

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24年度から27年度まで)



平成28年 3月

東京都福祉保健局

はじめに

東京都では、昭和 53 年度から窒素酸化物、オキシダントなどを中心とした複合大気汚染に係る健康影響調査の一環として、主に動物を用いた基礎的実験的研究を実施してきました。この間、東京の大気汚染物質の主役は硫黄酸化物からオキシダント、窒素酸化物、浮遊粒子状物質へと変わり、基礎的実験的研究においても、ディーゼル車排気ガス中に多量に含まれる粒子状物質等を主たる対象としています。

平成 20 年度から平成 23 年度の調査では、平成 15 年からディーゼル車に装着が義務付けられた DPF(粒子状物質減少装置)の装着時と、非装着時の排出ガスを動物にばく露し、ぜん息症状への影響を比較検討しました。その過程で行った成分分析結果では、DPF 装着時には、非装着時に比べて、排出ガスに有機酸類が多く含まれていました。

そこで、平成 24 年度から平成 27 年度にかけて、有機酸類の実態を把握し健康影響を調査するため、大気中有機酸類の成分分析、培養ヒト肺上皮由来細胞へのばく露実験及びラットを用いた吸入ばく露動物試験を実施し、研究結果を報告書に取りまとめました。

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。

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
第2章 大気中有機酸類の成分分析	5
I 目的	5
II 方法	5
1 大気中ギ酸及び酢酸の測定方法の検討	5
2 大気中有機酸類調査方法	5
3 イオンクロマトグラフによるギ酸及び酢酸の分析	6
III 結果	7
1 大気中ギ酸及び酢酸の測定方法	7
2 都内大気中ギ酸及び酢酸の測定結果	8
3 ギ酸及び酢酸と大気汚染物質等との関連	12
IV 考察	18
第3章 培養ヒト肺上皮由来細胞への有機酸類ばく露実験	21
I 目的	21
II 方法	21
1 試薬	21
2 培養ヒト肺上皮由来細胞への液相ばく露実験	21
3 培養ヒト肺上皮由来細胞への気相ばく露実験	22
III 結果	24
1 培養ヒト肺上皮由来細胞へのギ酸及び酢酸の液相ばく露による影響	24
2 培養ヒト肺上皮由来細胞へのギ酸及び酢酸の気相ばく露による影響	24
IV 考察	26
第4章 有機酸類ばく露システムの構築及びギ酸・酢酸測定の検討	29
I 目的	29
II 方法	29
1 有機酸類ばく露システムの構築	29
2 ギ酸及び酢酸測定方法の検討	29
3 糞尿への吸着程度の確認	30
III 結果	30
1 有機酸類ばく露システムの構築	30
2 ギ酸及び酢酸測定方法の検討結果	36
3 糞尿への吸着程度の確認	37
IV 考察	40

第5章 有機酸類吸入ばく露動物試験	43
I 目的	43
II 方法	43
1 実験動物	43
2 ばく露濃度及びばく露システム	43
3 解剖及び試料採取	44
4 病理組織学	44
5 血液学	45
6 免疫学	45
7 生化学（過酸化脂質）	45
8 プロテオーム	45
9 ウェスタンブロッティング	46
III 結果	47
1 酢酸ばく露	47
2 ギ酸ばく露	58
3 酢酸・ギ酸混合ばく露	69
IV 考察	78
1 混合ばく露による体重及び臓器重量の減少	78
2 呼吸器系への影響	78
3 凝固系への影響	80
4 ストレス応答の痕跡	80
5 結論	84
写真	85
第6章 まとめ	91
I 結果のまとめ	91
第2章 大気中有機酸類の成分分析	91
第3章 培養ヒト肺上皮由来細胞への有機酸類ばく露実験	91
第4章 有機酸類ばく露システムの構築及びギ酸・酢酸測定の検討	92
第5章 有機酸類吸入ばく露動物試験	92
II 総括	93
参考文献	95
用語解説	99

第1章

調 査 概 要

第1章 調査概要

I 背景及び目的

東京都では、平成20年度から平成23年度にかけて、東京都大気汚染保健対策の一環として、ディーゼル車排出ガスに着目した基礎的実験的研究を実施した。この研究では、Diesel Particulate Filter (DPF)装着時の排出ガスと、非装着時の排出ガスを、健常ラット、ぜん息様病態モデルラットにばく露させ、ぜん息の発症、増悪に関する生体影響について比較を行った。また、培養ヒト肺上皮由来細胞にばく露させ、酸化ストレス能、組織障害等との関連性を調査した。

その結果、動物実験では、健常ラットの実験においてディーゼル排出ガスとぜん息発症との関連性を明確に結論づけることは出来なかった。また、ぜん息様病態モデルラットの実験において、IgE等の値の上昇はあるものの、気道の炎症等は認められず、ぜん息増悪との関連性を明確に結論づけることは出来なかった。培養ヒト肺上皮由来細胞へのばく露実験では、DPF装着・非装着に係わらずディーゼル排出ガスは細胞傷害作用を持ち、その傷害作用には酸化ストレスが関与すること、また、DPFを装着した場合には、細胞傷害作用が抑制される可能性が示唆された。しかし、ディーゼル排出ガスとぜん息との関連性を示唆する結果は得られなかった¹⁾。

その一方、本研究によって、DPFを装着したディーゼル排出ガスの成分ではDPFを装着しないディーゼル排出ガスに比べ、ケトン類・アルデヒド類・芳香族炭化水素などは減少したが有機酸類濃度が増加することが初めて明らかになった。有機酸類の中でもギ酸及び酢酸濃度の存在比が大きく¹⁾、ディーゼル排出ガス中のギ酸及び酢酸の濃度はDPFを装着していない場合に比べて、DPFを装着することで、それぞれ125 µg/m³から304 µg/m³及び200 µg/m³から345 µg/m³に増加していた²⁾。

酢酸は、食酢や腐敗した乳製品等に含まれる弱酸で、遊離酸・塩・エステルの形で植物界に広く分布する。ギ酸は、植物、昆虫の毒液や哺乳類の組織にまで幅広く存在する弱酸で、大気及び水環境中にも存在し、またメタノール毒性における代謝中間体でもある^{3,4)}。いずれの酸も、工業的あるいは研究目的とした需要が高く、人体への影響、環境への影響を理解することは重要である。アメリカ国立労働安全衛生研究所 (National Institute for Occupational Safety and Health: NIOSH: アメリカ疾病対策予防センター (Centers for Disease Control and Prevention) に属する政府機関) は、ギ酸及び酢酸の実験動物に対する吸入ばく露・経口投与による致死用量やヒトへの影響濃度について以下のような値を示している。すなわち、ギ酸の吸入ばく露による半数致死濃度

(LC50) は、マウスで 3,246 ppm/15 min、ラットで 7,853 ppm/15 min⁵⁾、酢酸の吸入ばく露による LC50 は、マウスで 5,620 ppm/1h、ラットで 16,000 ppm/4 h となっている⁶⁾。ヒトに対する吸入毒性については、同じく NIOSH によれば、ギ酸では約 15 ppm で吐き気を訴え⁵⁾、酢酸では 50 ppm 以上で激しい流涙や目、鼻、喉の炎症により、ほとんどの人が耐え難いとされている⁶⁾。

また、職業ばく露に関して、わが国では日本産業衛生学会による作業環境中の許容濃度として、ギ酸については 5 ppm (9.4 mg/m³)、酢酸については 10 ppm (25 mg/m³) が勧告されている⁷⁾。

このように、ギ酸及び酢酸については、すでに、動物実験による経口ばく露・吸入ばく露による致死容量や職業ばく露における作業許容濃度が提示されている。しかしながら、自動車排出ガスの影響が懸念される都内大気中における有機酸類の実態やその生成・変動に影響する要因等については不明であった。また、吸入ばく露による長期的な影響に関する動物実験はほとんど行われておらず、慢性毒性に関する情報は少ない⁸⁾。さらに、培養細胞への気相ばく露実験によってその影響を調査した報告は見当たらない。

そこで、これら有機酸類の都内大気における実態調査と、実験動物への中長期的な吸入ばく露ならびに培養細胞への気相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。

Ⅱ 調査実施概要

第2章 大気中有機酸類の成分分析（平成 26 年度）

都内大気中の有機酸類濃度を把握することを目的として、ガス状と粒子状に分別する有機酸類測定法を確立し、実態調査を 1 年間実施した。自動車排出測定局（甲州街道大原測定局）及び一般環境大気測定局（中野区若宮測定局）において大気採取を毎月行い、得られた有機酸類濃度と大気汚染物質との関連について解析を行った。

第3章 培養ヒト肺上皮由来細胞への有機酸類ばく露実験 （平成 24 年度、25 年度）

ガス状態の被検物質をばく露するために開発された培養細胞ばく露実験装置を用い、培養ヒト肺上皮由来細胞にギ酸または酢酸をガス状にしてばく露し、酸化ストレスの誘導や、免疫系などの生体への影響について調べた。またギ酸・酢酸混合ガスも同様に培養細胞へ気相ばく露し、複合的な影響について調べた。

第4章 有機酸類ばく露システムの構築及びギ酸・酢酸測定の見直し (平成24年度から27年度)

ギ酸及び酢酸による動物ばく露実験を実施するために、ラットを用いた有機酸類ばく露システムを構築し、ばく露の目標濃度維持に影響する要因を見直した。

第5章 有機酸類吸入ばく露動物試験（平成24年度から27年度）

健康ラットを用い、酢酸及びギ酸を単独、混合して28日間、6か月間の吸入ばく露試験を実施した。ばく露濃度は、ギ酸及び酢酸の作業環境許容濃度を「中濃度」として設定し、その1/10の濃度を「低濃度」、10倍の濃度を「高濃度」と設定した。ばく露後は、病理組織学、生化学、免疫学等の手法により、生体影響を総合的に評価した。

平成24年度から27年度 研究スケジュール

	24			25			26			27		
	4~6	7~9	10~12	1~3	4~6	7~9	10~12	1~3	4~6	7~9	10~12	1~3
動物実験	ガス成分分析											
	病理組織学的検討											
	生化学的検討 免疫学的検討											
細胞実験	ばく露											
	分析											
大気中有機酸類の成分分析												

(※)

この期間に動物の餌管理と体重測定、分析
試液調整、分析機器安定試験を行う。

・結果検証(H27)時に直近のデータとするため、26年度に測定
・毎月3日間、24時間連続測定を実施(連続72時間)
・期間は1年間

ギ酸及び酢酸を同時に実施

ギ酸+酢酸

ギ酸

酢酸

第2章

大気中有機酸類の成分分析

第2章 大気中有機酸類の成分分析

I 目的

有機酸類の都内大気中濃度を把握することを目的として、ガス状、粒子状に分別する有機酸類測定法を確立し、都内大気中の実態調査を1年間実施した。大気採取は、一般環境大気測定局（以下、「一般局」と略す）及び自動車排出ガス測定局（以下、「自排局」と略す）の各1か所で毎月行い、得られた有機酸類濃度と大気汚染物質との関連について解析を行った。

II 方法

1 大気中ギ酸及び酢酸の測定方法の検討

大気中の有機酸類測定法を確立するにあたり、ギ酸及び酢酸をガス状及び粒子状に分けて数値が得られること、また、空気採取時間を24時間とし、1日の平均値が得られることを目指した。大気捕集機材としては、ガス状有機酸類捕集にミニチュア拡散スクラバー（MDS-1、ガステック）を用い、粒子状有機酸類は、この拡散スクラバーの下流側にミゼットインピンジャー（G-1型、柴田科学）を接続し、液体で捕集することとした。

機材の概要を図1Aに、ミニチュア拡散スクラバーの概要を図2に示す。ミニチュア拡散スクラバーは、ホルムアルデヒド測定用として市販されているもので、透明なプラスチックチューブの内側に多孔質テフロン（PTFE）チューブを入れた2重管構造になっている。内側のPTFEチューブ内に吸収液を入れ、内管と外管の間に空気を通して、空気中のホルムアルデヒドをPTFEチューブ内の吸収液に捕集する仕組みになっている。ミニチュア拡散スクラバーを用いた有機酸類測定については、短時間でガス状ギ酸を捕集した報告があるが¹⁾、24時間での捕集や、酢酸の捕集については、報告がほとんど無い。

そこで、ミニチュア拡散スクラバーを用いてガス状ギ酸及び酢酸を24時間捕集可能な条件について検討を行った。検討に際しては、ディフュージョンチューブ（ガステック）を用いてギ酸及び酢酸ガスをチャンバー内で定常的に発生させ、このガスを、直列に2本連結したミニチュア拡散スクラバーに通し、下流側にインピンジャーを接続して捕集した。

2 大気中有機酸類調査方法

調査期間は、平成26年4月から平成27年3月であり、大気採取地点は、一般局が中野区若宮測定局（以下、「若宮」と略す）、自排局が甲州街道大原測定局（以下、「大原」と略す）であった。

大気採取は、毎月24時間を3回連続で行った。大気捕集は、ミニチュア拡散スクラバー2本及びミゼットインピンジャー1本を直列に接続して用い、ミニポンプ（MP

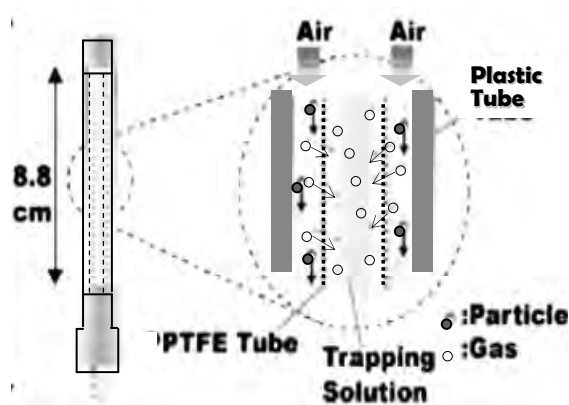


図2 ミニチュア拡散スクラバーの概要 (GASTEC 2015 製品カタログより)

表1 イオンクロマトグラフの分析条件

装置	Dionex™ ICS-1000
カラム	IonPac™ AG11-HC 及び AS11-HC
移動相	KOH 2.5 mM (8 min)-4 min-40 mM (8 min)
カラム温度	35°C
流速	1.0 mL/min
検出器	電気伝導度 (サプレッサーAERS 500 使用)
注入量	100 µL

III 結果

1 大気中ギ酸及び酢酸の測定方法

ギ酸及び酢酸の混合標準ガスを調製し、流速 50 mL/min 及び 100 mL/min で 24 時間の捕集を行った (各 n=1)。標準ガスの濃度は、ギ酸 510 µg/m³、酢酸 470 µg/m³ であった。表 2 は、各捕集管に捕集された有機酸類の合計量を 100% とし、ミニチュア拡散スクラバー及びインピンジャーに捕集された有機酸類量を割合 (%) で表したものである。2 本の拡散スクラバーに捕集された有機酸類の合計は、流速 50 mL/min では、ギ酸 99.7%、酢酸 100%、流速 100 mL/min では、ギ酸 99.8%、酢酸 99.2% であり、いずれの流速においても、インピンジャーに捕集された有機酸類割合は 0.8% 以下と少なかった。

したがって、流速 100 mL/min までは、2 本の拡散スクラバーで 24 時間の有機酸類ガス捕集が可能なが分かった。また、1 本目と 2 本目の拡散スクラバーに捕集された有機酸類の割合を比べると、100 mL/min の流速では、50 mL/min に比べて、2 本目の拡散スクラバーに捕集された有機酸類の割合が高く、酢酸では 50% 以上が

表2 ミニチュア拡散スクラバー及びインピンジャーによる有機酸類捕集割合 (%)

空気採取流速	捕集管	ギ酸	酢酸
50 mL/min	スクラバー 上段	96.1	84.2
	スクラバー 下段	3.6	15.8
	インピンジャー	0.2	0
100 mL/min	スクラバー 上段	63.9	42.1
	スクラバー 下段	35.9	57.1
	インピンジャー	0.2	0.8

