

今後の研究計画(案)について

東京都福祉保健局 健康安全部 環境保健衛生課

東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 環境衛生研究科
生体影響研究科

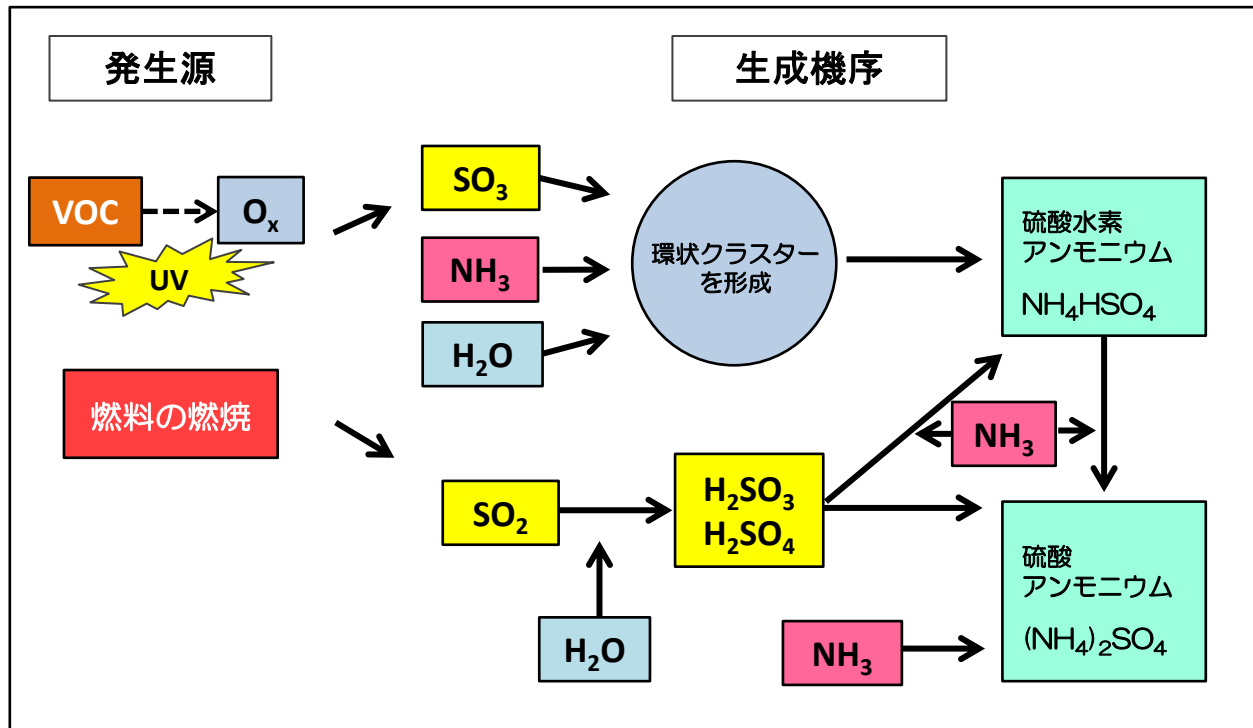
今後の基礎的実験的研究(案)について

◆目的

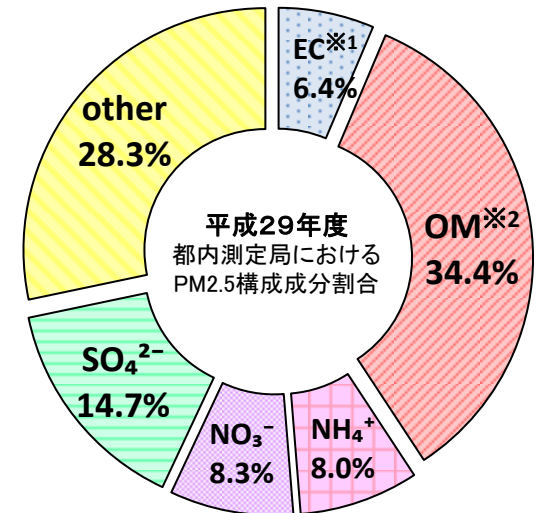
PM中に含まれる硫酸水素アンモニウムについて、その健康影響を解明するため、大気中実態調査やばく露実験を行い、その健康影響について調査する。

◆硫酸水素アンモニウム(NH₄HSO₄)

