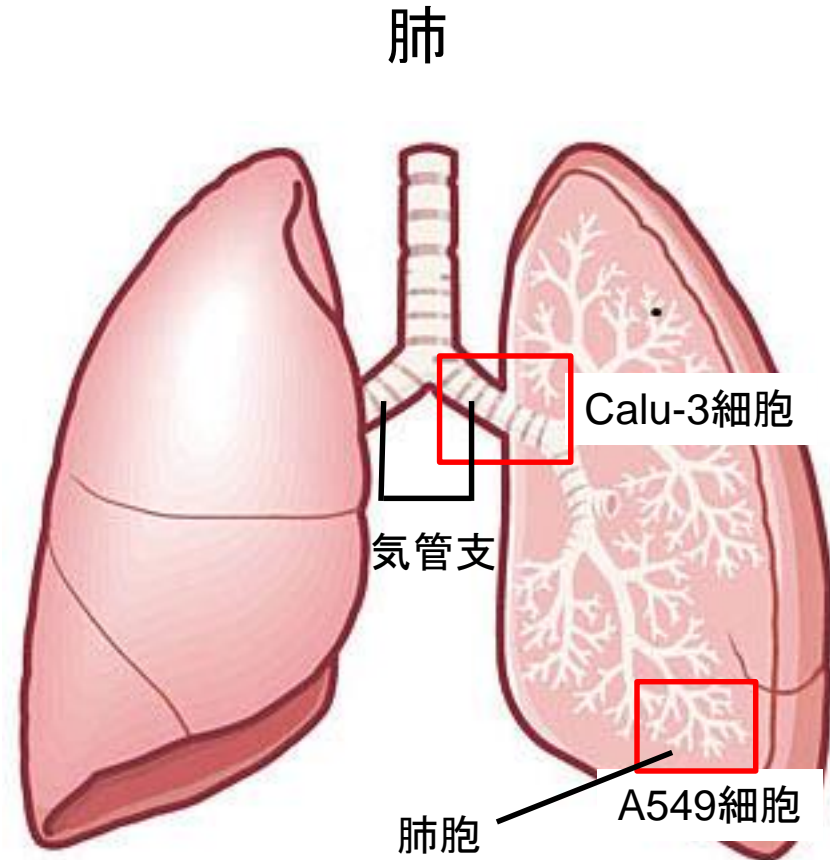
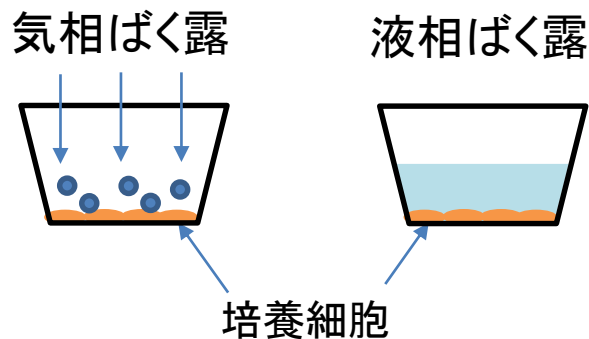
LDH: 1 mg/mLで増加  
IL-8、IL-6: 1 mg/mLで減弱  
HO-1: 不検出  
GSH: 1 mg/mLで減弱

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

# 考察 1

培養細胞の種類(A549細胞・Calu-3細胞)及びばく露方法(気相・液相)により各因子の増減等、反応性の違いが生じた

- 培養細胞の細胞膜の特性、粘液等、その他の防御機構の違い
- ばく露した硫酸アンモニウムの状態(粒子状、液状)の違いに起因する可能性



# 考 察 2

気相ばく露の中濃度群(10 mg/m<sup>3</sup>)、高濃度群(100 mg/m<sup>3</sup>)で炎症因子(IL-8)及び酸化ストレスマーカー(HO-1、GSH)が増強し、炎症の成立を示唆する結果が得られた

- ➡ これらの結果が得られたばく露濃度は、大気濃度の5,000倍、50,000倍であった

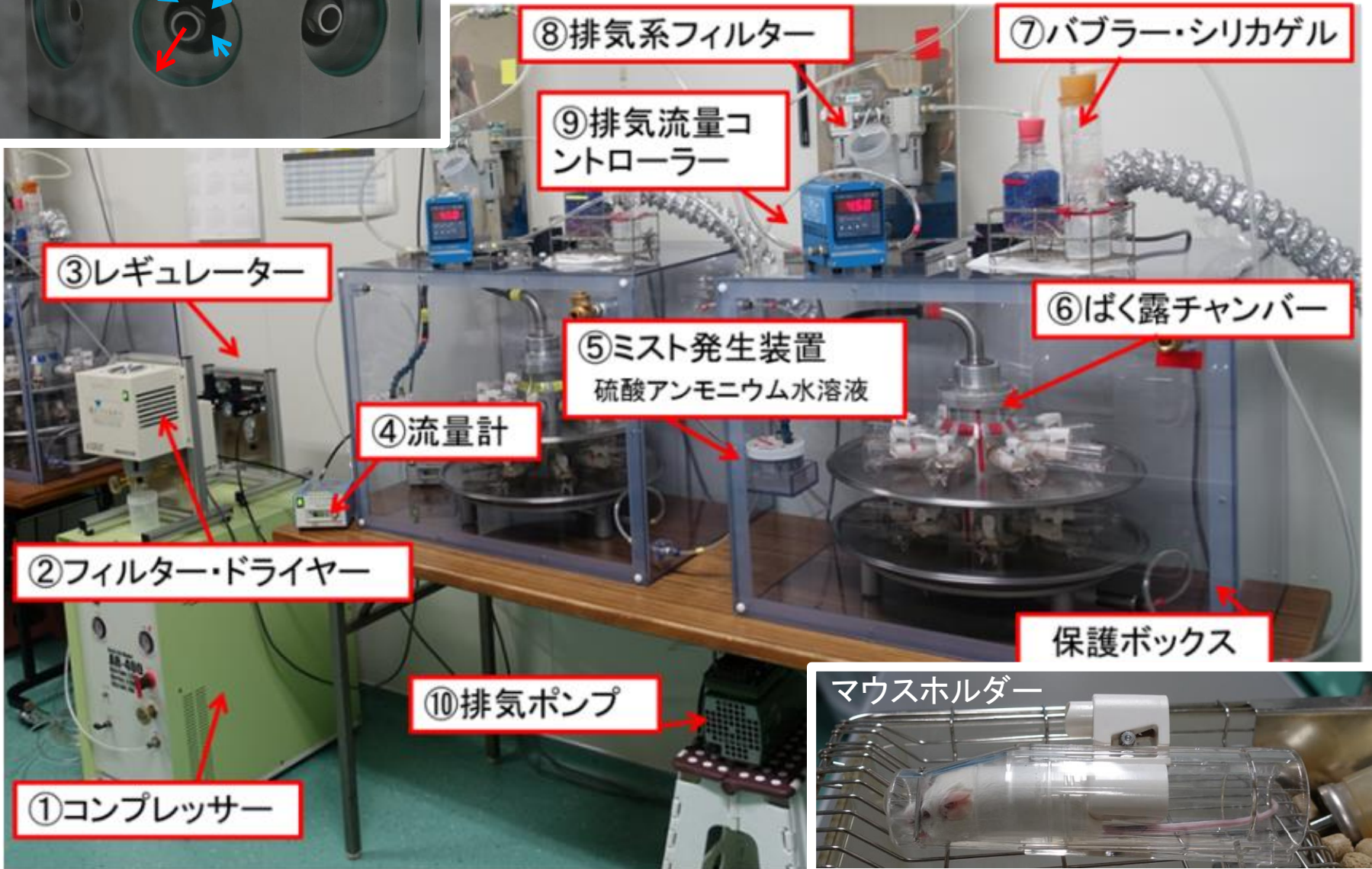
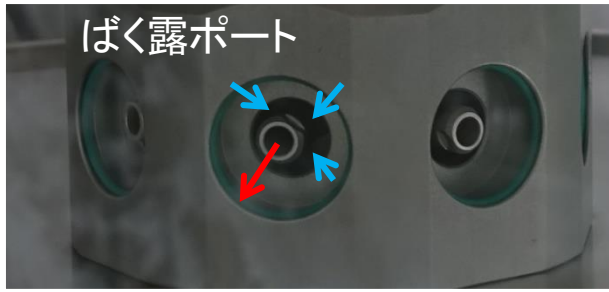
大気濃度レベルでの培養細胞への影響は  
極めて少ないと考えられる



# 第4章 硫酸アンモニウムばく露動物実験

## 第1節 正常マウスへの3か月吸入ばく露実験

# ばく露装置



# 実験概要

---

動物	BALB/cAnNCrIcrlj 雌性マウス 9週齢
ばく露方法	鼻部吸入ばく露
期間	3か月間（94日間）、5日間／週、3時間／日
被験物質	硫酸アンモニウム（試薬特級）CAS No.7783-20-2
群構成と濃度	各群16匹 対照群： 0 mg/m <sup>3</sup> （清浄空気） 低濃度群： 1 mg/m <sup>3</sup> 中濃度群： 10 mg/m <sup>3</sup> 高濃度群： 100 mg/m <sup>3</sup>

