

## 第5章 まとめ

### 1 各章のまとめ

#### 第2章 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

PM<sub>2.5</sub> 中硫酸アンモニウムの分別定量法の検討を行い、都内 6 か所の大気汚染常時監視測定局（一般局 3 か所、自排局 3 か所）において、1 年間の調査を実施した。分別定量法の検討では、PM<sub>2.5</sub> 中にアンモニウム塩として存在すると考えられる 4 種の塩、すなわち、硫酸アンモニウム、硫酸水素アンモニウム、硝酸アンモニウム及び塩化アンモニウムについて、揮発性の違いに着目し、加熱処理による硫酸アンモニウム分別定量法を開発した。次に開発した方法を用いて、平成 29 年 4 月から平成 30 年 3 月に、都内の大気を毎月 7 日間採取し、PM<sub>2.5</sub> 中の硫酸アンモニウムを測定した。その結果、硫酸アンモニウムの検出率は 100%、1 年間の濃度平均値は、一般局平均が  $2.0 \pm 0.86 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、自排局平均が  $2.2 \pm 0.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で、自排局の方が有意に濃度が高かった ( $p < 0.05$ )。また、硫酸アンモニウムが PM<sub>2.5</sub> に占める割合は年間平均で 15%程度であり、PM<sub>2.5</sub> 中 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>のうち約 62%が硫酸アンモニウムとして存在することが明らかとなった。硫酸アンモニウムと大気汚染物質との関連では、SPM 及び PM<sub>2.5</sub> との相関が高く、SO<sub>2</sub> 及び Ox との間に有意な相関が見られた。硫酸アンモニウム濃度について、一般局と自排局の間で有意差が認められたが、その濃度差は 1.1 倍であり、それほど大きいものではなかった。また、硫酸アンモニウムの粒径分布について、年 4 回の測定を行ったところ、いずれも 0.49  $\mu\text{m}$  に最頻粒子径を有する分布を示した。

#### 第3章 培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験

A549 細胞と Calu-3 細胞の 2 種の培養細胞を用い、硫酸アンモニウムの気相ばく露及び液相ばく露実験を行った。

ばく露濃度及びばく露時間は、気相ばく露では、低濃度 (1 mg/m<sup>3</sup>)、中濃度 (10 mg/m<sup>3</sup>) 及び高濃度 (100 mg/m<sup>3</sup>) で、1、2、3 時間のばく露を行った。液相ばく露では、0.001 mg/mL から 1 mg/mL までの濃度で、3 又は 24 時間のばく露を行った。

気相ばく露実験では、A549 細胞は LDH が低濃度 1 時間ばく露で対照群に比べ増強した。IL-8 産生は変化がなく、IL-6 は検出されなかった。HO-1 産生は、高濃度ばく露の全てのばく露時間で増強した。GSH 産生は、中濃度 2、3 時間ばく露で増強した。Calu-3 細胞は、LDH は変化がなかった。IL-8 産生は中濃度 2、3 時間ばく露で対照群に比べ増強したが、低濃度 3 時間ばく露では減弱した。IL-6 産生は、中濃度 3 時間ばく露で増強し、高濃度 3 時間ばく露で減弱した。HO-1 は検出されなかった。GSH 産生は、高濃度の全てのばく露時間で増強した。

液相ばく露実験では、A549 細胞は LDH が濃度依存的に増加したが、最大でも 3.3 %の増加であった。IL-8 産生は、1 mg/mL ばく露で対照群に比べて増強した。

HO-1 及び GSH は変化がなかった。Calu-3 細胞は、LDH が 1 mg/mL ばく露で 0.7% 増加した。IL-8、IL-6 及び GSH 産生は、1 mg/mL ばく露で対照群に比べ減弱した。

培養細胞の種類及びばく露方法により各因子の増減に違いが生じたが、これは、各培養細胞の細胞膜の特性及びばく露した硫酸アンモニウムの状態（液状、粒子状）に起因する可能性が考えられる。各因子の増強の程度については、気相ばく露で、炎症因子（IL-8）及び酸化ストレスマーカー（HO-1、GSH）がそれぞれ 2 倍程度増強したが、この時のばく露濃度（中濃度または高濃度）は、大気濃度の 5,000 倍または 50,000 倍であった。したがって、これらの濃度では炎症を起こす可能性が推察されたが、大気濃度レベルの一般的な生活環境では、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

