

1 研究従事者

松下秀鶴（富士常葉大学）、雨谷敬史（静岡県立大学）、遠藤 治（国立公衆衛生院）、
高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所）、新田裕史（国立環境研究所）、
根津豊彦（財）日本環境衛生センター）、松村年郎（国立医薬品食品衛生研究所）、
松本 寛（北海道環境科学研究センター）、安枝 浩（国立相模原病院）

2 平成 12 年度の研究目的

近年、生活環境中の粒子状物質、特に粒径 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の大気浮遊微粒子（PM2.5）の呼吸・循環器系への影響に大きな社会的関心が、国内的にも国際的にも寄せられつつある。しかし、我が国における生活環境空気中の PM2.5 の存在実態や、それに含まれる各種有害成分の定量的存在実態には不明な点が多く、曝露アセスメントを精度よく行う際の障害となっている。また、空気中のアレルゲン粒子の実態解明はアレルギー対策の基礎資料として極めて重要である。そこで、第 5 期研究の初年度にあたる本年度は、第 4 期研究の成果の上に立って、次の研究を行うことを目的とする。

1) PM2.5 個人曝露計測手法並びにフタル酸エステル等の有害成分に対する高感度簡易分析法の開発と分析マニュアルの作成

新たに PM2.5 個人曝露計測手法として、個人の装着・携帯に適したサンプリングシステムの検討を行った。また、有害成分の高感度簡易分析法の開発は、フタル酸エステルを中心に行う。

このほか、第 4 期研究で開発した分析法に関しては、広く環境モニタリングに役立てるべく詳細なマニュアルを作成する。

2) 空気中のアレルゲンのサンプリング、高感度計測法の開発とその信頼性の検討

新たに真菌を免疫化学的に高感度検出する手法の開発を試みると共に、PCI サンプラーによる気中浮遊真菌の捕集法の信頼性の検討などを行う。

3) 環境大気や室内空気の汚染実態調査

PCI サンプラー、ハイボリュームアンダーセンエアサンプラー等により捕集された浮遊粒子の粒径分布や、多環芳香族炭化水素、ニトロアレーン、変異原性等の測定・評価を通じて環境大気や室内空気の汚染実態の把握に努める。

3 平成 12 年度の研究の対象及び方法

1) 研究対象

環境媒体：一般環境大気、一般家庭の室内・室外空気

化学物質・アレルゲン等：PM2.5 及び各種粒径の浮遊粒子、多環芳香族炭化水素（PAH）、ニトロアレーン、有機リン化合物、フタル酸エステル類、変異原性、アレルゲンとして重要視されている 5 属の真菌

2) 研究方法

(1) PM2.5 個人曝露計測手法並びにフタル酸エステル等の有害成分に対する高感度簡易分析法の開発

と分析マニュアルの作成

・PM2.5の個人暴露計測法の開発

個人の携帯に適し、かつ正確にPM2.5を捕集しうるサンプリング系を開発するために、メーカーと協力してサンプラーを試作し、その性能を実地に評価することを繰り返し、信頼性の高い個人サンプラーの作成を試みつつある。

・有害化学成分の高感度簡易分析法の開発

空気中のフタル酸エステル類を粒子状とガス状に分別捕集し、GC/MS法で分離分析する方法を開発し、一層の高感度化に必要な今後の課題等を明らかにした。また、昨年度までの研究成果の上に、有機リン化合物12種のGC/FPD法による分離分析法の定量下限や信頼性を調べた。

・分析マニュアルの作成

広く環境モニタリングの役に立てるために、第4期研究において開発した浮遊粒子中の有害成分(PAH、ニトロアレーン、有機リン化合物、重金属元素類及び変異原性)の高感度分析法に関して、マニュアルを作成した。

(2) 空気中のアレルゲンのサンプリング、高感度計測法の開発とその信頼性の検討

・真菌の免疫化学的検出法の開発

アレルゲンとして代表的なアスペルギルス、アルテルナリア、クラドスポリウム、ペニシリウム及びカンジダの5属の真菌を対象として、代表的な菌株の培養濾液から細胞外多糖体(extracellular polysaccharide、以下EPS)を調製した。各EPSでウサギを免疫し、得られたウサギ抗血清を用いてELISAによる各EPS測定系を作成し、その性能を評価し、さらなる高感度化の検討を行いつつある。

・PCIサンプラーによる室内空気中の真菌測定法の評価

PCIサンプラー(10 μ m以上、2.5~10 μ m、2.5 μ m以下に3分級)を用いて室内空気中の真菌測定を、1回につき連続7日間、2000年9月~2001年1月の5ヶ月間に亘って行い、各段に分級捕集された真菌数を培養法で、真菌細胞の大きさや形状を直接法で調べ、これらの結果からPCIサンプラーによる真菌細胞捕集測定手法の評価を行った。

・真菌細胞内蛋白定量

生活環境中の主要真菌であるアスペルギルス、ペニシリウム、クラドスポリウムなど37株を前培養し、孢子液を調製した。この孢子をガラスビーズ衝撃法により細胞破碎し、全細胞中の蛋白量をピロガロールレッド・モリブデン錯体発色法によるプロテインアッセイラピッドキット(和光純薬)により定量した。

(3) 環境大気や室内空気の汚染実態調査

・PAH

札幌市及び室蘭市では、非暖房期における PAH 室内・室外濃度、東京都 23 区内では一般家庭の 8 ~ 12 月における PAH 室内・室外濃度、清水市では夏期及び冬期における一般環境及び一般家庭の PAH 室内・室外濃度の調査を行った。

また、東京都港区でハイボリュームアンダーセンサンプラー（5 段階分級）とロープレッシャーインパクター（12 段階分級）で捕集された浮遊粒子中の PAH を測定し、PAH の粒径分布を調べた。