酸性硫酸アンモニウムとも呼ばれる。PM中に含まれるアンモニウム塩の1種。



都内のPM2.5成分の構成割合



東京都環境局 平成30年度第3回大気中微小粒子状物質検討会資料より作成

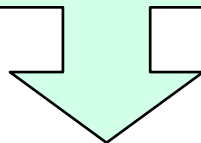
※1 元素状炭素 (Elemental Carbon:EC)

※2 有機物 (Organic Matter:OM)

有機炭素(OC)に1.7を乗じて算出した。

◆現状

- ・平成29年度はPM2.5の主要成分中、硫酸イオンが14.7%であった。
- ・硫酸水素アンモニウム生成を促進する物質である光化学オキシダントは、平成29年度都内全測定局において、環境基準を達成していない。
- ・平成29年度の都内PM2.5の環境基準達成率は、一般局で87%、自排局では79%であった。
- ・SO₂は、平成29年度都内全測定局において、環境基準を達成している。
(平成29年度平均濃度 一般局:0.001ppm 自排局:0.002ppm)
- ・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測するための指標となることが示唆されている。都内におい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が、その実態は不明である。



◆研究結果の活用

- ・都内における硫酸水素アンモニウム濃度や生体への影響を明らかにする。これにより、大気汚染物質とぜん息への健康影響を調査・検討し、都民の健康確保を図るための施策に反映させる。

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

- 平成29年度の都内大気PM2.5の実態調査において、硫酸水素アンモニウムを分別定量する方法を開発した。
- 平成29年度の都内大気PM2.5の実態調査で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、硫酸水素アンモニウムと黄砂の関連が推察される。
- 正常ラットやぜん息モデルマウスに対して、大気環境レベルの濃度で3日間連続ばく露を行い、気道抵抗等の各項目を調べたが、影響は見られなかった。(Casseeら、Report of National institute of Public Health and the Environment (RIVM),1999, Report No.650010010、Inhal. Toxicol., 2002, vol.14, p1215-29)
- 環境中ワーストケース及び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。(Utellら、Am. Rev. Respir. Dis. 1983 , vol.128, p444-50.)

硫酸水素アンモニウムについて分かっていないこと

- 培養細胞への気相ばく露、液相ばく露実験のデータはこれまでにない。
- 実験動物を用いた報告例は少なく、ぜん息モデルを用いた評価は不十分である。
- 動物実験や培養細胞による詳細な解析が行われておらず、ぜん息症状の増悪メカニズムは不明である。
- 許容濃度、管理濃度が未設定である。

調査・研究計画概要

生体影響調査及び分析を4か年で行う方向で検討。

1 培養細胞ばく露実験

1年目から3年目にかけて、ヒト肺上皮由来A549細胞及びヒト気管支上皮由来Calu-3細胞へ硫酸水素アンモニウムをばく露し、その影響について検討する。

2 都内大気PM中硫酸水素アンモニウムの連続測定

4年目に硫酸水素アンモニウムの連続測定を行い、大気PM中濃度と気象や黄砂との関連を解析する。

3 動物ばく露実験

2年目に正常マウスを用いて硫酸水素アンモニウムの吸入ばく露試験を行う。3年目、4年目にぜん息モデルマウスに対して硫酸水素アンモニウムをばく露し、ぜん息症状が増悪するかどうかについて検討する。

調査・研究スケジュール(案)

実施内容		1年目	2年目	3年目	4年目
生体影響調査	培養細胞ばく露	気相ばく露条件の検討			
		ヒト肺胞上皮由来 (A549)細胞	液相ばく露試験	気相ばく露試験	
			感受性を高めた細胞の液相ばく露試験		
			酸化ストレス能の測定		
	ヒト気管支上皮由来 (Calu-3)細胞		液相ばく露試験	気相ばく露試験	
		細胞膜間結合力の測定			
動物ばく露	硫酸水素アンモニウム吸入ばく露試験		正常マウスへのばく露		
				ぜん息モデルマウスへのばく露(予備実験)	
					ぜん息モデルマウスへのばく露(本実験)
分析	都内大気PM中の硫酸水素アンモニウム測定・成分分析			大気PM中の連続測定 ← 大気の採取 → ← 分析 →	
					報告書のまとめ

今後の研究計画(案)