2 本目の拡散スクラバーに捕集されていた。この原因としては、拡散スクラバーへの通気に伴って、水分の揮発により吸収液量が徐々に減少し、有機酸類の吸収率が低下したことが原因と考えられる。

また、空気採取流速が早いほど、吸収液量の減少が大きいことが予測された。実際に空気を 24 時間採取した後の吸収液の液量を計測したところ、流速 50 mL/min では、1 本目 0.5 mL、2 本目 0.8 mL であったのに対し、流速 100 mL/min では、1 本目 0.2 mL、2 本目 0.5 mL と、1 本目の液量はわずかしか残っていなかった。吸収液は水酸化ナトリウム溶液であるため、液量が減少しても、捕集した有機酸類が再揮発することは無いが、液体がすべて蒸発した場合は、析出した有機酸塩が分解する可能性も考えられた。今回の実験は室温 (24°C) で行ったが、夏季の測定では高温のために、より多くの液量減少が予想されたことから、空気採取は、50 mL/min で行うこととした。

次に、流速 50 mL/min での有機酸類捕集効率のばらつきをみるために、n=3 で実験を行った。その結果、1 本目の捕集効率はギ酸 96.7±0.75%、酢酸 85.4±1.4%、2 本目はギ酸 3.1±0.91%、酢酸 14.2±1.4%と求められ、2 本の拡散スクラバーを連結して用いることにより、24 時間のガス状有機酸類捕集が効率良くできることが分かった。

2 都内大気中ギ酸及び酢酸の測定結果

各月の大気採取期間を表3に示す。いずれの採取日も午前10時から11時の間に採取を開始し、約24時間後に終了する操作を3回連続で繰り返した。なお、若宮では、ポンプの不具合により9月9日から10日の測定は欠測であった。

大原及び若宮において得られたギ酸及び酢酸の測定結果を図3に示す。図の上段はギ酸、下段は酢酸の濃度推移であり、数値はガス状及び粒子状の合計値を、日付は測定を開始した日を示している。

各測定局における濃度最大値は、大原がギ酸 23.8 µg/m³ (8月7日)、酢酸 30.2 µg/m³ (7月15日)、若宮がギ酸 23.1 µg/m³ (5月29日)、酢酸 29.5 µg/m³ (5月29日)であった。

表3 各月の大気採取期間

採取月	開始日(曜日)	終了日(曜日)	採取月	開始日(曜日)	終了日(曜日)
4月	15日(火)	18日(金)	10月	21日(火)	24日(金)
5月	27日(火)	30日(金)	11月	25日(火)	28日(金)
6月	17日(火)	20日(金)	12月	16日(火)	19日(金)
7月	15日(火)	18日(金)	1月	19日(月)	22日(木)
8月	5日(火)	8日(金)	2月	17日(火)	20日(金)
9月	9日(火)	12日(金)	3月	10日(火)	13日(金)

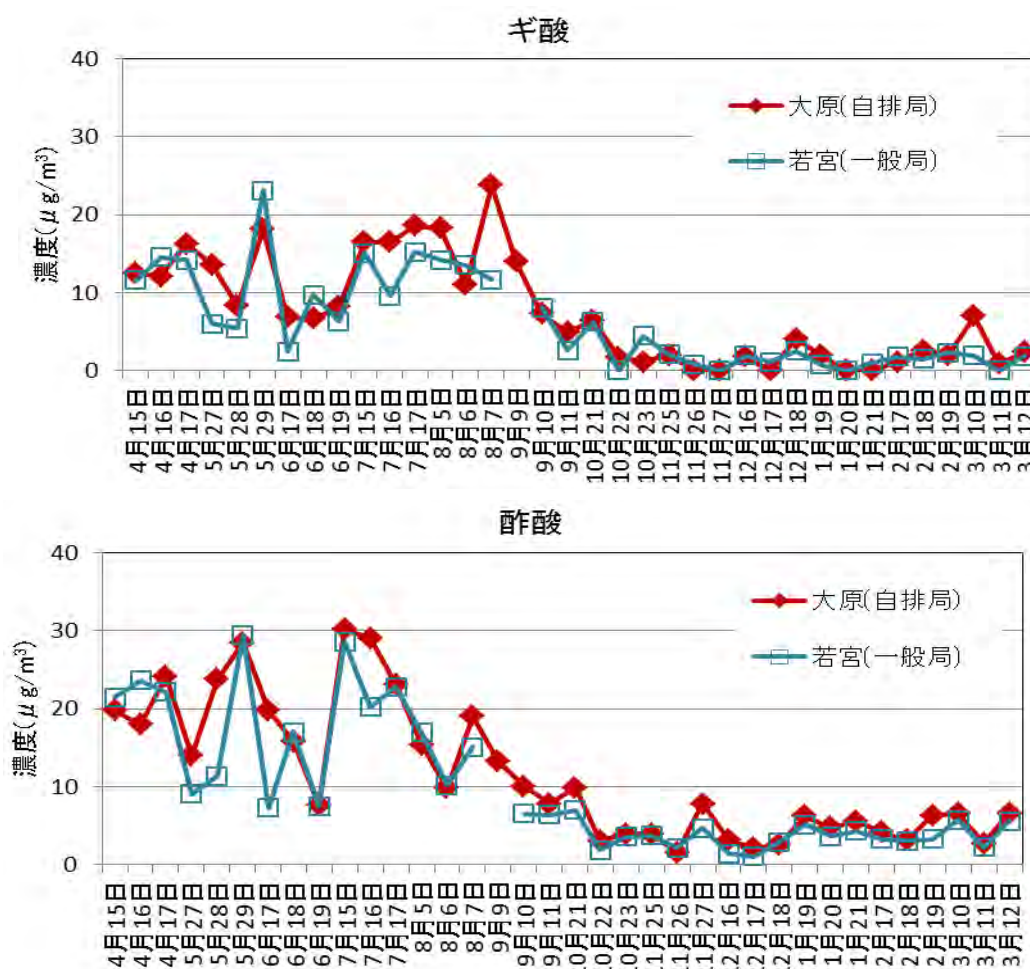


図3 東京都内の大気中ギ酸及び酢酸の測定結果

日)であった。大原、若宮ともに、ギ酸濃度よりも酢酸濃度の方が高い傾向が見られ、季節的には春季及び夏季(4月から8月及び3月)に濃度が高く、秋季及び冬季(9月から2月)に低くなる季節変動が見られた。各測定局における有機酸類濃度について単相関分析を行うと、ギ酸と酢酸の相関係数は、大原 $r=0.857$ ($p<0.01$)、若宮 $r=0.923$ ($r<0.01$) であり、ギ酸濃度と酢酸濃度の間に有意な相関が見られた。

また、ギ酸及び酢酸に分けて、2 測定局の測定値について単相関分析を行うと、ギ酸 $r=0.875$ ($p<0.01$)、酢酸 $r=0.916$ ($p<0.01$) であり、大原と若宮の測定値には有意な相関が見られた。

図 4 に 1 年間の測定値を平均し、測定局別に比較した結果を示す。なお、棒グラフ上の数値は平均値を表す。

大原と若宮を比較すると、ギ酸（ガス状及び粒子状の合計）の平均値は、大原 $7.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、若宮 $6.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ で、大原の方が 1.2 倍濃度が高く、有意差が見られた ($p<0.05$)。

酢酸（ガス状及び粒子状の合計）の平均値は、大原 $11.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、若宮 $9.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、大原の方が 1.2 倍高濃度で、有意差が見られた ($p<0.01$)。

次に、有機酸類をガス状及び粒子状に分けて、平均値を比較すると、ガス状の方が粒子状よりも高く、ガス状有機酸類は、ギ酸及び酢酸ともに大原の方が高濃度で、酢酸では有意差が見られた ($p<0.01$)。

一方、粒子状については、ギ酸及び酢酸ともに測定地点による濃度差は、ほとんど見られなかった。

図 5 に、ギ酸及び酢酸のガス状割合の月別推移を示す。ガス状割合は、ガス状濃度をガス状及び粒子状の合計濃度で除して求めた。ギ酸では、大原及び若宮ともに 4 月から 9 月はガス状割合が 75% 以上であったが、冬季に向かってガス状割合が低下し、1 月には両測定局ともにガス状割合が 0% まで低下した。その後、ガス状割合

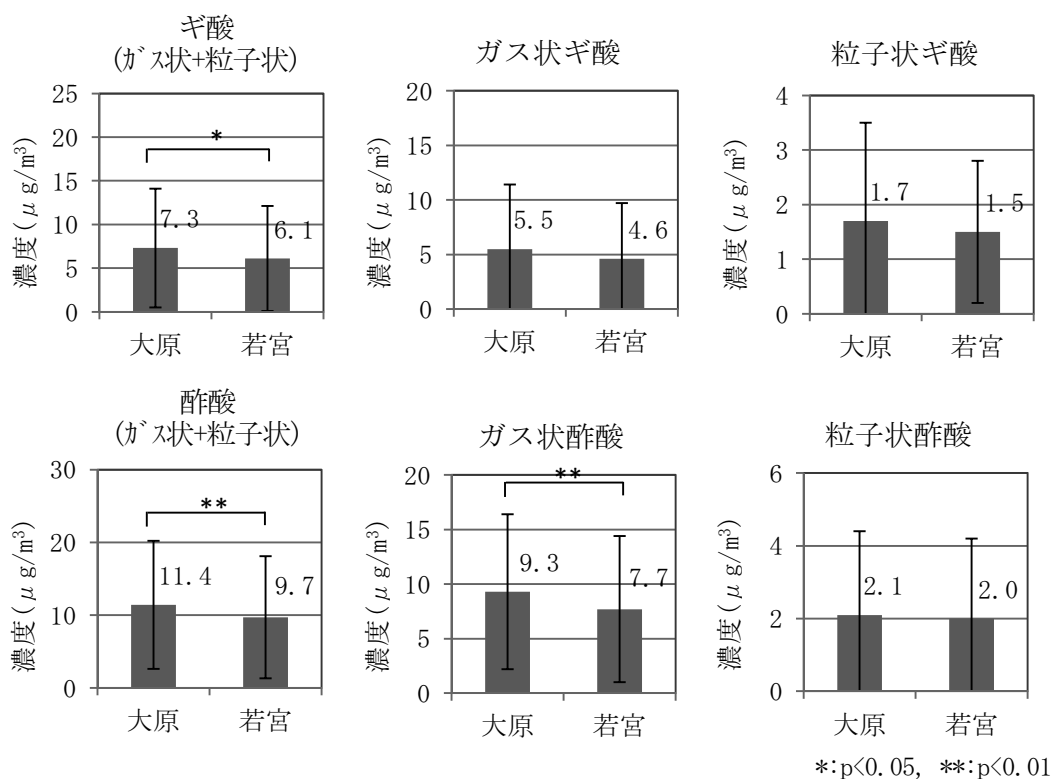


図 4 東京都内の大気中有機酸類濃度の測定地点別比較
棒グラフ上の数値は平均値を表す。

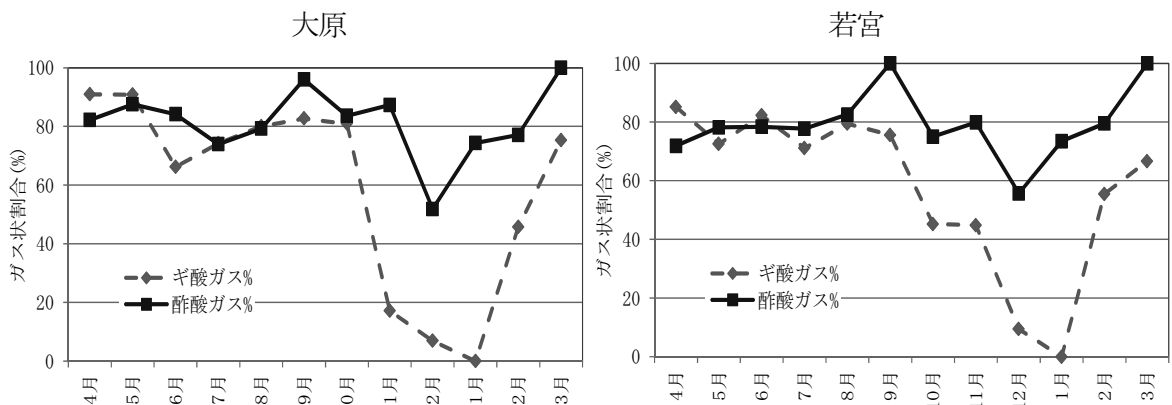


図5 東京都内の大気中ギ酸及び酢酸のガス状割合の月別推移

ガス状割合は、ガス状有機酸類濃度をガス状及び粒子状有機酸類の合計値で除して算出した割合

は再び増加し3月には67%から75%となった。酢酸については、4月から11月の間、ガス状割合が75%以上を占めていたが、12月にはガス状割合が50%台に低下し、その後再び増加して、3月には両測定局ともに、ガス状割合が100%となった。

測定局別にガス状割合の平均値を比較すると、ギ酸では、大原 59.2%、若宮 56.8%、酢酸では、大原 81.5%、若宮 78.8%であり、ギ酸及び酢酸ともに、大原の方がガス状割合が高かったが、有意差は見られなかった。ギ酸と酢酸の比較では、ギ酸の方が、ガス状割合が低かった。

図6に、各測定地点の気温、湿度及び窒素酸化物 (NOx)、二酸化窒素 (NO₂)、

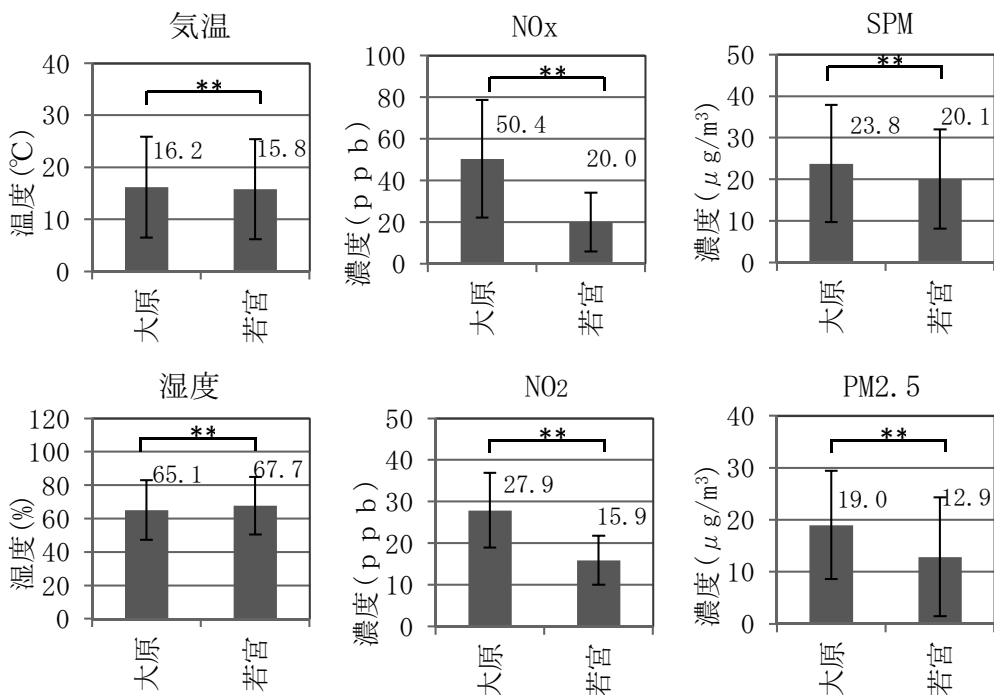


図6 東京都内の気温、湿度及び大気汚染物質の測定地点別比較
棒グラフ上の数値は平均値を表す。

粒子状物質（SPM）及びPM2.5の年間平均値を示す。なお、棒グラフ上の数値は平均値を表す。気温、NO_x、NO₂、SPM及びPM2.5については、いずれも大原の方が有意に高く(p<0.01)、湿度については若宮の方が有意に高かった(p<0.01)。