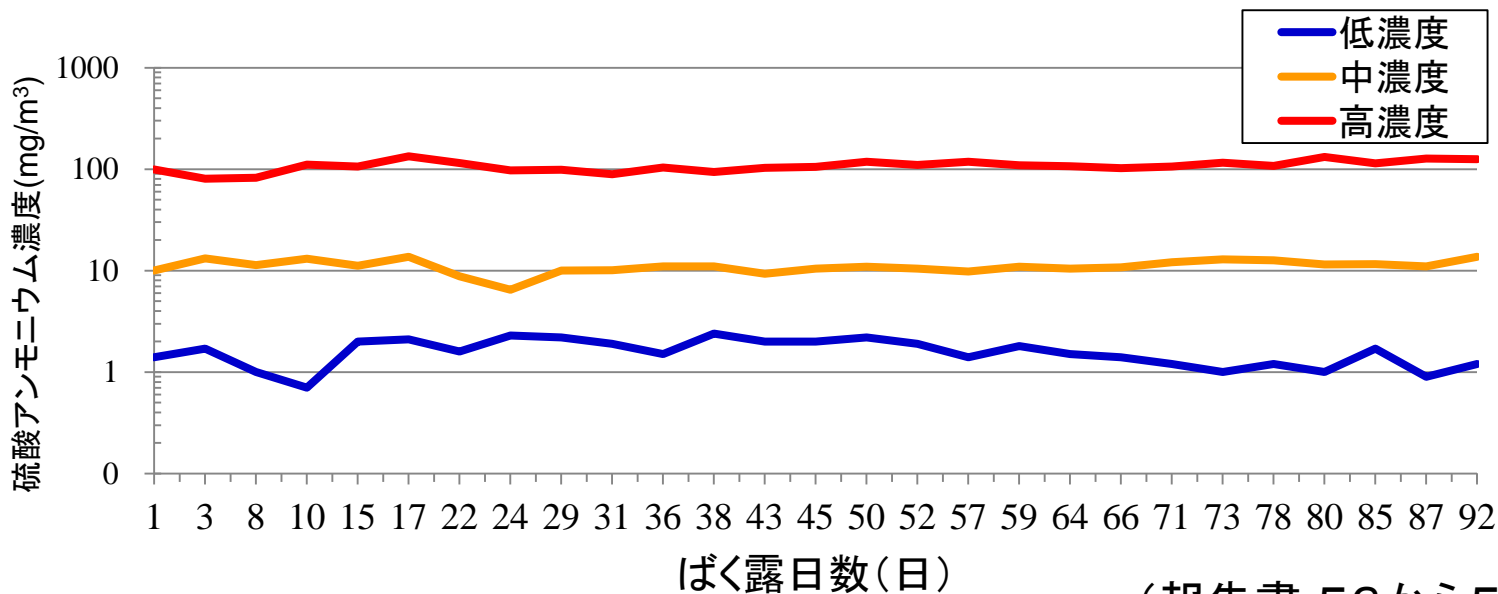
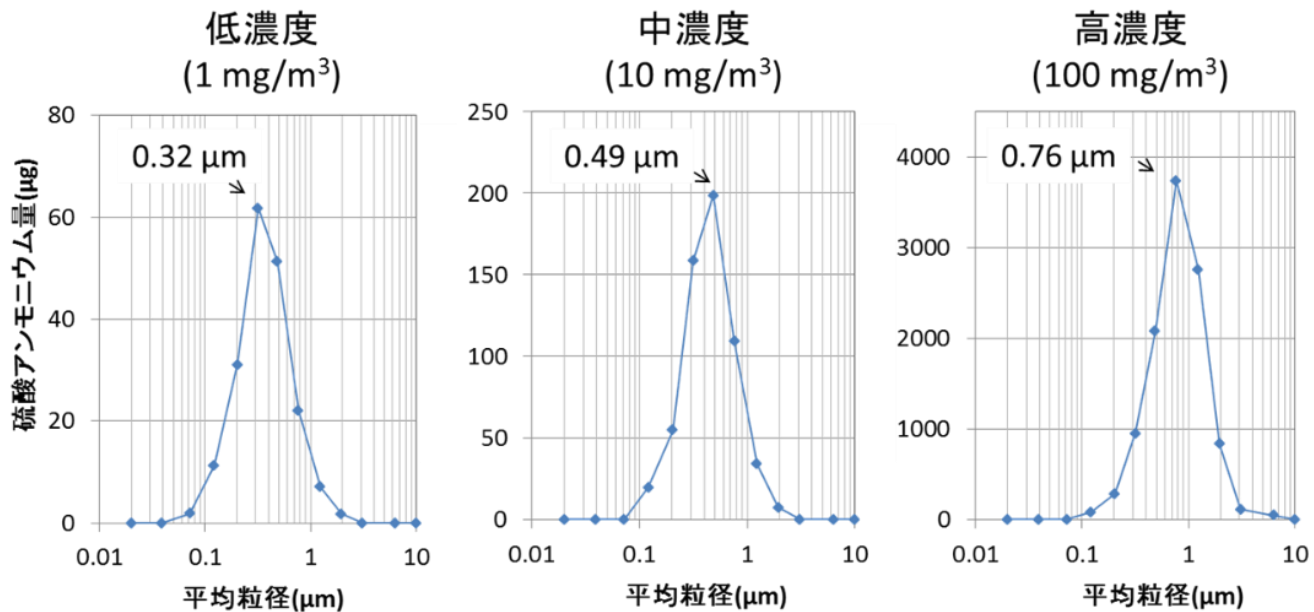
---

## 分析項目

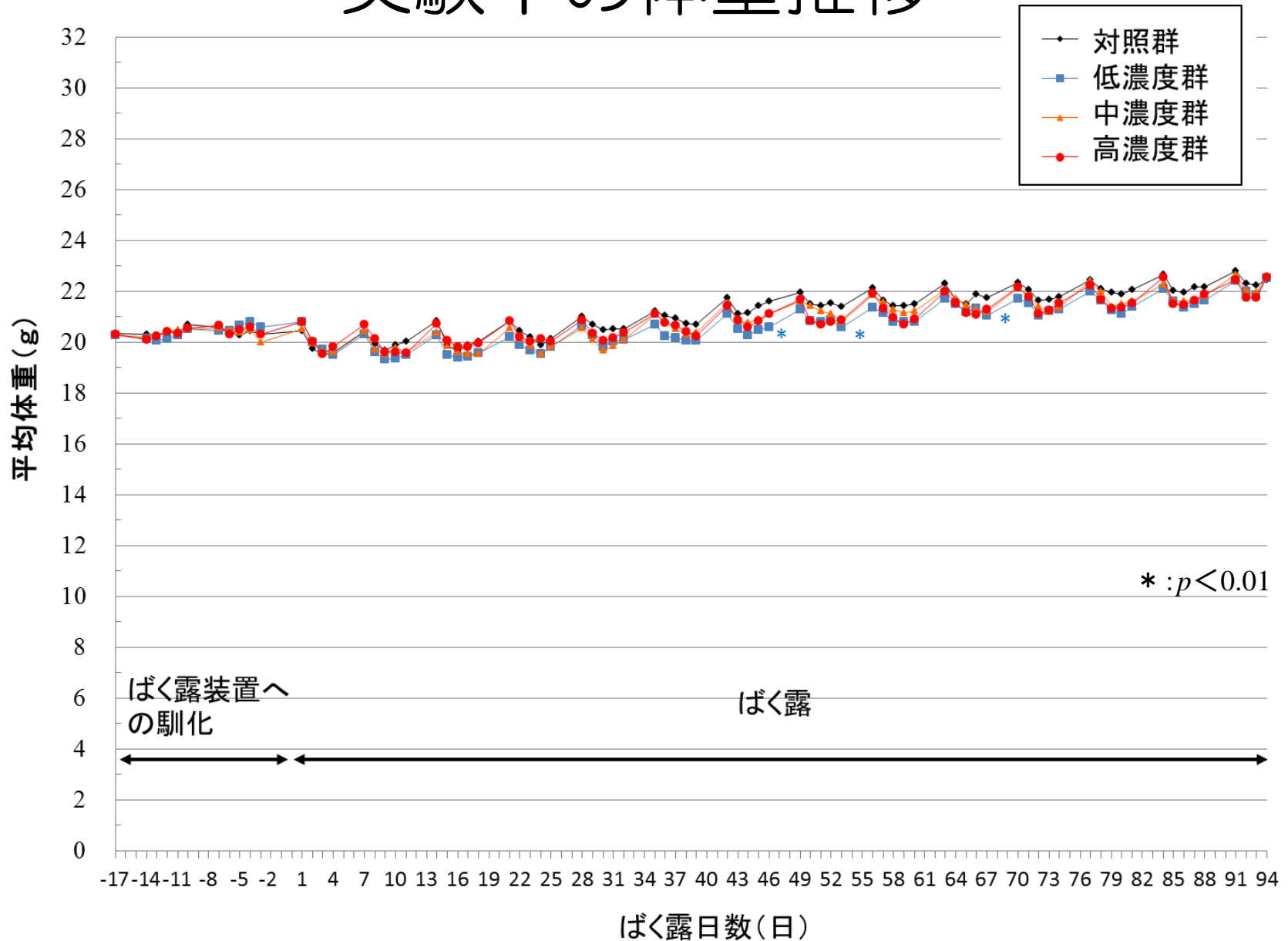
- 硫酸アンモニウムの粒子径、ばく露濃度
- 体重・臓器重量
- 病理組織学的解析
- BALF中の細胞数
- 生化学的解析（BALF中LDH及び肺実質のMDA）