硫酸水素アンモニウムの
培養細胞ばく露実験

硫酸水素アンモニウムばく露実験

目的

PM2.5の成分の1つである硫酸水素アンモニウムの培養細胞への影響を調べる。

実験計画(案)

- 気相ばく露条件の検討
- A549細胞及びCalu-3細胞への(気相、液相)ばく露実験
- 酸化ストレス能(細胞内ROS*)の測定
- 感受性を高めたA549細胞への液相ばく露実験
- Calu-3細胞の細胞膜間結合力の変化の測定

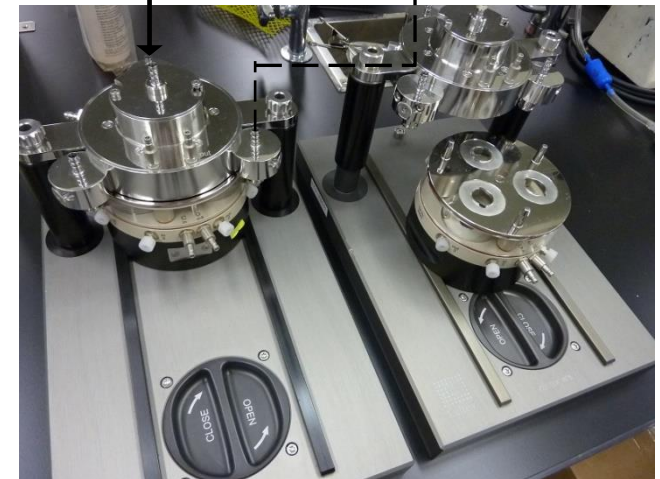
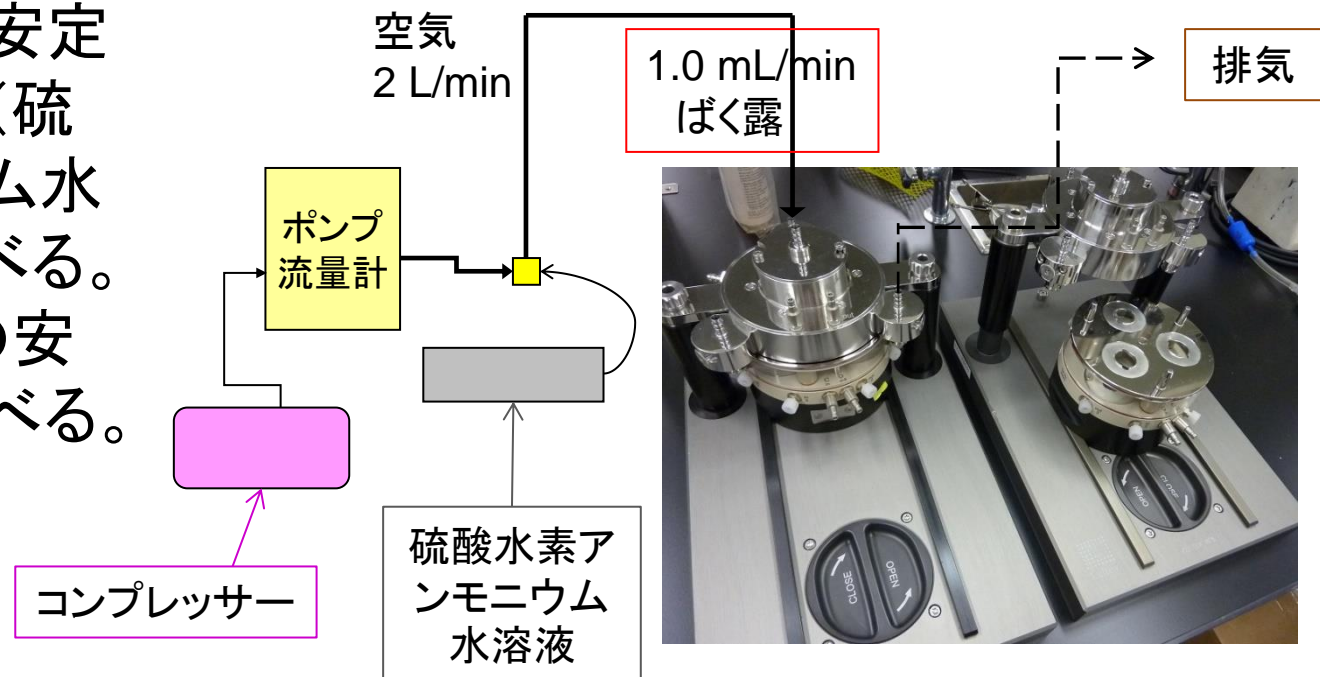
*ROS: 活性酸素種
(Reactive Oxygen Species)