.ニトロアレーン

2000 年 7 ~ 11 月に札幌市（商業都市）及び室蘭市（工業都市）の一般家庭の室内と室外で浮遊粒子を CI サンプラー(25 /min)で分級捕集し、その中のニトロアレーン 4 種を HPLC 法で分離分析した。

また、一般環境中のニトロアレーンの粒径分布調査は、札幌市の住居地域においてハイボリュームアンダーセンサンプラーで捕集した試料を用いて行った。

.変異原性

2000 年 11 月、東京都港区でハイボリュームアンダーセンサンプラーで 5 段階に分級捕集された大気浮遊粒子から変異原を溶剤抽出し、その変異原性をサルモネラ菌 YG1024 (+S9 及び-S9) を用いるマイクロサスペンション法で調べ、変異原性の粒径分布を求めた。

4 平成 12 年度の研究成果

1) PM2.5 個人暴露計測手法ならびにフタル酸エステル等の有害成分に対する高感度簡易分析法の開発と分析マニュアルの作成

. PM2.5 個人暴露計測手法の開発に関する研究

第 4 期研究において、我々は低騒音のカスケード インパクター（以下 CI サンプラーという）(25 /min) とパーソナル カスケード インパクター（以下 PCI サンプラーという）(3 /min) をメーカーと協力して開発し、環境大気や一般家庭の室内・室外空気中の浮遊粒子を 3 段階（10 μm 以上、2.5 ~ 10 μm、2.5 μm 以下）に分級捕集することを可能とした。

一方、日常生活は空気質を異にする様々な環境大気や室内環境の中で営まれている。したがって、このような日常生活に伴う浮遊微粒子や粒子状有害成分への暴露実態をより正確に求めるためには、1 人ひとりがサンプラーを一日中携帯し各人が生活する周辺空気中の浮遊粒子、特に粒径 2.5 μm 以下の微小粒子（PM2.5）を正確に捕集・計測しうるサンプラーの開発が不可欠である。

携帯型の個人暴露測定用サンプラーの必要条件は、被験者が 1 日又は数日間携帯しつづけてもよいと思うようなもので、かつ、サンプラーの携帯が被験者の日常活動の妨げにならないことである。したがって、この為のサンプラーとしては、小型、軽量、低騒音、優れた装着性、操作の簡易性、優れた正確性と再現性が要求される。

このようなサンプラーの作製を目指して、まず初めに直径 4.3cm、高さ 6.2cm、重さ 100g の携帯用サンプラーを作成した。このサンプラーを流量 2.5 /min で吸引すると、空気中の浮遊粒子を粒径 10 μm 以上、2.5 ~ 10 μm、2.5 μm 以下の 3 段に分級することが出来る。そこで、このサンプラーの再現性を調べる為にサンプラー 5 台を互いに近接した位置に設置して 24 時間サンプリングし、フィルターに捕集された浮遊粒子の量と空気吸引量とから浮遊粒子濃度を 5 台の各サンプラーについて求め、これらの値の変動を調べた。

大気汚染度の異なる日に6回、このような実験を繰返した結果、PM2.5の濃度は12.0 µg/ から81.5 µg/ の範囲にまたがるが、各濃度における測定値の変動係数は2.3%から10%と小さく、十分PM2.5への個人暴露実測定に使用可能であると判断された。なお、本サンプラーと先に作製したPCIサンプラーとの比較を行った結果、両サンプラーによるPM2.5濃度の値は10 µg/ レベルの低濃度を除くと、偏差5%以内と極めて良好な一致を示した。

なお、10 µm 以上や2.5~10 µm の浮遊粒子濃度の再現性は濃度が15 µg/ 以下の場合が多かったため、PM2.5の場合より悪かった。

浮遊粒子濃度が低下すると再現性が低下する最も大きな原因は、質量測定時にフィルターに発生する静電気である。現在、一応の静電気除去手法を見出したものの、さらに優れた除去手法等を見出し、再現性の高い質量測定が出来るようにする予定である（使用した天秤の最小秤量値：1 µg）。

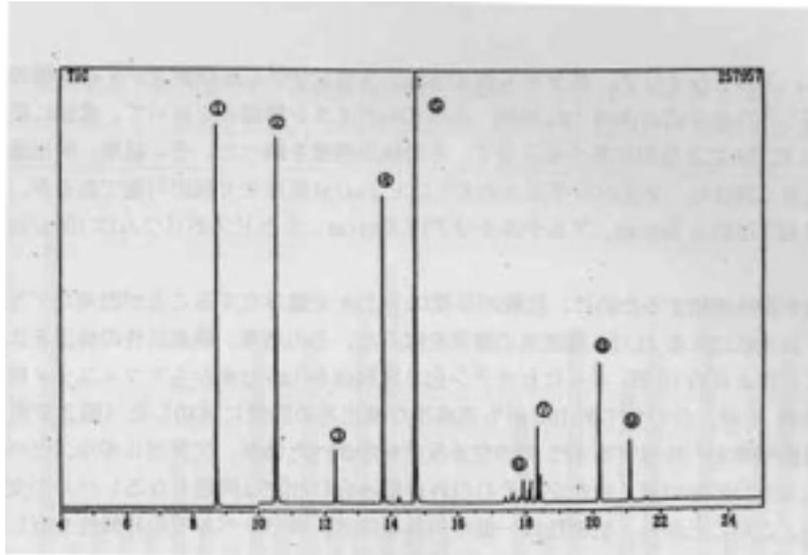
上記実験から、比較的容易に再現性の高い浮遊粒子濃度が得られるのはPM2.5についてであることが判った。これとPM2.5は有害性評価の観点からも重要であることや、装置をさらに小型化しうることなどを勘案して、PM2.5のみを測定する携帯用個人暴露サンプラーを作成し、現在、この性能や装着性等を検討中である。また、このサンプラーを動作させる小型ポンプも試作中である。これらの結果の総合評価を基に携帯用個人暴露サンプラーを作製する予定である。