（報告書 48から51ページ）

# 硫酸アンモニウムミストの粒子径及びばく露濃度



# 実験中の体重推移



# 体重及び臓器重量

項目		対照群 (n=16)	低濃度群 (n=16)	中濃度群 (n=16)	高濃度群 (n=16)
解剖時体重	(g)	22.2 ± 0.8	21.8 ± 1.1	22.1 ± 0.6	22.0 ± 0.8
副腎 (左右)	(mg)	6.6 ± 1.0	6.0 ± 1.0	6.0 ± 1.0	6.0 ± 0.7 <sup>c)</sup>
卵巣 (左右)	(mg)	8.6 ± 2.0	7.0 ± 2.1 <sup>*</sup>	7.3 ± 1.2	7.5 ± 1.8
胸腺	(mg)	21.6 ± 5.3	23.9 ± 3.5	24.1 ± 2.4	22.9 ± 5.2
脾臓	(mg)	92.1 ± 13	102.9 ± 55	90.4 ± 8.8	87.1 ± 12
腎臓 (左右)	(mg)	295.2 ± 22 <sup>b)</sup>	291.9 ± 27	287.8 ± 15	284.9 ± 13
心臓	(mg)	91.9 ± 5.3	91.4 ± 8.0	90.4 ± 5.0	91.2 ± 4.9
肺 <sup>a)</sup>	(mg)	260.5 ± 31	255.4 ± 28	249.7 ± 35	245.7 ± 38
脳	(mg)	418.6 ± 28	421.3 ± 10	419.5 ± 10	419.4 ± 7.8
肝臓	(mg)	976.7 ± 73	974.9 ± 68 <sup>d)</sup>	999.8 ± 58	980.3 ± 84

a) n=8    b) ,c),d) n=15

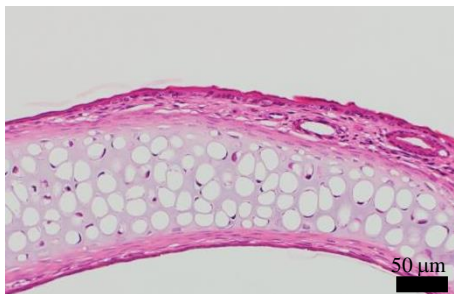
\*:  $p < 0.01$



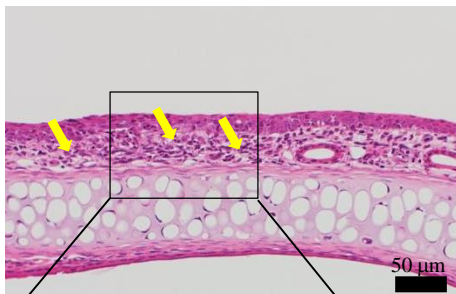
# 病理組織学的解析

## ◎鼻腔先端部の組織像（H&E染色）

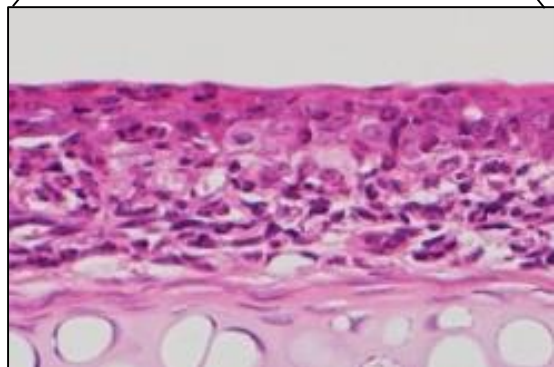
対照群



高濃度群

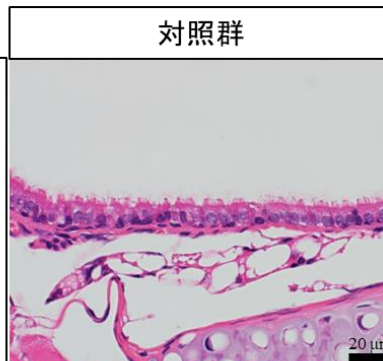


鼻腔先端部の横断面

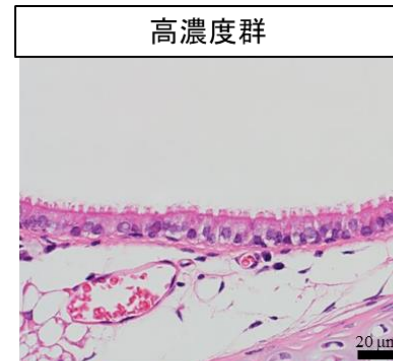


## ◎気管から肺胞の組織像（H&E染色）

対照群

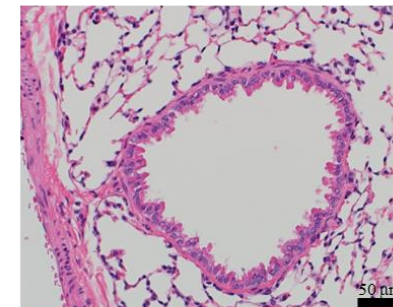
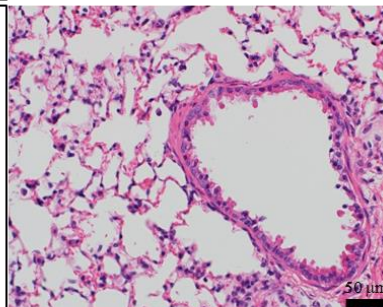


高濃度群

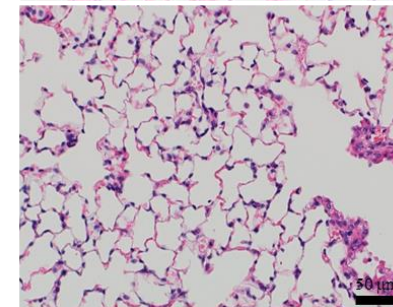
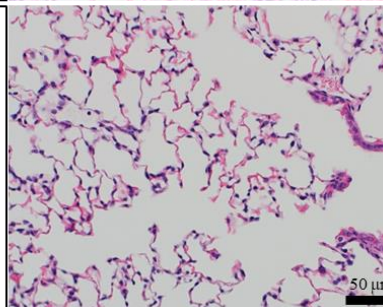


(甲状腺の部位)  
気管

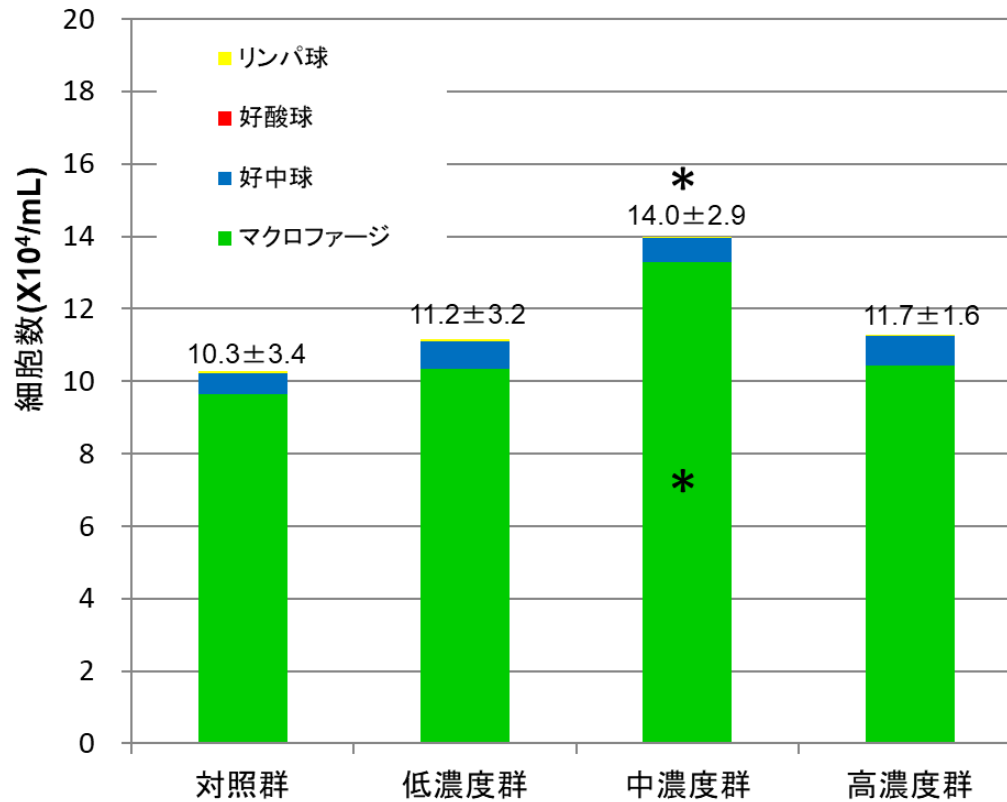
細気管支



終末細気管支  
肺胞



# BALF中の細胞数及び生化学的解析



\*:  $p < 0.01$

	対照群	低濃度群	中濃度群	高濃度群
BALF中LDH (吸光度 (490-600nm))	0.71 ± 0.19	0.69 ± 0.19	0.59 ± 0.15	0.66 ± 0.18
肺組織のMDA (nmol/100mg Lung)	13.9 ± 8.0	13.3 ± 5.5	9.3 ± 2.1	8.4 ± 1.9