気相ばく露条件の検討

- ・硫酸水素アンモニウムの気相濃度設定等、安定したばく露条件を検討する

気相ばく露装置模式図

気相ばく露濃度(1、10、100 mg/m³)を安定に発生できる条件(硫酸水素アンモニウム水溶液濃度等)を調べる。またばく露濃度の安定性についても調べる。



培養細胞ばく露装置
Cultex® RFS

A549細胞及びCalu-3細胞への (気相、液相)ばく露実験

実験条件-1	
ばく露方法	気相ばく露 1.0 mL/min
培養細胞	ヒト肺上皮由来A549細胞、 ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度	1、10、100 mg/m ³ 、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	ヒト肺上皮由来A549細胞、 ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度	0.001、0.01、0.1、1 mg/mL、精製水
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、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6 その他
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)、細胞内ROS(液相のみ)

酸化ストレス能(細胞内ROS)の測定

目的: 硫酸水素アンモニウムによる培養細胞への酸化ストレス能をより詳細に調べる(HO-1、GSHの結果の補完)

方法: 硫酸水素アンモニウムを液相ばく露したA549細胞内ROS*を定量する

酸化ストレス

ROS発生

ROSを試薬を用いて測定

*ROS(活性酸素種)

ROSとは、酸素分子(O_2)に由来する反応性に富む一群の分子群の総称。 O_3 、 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ などが含まれ、生体内に存在するスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素がその代謝に関与する。HO-1及びGSHは、こうしたROSの作用により増加する因子。従ってROSを測定することで、より直接的な酸化ストレスの測定が可能。

(羊土社 実験医学を改変)

感受性を高めたA549細胞への液相ばく露実験

目的: 感受性を高めたA549細胞へ硫酸水素アンモニウムを液相ばく露し、炎症への影響を調べる

方法: IL-1 β を反応させて感受性を高めたA549細胞を作成し、その細胞へ硫酸水素アンモニウムを液相ばく露して炎症因子(IL-8、IL-6、他)等の変化を調べる

A549細胞へIL-1 β を反応させると、IL-8やIL-6等の炎症因子が上昇
→感受性を高めた(ぜん息様状態)A549細胞

硫酸水素アンモニウムを液相ばく露し、炎症等が増悪するか調べる

Calu-3細胞の細胞膜間結合力の变化を測定

目的: 硫酸水素アンモニウムが細胞膜間結合力へ及ぼす影響を調べる

電気抵抗値測定システム

方法: 液相ばく露によるCalu-3細胞の細胞膜間結合力の变化を電気抵抗値の測定等で観察する



Calu-3細胞は細胞膜間結合力(タイトジャンクション)が強い特徴を持つ

細胞膜間結合力が弱まると、化合物が細胞間を通過し、基底膜、結合組織まで浸透し、より深部までダメージを及ぼす

電気抵抗値を測定することにより、細胞への傷害性が測定可能

細胞膜間の模式図

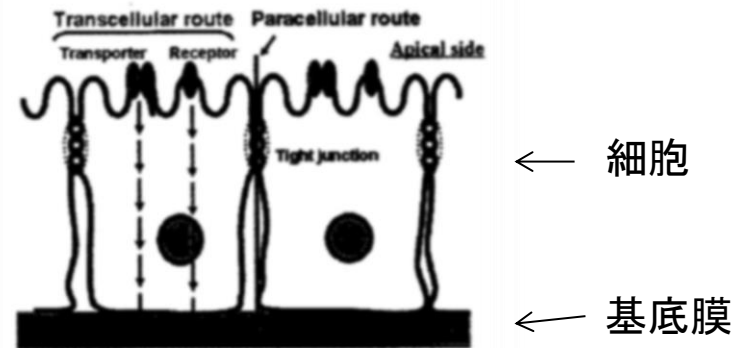


Fig. 1. Schematic Scheme of Transport Route in Epithelia

今後の研究計画(案)

都内大気PM中硫酸水素アンモ
ニウムの連続測定

• 目的

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

• 大気調査の特徴

- 1年間(7日間×52回連続)、大気を採取
- 測定地点は、健康安全研究センター1か所
- PM2.5に加え、粒径が $2.5\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ の粒子についても測定を行う