・フタル酸エステル等の有害成分に対する高感度簡易分析法の開発

フタル酸エステルはプラスチックの可塑剤として大量に生産・使用されており、その中には内分泌攪乱作用の疑われるものも含まれている。例えば、環境省が環境庁時代に発表した内分泌攪乱作用が疑われる67物質のうちには、フタル酸エステルが5種類も含まれており、それらの我が国における生産量（1994年）はフタル酸ジ-2-エチルヘキシルで291,551トン、フタル酸ブチルベンジルで約3,000トン、フタル酸ジ-n-ブチルで17,033トン、フタル酸ジシクロヘキシルで1,000トン、フタル酸ジエチルで700トンと多い。これらフタル酸エステルの環境調査は主に水質と底質について行われており、大気についての調査は極めて少ない。この一因として分析法上の問題があると推察される。また、フタル酸エステルは大気中で粒子状とガス状の両状態で存在する可能性が高い。そこで、本研究ではフタル酸エステルを粒子状とガス状のものに分けて捕集し、これらを別々に高感度かつ簡易に分離分析する手法を検討した。

その結果、試料空気を毎分10の流量で直径47mmのガラス繊維フィルターとCarbon Diskフィルターに通し、前者で粒子状物質を、後者でガス状物質を捕集するサンプリング系を作成した。サンプリング時間は24時間である。これらのフィルターに捕集されたフタル酸エステルをジクロロメタン10を用いて超音波抽出し、その一定量（1）を分取し、内部標準溶液20 µ を添加した後、キャピラリーカラムを用いたGC/MSで分離分析すればよいことが判った。

本法により9種類のフタル酸エステルが分離分析されること、それらの定量下限は粒子状で0.2~8 ng/、ガス状で0.5~7 ng/ の範囲にあること、フタル酸エステルをさらに高感度かつ正確に定量するためにはフィルターに含まれる当該物質群の低減が不可欠であることなどを明らかにした。また、本法を予備的に室内調査に適用した結果、9物質とも検出されること、生産量の高いフタル酸ジブチルやフタル酸ジオクチルの室内濃度が高いことなどを認めた。参考のために、図1に本法によるガスクロマトグラムの1例と室内環境調査結果を示しておく。



保持時間 (分)

建築物	形態	室内濃度 (ng / m ³)								
		DMP	DEP	DAP	DisoBP	DBP	BBP	DHP	DOP	DNP
戸建て 新築	粒子状	1.4	3.9	8.0	6.3	1459.0	8.8	33.0	557.2	3.4
	ガス状	70.0	160.4	126.5	43.5	1.4	1.7	7.5	5.3	0.3
戸建て 中古	粒子状	1.4	26.3	34.1	30.5	2633.0	8.2	30.5	540.6	2.6
	ガス状	125.1	123.8	45.2	1.0	68.7	N.D.	N.D.	N.D.	0.5
戸建て 中古	粒子状	N.D.	0.6	2.9	0.2	94.1	5.2	25.4	194.5	N.D.
	ガス状	57.7	65.2	22.9	25.6	1042.0	1.0	7.3	31.1	1.0

図 1 . 本法によるフタル酸エステルクロマトグラムと室内調査結果の 1 例

- ①DMP:Dimethyl phthalate ②DEP:Diethyl phthalate ③DAP:Diallyl phthalate
 ④DisoBP:Di-iso-butyl phthalate ⑤DBP:Di -n- butyl phthalate ⑥BBP: Benzyl butyl phthalate
 ⑦DHP:Di -n- hexyl phthalate ⑧DOP:Di -n- octyl phthalate ⑨DNP:Dinonyl phthalate

．分析マニュアルの作成

第 4 期研究において開発した大気浮遊粒子に含まれる PAH、ニトロアレーン、有機リン化合物、重金属元素類、変異原性の高感度分析法について、広く環境モニタリングの役に立てるために、分析マニュアルを作成した。また、アレルゲンの計測に関して開発した手法もマニュアル化する予定である。

なお、分析マニュアルの作成に当っては分析精度等の精度管理にも十分配慮することとし、各班員は分担した有害化学物質の定量下限等を求めることが要求された。

例えば、この要請に従って本年度、有機リン化合物の分離分析に対する定量下限の調査が 12 種の有機リン化合物についてなされた。その結果、検量線の最小濃度の 7 回繰り返し測定結果から求めた標準偏差の 10 倍を定量下限とし、空気吸引量を 4.32 (3 /min × 24hrs) とすると定量下限は 1 ng/ 以下となることを見出した。

2) 空気中のアレルゲンのサンプリング、高感度計測法の開発とその信頼性の検討

．真菌の免疫化学的検出法の開発

真菌は、ダニやネコなどのアレルゲンと共に主要な室内環境アレルゲンであるが、その高感度計測手法は確立されていない。そこで、本研究では真菌アレルゲン高感度計測法確立の一環として、代表的な 5 属の真菌を研究対象とし、これらの EPS を ELISA 法で高感度測定する方法の検討を行った。

アスペルギルス、アルテルナリア、クラドスポリウム、ペニシリウム及びカンジダの5属の各真菌から得たEPSで免疫したウサギ抗血清のIgG分画、及びそのビオチン標識体を用いて、常法に従って比色法による sandwich ELISA による測定系を組み立て、その検出感度を調べた。その結果、検出感度は真菌の種類によって大きく異なり、アスペルギルスのEPSは0.1ng/程度まで検出可能であるが、ペニシリウムとカンジダのEPSは約0.5ng/、アルテルナリアは3ng/、クラドスポリウムは10ng/であることが判った。

そこで、検出法を高感度化するために、比較的早期にELISAを組み立てることが出来たアルテルナリアの系について、蛍光法によるELISA測定系の開発を試みた。その結果、酵素活性の検出を比色法から蛍光法に変えることにより約10倍、さらにビオチン化2次抗体をIgG分画からアフィニティ精製抗体に変えることにより約10倍、合わせて約100倍も高感度な検出系の開発に成功した(図2参照)。