# 考 察 1

## 結果のまとめ

- 体重と摂餌量の周期的な変化は、硫酸アンモニウムのばく露によるストレスと考えられる。
- 病理組織学的に、ばく露の呼吸器への影響はほとんど認められなかった。鼻腔先端部の炎症等、ばく露群でのみ観察された所見もあるが、統計学的に有意な発生率ではなかった。
- BALF中の総細胞数及びマクロファージ数が中濃度で有意に高かったが、組織学的に関連する所見は見られなかった。

# 考 察 2

## 既報との関連

- 硫酸アンモニウムのミストの粒子径は、既報のラットばく露実験と同等であり、肺の深部まで到達していると考えられる。
- 既報のマウス以外の動物実験や人体吸入実験の結果からは作用が弱いことが示唆されており、今回の結果はそれに矛盾しない。
- ぜん息誘導型モルモットでのみ強い作用が認められている。

## 結論

硫酸アンモニウムの1、10及び100 mg/m<sup>3</sup>の3か月ばく露による影響は認められなかった

## 第4章 硫酸アンモニウムばく露動物実験

### 第2節 ぜん息モデルマウスへの2週間ばく露実験

# 実験概要 1

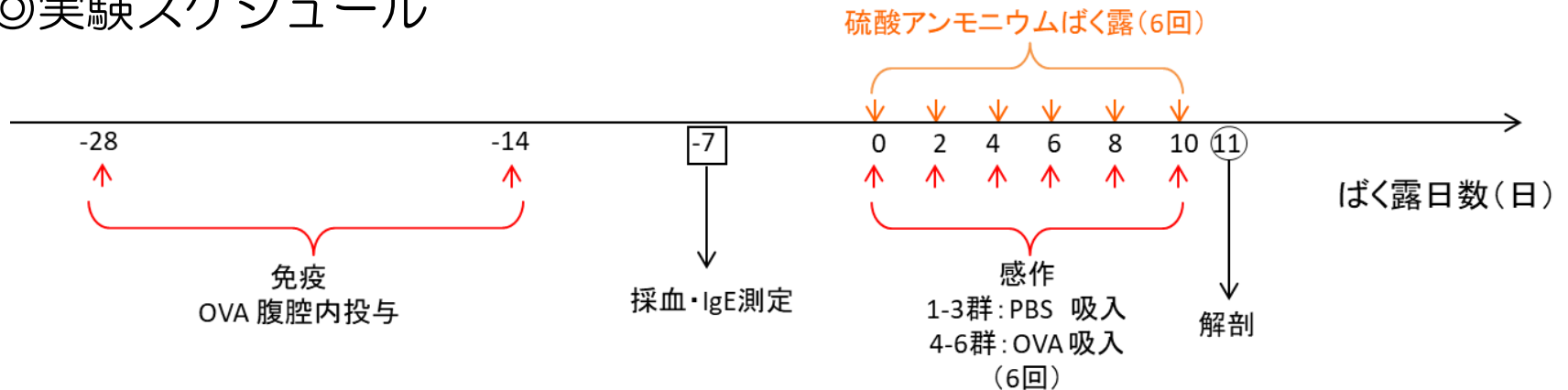
---

動物	BALB/cAnNCrIj 雌性マウス、ばく露開始時：13週齢
群構成と濃度	各群 16匹 1群 対照群：0 mg/m <sup>3</sup> （超純水） 2群 低濃度群：10 mg/m <sup>3</sup> 3群 高濃度群：100 mg/m <sup>3</sup> 4群 ぜん息群：OVA 5群 ぜん息+低濃度群：OVA+10 mg/m <sup>3</sup> 6群 ぜん息+高濃度群：OVA+100 mg/m <sup>3</sup>
硫酸アンモニウムばく露	
被験物質	硫酸アンモニウム（試薬特級）CAS No.7783-20-2
ばく露方法	鼻部吸入ばく露
ばく露期間	1日おきに2週間、6回、1時間／日
OVAぜん息誘導	
免疫方法	OVA (2 µg) + 硫酸カリウムアルミニウム (6mg)、腹腔内投与2回
感作方法	1.5% OVA/PBS、ネブライザー全身吸入ばく露30分
ばく露期間	1日おきに2週間、6回、30分／日（硫酸アンモニウムばく露後に実施）

---

# 実験概要 2

## ◎実験スケジュール



## ◎分析項目

- 硫酸アンモニウムのばく露濃度
- 体重・摂餌量
- 病理組織学的解析
- BALF中の細胞数
- 免疫学的解析
- 分子生物学的解析
- 気道過敏性試験(気道抵抗値の測定)

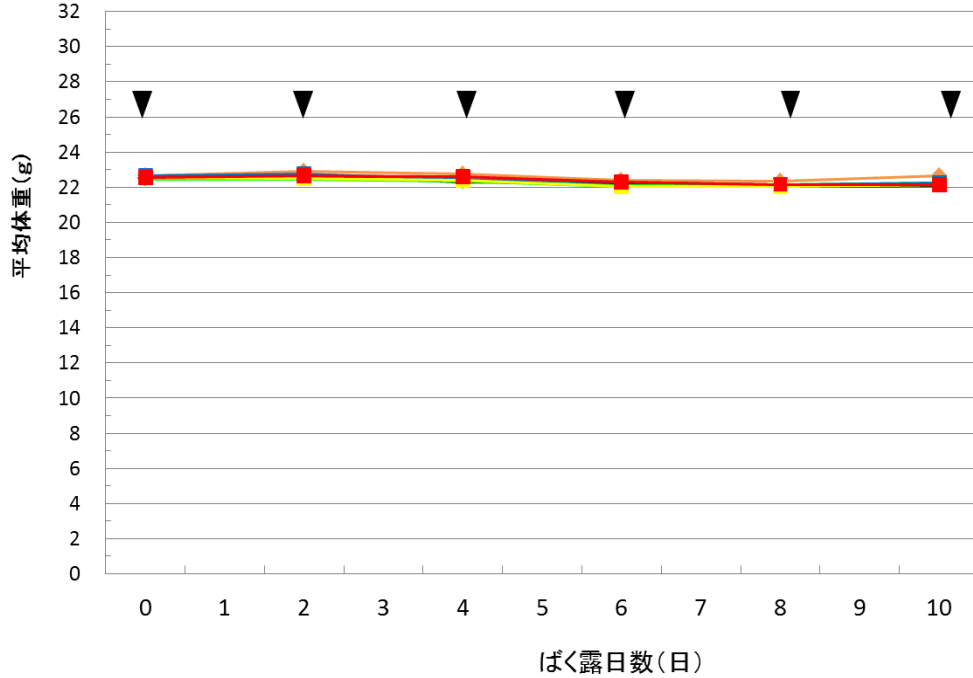
# 硫酸アンモニウムのばく露濃度

	ミスト発生装置の 水溶液濃度(%)	ばく露目標値 (mg/m <sup>3</sup> )	チャンバー内濃度 (mg/m <sup>3</sup> ) 平均値±SD
低濃度群	0.11	10	13.0±1.9
高濃度群	1.1	100	121±11