平成29年度の大気調査結果

—PM2.5中硫酸水素アンモニウム—

濃度($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	平成29年5月	平成29年6月	平成30年2月	平成30年3月
一般局平均	0.53	0.44¹⁾	0.77¹⁾	0.69
中野区若宮	0.65	nd	nd	0.42
町田市金森	0.48	0.88	0.96	0.74
中央区晴海	0.46	0.33	1.3	0.92
自排局平均	0.53	0.25¹⁾	0.51	0.46¹⁾
京葉道路亀戸	0.39	0.20	0.30	0.68
日光街道梅島	0.45	nd	0.49	0.59
環七通り松原橋	0.76	0.44	0.75	nd

1) 平均は、ndに定量下限値($0.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$)の1/2を代入して算出

- ・硫酸水素アンモニウムは、平成29年5月及び6月、平成30年2月及び3月のみ検出
- ・気象庁の目視の観測では、大気採取期間中に黄砂は観測されなかったが、ライダーによる観測では、5月、2月及び3月に、わずかな量が観測されていた
→硫酸水素アンモニウムは黄砂の影響を受けている可能性

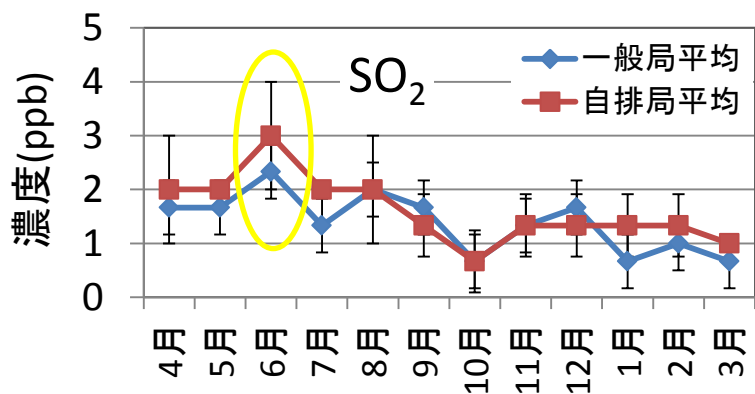
硫酸水素アンモニウムが検出された月の 黄砂観測状況

	平成29年5月	平成29年6月	平成30年2月	平成30年3月
大気採取期間	5月25日～ 6月1日	6月22日～ 6月29日	2月21日～ 2月28日	3月15日～ 3月22日
ライダー*による 黄砂観測日時 (濃度)	5月30日 1時～21時 ($>0.1 \text{ mg/mm}^3$)	黄砂は観測 されず	2月24日 11時～21時 ($>0.1 \text{ mg/mm}^3$)	3月15日 0時～4時 9時～21時 ($>0.1 \text{ mg/mm}^3$) 3月16日 19時 ($>0.1 \text{ mg/mm}^3$)

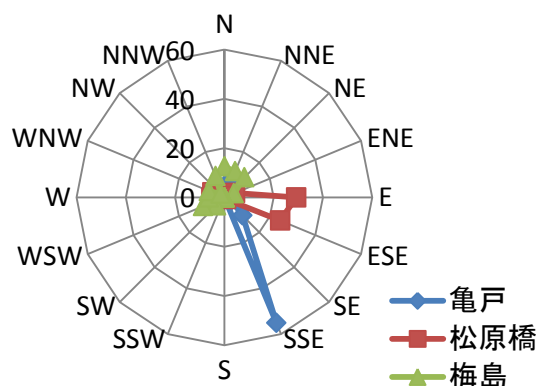
*:レーザー光を用いたレーザーで、上空を通過する黄砂をリアルタイムで計測できる機器

- ・硫酸水素アンモニウムが検出された月は、10時間～21時間の黄砂飛来があった
- ・黄砂は4月にも観測されていたが、硫酸水素アンモニウムは検出されなかった
→4月の黄砂飛来時間が6時間と短かったことが原因と推察される