また、5種の真菌が産生・放出するEPS間の交差反応性を調べた結果、アスペルギルスとペニシリウムの間には明確な交差反応性が見られたが、それ以外の組み合わせでは問題となるレベルの交差反応性は見られなかった。このことから、抗原性は一部の例外を除き、属のレベルでの特異性を有していることが判った。

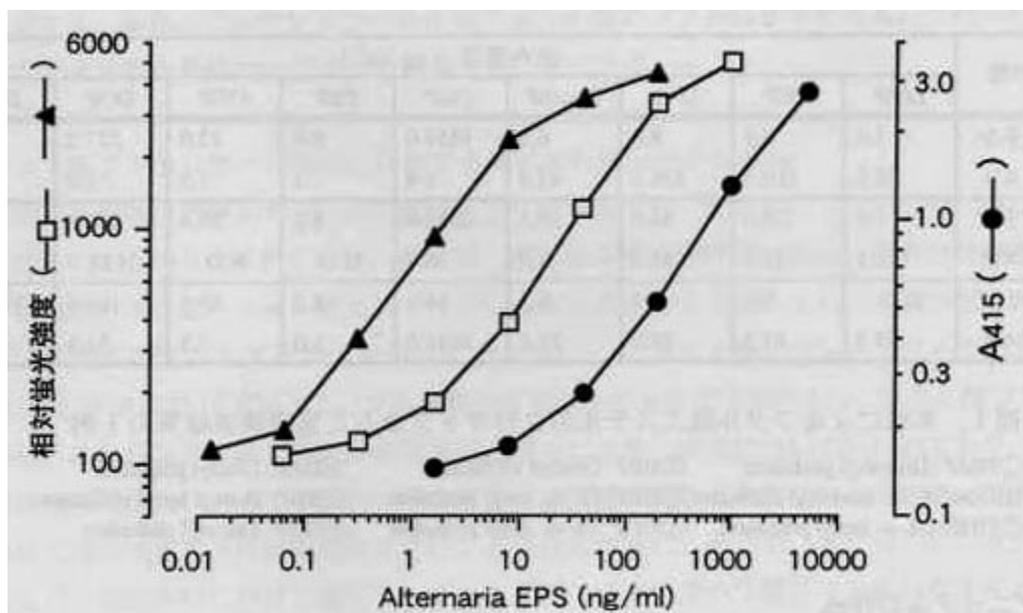


図2 . Alternaria EPS の ELISA における標準曲線

・ PCI サンプラーによる室内空気中の真菌測定法の評価

浮遊真菌のサンプリングシステム確立のために、PCI サンプラーを用い3 /min の流量で1回7日間ずつサンプリングし、粒径10μm以上(1層)、2.5~10μm(2層)、2.5μm以下(3層)の3種に分級捕集したフィルター中に存在する真菌数と真菌の大きさ、形状を調べた。その結果、真菌数は第1層>第2層>第3層の順となり、また、直接法で計測した真菌細胞の大きさはほぼ各層での捕集粒径と一致することから、PCI サンプラーは真菌計測手法の一環として有効であると判断された。

・ 真菌細胞内蛋白量の検討

真菌の主要アレルゲンは蛋白質成分である。そこで、真菌アレルゲン検索の手始めとして、生活環境空気中の主要真菌37株の孢子細胞中の蛋白質量を測定した。

その結果、図3に見られるように、蛋白質量は菌種や菌株によって 10～70 μg/10⁶ 胞子と大きく変化することが判った。今後さらに検討を進め、アレルゲンとして作用する蛋白成分の解明を試みる予定である。