硫酸アンモニウムの長期的な影響を評価するため、正常マウスに対し、1、10 及び 100 mg/m<sup>3</sup> の濃度で 3 か月間の吸入ばく露実験を行ったが、顕著な生体影響は認められなかった。ばく露群でばく露後の体重と摂餌量の一時的な減少傾向が認められたが、呼吸器系をはじめとした各臓器に器質的な変化を生じさせるものではなかった。炎症関連遺伝子の発現や肺障害性の指標に関する分子についても変化は見られず、本実験においては正常マウスに対する硫酸アンモニウムの吸入ばく露による影響は認められなかった。

また、硫酸アンモニウムのぜん息症状の増悪を評価するため、OVA で感作したぜん息モデルマウスを作製した。OVA 感作を実施した群において、好酸球性の炎症と気管支の粘液分泌の亢進、ヘルパーT細胞集団の変化等、典型的なぜん息様症状が認められた。10 及び 100 mg/m<sup>3</sup> の濃度で 2 週間の吸入ばく露実験を実施したが、いずれの濃度においても硫酸アンモニウムのばく露による増悪は見られなかった。モデルマウスの個体間のばらつきがやや大きかったことを考慮しても、硫酸アンモニウム単独でのマウスに対する増悪の影響は極めて弱いと言える。

## 2 総括

都内大気中 PM<sub>2.5</sub> 濃度は、本研究開始前の時点で環境基準に対する達成率が低い上、PM<sub>2.5</sub> の主要成分の一つである硫酸アンモニウムとぜん息発作に関連が見られることが疫学調査により報告されており、健康影響が懸念された。その一方で、大気中 PM<sub>2.5</sub> に存在する硫酸アンモニウムの都内大気中の存在実態や生体あるいは細胞への影響については、報告や知見が乏しく、その健康影響評価が困難であったことから、本研究に取り組んだ。

実態調査では、都内大気汚染常時監視測定局 6 か所において PM<sub>2.5</sub> 中の硫酸アンモニウムは全測定局で毎月検出され、都民が硫酸アンモニウムと常に隣り合わせである実態とその濃度が明らかとなった。また、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である大気中の現状も把握され、生体影響を明らかに

する必要性が確認された。

硫酸アンモニウムによる生体影響を確認するため、培養細胞を用いた実験と正常マウス及びぜん息モデルマウスを用いた動物実験とを行った。

培養細胞の実験では、呼吸器系上部と下部の 2 種のヒト由来培養細胞を用い、気相及び液相の 2 種のばく露方法で細胞への影響を確認したところ、人が大気中から呼吸により摂取する実態に近い実験系である気相ばく露実験において、炎症因子や酸化ストレスマーカー等に有意差のある影響が認められたがその程度は弱かった。同じ呼吸器系でも部位の異なる培養細胞種ごとに、ばく露方法の違いによる影響を評価した結果、それぞれで影響の現れ方が異なっていることを確認した。

動物実験では、正常マウスを用いた 3 か月ばく露実験において、呼吸器系をはじめとした各臓器に対する器質的な変化は見られず、炎症関連遺伝子の発現や肺障害性のバイオマーカーについても変化は見られなかった。ぜん息モデルマウスを用いた 2 週間ばく露実験における硫酸アンモニウムによるぜん息症状への影響評価においても、ばく露による増悪は極めて弱かった。

今回、培養細胞気相ばく露実験及び動物実験に設定したばく露濃度は、都内大気中濃度の 500 から 50,000 倍に相当し、実際の大气中の濃度と比べてかなり高濃度である。このような高濃度においても際立った特徴的な影響が観察されなかったことから、現状の都内大気中 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。