3 ギ酸及び酢酸と大気汚染物質等との関連

(1) 季節によるデータの区分

各測定局における大気採取時のNO_x濃度推移を図7に示す。図のNO_x濃度は、各測定局の1時間値より、大気採取開始時刻から終了時刻までの24時間平均値を算出して用いた。

図からも分かるように、秋季及び冬季は、春季及び夏季に比べてNO_x濃度が高まる傾向が見られ、これは上空に形成された逆転層により、大気汚染物質の拡散が妨げられたためと考えられる。有機酸類と大気汚染物質との解析を行うにあたっては、季節によって自動車排出ガスの拡散状況が異なる事を考慮し、1年間の測定データを用いた解析以外に、春季及び夏季と秋季及び冬季に2分した解析を行うこととした。なお、季節による2分割には、大原のNO_x濃度を判定基準として使い、50 ppb（大原の大気調査日平均値）を超える日が初めて2日間続いた9月10日から、50 ppbを下回る日が初めて2日間続いた2月19日までを秋季及び冬季、50 ppbを超える日が連続しなかった4月15日から9月9日及び3月10日から3月12日までを春季及び夏季とした。

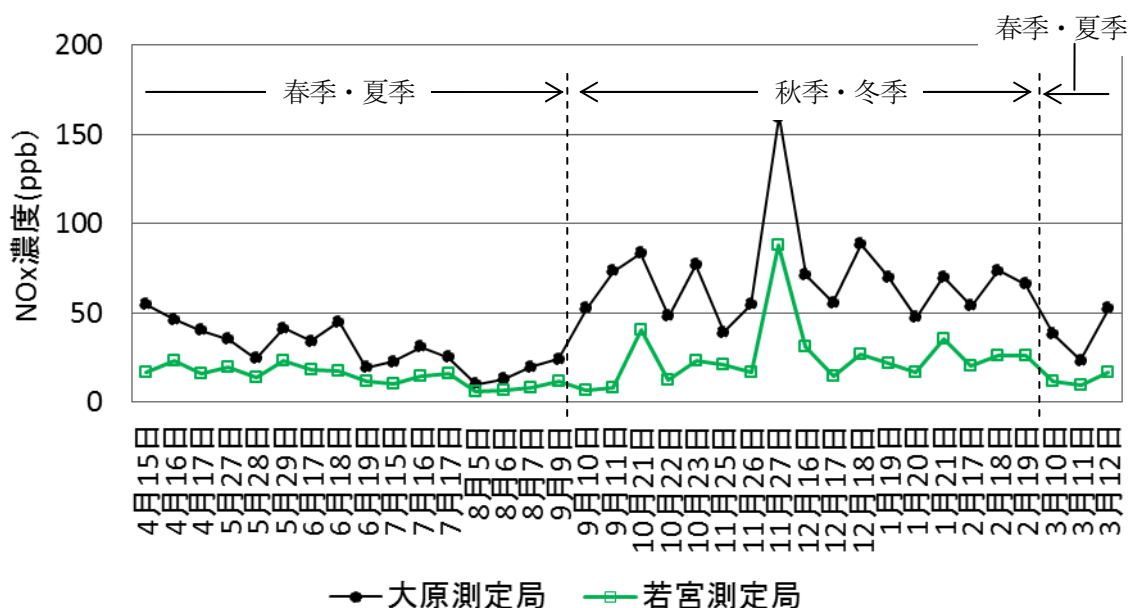


図7 東京都内の大気中窒素酸化物（NO_x）濃度推移

(2) 単相関分析

各測定局で計測した温湿度、大気汚染物質濃度 (NO_2 、 NO_x 、 $\text{PM}_{2.5}$ 等)、風向、風速とギ酸及び酢酸濃度について単相関分析を行った。大原の結果を表 4 に、若宮の結果を表 5 に示す。なお、大原では、風速、風向を測定していなかったため、近傍の自排局である環八通り八幡山測定局の風速、風向データを解析に用いた。

風向については、16 方位を 4 方位ずつに分けて数値化し、東 (ESE、E、ENE、NE) を 1、北 (NNE、N、NNW、NW) を 2、西 (WNW、W、WSW、SW) を 3、南 (SSW、S、SSE、SE) を 4 として解析に用いた。

日射量については、気象庁の地上観測地点東京 (北緯 35 度 41.5 分、東経 139 度 45.0 分、千代田区大手町) のデータを用いた。また、有機酸類濃度については、ガス状、粒子状合計濃度、ガス状濃度及び粒子状濃度のそれぞれを用いて解析を行った。

大原で、ガス状、粒子状合計濃度について、解析した結果では (表 4 上段)、ギ酸及び酢酸濃度と気温との間には、いずれも有意な正の相関が見られ ($r=0.542\sim 0.798$)、年間を通して、気温の上昇とともに有機酸類濃度が上昇する傾向が見られた。

湿度については、春季及び夏季にのみ、ギ酸及び酢酸濃度との間に有意な正の相関が見られた ($r=0.555\sim 0.628$)。

NO_2 及び NO_x については、年間ではギ酸及び酢酸濃度との間に有意な負の相関が見られたが ($r= -0.428\sim -0.573$)、季節別に 2 分すると、春季及び夏季では有意な相関は無く、秋季及び冬季で、酢酸と NO_2 との間に有意な正の相関が見られた ($r=0.501$)。

SPM 及び $\text{PM}_{2.5}$ については、年間ではギ酸及び酢酸との間に有意な正の相関が見られ ($r=0.390\sim 0.742$)、季節別では、春季及び夏季、秋季及び冬季ともに酢酸とのみ有意な正の相関が見られた ($r=0.659\sim 0.792$)。

大原では、自動車排出ガスの影響をみるため、一酸化炭素 (CO) 濃度を測定していることから、CO と有機酸類濃度についての解析を行ったところ、秋季及び冬季にのみ、酢酸と CO との間に有意な正の相関が見られ ($r=0.602$)、 NO_2 と酢酸との相関を考え合わせると、秋季及び冬季には、自動車排出ガスの酢酸への寄与が推察された。

風速については、年間及び秋季及び冬季に、酢酸との間に有意な負の相関が見られた ($r= -0.437\sim -0.753$)。風向については、年間でギ酸との間に有意な正の相関が見られ ($r=0.525$)、南風が多いほどギ酸濃度が高くなる傾向が示唆された。

日射量については、年間でギ酸及び酢酸との間に有意な正の相関が見られた ($r=0.668\sim 0.688$)。

次にガス状有機酸類と大気汚染物質との解析結果では (表 4 中段)、ガス状、粒子状合計と同様の傾向が見られ、年間では気温、SPM、 $\text{PM}_{2.5}$ 、風向及び日射

表4 大原における有機酸類濃度と大気汚染物質等との関連（単相関係数）

ガス状、粒子状合計

有機酸	気温	湿度	NO ₂	NO _x	SPM	PM2.5	CO	風速 ¹⁾	風向 ¹⁾	日射量 ²⁾
年間(n=36)										
ギ酸	0.798**	-0.049	-0.539**	-0.573**	0.424**	0.390*	-0.287	-0.304	0.525**	0.688**
酢酸	0.750**	-0.056	-0.292	-0.428**	0.742**	0.714**	-0.047	-0.437**	0.400*	0.668**
春季及び夏季(n=19)										
ギ酸	0.637**	0.628**	-0.290	-0.279	0.180	0.160	-0.155	-0.022	0.015	0.223
酢酸	0.542*	0.555*	0.159	0.073	0.731**	0.699**	0.346	-0.266	-0.168	0.186
秋季及び冬季(n=17)										
ギ酸	0.671**	0.154	0.127	-0.041	0.416	0.147	0.159	-0.448	0.022	0.087
酢酸	0.690**	0.122	0.501*	0.324	0.792**	0.659**	0.602*	-0.753**	-0.348	0.265

ガス状のみ

有機酸	気温	湿度	NO ₂	NO _x	SPM	PM2.5	CO	風速 ¹⁾	風向 ¹⁾	日射量 ²⁾
年間(n=36)										
ギ酸	0.788**	-0.041	-0.479**	-0.549**	0.445**	0.422*	-0.256	-0.358*	0.508**	0.701**
酢酸	0.751**	-0.091	-0.257	-0.409*	0.755**	0.716**	-0.013	-0.478**	0.371*	0.687**
春季及び夏季(n=19)										
ギ酸	0.590**	0.583**	-0.142	-0.140	0.244	0.245	-0.017	-0.151	0.044	0.277
酢酸	0.487*	0.496*	0.236	0.136	0.779**	0.732**	0.405	-0.295	-0.222	0.166
秋季及び冬季(n=17)										
ギ酸	0.829**	0.252	0.069	-0.135	0.357	0.078	0.090	-0.519	-0.244	0.174
酢酸	0.755**	0.109	0.530*	0.375	0.662**	0.510*	0.630**	-0.791**	-0.507*	0.382

粒子状のみ

有機酸	気温	湿度	NO ₂	NO _x	SPM	PM2.5	CO	風速 ¹⁾	風向 ¹⁾	日射量 ²⁾
年間(n=36)										
ギ酸	0.474**	-0.054	-0.502**	-0.398*	0.163	0.104	-0.266	0.012	0.346*	0.340*
酢酸	0.522**	0.067	-0.310	-0.360*	0.478**	0.495**	-0.138	-0.178	0.365*	0.407*
春季及び夏季(n=19)										
ギ酸	0.368	0.357	-0.526*	-0.500*	-0.117	-0.186	-0.449	0.358	-0.077	-0.071
酢酸	0.482*	0.501*	-0.069	-0.094	0.374	0.387	0.096	-0.111	0.013	0.169
秋季及び冬季(n=17)										
ギ酸	0.048	-0.082	0.142	0.124	0.266	0.167	0.173	-0.083	0.410	-0.094
酢酸	-0.197	0.044	-0.084	-0.161	0.438	0.498*	-0.079	0.109	0.511*	-0.375

*:p<0.05, **:p<0.01

1) 環八通り八幡山測定局データ、2) 気象庁地上観測地点東京(千代田区)データ

量とギ酸、酢酸濃度との間に有意な正の相関が見られ ($r=0.371\sim0.788$)、秋季及び冬季には、ガス状酢酸と NO_2 ($r=0.530$)、 CO ($r=0.630$) との間に有意な正の相関が見られた。粒子状では (表 4 下段)、年間及び春季及び夏季には、ガス状、粒子状合計と同様の傾向が見られたが、秋季及び冬季では、有意な相関が見られる項目が少なく、酢酸と $\text{PM}_{2.5}$ ($r=0.498$) 及び風向 ($r=0.511$) のみで、有意な正の相関が見られた。

若宮で、ガス状、粒子状合計濃度について、解析した結果では (表 5 上段)、ギ酸及び酢酸濃度と気温との間には有意な正の相関が見られ ($r=0.684\sim0.735$)、年間を通して、気温の上昇とともに有機酸類濃度が上昇する傾向が見られた。 NO_2 及び NO_x については年間、春季及び夏季、秋季及び冬季のいずれにおいても、有機酸類濃度との有意な相関は見られず、 SPM 及び $\text{PM}_{2.5}$ については、春季及び夏季のギ酸と SPM を除き、年間、春季及び夏季、秋季及び冬季ともに、ギ酸及び酢酸との間に有意な正の相関が見られた ($r=0.486\sim0.769$)。

若宮では、 CO は測定していないが、オキシダント(Ox)を測定していることから、 Ox と有機酸類濃度についての解析を行ったところ、年間でのみ、ギ酸及び酢酸と有意な正の相関が見られた ($r=0.493\sim0.676$)。風速については、秋季及び冬季の酢酸との間にのみ有意な負の相関が見られた ($r=-0.636$)。風向については年間でギ酸及び酢酸との間に有意な正の相関が見られ ($r=0.421\sim0.514$)、南風が多いほど、ギ酸濃度が高くなる傾向が示唆された。日射量については、年間でギ酸及び酢酸との間に有意な正の相関が見られた ($r=0.669\sim0.671$)。

次にガス状有機酸類と大気汚染物質との解析結果では (表 5 中段)、ガス状、粒子状合計と同様の傾向が見られ、年間では気温、 SPM 、 $\text{PM}_{2.5}$ 、 Ox 、風向及び日射量とギ酸及び酢酸濃度との間に有意な正の相関が見られた ($r=0.429\sim0.759$)。粒子状では (表 5 下段)、年間では、ガス状、粒子状合計と同様の傾向が見られたが、春季及び夏季には湿度とギ酸との間に有意な正の相関が見られ ($r=0.679$)、秋季及び冬季には NO_2 と酢酸との間に有意な正の相関が見られた ($r=0.584$)。

(3) 偏相関分析

単相関分析に用いた因子のうち、温湿度及び大気汚染物質濃度については、相互に相関を有するものがあると考えられた。そこで、これらのうち、有機酸類濃度の変動に最も関連のある因子を見いだすことを目的として、ギ酸または酢酸の濃度 (ガス状、粒子状合計) を目的変数、気温、湿度、 NO_x 、 SPM 及び日射量を説明変数として偏相関分析を行った。

大原の結果を表 6、若宮の結果を表 7 に示す。大原で有意な正の相関が見られたのは、年間ではギ酸と気温 ($r=0.368$) 及び酢酸と SPM ($r=0.683$)、春季及び夏季では酢酸と SPM ($r=0.611$)、秋季及び冬季では酢酸と SPM ($r=0.876$) 及び酢酸と日射量 ($r=0.713$) であった。また、有意な相関は見られなかったが、秋季及び

表5 若宮における有機酸類濃度と大気汚染物質等との関連（単相関係数）

ガス状、粒子状合計

有機酸	気温	湿度	NO ₂	NO _x	SPM	PM2.5	Ox	風速	風向	日射量 ¹⁾
年間(n=35)										
ギ酸	0.735**	-0.038	-0.201	-0.268	0.571**	0.714**	0.493**	-0.052	0.514**	0.669**
酢酸	0.684**	-0.102	-0.118	-0.204	0.654**	0.769**	0.676**	-0.152	0.421*	0.671**
春季及び夏季(n=18)										
ギ酸	0.550*	0.429	0.193	0.176	0.360	0.577*	0.067	-0.031	0.059	0.415
酢酸	0.423	0.394	0.351	0.327	0.513*	0.701**	0.382	-0.254	-0.182	0.269
秋季及び冬季(n=17)										
ギ酸	0.631**	0.263	-0.266	-0.198	0.519*	0.612**	-0.111	-0.413	0.243	0.062
酢酸	0.685**	0.243	-0.074	0.125	0.749**	0.486*	0.074	-0.636**	-0.218	0.095

ガス状のみ

有機酸	気温	湿度	NO ₂	NO _x	SPM	PM2.5	Ox	風速 ¹⁾	風向 ¹⁾	日射量 ¹⁾
年間(n=35)										
ギ酸	0.713**	-0.089	-0.219	-0.282	0.535**	0.700**	0.525**	-0.052	0.515**	0.696**
酢酸	0.695**	-0.118	-0.152	-0.220	0.622**	0.759**	0.641**	-0.162	0.429*	0.686**
春季及び夏季(n=18)										
ギ酸	0.475*	0.320	0.212	0.198	0.337	0.579*	0.084	-0.028	0.075	0.450
酢酸	0.417	0.341	0.334	0.323	0.458	0.688**	0.293	-0.229	-0.149	0.323
秋季及び冬季(n=17)										
ギ酸	0.685**	0.285	-0.387	-0.261	0.306	0.425	0.050	-0.452	0.029	0.124
酢酸	0.755**	0.200	-0.274	-0.154	0.566*	0.397	0.191	-0.662**	-0.183	0.187