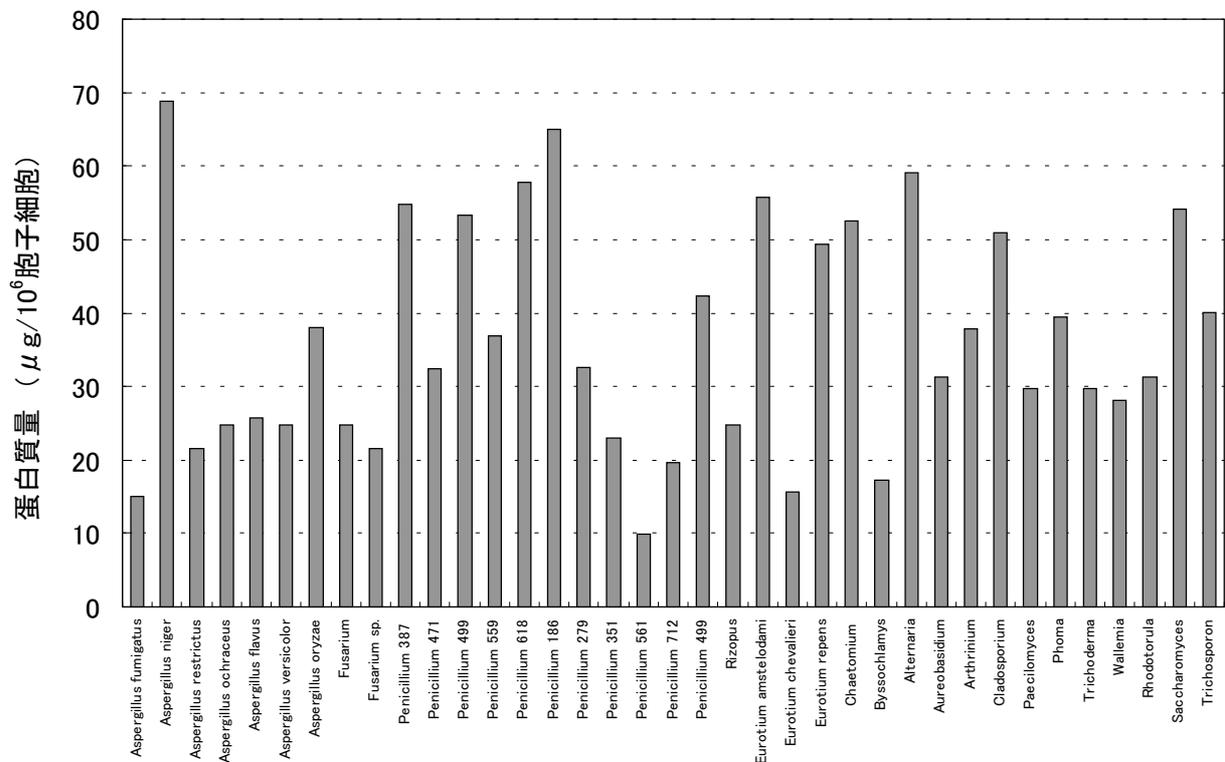


図3 . 真菌胞子細胞の蛋白質量

3) 環境大気や室内空気の汚染実態調査

・浮遊微小粒子濃度について

札幌・室蘭市の非暖房期及び清水市の夏期と冬期に一般家庭の室内・室外の浮遊粒子を CI 及び PCI サンプラーで3段階に分級捕集し、PM10、PM2.5 の濃度及び両濃度の比を求めた。その結果を表1に示す。表1には昨年度行った札幌・室蘭市の暖房期の調査結果も併せて記してある。

表1 . 一般家庭の室内・室外空気中のPM10、PM2.5 の濃度とそれらの割合

	札幌・室蘭市				清水市			
	暖房期		非暖房期		夏期		冬期	
調査時期	1999年12月～2000年2月		2000年7月～11月		2000年8月		2001年1月	
調査家庭数	12		11		21		18	
	室内	室外	室内	室外	室内	室外	室内	室外
PM10(μg/m ³)								
最大	280.0	52.4	29.7	101.3	106.0	109.0	97.7	130.0
最小	7.8	16.6	6.4	15.0	25.4	30.4	17.2	17.9
平均	56.2	28.0	16.7	30.6	63.0	66.5	63.3	69.5
PM2.5(μg/m ³)								
最大	270.9	31.2	22.8	70.5	76.6	67.8	75.4	96.8
最小	6.7	12.8	5.3	8.9	11.6	18.7	4.2	14.0
平均	51.1	20.7	13.6	21.0	40.9	44.1	40.2	43.9
PM2.5/PM10(%)								
平均	85	75	77	64	64	67	64	63

札幌・室蘭市の非暖房期の測定値を暖房期のそれと比較すると、室外濃度の平均値はほぼ同じか、や

や非暖房期の方が高いのに対して、室内濃度は逆に、暖房期の方が圧倒的に高いことが判る。この原因としては暖房期の調査では、喫煙家庭が約半数を占めていたのに対して非暖房期の調査には喫煙家庭が含まれていなかったことや、室内の密閉度が暖房期の方が非暖房期より著しく高いことなどがあげられる。また、非暖房期又は夏期の調査では札幌・室蘭市、清水市とも、室内のPM10、PM2.5の濃度は一般に、室外の値より低いことを認めた。これは調査時期では一般に窓の開放率が高いことと、室内には浮遊微小粒子を吸着する作用があることによると考えられる。

清水市の冬期の測定結果も夏期のそれと同様に室内のPM10、PM2.5の濃度は室外のそれより低く、かつPM10とPM2.5の平均濃度は夏期のそれとほぼ同等であった。これは清水市は気候温暖で冬期でも窓を開ける回数が多いことや、調査家庭の殆どは非喫煙家庭であったことによるものと推察された。

PM2.5のPM10又はSPMに対する比率は我が国の過去における大気中PM2.5濃度の大きかな推定に役立つものと考えられる。清水市の調査結果は室内・室外とも60数%であることを示しており、昨年の富士市の調査結果とほぼ一致している。しかし、札幌・室蘭地区に対する値は非暖房期の室外大気の数値は清水市と同等であったが、室内や暖房期の室外ではPM2.5がPM10の75～85%とかなり高い値を示していた。この原因についてはさらに詳細な検討が必要である。

・ PAH に関して

浮遊粒子に含まれるPAHの粒径分布調査は主にCIサンプラーとPCIサンプラーを用いて行われた。すなわち札幌・室蘭市では非暖房期に15家庭から得たCI試料を用いる4PAHの粒径分布調査、東京都23区内では22家庭から2000年9～12月に採取したPCI試料を用いる8PAHについての粒径分布調査、さらには清水市では2000年8月に21家庭から得たPCI試料による18PAHの粒径分布調査が行われた。その結果、凡ての調査とも、室内、室外空気中の浮遊粒子に含まれるPAHの粒径分布は、凡てのPAHについて、粒径2.5μm以下の粒子(PM2.5) >> 2.5～10μmの粒子 > 10μm以上の粒子の順となることを認めた。

PAHのより詳細な粒径分布調査は東京都港区で2000年11月、ハイボリュームアンダーセンサンプラー及びローボリュームインパクターにより、5段階及び12段階に分級捕集した環境大気試料についてなされた。その結果、測定した8PAHは凡て、粒径の小さな粒子に多く存在することを認めた。表2にその一例として、粒径1.1μm以下の粒子に含まれるPAHの全浮遊粒子に含まれる値に対する割合を示す。

表2．粒径1.1μm以下の大気浮遊粒子(PM1.1)、PAH濃度及び変異原比活性とこれらの全体に対する割合

	第1回(11月7～10日)		第2回(11月14～17日)		第1回(11月21～24日)	
	濃度	全体に対する割合(%)	濃度	全体に対する割合(%)	濃度	全体に対する割合(%)
PM1.1	9.0	24.4	21.1	37.9	16.1	55.2
Pyrene	0.447	63.0	0.508	73.1	0.415	69.5
BaA	0.357	84.4	0.344	81.7	0.240	81.6
BkF	0.236	84.9	0.248	84.9	0.146	83.0
BaP	0.536	85.6	0.567	85.5	0.324	83.5
DBahA	0.077	81.1	0.114	86.4	0.051	81.0
BbC	0.079	82.3	0.109	84.5	0.052	81.3
BghiP	0.851	84.3	0.818	84.9	0.545	83.8
DBaeP	0.058	79.5	0.109	85.2	0.045	84.9
変異原比活性 (YG1024)						
-S9	415	85.6	419	82.6	267	82.9
+S9	179	79.0	251	81.7	143	77.2