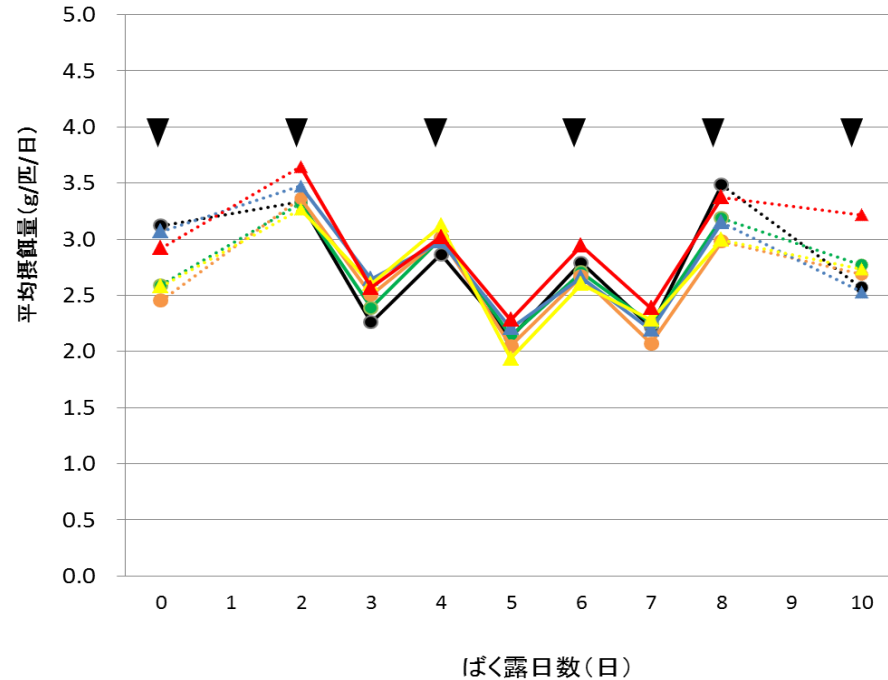
全6回のばく露のうち、4回でサンプル採取を実施した。

# 体重及び摂餌量

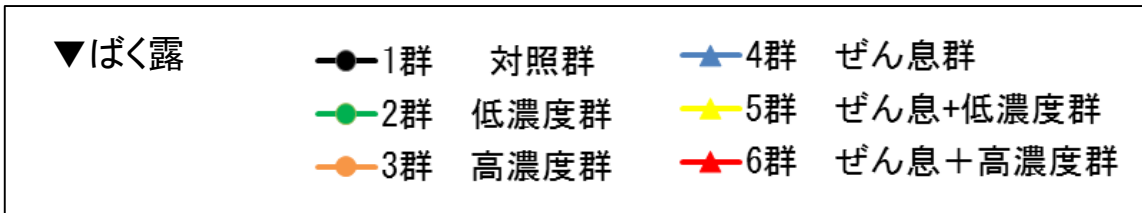
◎体重の推移



◎摂餌量の推移

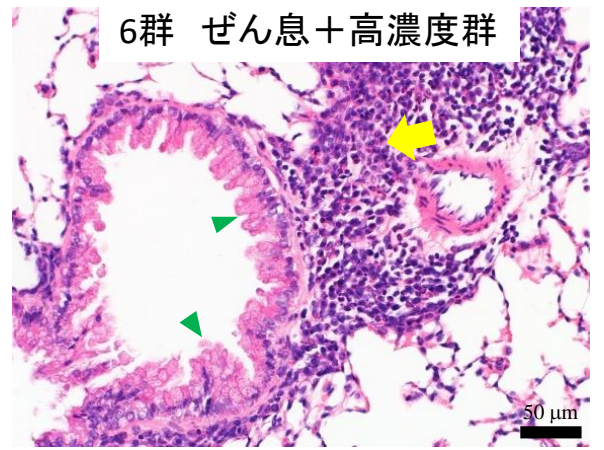
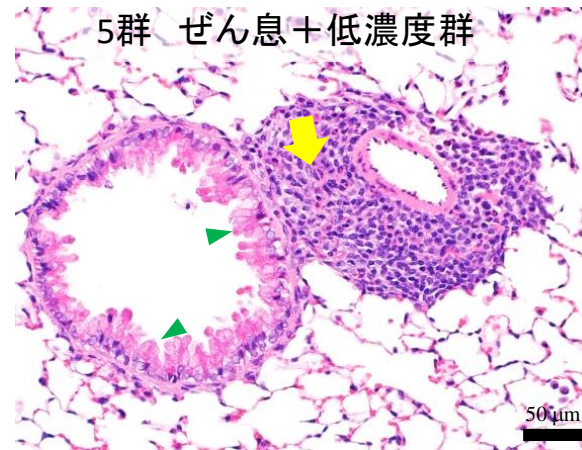
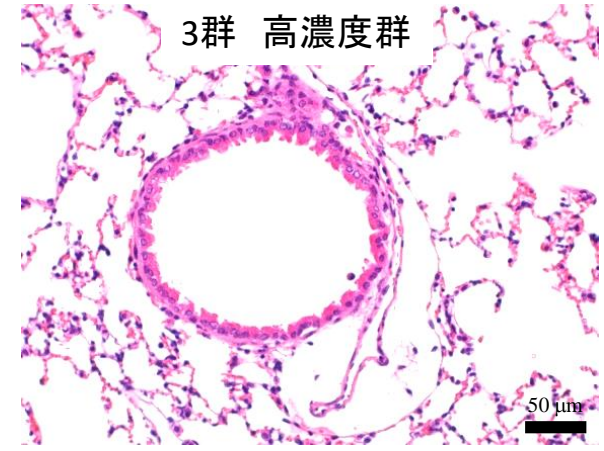
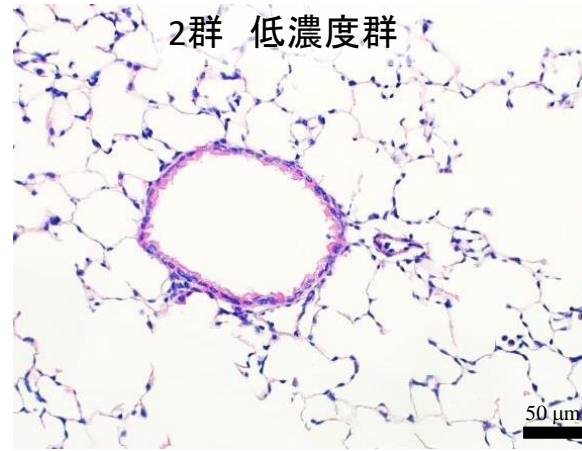
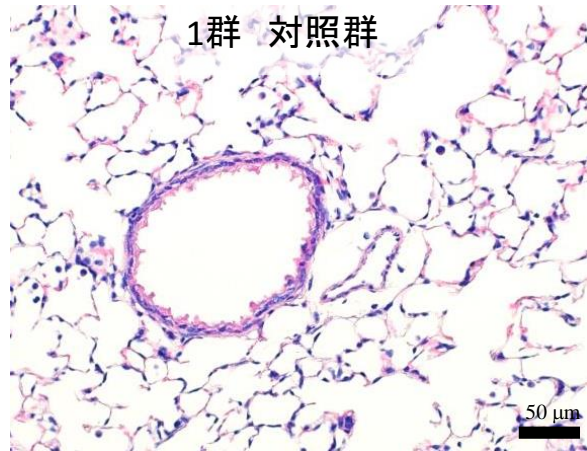


※破線部分はデータ欠測



# 病理組織学的解析

## ◎肺内気管支と周辺の血管（H&E染色）



↓ 細胞浸潤  
▼ 上皮の肥厚

(報告書 73から77ページ)



# 病理組織学的解析

## ◎肺実質の病理スコア

各所見のスコアリング・・・ 0:無し・ほぼ無し、1:弱い、2:中程度、3:強い

- ・8枚の切片を観察し、その平均値を1匹のスコア値とした。
- ・各群のスコア平均値は、10匹の平均値。

記号2つ:  $p < 0.01$   
記号1つ:  $p < 0.05$

組織・部位	所見	1群	2群	3群	4群	5群	6群
		対照群 (n=10)	低濃度群 (n=10)	高濃度群 (n=10)	ぜん息群 (n=10)	ぜん息+ 低濃度群 (n=10)	ぜん息+ 高濃度群 (n=10)
肺内気管支	気管周囲 炎症細胞浸潤	0.10	0.17	0.22 #, §	1.51 **	1.24 **	1.66 **
	血管周囲 炎症細胞浸潤	0.04	0.07	0.06	1.37 **	1.28 **	1.50 **
	気管支上皮肥厚	0.11	0.13	0.40 #, §	1.82 **	1.65 **	2.01 **
	気管支平滑筋肥厚	0.63	0.44	1.05 #, §	1.17 **	1.04 *	1.07 *
細気管支	気管周囲 炎症細胞浸潤	0	0	0.01	0.59 **	0.39 **	0.83 **
	血管周囲 炎症細胞浸潤	0.01	0.03	0.05	1.69 **	1.53 **	1.91 **
	気管支上皮肥厚	0.01	0.04	0.19 #, §	0.75 **	0.68 **	1.10 **, ¶, §
	気管支平滑筋肥厚	0.01	0.00	0.08 #, §	0.12 **	0.09 *	0.13 **
肺胞管 ～肺胞	多核巨細胞集簇	0	0	0	0.36 **	0.34 **	0.49 **
	マクロファージ集簇	0	0	0	0.25 **	0.26 *	0.30 **