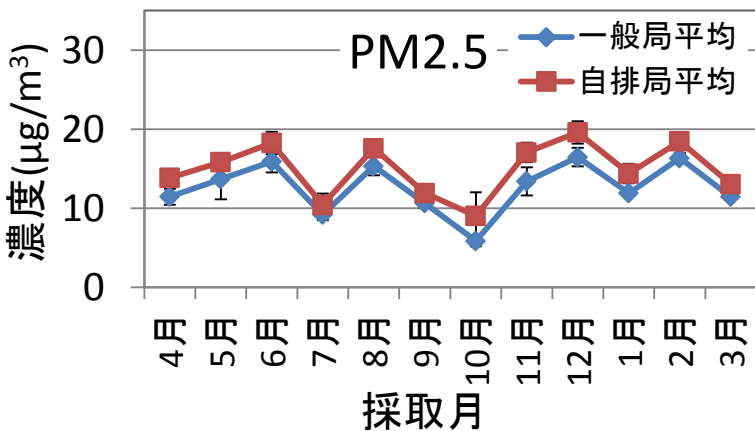
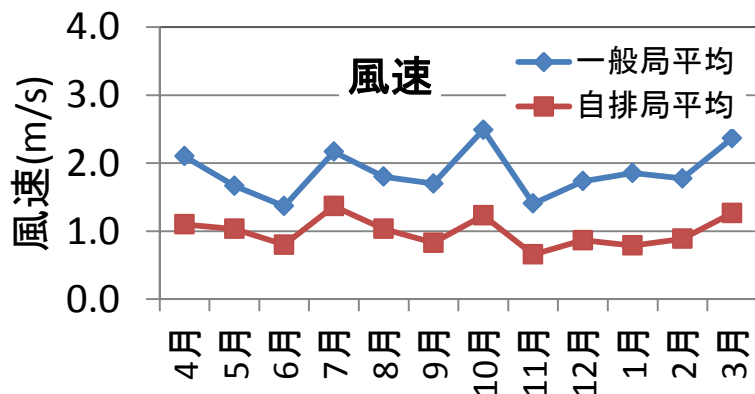
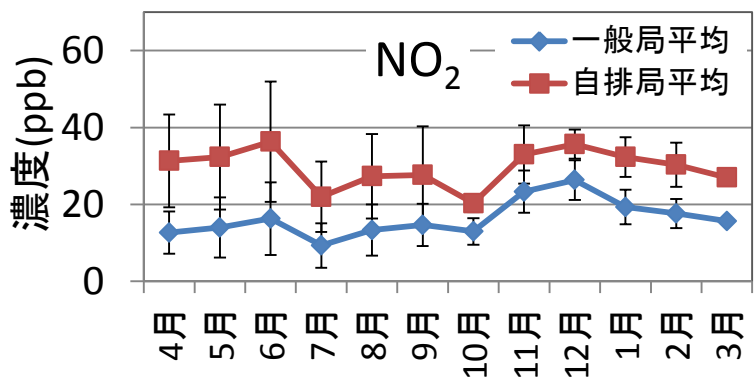
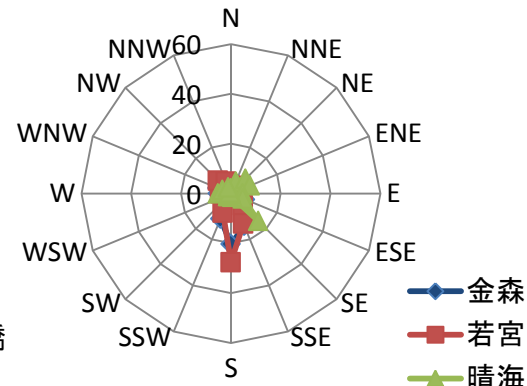
6月に検出された硫酸水素アンモニウムに関する考察



自排局 風向(6月)



一般局 風向(6月)



採取月

- ・SO₂濃度は6月が最大。一方、NO₂及びPM2.5は、6月以外に12月にも濃度が高まる傾向
 - ・各測定局の6月風向は南～東が卓越風、風速は弱かった
- 6月のSO₂は、自動車排ガス以外の寄与か？

大気PM中硫酸水素アンモニウム 調査の概要

- 採取場所 東京都健康安全研究センター
- 大気採取期間 1年間(7日間×52回連続)
- 採取方法
採取装置 3段インパクター(n=2)
(NWPS-35H、柴田科学製)

粒径範囲(カット特性) 上段:10 μm 以上(100%カット)、

中段:2.5~10 μm (50%カット)、下段:2.5 μm 以下

黄砂
(粒径4 μm)