単位: PM1.1 μg/m³, PAH ng/m³, 変異原比活性 rev./m³

BaA: Benz(a)anthracene, BkF: Benzo(k)fluoranthene,
BaP: Benzo(a)pyrene, DBahA: Dibenz(a,h)anthracene,
BbC: Benzo(b)chrysene, BghiP: Benzo(ghi)perylene,
DBaeP: Dibenzo(a,e)pyrene

1.1 μm 以下の浮遊粒子 (PM1.1) の全浮遊粒子に対する割合は 24 ~ 55%であったのに対して、若干揮発性を有する Pyrene でもこの割合は 63 ~ 73%と高く、5 環系以上の PAH は凡て 80 ~ 86%と大部分の PAH が粒径の小さな、肺深部への侵入率の高い微小粒子に含まれていることが判った。

図 4 はロープレッシャーインパクターにより大気浮遊粒子を 12 段階に分級して捕集した場合の浮遊粒子の濃度分布と代表的発がん物質であるベンゾ[a]ピレン(BaP)の気中濃度の粒径分布を示したものである。BaP の粒径分布は 2.5 μm 以下では浮遊粒子のそれと比較的類似しているが、2.5 μm 以上では大きく異なっていることが判る。これらの結果は PCI サンプラーやハイボリュームアンダーセンサンプラーによる調査結果と軌を一にしている。

浮遊粒子に含まれる有害成分の健康影響を考察する場合、浮遊粒子単位重量当たりの有害成分含量に関する情報も重要である。図 4 にはその一例として BaP の浮遊粒子単位重量当たりの含量の粒径依存性も示してある。この図から単位重量当たりの BaP 含量は粒径が 2.5 ~ 3.9 μm あたりから小さくなるにつれて急激に増大し、0.33 ~ 0.52 μm でピークに達し、その後ほぼ一定のレベルを保つことが判る。他の PAH の関してもこれとほぼ同様の結果を得ている。浮遊粒子の粒径は肺の侵入部位や沈着率、さらには細胞内取り込み率にも影響を及ぼすことを考えると、粒径 0.13 μm 以下の粒子に含まれる PAH 含量がピーク含量とほぼ同等であったとの知見に強く留意する必要がある。

なお、清水市での 18PAH 調査結果をみると夏期における PAH 濃度は室内と室外でほぼ同等であった。この事実は室内に顕著な発生源がない場合、室内 PAH 濃度を環境大気中の PAH 濃度と同レベルとして経気道暴露量を推定しても大きな誤差を生じないことを示唆している。