## 用語解説

本報告書に用いられている以下の用語について解説を記載する。

B 細胞	リンパ球の一種で、体内に侵入した病原体を排除するための液性免疫に関わる細胞。B 細胞は形質細胞に分化し、毒素のような抗原に対する抗体を産生する。
GSH	還元型グルタチオンの略。細胞内に多く存在しており、酸化物質の 1 つとして知られている。酸化ストレスを受けると酸化型グルタチオン (GSSG) を GSH に変換する酵素が活性化、誘導され、GSH が増加する。
HO-1	ヘムオキシゲナーゼ-1 の略。抗酸化・抗炎症作用等、細胞保護作用を有している。熱や酸化ストレス、炎症性サイトカイン等により急速に発現が誘導される。
IgE 〔免疫グロブリン E〕	免疫グロブリンの一種。アレルギーを引き起こす物質 (アレルゲン: 花粉、ダニの死骸、ハウスダスト、ホルムアルデヒドなど) と IgE 抗体が結びつくと、細胞からヒスタミンなどが放出されてアレルギー症状を引き起こす。アトピー患者やぜん息患者の血清では IgE が高いことが多い。
IgG 〔免疫グロブリン G〕	免疫グロブリンの一種。血清中に最も高濃度で存在し、血清及び組織においても比較的均一に分布している。種々の抗原 (細菌、ウイルスなど) に対する抗体を含んでいる。
IL-6	T 細胞、マクロファージ、線維芽細胞など、種々の細胞から産生されるインターロイキンの一種。B 細胞の抗体産生、骨代謝、T 細胞の分化、急性期たんぱく質の発現など多様な生体内の反応に関わる。IL-6 は、生体に細菌等が侵入すると、これを排除しようと様々な反応を引き起こすと考えられている。
IL-8	白血球、線維芽細胞や血管内皮細胞など種々の細胞から産生され、免疫や炎症に関与するインターロイキンの一種。IL-8 は白血球が刺激物に向かうようにさせる因子であり、生体における炎症形成に関与すると考えられている。
<i>in vitro</i>	「試験管内で (の)」という意味を示す用語。試験管や培養器の中でヒトや動物の細胞などを用いて反応を見る試験の総称、あるいはその様な試験条件を指す。

<i>in vivo</i>	「生体内で (の)」という意味を示す用語。実験動物を用いて反応を見る試験の総称、あるいはその様な試験条件を指す。
T細胞	リンパ球の一種で、免疫応答において重要な役割を果たし、細胞性免疫に関わる細胞。胸腺で自己と非自己を識別するために選別された後、主にヘルパーT細胞、キラーT細胞として機能を果たす。過剰な活性化は自己免疫疾患やアレルギーなどをもたらす。
亜慢性毒性試験	慢性毒性試験は、被験物質を長期間（6か月以上）にわたり繰り返し投与し、生体への影響を調べる試験である。亜慢性毒性試験は、慢性試験より短いが、反復ばく露による影響を調べる試験のことを指す。
イオンクロマトグラフ	無機イオンや有機酸など、イオン性の物質を定性・定量する装置。液体クロマトグラフの一種で、カラムで各イオンを分離し、電気伝導度検出器で測定する。
インサート	培養細胞の気相ばく露実験に用いる培養器具で、セルカルチャーインサートのことを示す。インサートの底面には膜が張られており、膜上に培養細胞を増殖させて使用する。通常、培養細胞は液体培地の中で培養するが、インサートを使うと、培養細胞の上側の培地を除去しても、膜下の培地が膜を通して培養細胞へ供給される特色がある。そのため、培養細胞上部を気体に接触させることができ、気相ばく露実験に汎用される。
インパクター	空気中の粒子を捕集する装置の一種。空気を細孔から吸引して捕集板にあて、捕集板に衝突した粒子を捕集板に付着させて捕集する。細孔と捕集板を交互に重ねて配置し、下流側の細孔径を次第に小さくすることにより、下流側で、より小さな粒径の粒子を捕集することができる。
インピンジャー	空気などのガス状試料を溶液中に通し、バブリングする装置。空気を超純水に通すことにより、加湿することができる。
越境汚染	大気汚染の原因物質が気流に乗って運ばれ、国境を越えることで、別の国で発生する大気汚染のこと。