\*: 1群との比較: OVA感作の影響

#: 1群との比較: 硫酸アンモニウムの影響

¶: 4群との比較: 硫酸アンモニウムによるぜん息の増悪

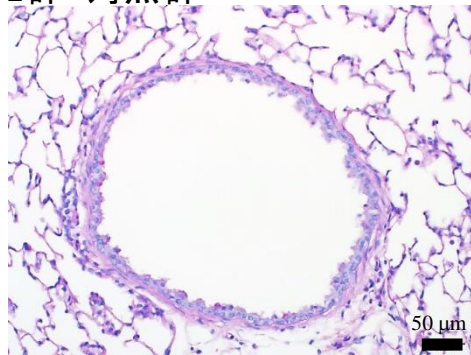
§: 1-3群の増加傾向、§: 4-6群の増加傾向

(報告書 73から77ページ)

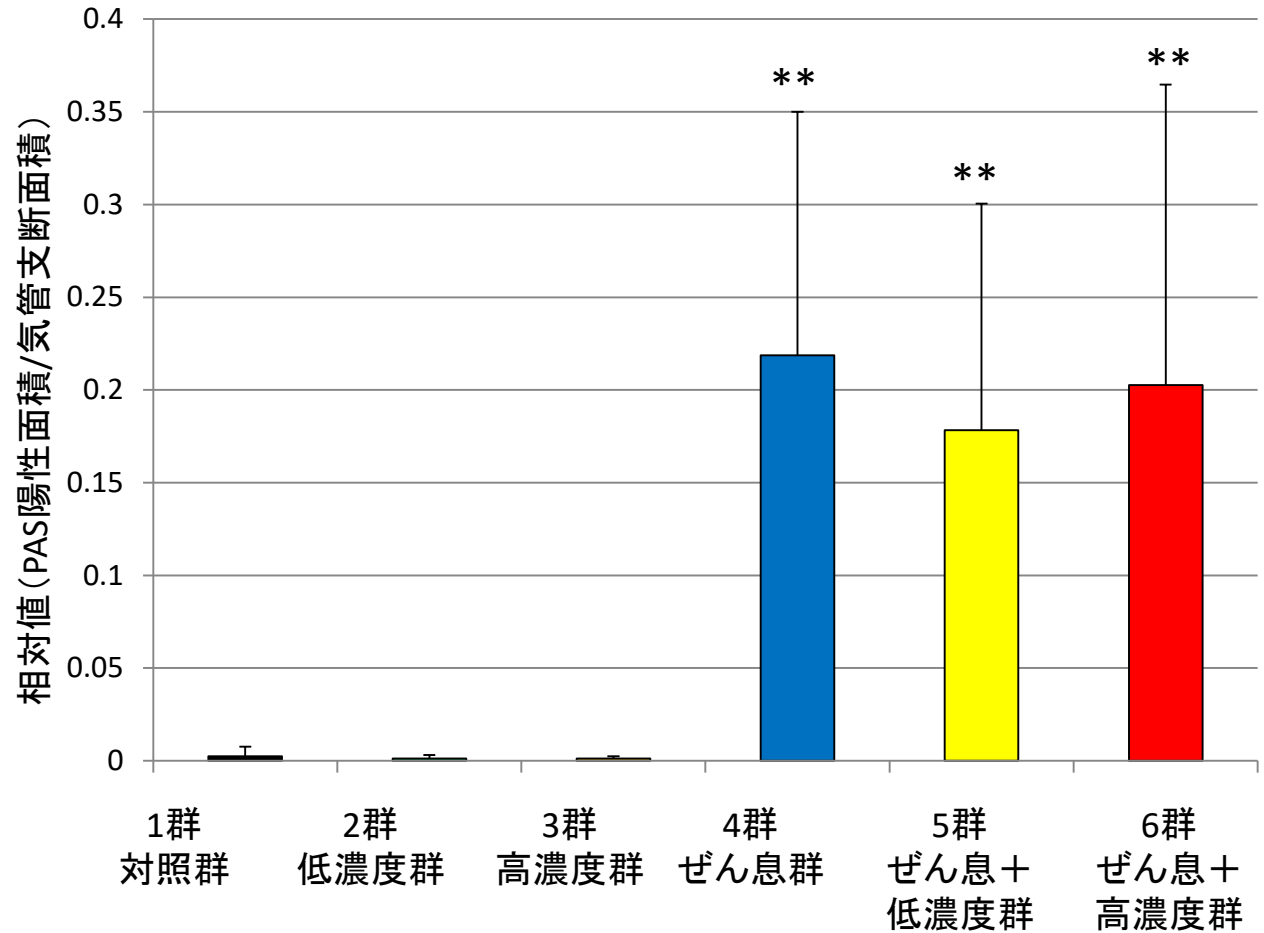
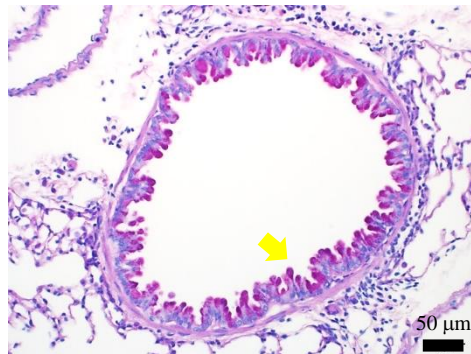
# 病理組織学的解析