フィルター 石英繊維フィルター

→7日間毎にインパクターを交換し、52回連続して採取
測定対象 硫酸水素アンモニウム、硫酸アンモニウム

今後の研究計画(案)

硫酸水素アンモニウムの
マウス吸入ばく露試験

目的

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。

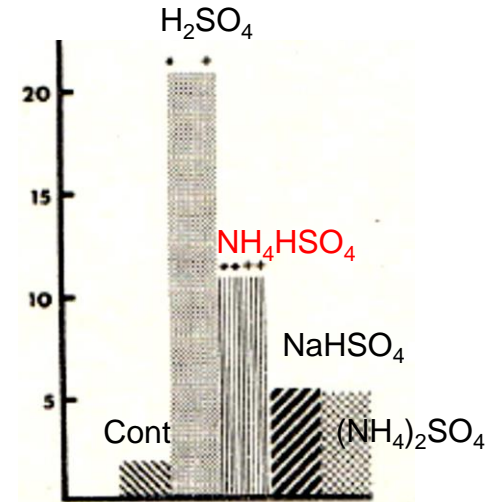
●硫酸水素アンモニウムに関する過去の報告

- ・ラットに対するオキシダント(O_3)との混合ばく露による気道や肺組織への障害作用 (Mautz *et al.*, 2001)
- ・肺のクリアランス機能の低下 (Schlesinger 1989)
- ・ぜん息患者に対する気道コンダクタンスの低下 (Utell *et al.* 1983)

●硫酸水素アンモニウムは、硫酸アンモニウムより強い作用を及ぼすことが示唆されている。

(刺激性, コンダクタンスの低下, クリアランス)

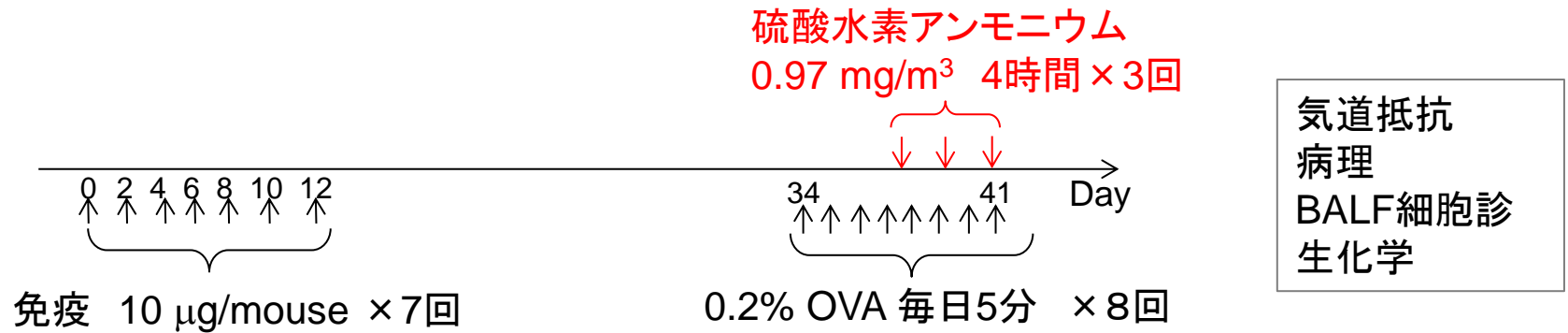
硫酸 > 硫酸水素アンモニウム > 硫酸アンモニウム > 硫酸ナトリウム



1mg/m³ 16分ばく露後の気道コンダクタンスの変化 (%) (Utell *et al.*, 1983)

●ぜん息モデル動物を用いた実験はほとんど無く、詳細な検討が行われていない。

ぜん息モデルマウスを用いた動物実験 (Cassee *et al.* 1999)