気道過敏性試験	気道の過敏性を測定することでぜん息の重篤度を調べる試験。気管支平滑筋収縮作用のあるメサコリンやアセチルコリンなどの薬を、薄い濃度から段階的に濃度を上げて吸入させ、気道抵抗が上昇するかどうかを調べる。重篤なぜん息患者ほど低い濃度で気道抵抗が上昇する（すなわち「過敏性が高い」）。
気道抵抗	気道を通る空気の通りにくさを意味し、気管支ぜん息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）など気道が狭くなる疾患において重要な指標である。1 L/秒の流量でガスを流すときにかかる圧力（cmH <sub>2</sub> O・s/mL）として表記する。
キラーT細胞	T細胞の一種で、細胞傷害性T細胞とも呼ばれる。成熟したT細胞のうち、ウイルスや微生物への感染防御などに働く細胞。抗原提示された感染細胞を認識して殺傷する。炎症性免疫疾患やアレルギー性疾患における組織障害に関与すると考えられる。
黄砂	東アジアの砂漠地帯や黄土地帯から、強風によって巻き上げられた砂じんが偏西風に乗って運ばれ、大気中に浮遊あるいは降下する現象のこと。
好酸球	顆粒球（細胞質内に染色性の高い顆粒を有する白血球）の一種で、アレルギー性気管支ぜん息の病態に関わり、ぜん息患者の気道組織で多数の浸潤が認められる。刺激により脱顆粒し、ペルオキシダーゼや主要塩基性たんぱく質などを放出することで、気道粘膜上皮を傷害する。
好中球	顆粒球（細胞質内に染色性の高い顆粒を有する白血球）の一種で、細菌などの侵入の際に見られる急性炎症反応で主要な役割を果たす。細菌を取り込み、細胞内の小胞（リソソーム）で、消化・殺菌・分解する。
サイトカイン	白血球等から血液・体液中に放出され、細胞間の情報伝達に働くたんぱく質性の因子。インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、細胞増殖因子などのグループがあり、免疫、炎症、造血等の生体反応において重要な役割を果たす。極めて微量で効果を発揮し、多彩な生理活性を有する。ただし、過剰に産生されれば病態形成にも関与する。
式量	物質の化学式に基づき、各原子の原子量の総和を求めた値。イオン性の物質では分子が存在しないため、分子量に相当する量として使う。

脱顆粒	細胞内に顆粒を有する白血球が、刺激に応じて、顆粒に貯蔵してあるプロテアーゼや化学伝達物質を放出すること。これらの物質が周囲に作用し、生体における炎症反応の制御に深く関わる。
ネブライザー	呼吸器疾患の治療を目的に薬液をミスト状にして気管支・肺に送るための医療機器。超音波や圧縮空気などを利用して、ミストを発生させる。
フローサイトメトリー	蛍光標識した細胞を、一つ一つ水流に乗せて流し、レーザーの光束を当てることにより解析する手法。散乱光や蛍光を検出することで、細胞集団における細胞の種類、数、大きさなどを調べることができる。
ヘルパーT細胞	T細胞の一種で、獲得免疫系で中心的な役割を果たす。ヘルパーT細胞は特定のサイトカイン環境にさらされることで、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、Treg細胞などのサブセットに分化し、それぞれの機能を発揮する。例えば、IL-4の刺激により成熟したTh2細胞は好酸球を活性化する。Th2のサブセットが過剰に活性化すると、気管支ぜん息やアトピー性皮膚炎などの病態につながる。
マクロファージ	大食細胞や組織球とも呼ばれ、遊走性を持つ白血球の一種。外傷や炎症の際に活発に働き、死細胞や細菌などの異物を捕食する。
マスト細胞	肥満細胞とも呼ばれ、細胞内に好塩基性の顆粒を持ち、ぜん息症状の発症に深く関与する。アレルギー特異的なIgEが作用すると、脱顆粒が起こり、放出されたヒスタミンなどの化学伝達物質により、血管拡張や血管透過性の亢進、平滑筋の収縮などを惹起し、ぜん息発作を誘発する（即時型のアレルギー反応）。また、気管支粘膜などのアレルギー性炎症部位でサイトカインなどを産生することで、好酸球を誘引し、遅発型のアレルギー反応も惹起する。
マロンジアルデヒド (MDA)	脂質過酸化分解生成物の一つであり、生体内の酸化ストレスの指標として広く用いられる。
卵白アルブミン (OVA)	鶏卵の卵白に含まれるたんぱく質全体の50%程度を占めるたんぱく質で、卵アレルギーの原因物質と言われる。アレルギー分野の研究においても、アレルゲンとして利用されることが多い。