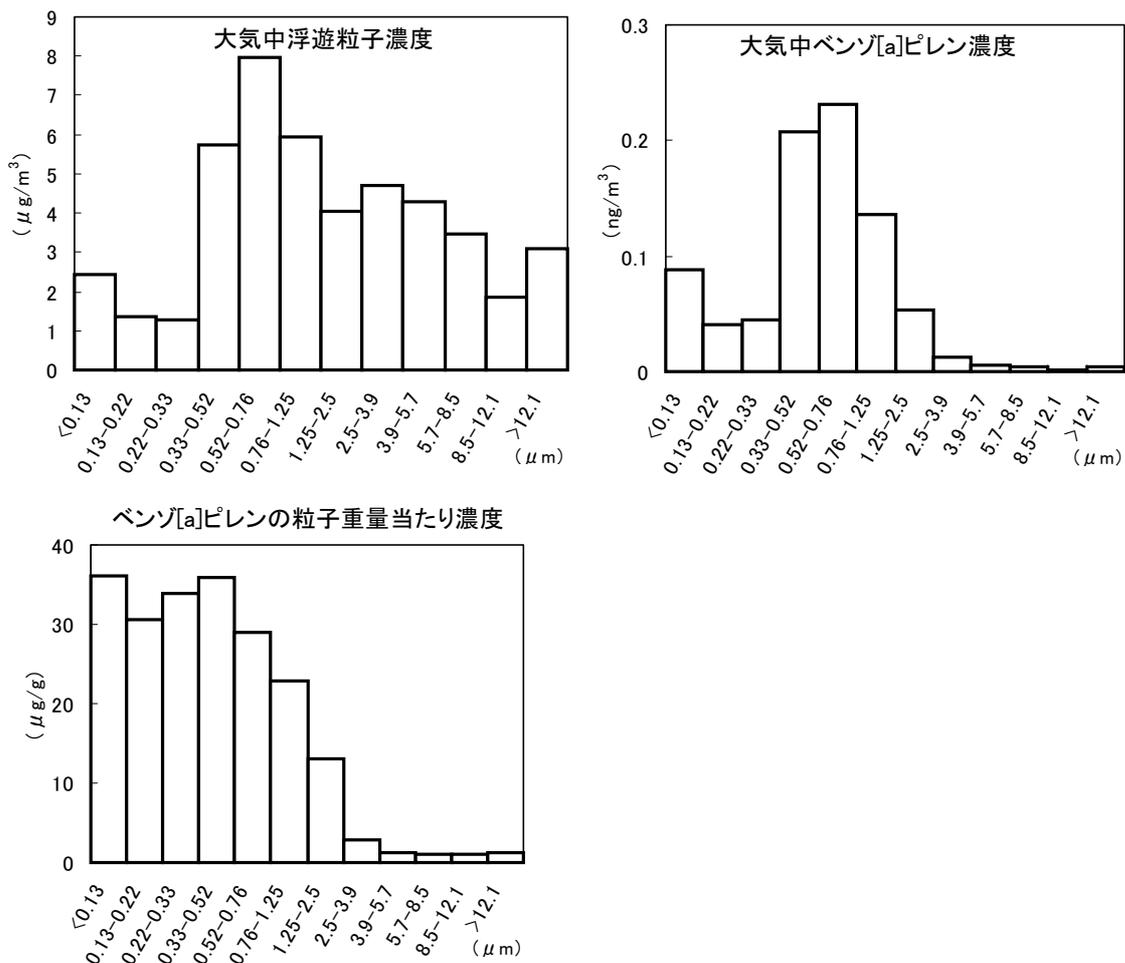


図 4 . 東京都港区でロープレッシャーインパクターにより捕集した粒径別浮遊粒子濃度とベンゾ[a]ピレンの粒径分布

・ニトロアレーン

ニトロアレーンによる大気汚染状況の調査は北海道においてなされた。図5は札幌市住宅地区で大気浮遊粒子をハイボリュームアンダーセンサンプラーで捕集し、その中のニトロアレーン4種を定量した結果を示したものである。4種のニトロアレーンの大部分は粒径 1.1 μm 以下の粒子に含まれ、その全体に対する割合は非暖房期、暖房期それぞれについて、1-NP で81%と80%、3種類のDNPで70~85%と71~80%であり、両季節間で相異を認めなかった。

一方、ニトロアレーン濃度は季節によって大きく異なり、1-NP は非暖房期 23pg/、暖房期 54pg/ であり、3種のDNPは非暖房期で0.09~0.16pg/、暖房期で0.26~0.50pg/ と暖房期の方が2~3倍高いことを認めた。

また、札幌と室蘭でのCIサンプラーでの一般家庭調査試料から、1-NPの濃度は室外大気濃度の方が室内濃度より常に高く、3種のDNPも室外濃度は室内濃度とほぼ同等か、やや高い場合が多かった。また、室蘭でかなり高い1-NP濃度が観測されたことなどから、札幌と異なる発生源の存在が示唆された。

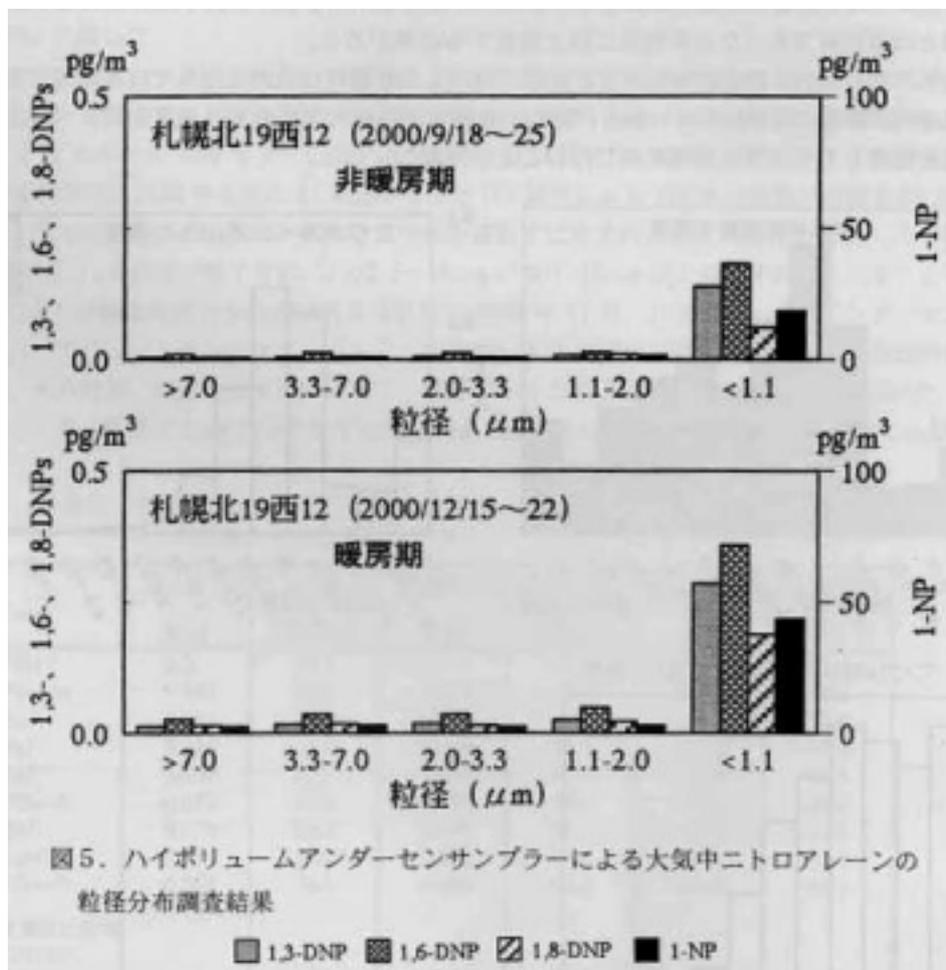


図5. ハイボリュームアンダーセンサンプラーによる大気中ニトロアレーンの粒径分布調査結果

・変異原性

変異原性は東京都港区でハイボリュームアンダーセンサンプラーで分級捕集した一般環境大気試料について、サルモネラ菌 YG1024 を用いるマイクロサスペンション法 (+S9, -S9 の両条件) で測定された。その結果、表2に示す如く、変異原性は代謝活性化しない-S9条件下の方が代謝活性化条件 (+S9) 下よ