粒子状のみ

有機酸	気温	湿度	NO ₂	NO _x	SPM	PM2.5	Ox	風速	風向	日射量 ¹⁾
年間(n=35)										
ギ酸	0.564**	0.168	-0.062	-0.121	0.508**	0.520**	0.200	-0.034	0.331	0.334*
酢酸	0.495**	-0.030	0.014	-0.108	0.603**	0.626**	0.628**	-0.089	0.301	0.470**
春季及び夏季(n=18)										
ギ酸	0.640**	0.679**	0.060	0.038	0.320	0.377	-0.015	-0.033	-0.021	0.152
酢酸	0.306	0.409	0.285	0.236	0.495*	0.511*	0.500*	-0.239	-0.215	0.040
秋季及び冬季(n=17)										
ギ酸	0.155	0.067	0.101	0.030	0.565*	0.559*	-0.318	-0.096	0.458	-0.081
酢酸	-0.271	0.101	0.584*	0.394	0.452	0.208	-0.346	0.140	-0.075	-0.277

*:p<0.05, **:p<0.01

1) 気象庁地上観測地点東京(千代田区)データ

表6 大原における有機酸類濃度と大気汚染物質等との関連（偏相関係数）

ガス状、粒子状合計

有機酸	気温	湿度	NO _x	SPM	日射量 ¹⁾
			年間(n=36)		
ギ酸	0.368*	0.072	-0.243	0.102	0.213
酢酸	0.224	0.092	-0.131	0.683**	0.297
			春季及び夏季(n=19)		
ギ酸	0.198	0.204	0.126	-0.091	0.031
酢酸	0.290	0.099	0.307	0.611*	-0.081
			秋季及び冬季(n=17)		
ギ酸	0.527	-0.011	-0.257	0.233	0.116
酢酸	0.417	0.434	-0.081	0.876**	0.713**

*:p<0.05, **:p<0.01

1) 気象庁地上観測地点東京(千代田区)データ

表7 若宮における有機酸類濃度と大気汚染物質等との関連（偏相関係数）

ガス状、粒子状合計

有機酸	気温	湿度	NO _x	SPM	日射量 ¹⁾
			年間(n=35)		
ギ酸	0.174	0.093	-0.108	0.278	0.252
酢酸	0.127	-0.002	-0.062	0.458**	0.222
			春季及び夏季(n=18)		
ギ酸	0.238	-0.045	0.346	-0.063	0.135
酢酸	0.254	-0.147	0.274	0.183	-0.010
			秋季及び冬季(n=17)		
ギ酸	0.245	0.188	-0.453	0.525	0.310
酢酸	0.477	-0.054	-0.088	0.704**	0.214

*:p<0.05, **:p<0.01

1) 気象庁地上観測地点東京(千代田区)データ

冬季ではギ酸と気温の偏相関係数が0.5以上であった ($r=0.527$ 、 $p=0.064$)。

一方、若宮で有意な正の相関が見られたのは、年間で酢酸とSPM ($r=0.458$)、秋季及び冬季でも酢酸とSPM ($r=0.704$) であった。また、有意な相関は見られなかったが、秋季及び冬季ではギ酸とSPMの偏相関係数が0.5以上であった ($r=0.525$ 、 $p=0.065$)。

以上より、大原では、ギ酸と気温、酢酸と SPM との関連が大きいと推察された。また若宮では、ギ酸については、秋季及び冬季のみに SPM との関連が推察され、酢酸については SPM との関連が大きいことが推察された。

IV 考 察

大気中有機酸類濃度と大気汚染物質について単相関分析を行った結果、大原では、秋季及び冬季には、酢酸濃度と NO₂ 及び CO 濃度との間に有意な正の相関が見られ、道路沿道で検出された酢酸の発生源として、自動車排出ガスの寄与が示唆された。都内一般道及び首都高速道路の交通量の調査結果から考えると（図 8）、自動車排出ガスは、年間を通して排出されており、春季及び夏季においても、酢酸への排出ガスの寄与が考えられた。しかし、単相関分析の結果では春季及び夏季には、酢酸と NO₂ 及び CO の間に有意な相関は見られなかった。

その原因としては、春季及び夏季は秋季及び冬季よりも逆転層が形成されにくく、自動車排出ガスの拡散抑制が起こりにくいこと、また、酢酸は大気中で VOC の光化学反応によっても生成されることから²⁾、気温が高く日射量の多い春季及び夏季では、光化学反応による酢酸生成の寄与が大きくなり、自動車排出ガスの寄与が相対的に小さくなることが推察される。

また、大原と若宮において、年間のギ酸及び酢酸の濃度平均値は、いずれも、大原の方が 1.2 倍高濃度で有意差が見られた。しかし、今回の調査は、一般局及び自排局、それぞれ 1 か所を対象としたものであり、都内全体の一般局及び自排局を比較した場合に、同様の傾向が見られるかどうかについては、言及できないと考える。

今回の調査で得られた大気中ギ酸及び酢酸濃度と、SPM 及び PM_{2.5} 濃度との間には、有意な正の相関が見られた。この理由としては、有機酸類及び PM_{2.5} の両方が、各種燃焼ガスに含まれること^{3,4)}、また、光化学反応による、揮発性有機化合物（VOC）等

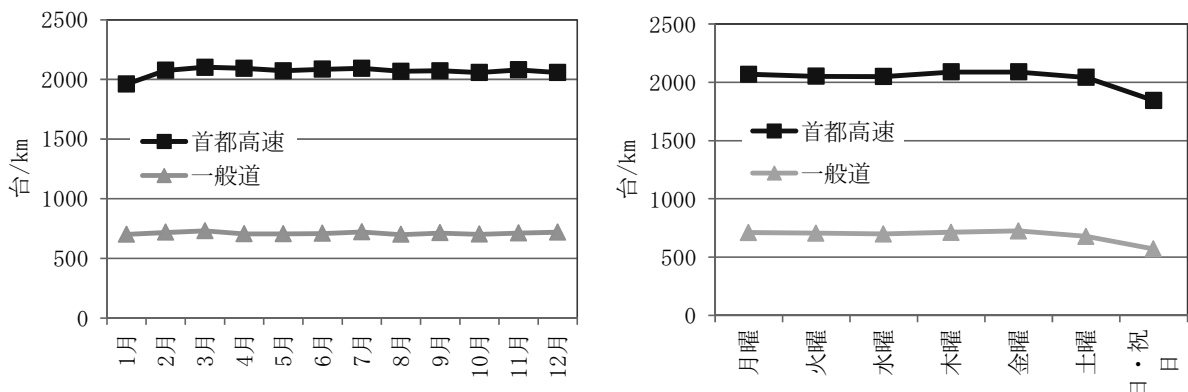


図 8 都内一般道及び首都高速道路における交通量の月別、曜日別推移

(平成 25 年 警視庁調査)

台/km : 7 時～19 時の間に走行した自動車台数を km あたりで表した数字

からの生成機構があることなど^{2,3)}、いくつかの共通した発生源を有することが要因の一つと推察される。また、有機酸類は大気中でアンモニア等と反応し、容易に粒子化することから、有機酸類がPM2.5の生成に密接に関与している可能性が考えられる。

ギ酸及び酢酸は水溶性の酸であるため、雨の日には大気中濃度が低下すると考えられるが、大原では春季及び夏季にのみ、有機酸類濃度と湿度との間に、有意な正の相関が見られた。図9に、大原において測定したギ酸及び酢酸の濃度と湿度との関連を示す。図中でグレーのマーカ―は春季及び夏季、色の無いマーカ―は秋季及び冬季のデータを示す。春季及び夏季の測定日の天候は、降雨のあった日が1日、その他18日間は晴れあるいは曇りで、湿度は30%から76%の範囲であった。この時期には、気温の上昇に伴って湿度も上昇する傾向があり、有機酸類は気温と有意な正の相関を有することから、単相関分析では、見かけ上、湿度とも有意な相関があるという結果が得られたと考えられる。なお、偏相関分析においては、湿度と有機酸類の濃度について、有意な相関は見られていない。一方、秋季及び冬季の天候は、降雨のあった日が12日間、晴れあるいは曇りが5日間であり、湿度は45%以下と65%以上に分かれていた。秋季及び冬季は気温が低く、大気中VOCからの有機酸類の生成は少ないと考えられることから、秋季及び冬季の、湿度65%以上の日に得られた有機酸類の濃度が、降雨により低下していたかどうかについては、明らかではなかった。

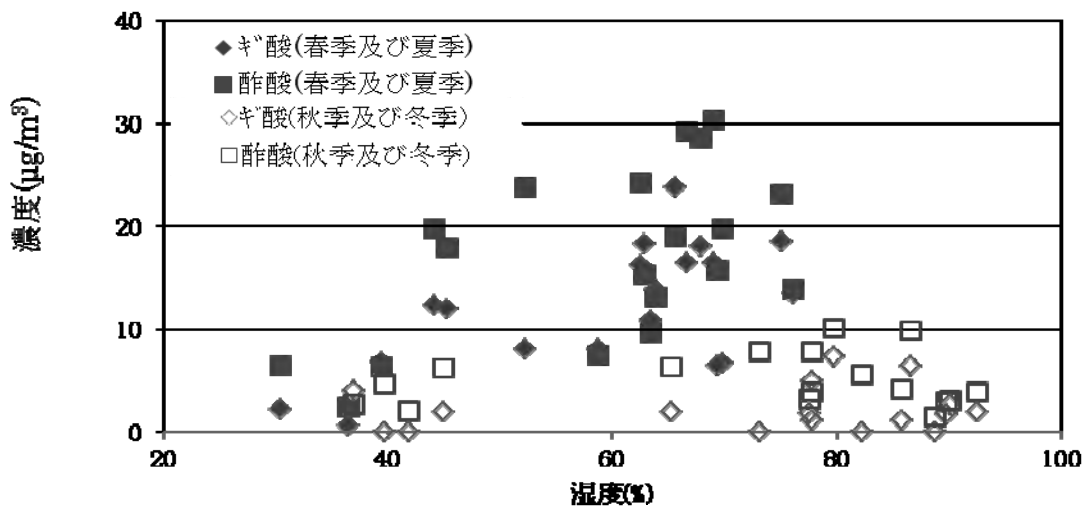


図9 大原における有機酸類濃度と湿度との関連

有機酸類をガス状と粒子状とに分けて測定し、その割合を解析した結果、ガス状有機酸類の割合は冬季に減少する傾向が見られた。この理由としては、ギ酸の融点が8.4℃、酢酸の融点が16.0℃であるため、冬季の低温が、ギ酸及び酢酸の融点を下回り、粒子化が促進されることが一因と考えられる。

また、ギ酸と酢酸とを比較するとギ酸の方がガス状割合が低かった。大気中のガス

状有機酸類が粒子化する原因としては、低温による固体化以外に、主にアンモニアなどの塩基性ガスとの反応が考えられる。そこで、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムの物理化学的性状をみると、酢酸アンモニウムは潮解性を有し、空気中の水分を吸収して加水分解しガス化するため、蒸気圧を有する（11.95 mm Hg、25℃）⁵⁾。ギ酸アンモニウムも潮解性を有するが、蒸気圧は酢酸アンモニウムよりも低い（1 mm Hg、20℃）⁶⁾。したがって、大気中に両方の粒子が存在した場合、酢酸アンモニウムの方が、ガス化し易いと予想されることから、酢酸の方がガス状割合が高く、ギ酸の方がガス状割合が低い可能性が推察される。

偏相関分析の結果、大原における有機酸類の濃度変動に関連する因子として、ギ酸では気温、酢酸では SPM の寄与が大きいことが推察された。大気中に存在する有機酸類の発生源については、①各種燃焼ガス由来及び②光化学反応による VOC からの生成が考えられるが、気温との関連が強いギ酸については②の寄与が、SPM との関連が強い酢酸については①の寄与がより大きい可能性が推察される。

大気中のギ酸及び酢酸濃度については、これまでの報告データが少ないが、1985年に横浜国立大学敷地内で行われた調査では⁷⁾、4月28日から6月4日に測定した平均値として、ギ酸 8.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、酢酸 5.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ というデータが示されている。本調査における4月から6月調査の平均値は、若宮でギ酸 10.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、酢酸 16.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、横浜の濃度に比べると、若宮の方が、ギ酸で1.3倍、酢酸で3.0倍高いことから、近年では、1980年代に比べて、大気中酢酸濃度が増加している可能性が示唆される。その原因としては、平成15年（2003年）に開始されたディーゼル車規制⁸⁾により、ディーゼル車にDPFの装着が義務付けられ、排出ガス中の有機酸類濃度が増加したことが関連している可能性も否定できない。しかし、規制前後に同じ測定地点で有機酸類を調査したデータは無く、DPFの装着が、都内大気中の有機酸類濃度に影響を及ぼしているかどうかについては、明らかではない。

また、2011年から2012年に北海道（北海道大学、低温科学研究所屋上）で実施された調査では⁹⁾、最大値がギ酸 1.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、酢酸 2.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ という報告があり、これに比べると今回の調査で得られた有機酸類濃度は、かなり高い値であった。したがって、都内の大気中有機酸類は、北海道に比べて数倍以上高濃度である可能性が考えられる。

第3章

培養ヒト肺上皮由来細胞への
有機酸類ばく露実験

第3章 培養ヒト肺上皮由来細胞への有機酸類ばく露実験

I 目的

ギ酸、酢酸については、培養細胞への気相ばく露実験によってそれらの影響を調査した報告は見当たらない。そこで、ガス状の被験物質をばく露するために開発された培養細胞ばく露実験装置を用い、培養ヒト肺上皮由来細胞にガス状化したギ酸または酢酸をばく露し、酸化ストレスの誘導や、免疫系などへの影響について調べた。またギ酸・酢酸混合ガスも同様に培養細胞へ気相ばく露し、複合的な影響について調べた。

II 方法

1 試薬

ギ酸、酢酸は、それぞれ特級を和光純薬から購入した。RPMI1640 液体培地、0.25% トリプシン-EDTA、牛胎児血清 (FBS) は GIBCO[®] (Thermo Fisher Scientific, Inc.) のものを用い、細胞増殖アッセイキット (Cell Counting Kit-8) は DOJINDO から購入した。DuoSet[®] ELISA Development kit human CXCL8/IL-8、DuoSet[®] IC Human Total HO-1/HMOX1 ELISA は R&D SYSTEMS から購入した。High Capacity RNA-to-cDNA kit、TaqMan[®] Gene Expression Master Mix、TaqMan[®] Gene Expression Assay は Applied Biosystems[®] (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用した。RNA 抽出試薬 (RNAqueous[®] Kit) は Ambion[®] (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用した。

2 培養ヒト肺上皮由来細胞への液相ばく露実験

(1) 培養ヒト肺上皮由来細胞の処理

培養ヒト肺上皮由来 A549 細胞 (以下「A549 細胞」と略す) (American Type Culture Collection, No. CCL-185) は、10%FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて、37°C、5% CO₂・95% air の条件下で継代培養した。A549 細胞は、必要時にトリプシン-EDTA を用いて回収し、96 ウエルプレートに 2×10^4 cells/well 播種し、実験に供した。

実験は、1 回のばく露実験を 8 個同時に行い、同じ条件の実験を 3 回繰り返した。

(2) 細胞増殖能力試験

A549 細胞は、2 日間培養した後、1%FBS 含有 RPMI1640 培地に、純水で所定の濃度に希釈したギ酸または酢酸を 1/10 量加えた実験用培地に交換し、24 時間培養した。細胞増殖アッセイキット内の WST-8/1-Methoxy PMS 混合液を培地の 1/10 量加えてさらに 1 時間培養し、マイクロプレートリーダー (Multiskan FC、Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、波長 450 nm における培地の吸光度を測定した。増殖能力は、1%FBS 含有 RPMI1640 培地に純水を 1/10 量加えた実験用培地で 24 時間培養した対照細胞の培地の吸光度を 100% として算出した。