## ◎気管支内腔の粘液量 (PAS染色)

1群 対照群

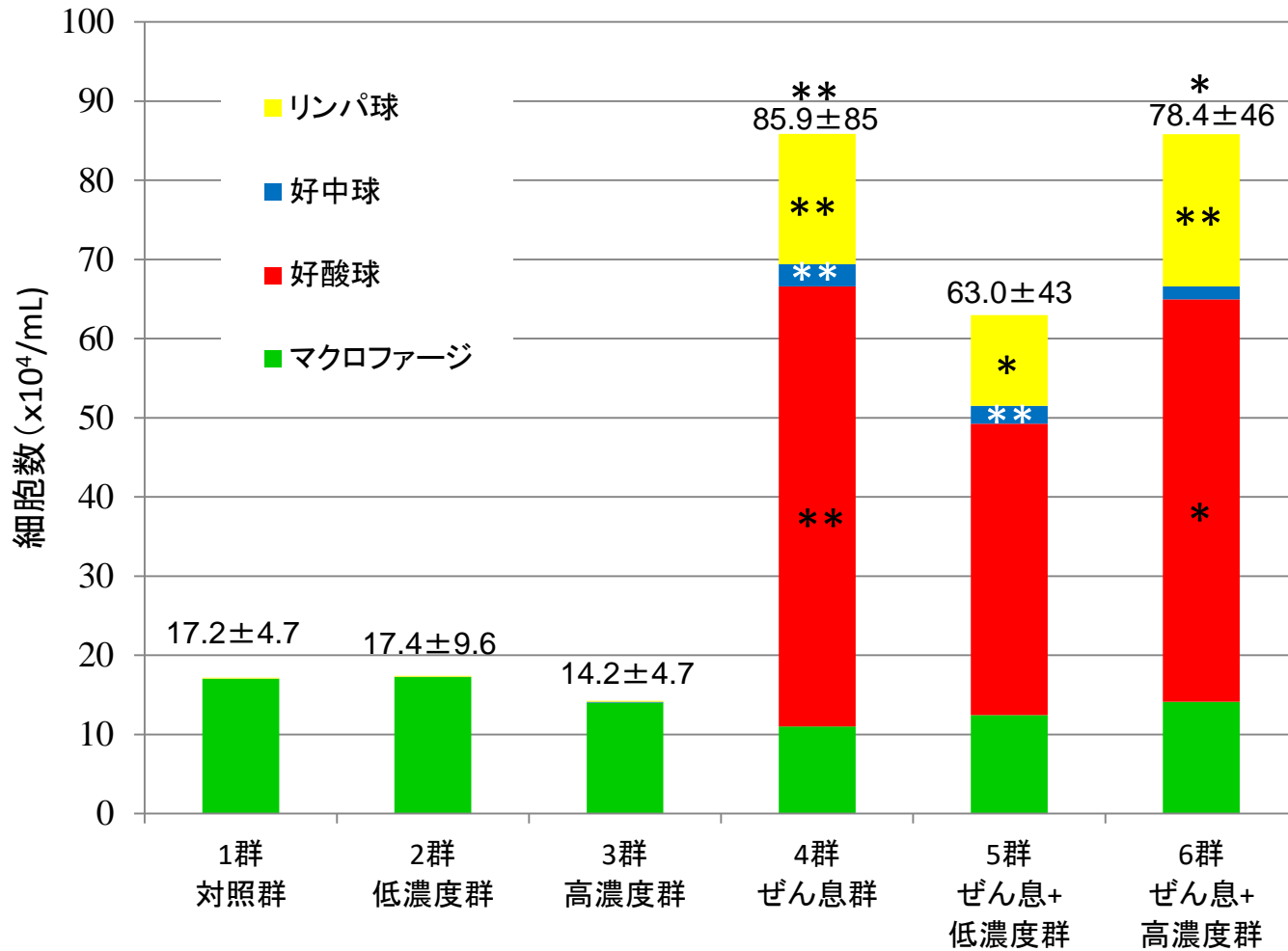


4群 ぜん息群



\*\* :  $p < 0.01$   
1群との比較: OVA感作の影響

# BALF中の細胞数

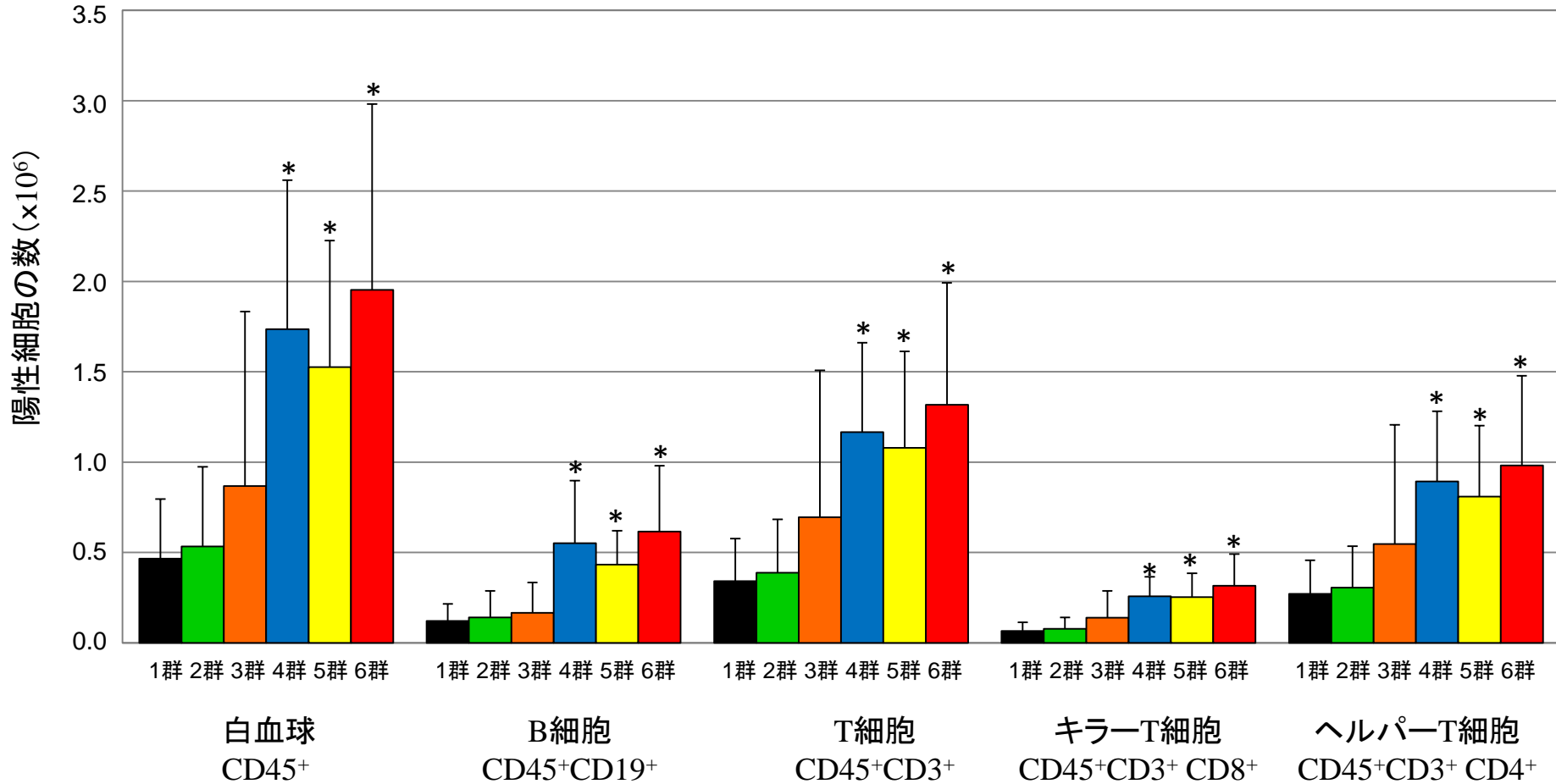


グラフ上部の数値は総細胞数の平均値±標準偏差

\* :  $p < 0.05$ 、\* \* :  $p < 0.01$   
1群との比較: OVA感作の影響

# 肺関連リンパ節におけるリンパ球サブセット分析

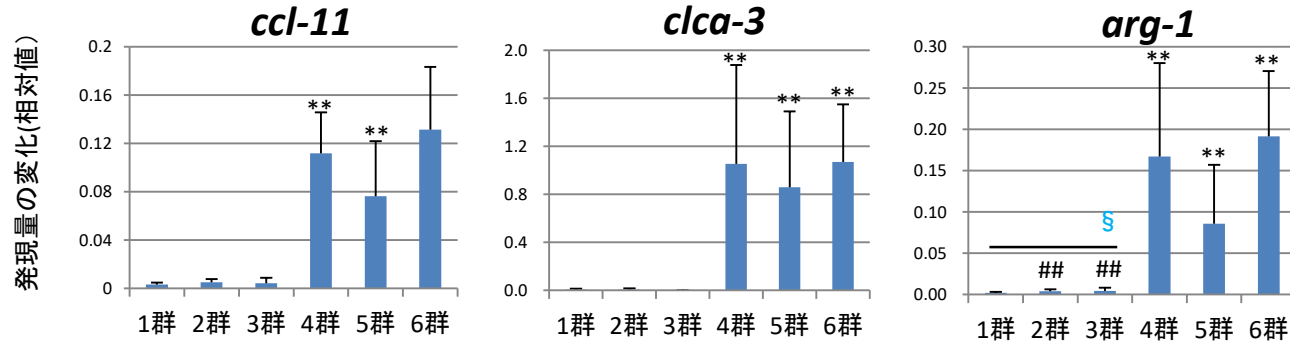
肺門リンパ節・縦隔リンパ節のリンパ球集団をフローサイトメーターで分析した。



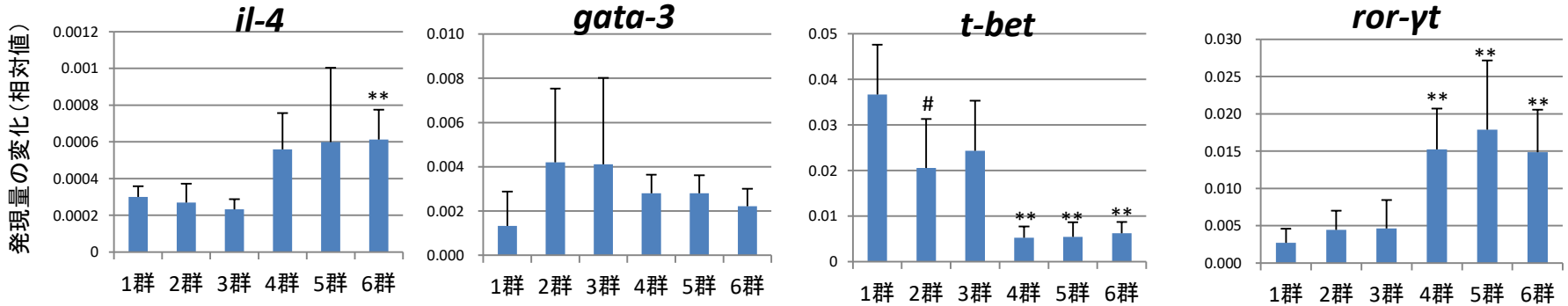
\* :  $p < 0.05$   
1群との比較: OVA感作の影響

# 肺実質における遺伝子発現解析

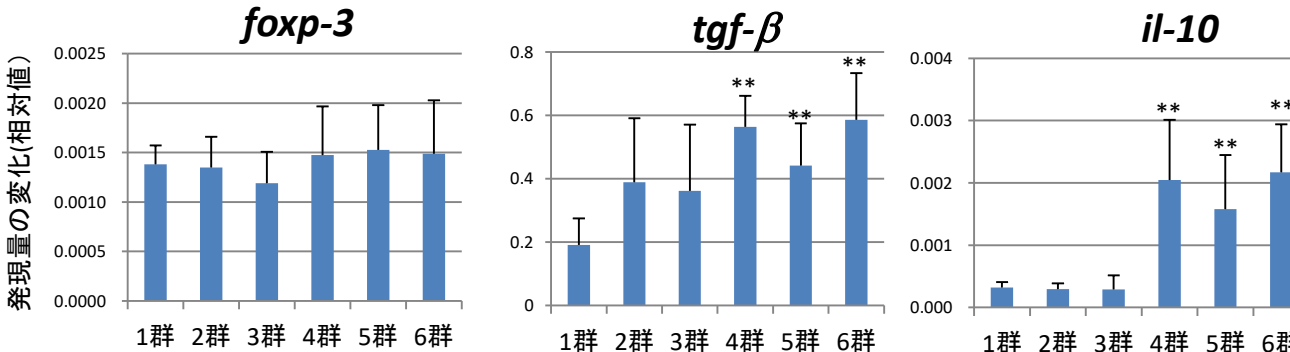
## ◎ぜん息関連



## ◎ヘルパーT細胞の分化



## ◎免疫抑制・Treg細胞



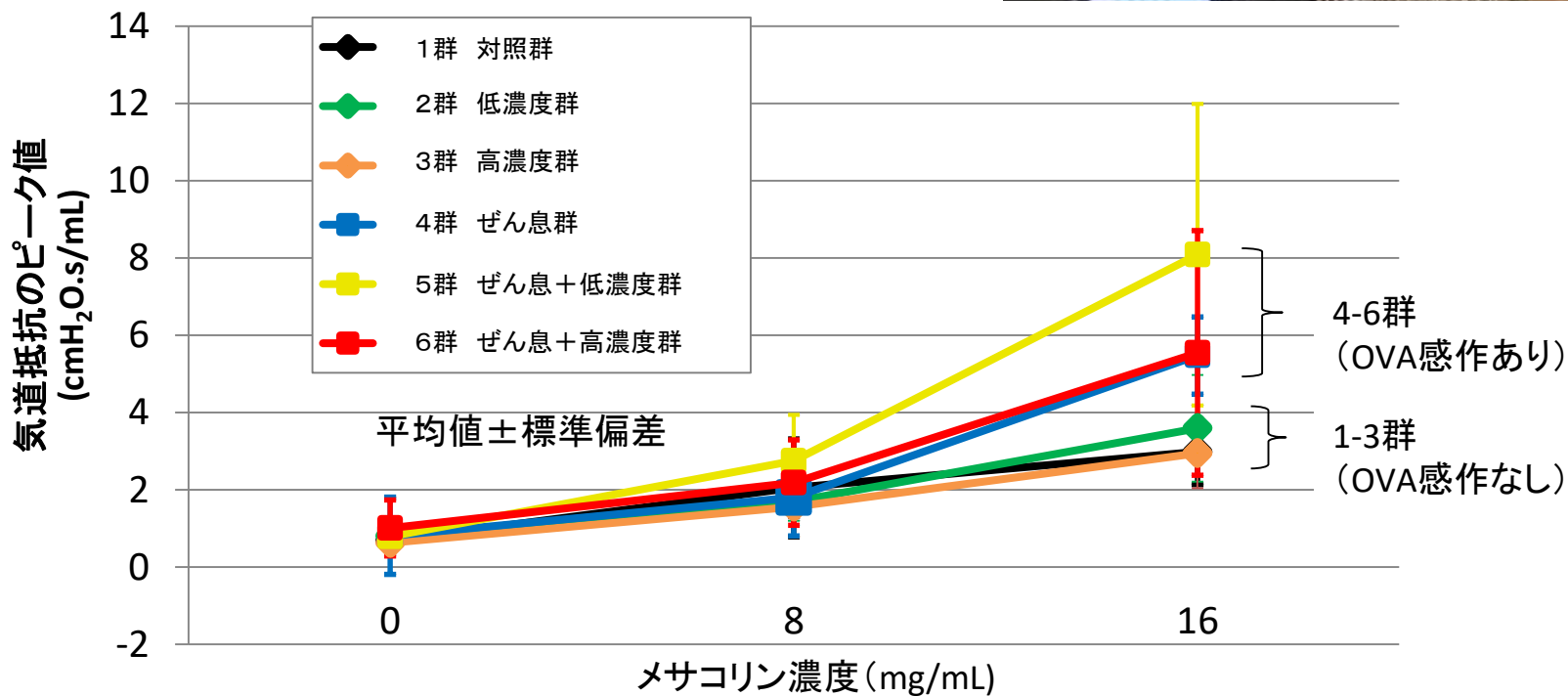
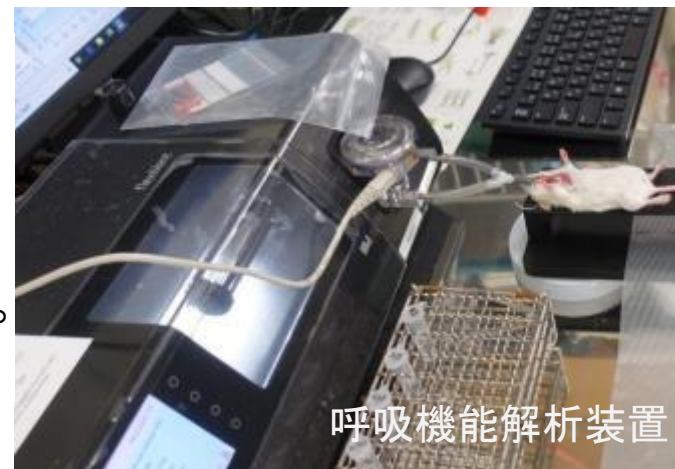
\* : 1群との比較: OVA感作の影響  
 # : 1群との比較: 硫酸アンモニウムの影響  
 § : 1-3群の増加傾向

※記号2つ:  $p < 0.01$ 、記号1つ:  $p < 0.05$

(報告書 81から83ページ)

# 気道過敏性試験（気道抵抗値の測定）

- ◎メサコリンを低濃度から順に吸入させたときの気道抵抗を呼吸機能解析装置で測定した。
- ◎ベンチレーターで一定の振動を与え、各種パラメータを分析。
- ◎各濃度で12回データを取得し、ピーク値を抵抗値とした。



# 考 察 1

## 結果のまとめ

- OVA感作を行わない群では硫酸アンモニウムの影響はほとんど見られず、第1節と同様の結果であった。
- OVA感作によりぜん息モデルを作製することができた。硫酸アンモニウムの増悪を検討するために軽度な症状を誘導したが、やや個体差が大きかった。気道抵抗等、一部の項目において、対照群と比べて有意な変化が見られなかった原因と思われる。
- 病理組織学的に、ぜん息モデルマウスにおいて、気管支上皮の肥厚が硫酸アンモニウムのばく露によって有意なスコアの上昇を認めたが微弱な変化であった。それ以外に増悪を疑わせる結果は得られなかった。

# 考 察 2

## 既報との関連

- モルモットにおいては、今回の10分の1程度のばく露でも非常に強いぜん息の増悪が認められており、種差が大きいことがわかった。