⇒ばく露による増悪は認められなかった。

ばく露群で血中IgEの濃度がわずかに変化したのみ。

硫酸塩がぜん息を増悪するメカニズムについて提唱される仮説

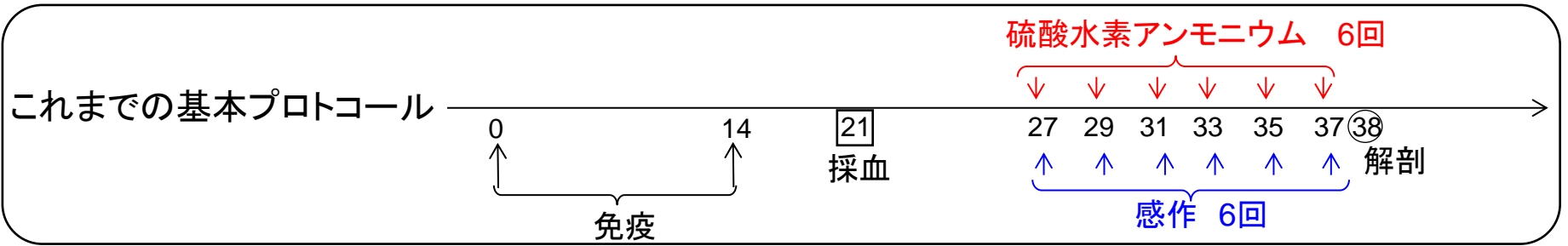
- 酸性のエアロゾルばく露によりプロトンが平滑筋に作用し収縮を引き起こす。
- 気道上皮への障害がアレルゲン等の取り込みを高める。
- 呼吸器のクリアランス作用を低下させる。

研究計画(案)

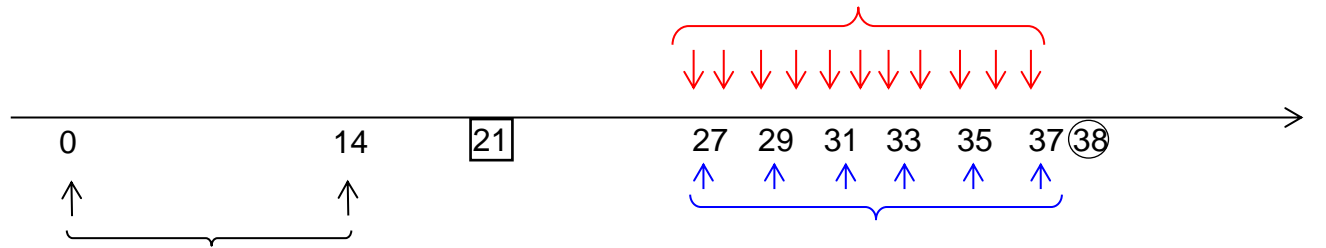
過去の報告や昨年度までの硫酸アンモニウムの結果をふまえ、**ばく露プロトコールと剖検のタイミング**(ばく露直後の影響も検討)に注意して、実験を行う。

	2年目	3年目	4年目
内容	正常マウスへの硫酸水素アンモニウムばく露	ぜん息モデルマウスへの硫酸水素アンモニウムばく露	ぜん息モデルマウスへの硫酸水素アンモニウムばく露
目的	ばく露濃度・粒子径の把握 正常マウスに対する毒性を調べる	ばく露プロトコールを検討する (予備試験)	ぜん息の増悪を調べる (本試験)
期間・規模	2週間～1か月間(28日間)	2週間程度	2週間程度
	1群最大16匹	1群8匹程度	1群最大16匹
主な分析項目	一般毒性及び呼吸器毒性 体重・臓器重量等 病理組織学的解析 生化学的解析・・・LDH、ROS、総タンパク質 免疫学的解析・・・リンパ球のサブセット、ぜん息関連遺伝子の発現 気道抵抗		

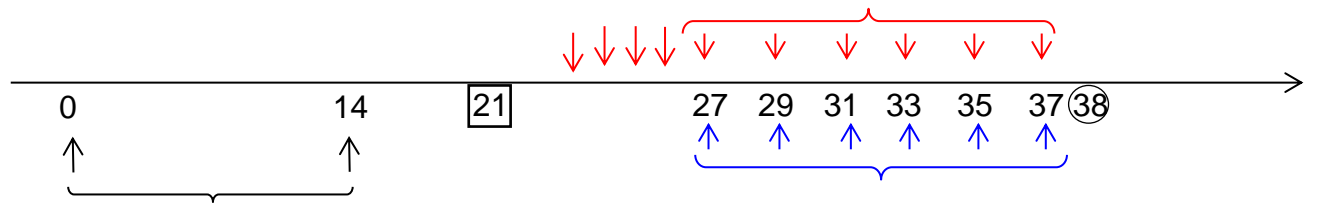
3年目のばく露プロトコール検討



① ばく露頻度を増やす



② 事前にはく露を開始する



③ 免疫の際にもばく露する