3 培養ヒト肺上皮由来細胞への気相ばく露実験

(1) 培養細胞気相ばく露実験装置

培養細胞気相ばく露実験装置は、Cultex[®] CG システム (Cultex[®] Laboratories GmbH、柴田科学) を用いた。

(2) 有機酸類のガス状化

有機酸類のガス状化には、校正用ガス調整装置パーミエーター (ガステック) を用いた。ギ酸、酢酸の単独ばく露はディフュージョンチューブ D-30 にギ酸または酢酸を入れて装置内に設置し、湯浴温度 50°C、空気流量 0.8 L/min または 0.5 L/min に設定し、ギ酸または酢酸をガス状化させ、Cultex[®] CG に導入した。ギ酸及び酢酸の濃度は、それぞれ 156 及び 66.3 ppm (294 及び 163 mg/m³) であった。ギ酸・酢酸混合ばく露では、パーミエーター 2 台を用い、1 台にはギ酸を入れたディフュージョンチューブ D-30、もう 1 台に酢酸を入れた試験管 (内径 12.3×長さ 103 mm) を設置し、湯浴温度 50°C、空気流量 0.5 L/min に設定して、ギ酸、酢酸をそれぞれガス状化させた。マニホールド導入直前にギ酸と酢酸を混合し、ギ酸・酢酸混合ガス (混合ガス) として Cultex[®] CG に導入した。混合ガス中のギ酸及び酢酸の濃度は、それぞれ、116 及び 64.6 ppm (218 及び 159 mg/m³) であった。

(3) 培養ヒト肺上皮由来細胞の処理

A549 細胞は、トリプシン-EDTA を用いて回収し、10%FBS 含有 RPMI1640 培地を入れた 12 ウェルプレートのウェル内に置いたインサート (面積 0.9 cm²) に 17×10^4 個を播種し、インサートのメンブラン膜上で、37°C、5% CO₂・95% air の条件下にて 3 日間培養した。A549 細胞を培養したインサートは、1%FBS 含有 RPMI1640 培地を入れた Cultex[®] CG に設置した。A549 細胞は、ガス状化したギ酸、酢酸、混合ガスまたは対照群として活性炭を通過させ清浄にした空気を、1.0 mL/min の流速で、15、30、60、90 または 120 分間ばく露した。その後は、インサートを新しい 1%FBS 含有 RPMI1640 培地 0.6 mL の入ったプレートのウェルに入れ、インターロイキン (IL) -8 測定試料のみインサート内に培地を 0.5 mL 加え、37°C、5% CO₂・95% air の条件下にて培養した。A549 細胞にギ酸をばく露した群はギ酸群、酢酸をばく露した群は酢酸群、混合ガスをばく露した群は混合群とした。

実験は、1 回のばく露実験を 3 個同時に行い、同じ条件の実験を 2 回繰り返した。

(4) 細胞増殖能力試験

細胞増殖能力は、ばく露後24時間培養したA549細胞にWST-8/1-Methoxy PMS混合液を加えた培地を入れ、さらに1時間培養してから、マイクロプレートリーダーを用いて、波長450 nmにおける培地の吸光度を測定した。細胞増殖能力は、ばく露開始時の細胞の培地の吸光度を100%として増殖能力を算出した。

(5) IL-8 濃度

ばく露後24時間培養したA549細胞の培地を回収し、当該培地を用い、DuoSet[®] ELISA Development kit human CXCL8/IL-8を使用して、キットに添付された方法に従って操作し、波長450 nmにおける吸光度を測定して、IL-8濃度を定量した。IL-8濃度は、培地回収後の細胞をトリプシンで回収し、PBSで2回洗浄した後、細胞溶解用液(1mM EDTA、0.5% Triton X-100、タンパク質分解酵素阻害剤含有PBS)を用いて作成した細胞溶解液のタンパク質濃度当たりの値として標準化した。細胞溶解液の蛋白質濃度は、Lowry法¹⁾を用いて定量した。

(6) ヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 遺伝子発現

ばく露後3時間培養したA549細胞をPBSで2回洗浄後、RNA抽出試薬を用いて、試薬に添付された方法に従って細胞の全RNAを抽出・精製した。吸光度法によりRNA量を定量した後は、High Capacity RNA-to-cDNA kitを用い、試薬に添付された方法に従ってmRNAをcDNAに逆転写した。このcDNAにTaqMan[®] Gene Expression Master Mix及びTaqMan[®] Gene Expression Assayを加え、リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems[®] 7500)を用いてRT-PCRを行い、遺伝子発現量を定量した。反応条件は、初期熱変性を50°C 2分間、95°C 10分間、サイクリングを熱変性95°C 15秒、アニーリング/伸長反応60°C 1分間、40サイクルとした。目的遺伝子としてHO-1、リファレンス遺伝子としてβ-アクチンを用いた。HO-1遺伝子発現量はβ-アクチン遺伝子発現量で補正し、相対定量を行った。

(7) HO-1 タンパク質濃度

HO-1濃度は、ばく露後3時間培養したA549細胞を細胞溶解用液で調整した細胞溶解液を用い、DuoSet[®] IC Human Total HO-1/HMOX1 ELISAを使用して、キットに添付された方法に従って操作し、マイクロプレートリーダーを用いて、波長450 nmにおける吸光度を測定して定量した。HO-1濃度は細胞溶解液のタンパク質濃度当たりの値として標準化した。

(8) 統計学的解析

統計学的検定は、Studentのt検定を用いて有意差の検定をした。

III 結果

1 培養ヒト肺上皮由来細胞へのギ酸及び酢酸の液相ばく露による影響

ギ酸及び酢酸による細胞増殖能力試験は、ギ酸の濃度を 0.01、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、3.0、5.0、10 mg/mL、酢酸の濃度を 0.01、0.1、0.5、0.7、1.0、3.0、5.0、10 mg/mL に濃度を変化させて実験を行った。その結果を図 1 に示す。ギ酸及び酢酸ともに、0.01 から 0.5 mg/mL までは細胞増殖能の増加が見られたが、1.0 mg/mL では細胞増殖能が抑制され、3.0 mg/mL 以上では細胞傷害が認められた。

2 培養ヒト肺上皮由来細胞へのギ酸及び酢酸の気相ばく露による影響

対照群を含む全ての群は、ばく露開始時の A549 細胞に比べ、細胞増殖能力を減少させた (図 2)。しかし、ばく露時間に係わらず、いずれの群も対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

炎症症状を引き起こす原因因子の 1 つである IL-8 は、対照群を始め、全ての群でばく露時間に依存して、その濃度が増加した。酢酸群は、120 分間ばく露により IL-8 産生を増強する傾向を示した。混合群は、30 分間ばく露により IL-8 産生が増強した。ギ酸ばく露は、IL-8 産生に影響を及ぼさなかった (図 3)。

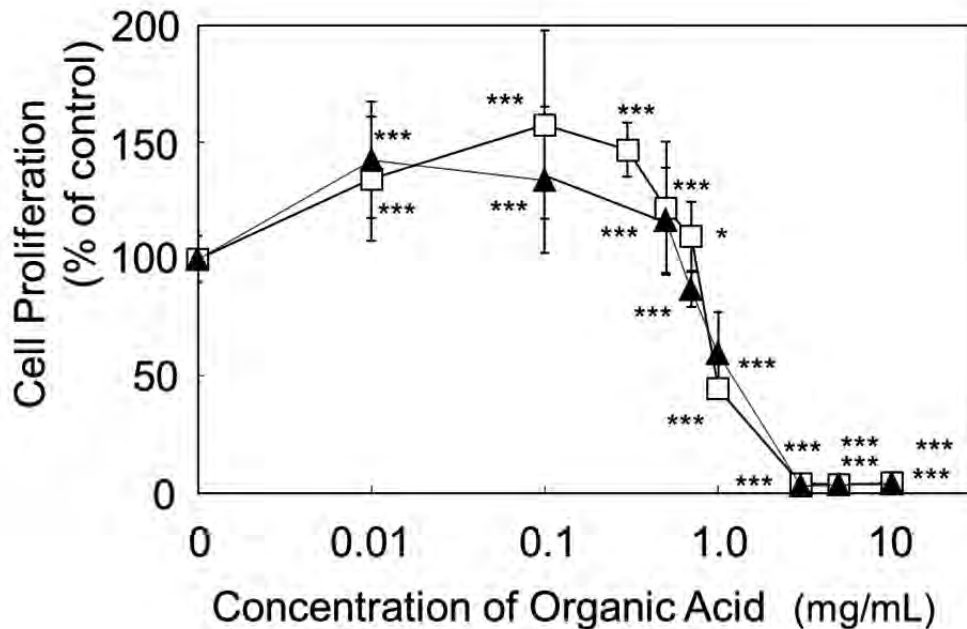


図 1 有機酸類を 24 時間直接ばく露した A549 細胞の増殖率

□ ; ギ酸、▲ ; 酢酸

* ; $P < 0.05$ 、*** : $P < 0.001$ VS 対照群

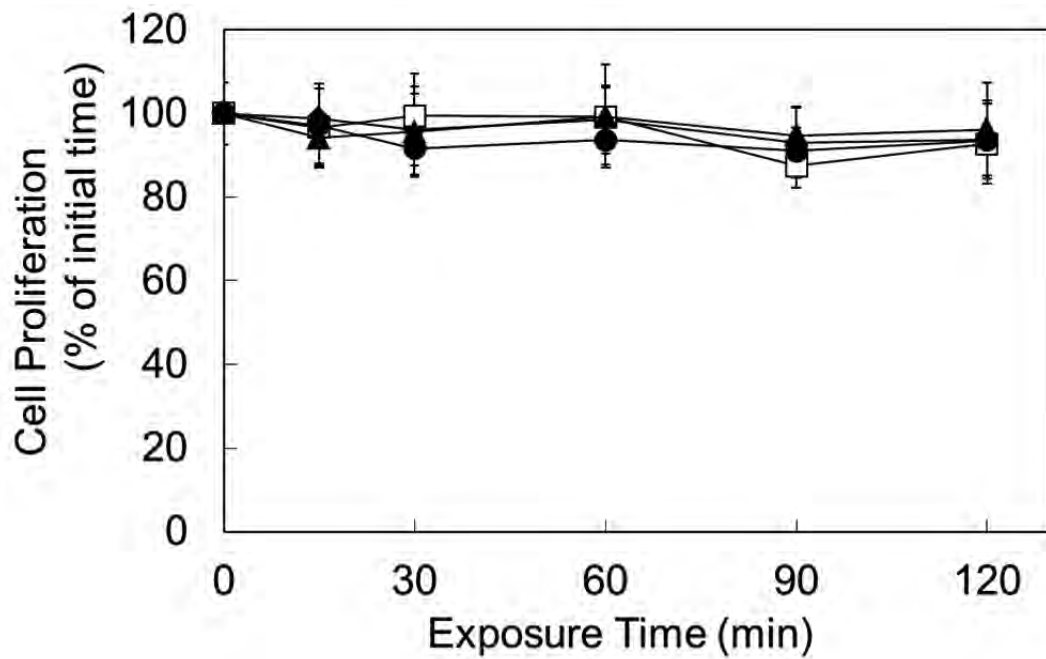


図2 A549細胞の増殖能力に対する有機酸類ガスばく露の影響
 ◆；対照群、□；ギ酸群、▲；酢酸群、●；混合群

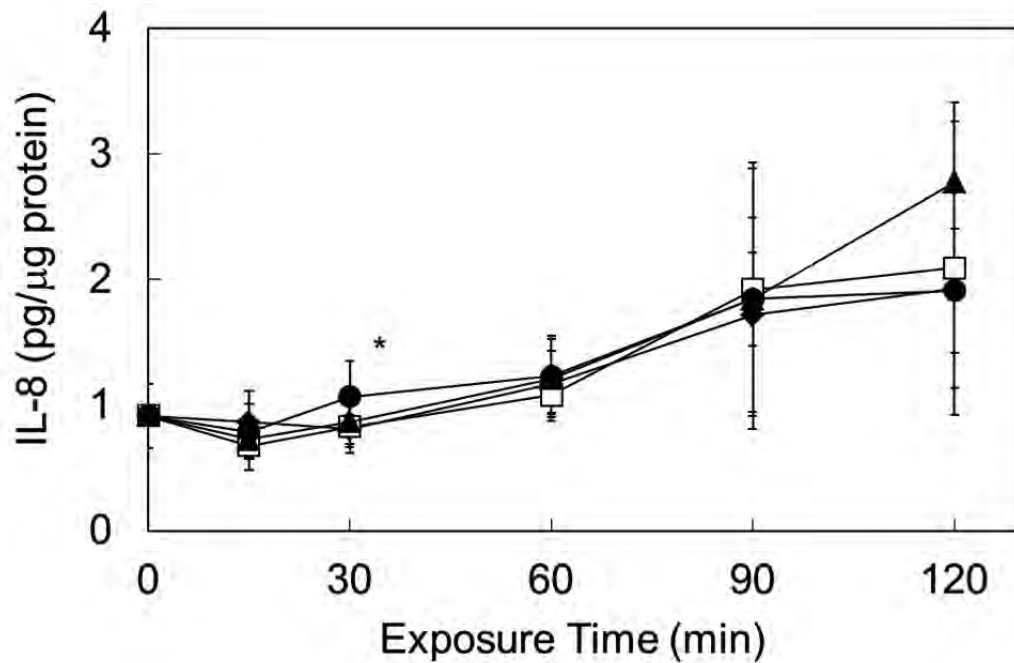


図3 有機酸類ガスをばく露したA549細胞から産生されるIL-8濃度
 ◆；対照群、□；ギ酸群、▲；酢酸群、●；混合群
 *； $P < 0.05$ 、混合群 VS 対照群

酸化ストレスマーカーである *HO-1* 遺伝子発現の結果を、図4に示す。ばく露開始時の細胞中 *HO-1* 遺伝子発現量を1とし、ばく露後3時間の細胞中 *HO-1* 遺伝子発現量を相対値で示した。60、90分間ばく露すると、対照群を含む全ての群で *HO-1* 遺伝子発現量は増加した。酢酸群と混合群の *HO-1* 発現量は、ほとんどのばく露時間において対照群に比べて有意に減少したが、ばく露時間には依存していなかった。ギ酸ばく露は、*HO-1* 遺伝子発現に影響を与えなかった。

HO-1 濃度については、酢酸群と混合群では、対照群に比べ *HO-1* 濃度が増加していたが、ばく露時間には依存していなかった。ギ酸ばく露は、*HO-1* 濃度に影響を及ぼさなかった (図5)。