- 過去にいくつか増悪の機序が推定されているが、明確な証拠はない。

## 結論

2週間の硫酸アンモニウムのばく露によるぜん息症状の増悪への影響は極めて弱かった。



# 第5章 まとめ

# まとめ

## 大気中PM<sub>2.5</sub>中の硫酸アンモニウムの実態調査

- 6測定局で毎月検出され、検出率は100%であった。
- 平均濃度は一般局 $2.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 及び自排局 $2.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、自排局の方が一般局よりも有意に1.1倍程度高かった。
- 大気汚染物質との関連においては、SPMとの相関が最も高かった。
- 最頻粒子径は $0.49 \mu\text{m}$ であり、 $1 \mu\text{m}$ より小さかった。

## 培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験

- 培養細胞の種類、ばく露方法の違いにより、影響の現れ方が異なった。
- 気相ばく露の方が液相ばく露より影響が認められ、炎症因子(IL-8: Calu-3細胞)及び酸化ストレスマーカー(HO-1及びGSH: A549細胞)が各々2倍程度増強した。
- 影響が認められたばく露濃度は、大気中濃度の5,000倍または50,000倍であった。

## 硫酸アンモニウムばく露動物実験

- 正常マウスへのばく露において、大気中濃度の500から50,000倍の濃度で、各臓器の器質的な変化、炎症関連遺伝子の発現及び肺障害性バイオマーカーへの影響は認められなかった。
- ぜん息モデルマウスへのばく露において、大気中濃度の5,000及び50,000倍の濃度で、ぜん息の増悪に対する影響は極めて弱かった。

# 総括

- 都内大気におけるPM<sub>2.5</sub>中の硫酸アンモニウムは、6測定局で検出率100%であり都民と常に隣り合わせにある実態と、最頻粒子径が1 μmより小さく呼吸器の奥深くまで入りやすい状況が把握された。これにより、生体影響を明らかにする必要性が確認され、本研究実施の意義が裏付けられた。
- 細胞レベルでは炎症因子や酸化ストレスマーカー等に有意差のある弱い影響が認められたが、今回設定した濃度は、都内大気中濃度の500から50,000倍に相当する高濃度であった。
- 実験動物に対しては、細胞実験と同じ高濃度において、正常マウスに影響は認められず、ぜん息モデルマウスに対するぜん息の増悪への影響も極めて弱かった。

以上より、現状の都内大気におけるPM<sub>2.5</sub>中の硫酸アンモニウム濃度レベルでは、生体に対する影響は、ほとんどないものと考えられる。