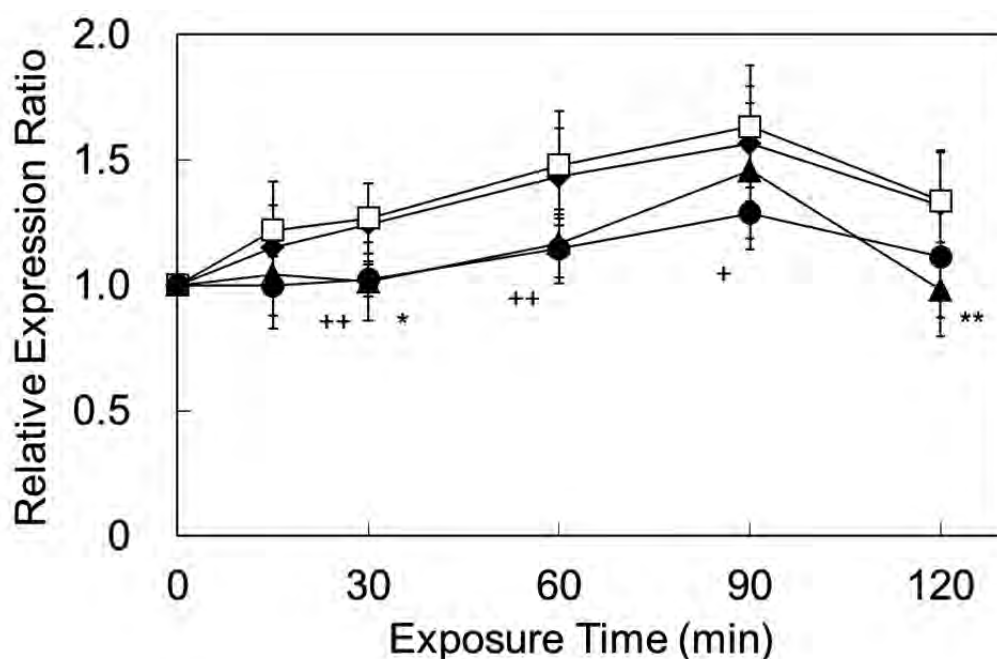


図4 有機酸類ガスをばく露した A549 細胞に発現する *HO-1* 遺伝子

◆ ; 対照群、□ ; ギ酸群、▲ ; 酢酸群、● ; 混合群

* ; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 酢酸群 VS 対照群

+ ; $P < 0.05$ 、++ ; $P < 0.01$ 混合群 VS 対照群

IV 考察

気相ばく露実験と同様、これまでにギ酸、酢酸について、培養細胞への液相ばく露実験によってそれらの影響を調べた報告は見当たらない。そこで今回、A549細胞へ有機酸類の液相ばく露実験を行った。実験に用いた1%FBS含有RPMI1640培地のpHは7.3であった。ギ酸が1.0 mg/mLの時の培地のpHは6.2で、3.0 mg/mLでのpHは3.8であった。酢酸が1.0 mg/mLの時の培地のpHは6.0で、3.0 mg/mLではpH4.9であった。通常、培養細胞の至適pHは6.8から7.2であることから、液相ばく露の際に観察された細胞傷害は、酸性度の上昇によるタンパク質の変性などに起因するものと考えられた。

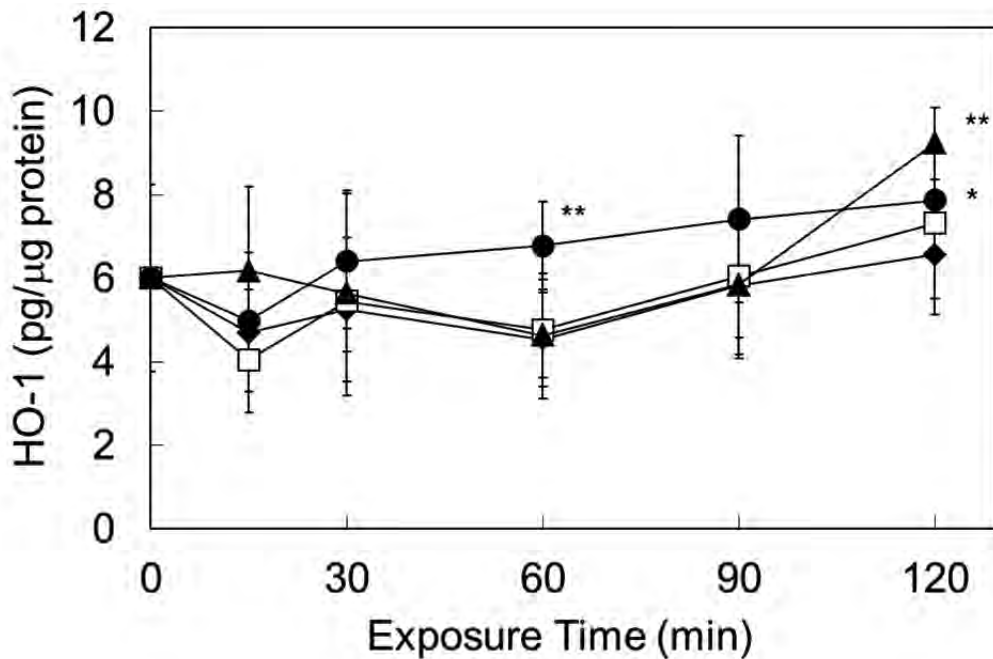


図5 有機酸類ガスをばく露した A549 細胞で発現される HO-1 濃度

◆ ; 対照群、□ ; ギ酸群、▲ ; 酢酸群、● ; 混合群

* ; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 酢酸群または混合群 VS 対照群

ヒトは、ギ酸の単回吸入ばく露で、鼻炎、咳、気管支炎、呼吸困難を引き起こす²⁾。一方、酢酸は、鼻、上気道、肺に対する刺激性がある³⁾。化学物質によるヒトの呼吸器系への影響を調べる上で、培養細胞を用いた *in vitro* の毒性試験は有用であると考え、A549 細胞を用いて、ギ酸及び酢酸を短時間で高濃度にばく露した場合の影響を調べることにした。本実験では、ギ酸群 (ギ酸 294 mg/m^3)、酢酸群 (酢酸 163 mg/m^3) 及び混合群 (ギ酸 218 mg/m^3 、酢酸 159 mg/m^3) は、大気中の濃度と比較して全て高濃度であり、ばく露時間は 15 分間から 120 分間という比較的短時間の気相ばく露実験を行った。大気及びディーゼル排出ガスには、ギ酸と酢酸が同時に含まれている。そこで、今回の実験ではギ酸、酢酸単独だけでなく、ギ酸と酢酸を混合したガスのばく露実験も行った。炎症指標の 1 つである IL-8 産生について、対照群に比べ酢酸群では 120 分間ばく露すると増強傾向を示したことから、それ以上の時間でばく露実験を行うと、有機酸類の刺激により IL-8 産生が増強する可能性も考えられる。さらに、酢酸は HO-1 遺伝子発現に影響を及ぼし、混合群は酢酸群の結果に類似するものであった。また HO-1 蛋白質濃度について、酢酸群に比べ混合群の方が早く影響が現れた。酢酸群、混合群は 120 分間ばく露すると HO-1 濃度は増加したことから、より長時間でばく露実験を行うと、HO-1 濃度に影響が現れる可能性が考えられる。これらのことから、混合群における A549 細胞への作用は酢酸成分による影響が大きいと推察される。

本実験では、酸化ストレスマーカー HO-1 に関して、遺伝子発現の変化、タンパク

質濃度の変化の様相が相反していた。すなわち酢酸群、混合群は対照群と比較して、遺伝子発現が低かったが、HO-1 タンパク質濃度は高く、両者の発現に統計学的に有意差が見られた。A549 細胞にタバコ煙をばく露した後、3、6、18 時間で A549 細胞を回収し、細胞中の HO-1 遺伝子の発現を調べ、対照群と比較した結果、その発現量はそれぞれ 10、14、2 倍に増加するとの報告がある⁴⁾。しかし、本実験では、有機酸類ばく露後 3 時間の細胞中の HO-1 遺伝子が対照群と比較し減少していた。ギ酸群では、ばく露による遺伝子発現、タンパク質濃度は対照群と比較して変化がなかった。酢酸をばく露されるとヒト肺上皮由来 A549 細胞の酸化ストレスが誘導される可能性が示唆されたことに注意を払うべきと考える。

第4章

有機酸類ばく露システムの構築
及びギ酸・酢酸測定の検討

第4章 有機酸類ばく露システムの構築及びギ酸・酢酸測定の見討

I 目的

ギ酸及び酢酸による動物ばく露実験を実施するために、ラットを用いた有機酸類ばく露システムを構築し、ばく露の目標濃度維持に影響する要因を見討した。

II 方法

1 有機酸類ばく露システムの構築

(1) 装置

有機酸類ばく露システムを構築するにあたり、有機酸類ガス発生装置にはパーミエーター (PB-1B、ガステック) を用いた。ギ酸または酢酸 (特級、和光純薬) の溶液をディフュージョンチューブ (ガステック) あるいは試験管に注入してパーミエーターにセットし、ポンプあるいはコンプレッサーから空気を送って有機酸類ガスを発生させた。また、発生した有機酸類ガスを導入し、ばく露を行うためのばく露チャンバーには、換気機能が付いた樹脂性ボックス (容積 53 L、307 mm×307 mm×560 mm) を用いた。

(2) ばく露濃度

ばく露実験には、対照群、低濃度群、中濃度群及び高濃度群を設けることとし、ばく露濃度は、作業環境許容濃度¹⁾を「中濃度」として設定し、その1/10の濃度を「低濃度」、10倍の濃度を「高濃度」として設定した。

具体的な濃度は、ギ酸ばく露では、低濃度群 0.5 ppm (0.94 mg/m³)、中濃度群 5 ppm (9.4 mg/m³)、高濃度群 50 ppm (94 mg/m³)、酢酸ばく露では、低濃度群 1 ppm (2.5 mg/m³)、中濃度群 10 ppm (25 mg/m³)、高濃度群 100 ppm (247 mg/m³) とした。

ばく露実験には、1群あたり10匹のラットを用いた。1つのばく露チャンバーには、5匹のラットを入れる設計としたことから、同じ濃度のチャンバーを2つ作り、ばく露濃度の偏りを無くすため、1日ごとにチャンバー内のラットを入れ替えて実験を行うこととした。

上記の条件下でばく露実験を行うに当たり、一定の換気を保持してチャンバー内の有機酸類ガス濃度を適正に保つため、パーミエーターの温度や送風量、ディフュージョンチューブや試験管の種類、ばく露チャンバーの換気回数等について、適切な組み合わせを見討した。

2 ギ酸及び酢酸測定方法の見討

ばく露チャンバー内のギ酸及び酢酸濃度の測定方法を見討した。分析装置には、Waters 2690 alliance/Waters 432 (日本ウォーターズ)、サプレッサーには

ICA-25P（東亜ディーケーケー）を用いた。分析カラムについては、2 種のカラム TSKgel SuperIC-AZ（東ソー）及び IonPac AS11-HC（日本ダイオネクス）を用いて、検出感度を比較した。ばく露チャンバー内の空気採取は、インピンジャーを用いて蒸留水に捕集する方法で行った。インピンジャーにはガラスフィルター付きバブラー（柴田科学）、吸引ポンプにはミニポンプ MP-Σ30（柴田科学）を用いた。添加回収試験は、蒸留水 15 ml を入れたインピンジャーを 2 連につなぎ、前段のインピンジャーに酢酸及びギ酸をそれぞれ 50 µg 添加後、清浄空気を 200 mL/min の流速で 60 分間通気して行った。

また、ばく露実験期間中のチャンバー内空気の採取は、対照群及び低濃度群が流速 400 mL/min、中濃度群が 200 mL/min、高濃度群が流速 100 mL/min で、空気採取時間は 30 分間で行った。この流速は、ばく露チャンバーの換気回数に換算すると 0.12 回/h から 0.46 回/h に相当し、チャンバーの換気回数（7.4 回/h）の 1.5% から 6.0% 程度であり、チャンバー内濃度に影響を与えずに空気採取が可能と考えられた。なお、ばく露実験開始時の測定の際に、インピンジャーを 2 本連結して 30 分の空気採取を行い、後段のインピンジャーへのギ酸及び酢酸の破過の有無を調べた。

3 糞尿への吸着程度の確認

平成 24 年度のばく露実験において、ラットを入れない状態で有機酸類濃度を調整した後、チャンバーにラットを入れたところ、有機酸類濃度の大幅な低下がみられた。そこで、ラットの呼吸以外にチャンバー内のギ酸及び酢酸濃度を低下させる要因として、糞尿及び体毛への吸着が考えられたことから、糞尿の有無によるチャンバー内ギ酸及び酢酸濃度の比較を行い、この値から体毛への吸着を試算した。平成 25 年度は、酢酸で低濃度群、中濃度群の 2 群、平成 26 年度はギ酸で低濃度群、中濃度群、高濃度群の 3 群において、それぞれ 1 つのチャンバーに、6 週齢ラット 5 匹（以下、「生体」と略す）、あるいは 6 週齢ラット 5 匹の糞尿 2 日分（以下、「糞尿」と略す）を入れ、朝（10 時半から 11 時）、昼（13 時から 13 時半）、夕方（14 時半から 15 時）の 3 回、チャンバー内のギ酸及び酢酸濃度を測定した。なお、各群 1 つのチャンバーは、被験体（生体及び糞尿）を入れず、対照とした。

III 結果

1 有機酸類ばく露システムの構築

有機酸類ばく露システムの模式図を図 1 に、実験に用いたパーミエーターの概要を図 2 に示す。平成 24 年度に実施したばく露実験では、空気ポンペをパーミエーターに接続して空気を供給し、平成 25 年度から平成 27 年度に実施したばく露実験では、コンプレッサーから空気を供給した。有機酸類ガスは、パ

パーミエーター前面の2本のノズルから放出され、これを同じ濃度群の2つのばく露チャンバーに導入した。

図3にばく露チャンバーの概要を示す。ばく露チャンバーは、後ろ面の穴が排気ラインに接続されている。排気の強さは、ラット5匹を入れた場合の二酸化炭素濃度を勘案して調節し、換気回数7.4回/hに設定した。この状態で、ラット5匹をばく露チャンバーに入れ、パーミエーターから有機酸類を含まない空気を供給して、二酸化炭素濃度を測定したところ約3,000ppmであり、これはディーゼル排出ガスのばく露実験を行った時の濃度と同じであった。

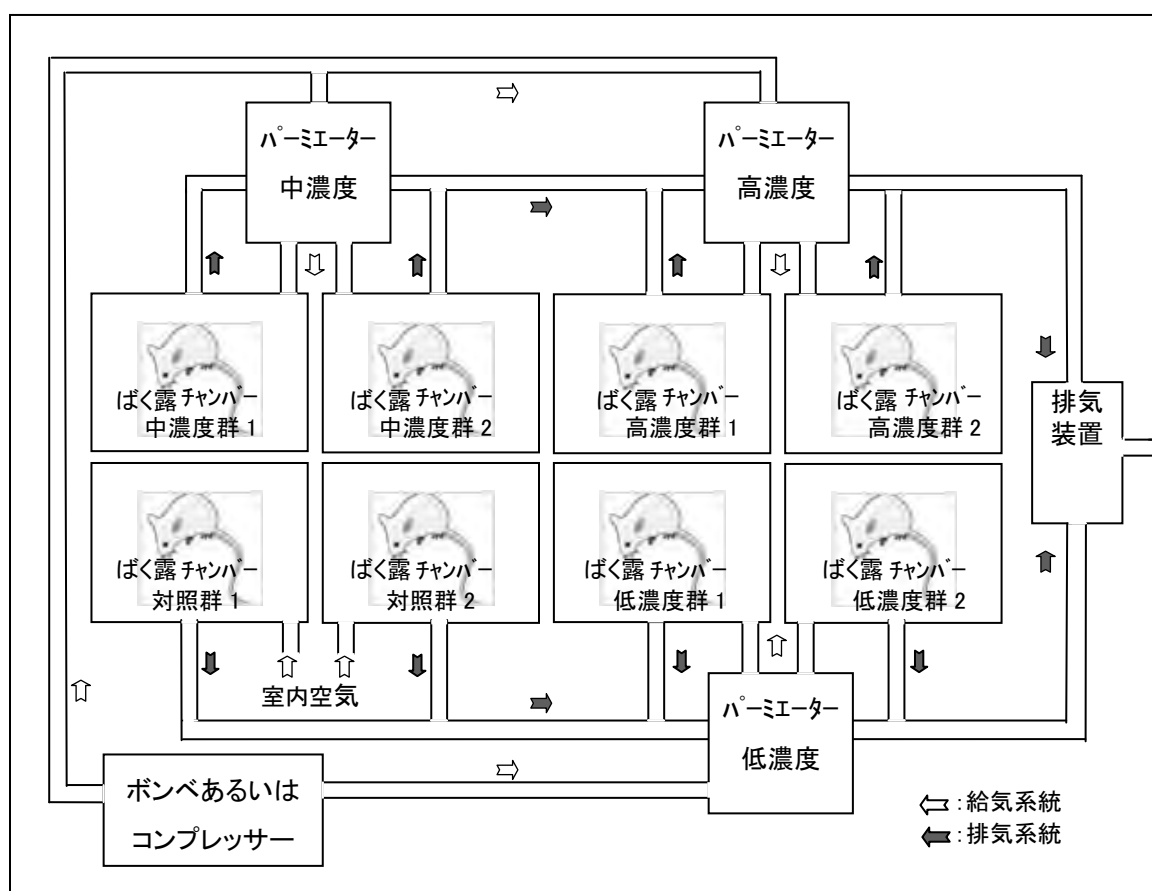


図1 有機酸類ばく露システムの模式図

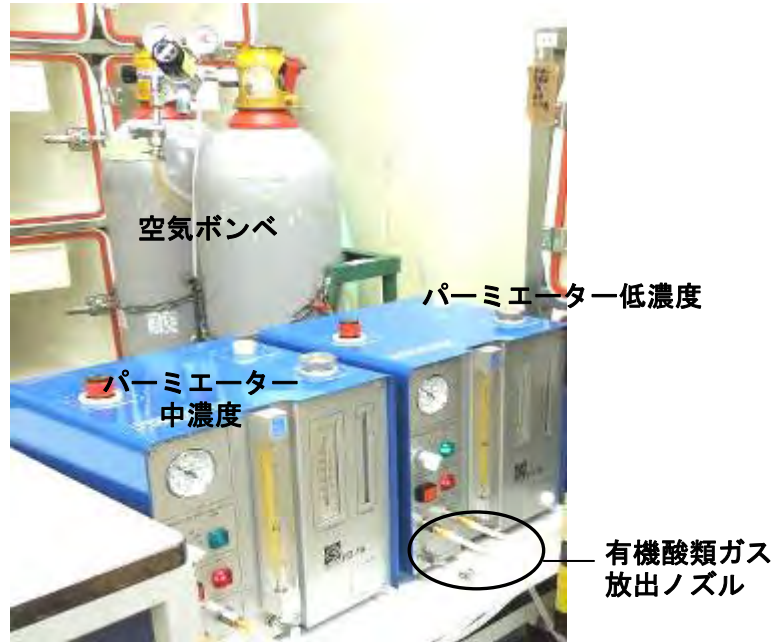


図2 パーミエーターの概要

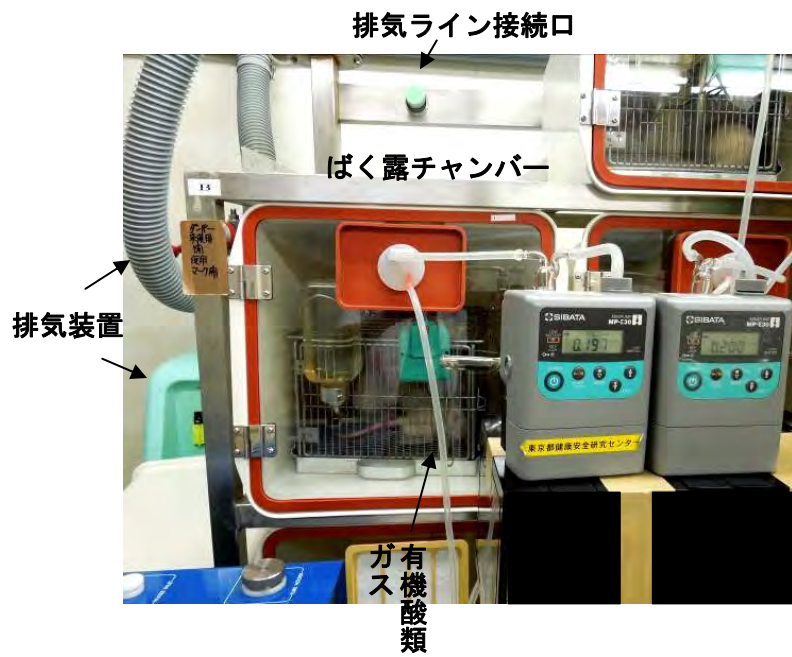


図3 ばく露チャンバーの概要



図4 ばく露チャンバー前面の拡大図

図4に、ばく露チャンバー前面の拡大図を示す。シリコンチューブからチャンバー内に供給された有機酸類ガスは、扉内側に設置した小型ファンによって攪拌され、扉の隙間から吸い込まれる空気によって希釈される仕組みとした。平成24年度から平成27年度に実施したばく露実験時のパーミエーター及びチャンバーの条件を表1から表4に示す。

ばく露実験を開始した平成24年度は、動物のいない状態でばく露チャンバー内の濃度調整を行った後に、ばく露を開始したが、チャンバー内濃度が目標濃度よりも低かったため、ばく露期間の途中でパーミエーターの温度を上げて、目標濃度に近づくよう調整を行った（酢酸は、低濃度群を30℃から35℃に変更、中濃度群を40℃から50℃に変更、ギ酸は、低濃度群を35℃から40℃に変更、中濃度群を35℃から50℃に変更）。

また、平成24年度低濃度群及び中濃度群ではディフュージョンチューブの代わりに試験管を使用した。これは、市販のディフュージョンチューブのうち、口径の最も大きいD-30（ガステック）を用いても、チャンバー内濃度が目標値まで上がらなかったことから、より口径の大きい容器として試験管を代用し、口径と長さを調節することにより、目標濃度を達成することができたためである。なお、平成26年度のギ酸中濃度群及び高濃度群、平成27年度の酢酸高濃度群では、有機酸類ガスの濃度を目標に近づけるため、試験管内にろ紙を入れ、蒸発量を増やす工夫を行った。

表1 28日間ギ酸、酢酸ばく露のパーミエーター及びばく露チャンバー条件

装置条件	酢酸		ギ酸	
	低濃度群	中濃度群	低濃度群	中濃度群
パーミエーター				
空気供給速度	4 L/min	4 L/min	4 L/min	4 L/min
有機酸類注入容器	D-30*	試験管(φ 17 mm×75 mm)	D-30*	試験管(φ 13 mm×85 mm)
温度(最初→変更後)	30°C→35°C	40°C→50°C	35°C→40°C	35°C→50°C
ばく露チャンバー				
換気回数	7.4 回/h	7.4 回/h	7.4 回/h	7.4 回/h
有機酸類ガス供給速度	2 L/min	2 L/min	2 L/min	2 L/min

* : ディフュージョンチューブ 中央部φ 10 mm、底部φ 20 mm、全長 125 mm

表2 180日間酢酸ばく露のパーミエーター及びばく露チャンバー条件

装置条件	酢酸	
	低濃度群	中濃度群
パーミエーター		
空気供給速度	4 L/min	4 L/min
有機酸類注入容器	D-30*	試験管 (φ 17 mm×75 mm)
温度	40°C	50°C
ばく露チャンバー		
換気回数	7.4 回/h	7.4 回/h
酢酸ガス供給速度	2 L/min	2 L/min

* : ディフュージョンチューブ 中央部φ 10 mm、底部φ 20 mm、全長 125 mm

表3 180日間ギ酸ばく露のパーミエーター及びばく露チャンバー条件

装置条件	ギ酸		
	低濃度群	中濃度群	高濃度群
パーミエーター			
空気供給速度	4 L/min	4 L/min	4 L/min
有機酸類注入容器	試験管 (φ 10.5 mm × 106 mm)	試験管 (φ 13 mm × 85 mm)	試験管 (φ 17.5 mm × 74.8 mm)
温度	30°C	35°C	35°C
ろ紙	なし	直径 55 mm	直径 70 mm
ばく露チャンバー			
換気回数	7.4 回/h	7.4 回/h	7.4 回/h
ギ酸ガス供給速度	2 L/min	2 L/min	2 L/min

表4 28日間混合ガスばく露のパーミエーター及びばく露チャンバー条件

装置条件	低濃度群	中濃度群	高濃度群
パーミエーター ギ酸			
空気供給速度	6 L/min	6 L/min	4 L/min
有機酸類注入容器	D-30*	試験管 (φ 10 mm × 104 mm)	試験管 (φ 22.5 mm × 60 mm)
ギ酸液量	3 mL	3 mL	3 mL
温度	35°C	50°C	50°C
ろ紙	なし	なし	なし
パーミエーター 酢酸			
空気供給速度	6 L/min	6 L/min	6 L/min
有機酸類注入容器	試験管 (φ 13 mm × 85 mm)	試験管 (φ 22.5 mm × 60 mm)	試験管 (φ 22.5 mm × 60 mm)**
酢酸液量	3 mL	3 mL	5 mL
温度	35°C	35°C	30°C
ろ紙	なし	なし	長さ 55 mm 幅 15 mm***
ばく露チャンバー			
換気回数	7.4 回/h	7.4 回/h	7.4 回/h
ギ酸ガス供給速度	3 L/min	3 L/min	2 L/min
酢酸ガス供給速度	3 L/min	3 L/min	3 L/min

*: ディフュージョンチューブ 中央部φ 10 mm、底部φ 20 mm、全長 125 mm

** : 酢酸高濃度群の試験管は、試料籠の上に乗せてパーミエーターに挿入 (底部から 75 mm の高さ)

*** : 直径 55 mm ろ紙の中央部を 15 mm 幅にカットして使用 (平均重量約 0.95 g)

2 ギ酸及び酢酸測定方法の検討結果

カラムの比較検討において、TSKgel SuperIC-AZ と IonPac AS11-HC の2種を用いて、酢酸及びギ酸を分析して得られたクロマトグラムを図5に示す。上段が、TSKgel SuperIC-AZ、下段が IonPac AS11-HC を用いた結果である。溶離液は、TSKgel SuperIC-AZ が、7.5 mmol/L NaHCO₃+1.1 mmol/L Na₂CO₃、IonPac AS11-HC が、1 mmol/L KOH であった。

図からも明らかなように、TSKgel SuperIC-AZ では酢酸とギ酸の分離が悪く、酢酸のピーク高が低いのに対し、IonPac AS11-HC では、酢酸とギ酸の分離が良好で、かつ酢酸のピーク高が TSKgel SuperIC-AZ に比べて2.5倍高いという結果が得られた。以上の結果より、分析カラムとして、IonPac AS11-HC を用いることとした。イオンクロマトグラフの分析条件を表5に示す。

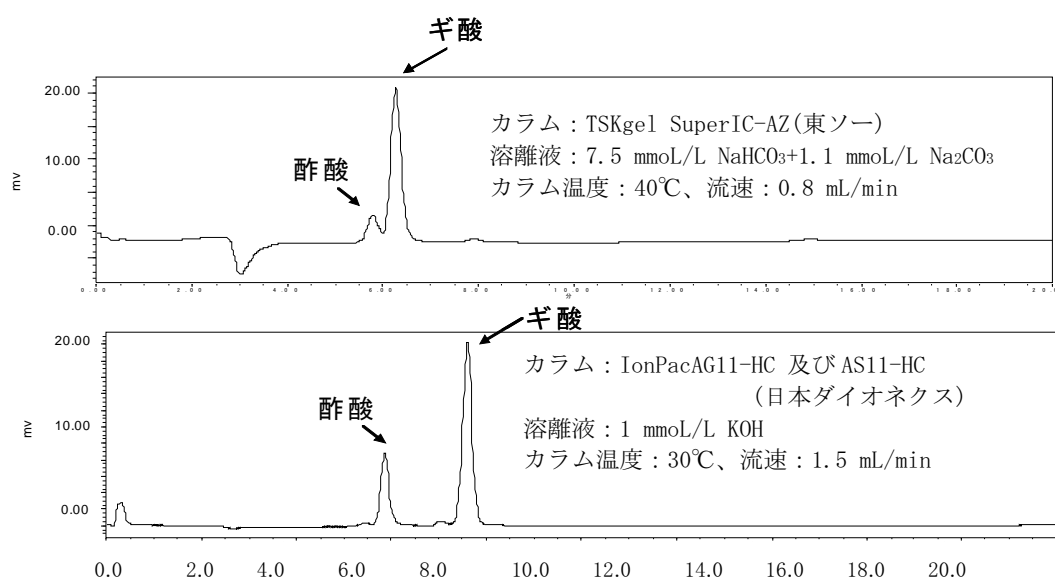


図5 酢酸及びギ酸標準液(各 5 ppm)のイオンクロマトグラフのクロマトグラム比較

表5 イオンクロマトグラフの分析条件

カラム	IonPac AG11-HC 及び AS11-HC
移動相	1 mmol/L KOH
カラム温度	30°C
流速	1.5 mL/min
検出器	電気伝導度 (サプレッサー使用)
注入量	30 μ L

添加回収試験の結果では、流速 200 mL/min、60 分通気の場合、2 連につないだインピンジャーの後段からは、有機酸類は検出されず、前段のインピンジャーのみで有機酸類の捕集が可能ながわかった。回収率 (n=1) は、酢酸は 93.2%、ギ酸では 96.9%といずれも良好であった。また、2 連につないだインピンジャーを用い、実際のチャンバーで流速 100 mL/min、200 mL/min 及び 400 mL/min で 30 分間チャンバー内空気の採取を行い、後段のインピンジャーへのギ酸及び酢酸の破過の有無を調べたところ、破過は認められなかった。

3 糞尿への吸着程度の確認

ラットの糞尿の有無による、チャンバー内の有機酸類濃度比較実験の概要を図 6 に示す。空気採取は、チャンバーの奥側に設けられた空気採取ノズルから行った。平成 25 年度に実施した酢酸を用いた実験について、測定時刻ごとのチャンバー内酢酸濃度変化を図 7 に示す。4 個の折れ線グラフのうち、上段は低濃度群、下段は中濃度群の結果を示す。いずれの条件においても、被験体の設置されていない対照のチャンバーに比べ、被験体が設置されたチャンバーでは、酢酸濃度の低下がみられた。また、測定時刻ごとに比較すると、朝が最も低く、夕方にかけて次第に濃度が上昇していた。

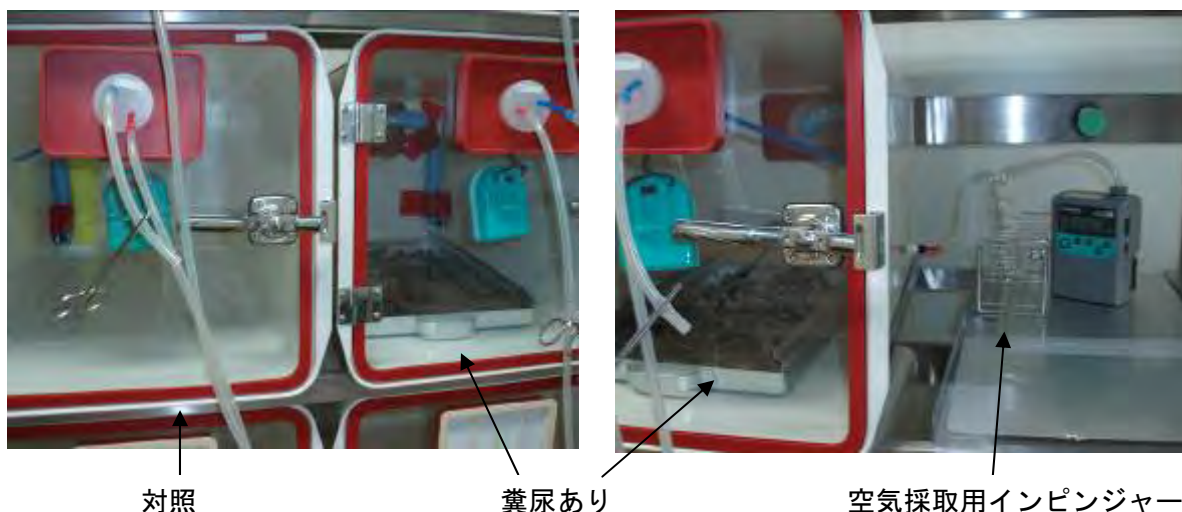


図 6 ラット糞尿の有無によるチャンバー内の有機酸類濃度比較実験の概要

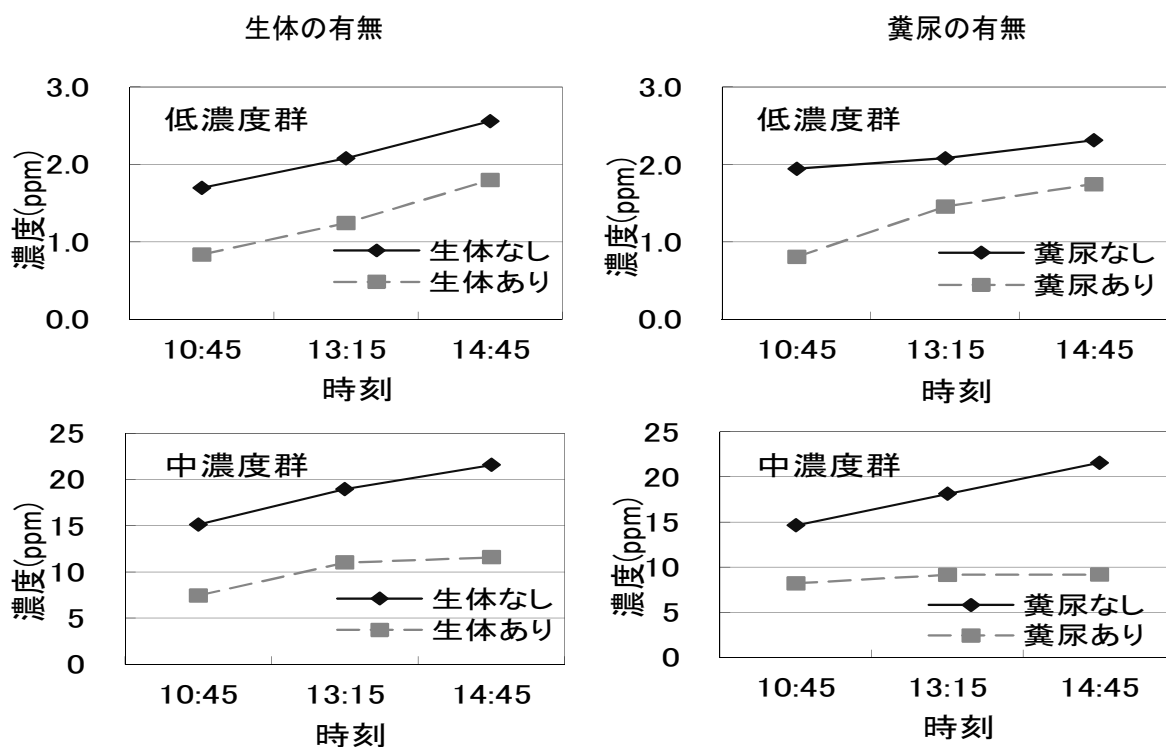


図7 ラットの生体及び糞尿の有無によるチャンバー内酢酸濃度の経時変化

次に、各群、各条件におけるチャンバーの1日平均濃度及び平均の酢酸減少率を表6に示す。なお、表中の酢酸減少率(%)は、朝、昼、夕方それぞれの測定値について、被験体なしの濃度から被験体ありの濃度を差し引き、その値を被験体なしの濃度で除して割合(%)を求め、条件ごとに1日の平均値を算出した。チャンバー内に設置した被験体ごとに比較すると、酢酸濃度の減少率は、低濃度群では生体>糞尿、中濃度群では生体<糞尿であった。また、低濃度群と中濃度群とを比較すると、いずれの被験体においても、低濃度群よりも中濃度群の方が濃度の減少割合が大きい傾向がみられた。

次に、平成26年度に実施したギ酸を用いた実験について、測定時刻ごとのチャンバー内のギ酸濃度変化を図8に示す。いずれの条件においても、被験体の設置されていない対照のチャンバーに比べ、被験体が設置されたチャンバーでは、ギ酸濃度の低下がみられた。また、測定時刻ごとに比較すると、朝が最も低く、夕方にかけて次第に濃度が上昇する傾向は酢酸と同様であった。

表6 ばく露チャンバー内の酢酸の1日平均濃度及び減少率

ばく露群	被験体の有無	被験体の種類	
		生体	糞尿
低濃度群 (ppm)	なし	2.1	2.1
	あり	1.3	1.3
被験体設置による酢酸減少率(%)		-38.7	-36.6
中濃度群 (ppm)	なし	18.6	18.1
	あり	10.0	8.9
被験体設置による酢酸減少率(%)		-46.0	-51.2

生体：生きた6週齢ラット5匹、糞尿：6週齢ラット5匹の糞尿2日分、

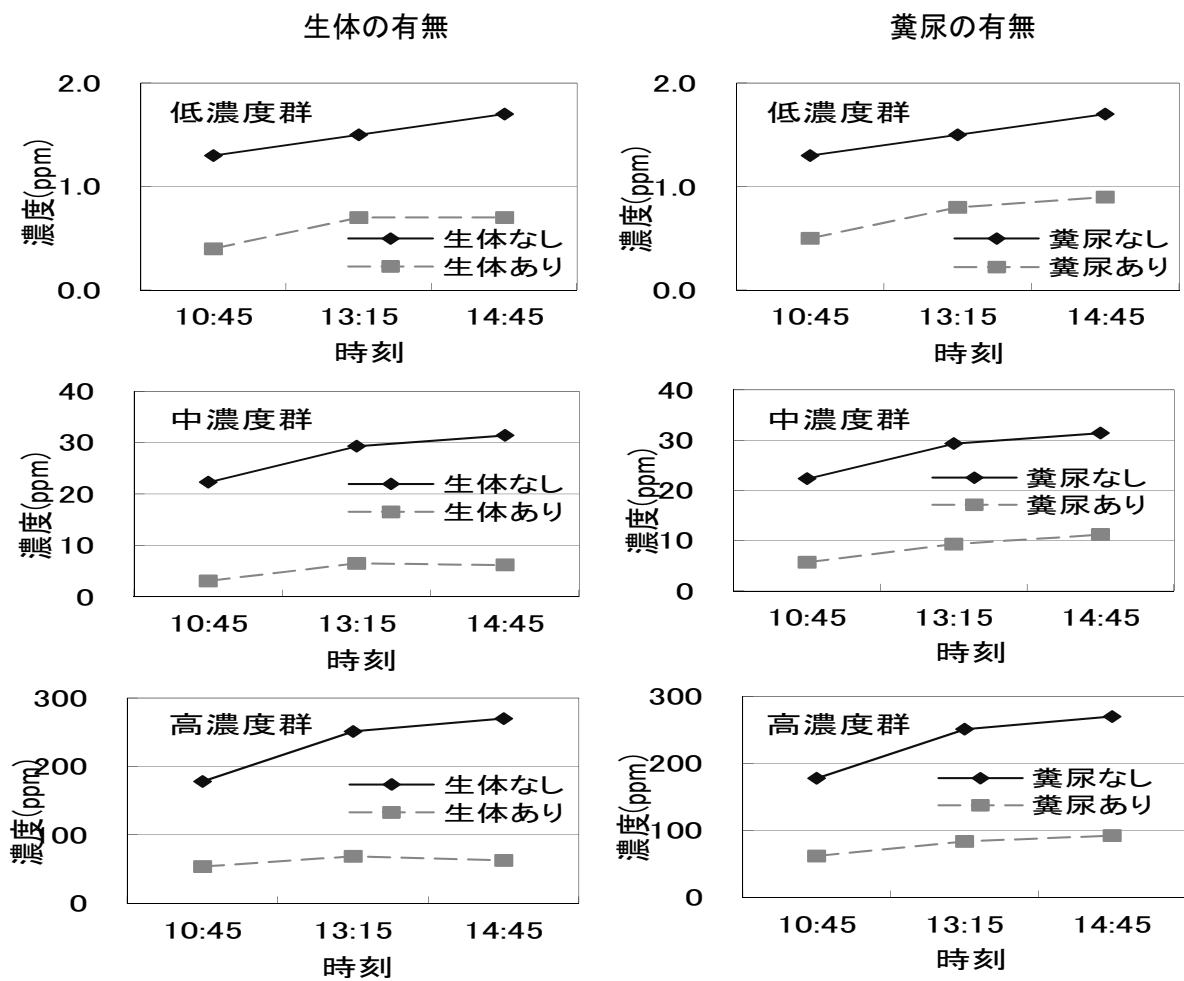


図8 ラットの生体及び糞尿の有無によるチャンバー内ギ酸濃度の経時変化

各群、各条件における1日の平均濃度および平均のギ酸減少率を表7に示す。チャンバー内に設置した被験体ごとに比較すると、ギ酸の減少率は、低濃度群、中濃度群及び高濃度群ともに、生体>糞尿であった。また、低濃度群と中濃度群を比較すると、いずれの被験体においても、中濃度群の方が濃度の減少割合が大きかった。しかし、中濃度群と高濃度群とを比較すると、生体及び糞尿による減少割合は、高濃度群よりも中濃度群で大きかった。また、酢酸とギ酸の比較については、各ばく露群の目標濃度が、酢酸とギ酸で2倍異なるため、減少割合の数値そのものを比較することはできないが、酢酸よりもギ酸の方が減少が大きい傾向がみられた。

表7 ばく露チャンバー内のギ酸の1日平均濃度及び減少率

ばく露群 (ppm)	被験体の有無	被験体の種類	
		生体	糞尿
低濃度群	なし	1.5	1.5
	あり	0.6	0.8
被験体設置による ギ酸減少率(%)		-60.0	-46.7
中濃度群	なし	27.7	27.7
	あり	5.3	8.7
被験体設置による ギ酸減少率(%)		-80.9	-68.6
高濃度群	なし	233	233
	あり	62.0	79.4
被験体設置による ギ酸減少率(%)		-73.4	-65.9

生体：生きた6週齢ラット5匹、糞尿：6週齢ラット5匹の糞尿2日分、

IV 考察

平成24年度のばく露実験では、ばく露装置の条件設定をラットのいない状態で行い、チャンバー内の酢酸が目標濃度となるように調整した。しかし、その後に、ラットを入れたところ、チャンバー内濃度は目標濃度よりも低くなり、ばく露開始初日の中濃度群の有機酸類濃度は、酢酸が6.2 ppmで目標値(10 ppm)

表 8 有機酸類濃度の減少に対する呼吸、糞尿及び体毛への吸着の寄与

濃度減少割合(%)	生体	呼吸*	糞尿 B (5 時間分)	体毛 (生体-呼吸-糞尿 B)	糞尿 A (2 日分)
酢酸濃度減少の要因					
低濃度群	38.7	15.3	3.8	19.6	36.6
中濃度群	46.0	15.3	5.3	25.4	51.2
ギ酸濃度減少の要因					
低濃度群	60.0	15.3	4.9	39.8	46.7
中濃度群	80.9	15.3	7.1	58.5	68.6
高濃度群	73.4	15.3	6.9	51.2	65.9

* ラット 1 匹の呼吸量 0.2 L/min、チャンバー容積 53 L、換気回数 7.4 回/h として算出

の 62%、ギ酸が 1.7 ppm で目標値 (5ppm) の 34%であった。そこで、平成 25 年度及び平成 26 年度には、ばく露実験開始前に、ラットを入れることによる濃度減少の要因を検討した。検討の結果、得られた糞尿への吸着及びラットの呼吸による有機酸類濃度の割合より、体表への吸着割合を試算し、各要因の寄与について表 8 にまとめた。

呼吸による濃度減少割合は、ラット 1 匹の呼吸量を 0.2 L/min とし、チャンバー容積 (53L)、換気回数 7.4 回/h より算出した。また、体毛への吸着による有機酸類濃度減少割合については、以下のように算出した。まず、糞尿 2 日分を用いた実験から求めた有機酸類濃度減少割合 (糞尿 A) を 48 時間分の糞尿によるものとし、その値から、ばく露を行った 5 時間分の糞尿による減少割合を算出し (糞尿 B)、次に、生体を入れたことによる濃度減少割合から、呼吸及び糞尿 B の減少割合を差し引いて求めた。

生体による有機酸類濃度減少の要因を、①呼吸による吸収、②体毛への吸着、③糞尿への吸着の 3 つに分けた場合、①呼吸による減少及び②体毛への吸着はラットを入れた直後から一定の割合で濃度減少に寄与すると考えられる。

一方、③糞尿への吸着については、朝、チャンバー内を清掃した後にはばく露を開始するため、糞尿が無い状態からスタートし、夕方のばく露終了時まで、糞尿が継続的に蓄積される。しかし、今回の試算では、5 時間分の糞尿がばく露開始時から、チャンバー内に蓄積されていたという仮定で計算を行ったため、実際よりも、糞尿の寄与が大きめに見積もられている可能性がある。

表 8 より、酢酸については、生体を入れたことによる濃度減少割合は、低濃度群は 38.7%、中濃度群では 46.0%であり、この濃度減少への各要因の寄与の大き

さは、②体毛への吸着>①呼吸による吸収>糞尿への吸着の順と考えられ、低濃度群及び中濃度群ともに、酢酸濃度減少割合の約 1/2 が、体毛への吸着によるものであると推察された。

また、ギ酸については、生体を入れたことによる濃度減少割合は、低濃度群は 60.0%、中濃度群では 80.9%、高濃度群では 73.4%であり、この濃度減少への各要因の寄与の大きさは、②体毛への吸着>①呼吸による吸収>糞尿への吸着の順と、酢酸と同様で、低濃度群、中濃度群及び高濃度群ともに、ギ酸濃度減少割合の約 2/3 が、体毛への吸着によるものであったと推察される。

なお、ギ酸ばく露において、生体を入れたことによる濃度減少は、中濃度群 (80.9%) よりも、高濃度群 (73.4%) の方が少なかった。その原因としては、ラットの呼吸による減少分を 15.3%としているが、チャンバー内が 50 ppm 以上の高濃度であるため、吸気中のギ酸が全てラットの体内に吸収されるのではなく、吸収率の低下により、呼気にギ酸が含まれていた可能性があること、また、体毛へのギ酸の吸着が、比較的短時間で飽和してしまったことなどが考えられる。

また、ギ酸と酢酸を比較すると、体毛や糞尿への吸着割合は酢酸に比べギ酸の方が大きかった。ギ酸、酢酸ともに水と任意に混和し³⁾、水への溶解度に差はないことから、糞尿中の水分への溶解はギ酸、酢酸で同程度と考えられた。しかし、アンモニアなどの塩基性物質との反応性は、酢酸に比べてギ酸の方が高いことから²⁾、ギ酸は糞尿や体毛から発生したアンモニアと反応してギ酸アンモニウムに変化し易く、そのために減少割合が高くなると推察される。

生体及び糞尿の有無によるチャンバー内の有機酸類濃度の経時変化では、被験体を設置していない対照のチャンバーにおいても、朝から夕方にかけて、徐々に有機酸類濃度が増加していた。チャンバーの換気回数が 7.4 回/h であったことから考えると、ばく露開始後 1 時間程度でチャンバー内の濃度はほぼ平衡に達すると考えられるが³⁾、夕方になっても濃度の上昇がみられた主な理由としては、樹脂製のチャンバー容器へのギ酸、酢酸の吸着が主な要因と思われる。

今回の検討結果より、有機酸類を含めて、ガス状物質のばく露実験開始前に、チャンバー内濃度を調整する動物を入れた状態で、目標濃度になるよう調整することが不可欠であることがわかった。