り高いこと、変異原性の 80～85%は粒径 1.1 μm 以下の微小粒子に含まれることなどを認めた。

5 考察

大気浮遊粒子の健康に及ぼす影響については古くから強い関心が持たれ、我が国では 1973 年 5 月、粒径 10 μm 以下の浮遊粒子状物質 (SPM) に対して環境基準が設定され、多数の大気監視局で SPM が測定され続けている。また、固定、移動両発生源に対して種々の SPM 低減対策がとられつつあるものの、依然として大都市圏を中心に環境基準の達成率は低い現状にある。さらに、近年、米国を中心とする種々の疫学調査は、粒径 2.5 μm 以下の微小粒子、すなわち PM2.5 が健康に大きな影響を与えることを示しており、これらの知見を基に米国では 1997 年 7 月、PM2.5 に対する環境基準が追加設定された。しかし、微小浮遊粒子に対する知見は、SPM 又は PM10 と比べて米国においても少なく、我が国では著しく少ないため、微小浮遊粒子の健康影響評価にあたっては、まず、微小浮遊粒子の濃度及び当該粒子に含まれる有害成分等の種類や組成を明らかにし、日常生活を通じての暴露実態を定量的に把握する必要がある。

そこで、本研究の第 4 期 (平成 9 年～11 年度) においては、室内の微小浮遊粒子による汚染状況も計測しうる 2 種の分級サンプラー (CI 及び PCI) を開発すると共に、環境大気測定用の既存の分級サンプラーと併用して、環境大気や室内空気中の浮遊粒子の実態把握に努めた。また、浮遊粒子に含まれる有害成分の分析法も開発し、それらを駆使して室内外の空気汚染の実態調査を行った。

さらに、アレルギーに関して、ネコ、ダニ、スギ花粉の主要アレルギーの定量法として蛍光 ELISA 法を開発し、その有効性を示した。真菌についてもサンプリングシステム等の検討を行った。このような第 4 期研究の諸成果を基礎に、第 5 期研究 (平成 12～14 年度) においては焦点を個人暴露実態の定量的把握におくと共に、室内や環境大気中の有害成分やアレルギーの計測法の開発、これらの手法を駆使した室内外の汚染実態の把握に努めることにした。すなわち、本研究の初年度においては、まず、個人の装着・携帯に適した PM2.5 個人暴露測定システムを開発するために、浮遊粒子を 3 段階に分級捕集する小型サンプラーを試作し、性能評価の結果、PM2.5 測定に関しては良好な成績を得た。そこで装着・携帯性がよりすぐれ、さらに小型化した PM2.5 サンプラーを試作し、現在その性能を評価中であり、これに適した小型ポンプも試作中である。これらの成果をもとに平成 13 年度には個人暴露調査に適した新しい携帯型の PM2.5 個人暴露サンプラーを開発したいと考えている。

フタル酸エステルは、プラスチックの可塑剤として広く使用されているが、その中には内分泌攪乱作用の疑いのある物質も含まれている。しかし、大気や室内空気中のこれらフタル酸エステルの測定例は極めて少ない。この一因は分析法上の問題によるものと思われるので、空気中のフタル酸エステルをガス状と粒子状に分別して捕集し、それらを GC/MS で分離定量する手法の開発は今後経気道暴露実態の解明に役立つものと思われる。このほか真菌の EPS を高感度計測する ELISA 法も注目に値する。EPS の抗原性は一部の例外を除き、属のレベルでの特異性を有していることから、環境中の多様な真菌による汚染のレベルを属単位で評価する手法として有用かと思われる。このほか本研究では真菌 37 株の蛋白質含量も測定し、その含量は菌種・菌様により大きく異なることなどを認めた。EPS や蛋白含量と主要アレルギーとの関係の解明は今後の研究課題である。

このほか、環境大気や一般家庭の室内・室外空気中の浮遊粒子の粒径別存在実態、PAH、ニトロアレーン、変異原性の粒径分布等の調査を札幌市・室蘭市、東京都 23 区、及び清水市で行った。このような調査により PAH、ニトロアレーン及び変異原性は凡て、粒径の小さな PM2.5 にその殆ど大部分が存在することが第 4 期研究に続いて再確認されたことや、これら各都市における環境大気や一般家庭内空気

中の汚染実態調査データは暴露実態解明の基礎資料として重要である。なお、広く環境モニタリングの役に立てるべく、第4期研究において開発した種々の化学物質分析法のマニュアルを作成した。また、第4期研究で得た調査データは凡てまとめて整理し、微小粒子や粒子状有害成分等による大気や生活環境空気の汚染実態解明や、これらへの経気道暴露評価の役に立てるべく測定データ集として取りまとめたところである。

6 今後の課題

本研究班の最終目標は PM2.5 等の浮遊微小粒子及びそれに含まれる各種有害成分に対する信頼性の高い個人暴露推定手法の確立にある。各種有害成分の高感度分析法の開発や各種アレルゲンに対する高感度計測法の開発、さらにはこれらの計測法を駆使した環境汚染実態調査も本研究の最終目標達成の一環として重要である。本研究の今後の主な研究課題としては次のようなものがあげられる。

・本年度は個人携帯型の PM2.5 個人サンプラーの検討を行い、次年度には実用可能なサンプリングシステムが完成する目途がついた。本サンプリングシステムをさらに簡易かつ高精度のものとするためには、天秤秤量時の静電気対策を含めたキメ細かな手法の確立が必要である。

・本年度は有害成分として新たにフタル酸エステルを取り上げ、ガス状と粒子状の両成分に分けて捕集し、分離分析する高感度手法を開発したが、さらなる高感度化・高再現性を得るためには用いる捕集フィルターをはじめとする各種器具のフタル酸エステルによる汚れの有効適切な除去手法の確立が必要である。今後さらに気道過敏性と密接な関係にある多種のアルデヒド類や免疫毒性、遺伝毒性等に関する各種粒子状有害成分等の高感度分析法を開発する必要がある。

・ダニ、ネコ、スギ花粉の主要アレルゲンの高感度計測法はすでに第4期研究において開発したが、気中に浮遊するアレルゲンの正確なサンプリング法については、今後さらに検討する必要がある。また、EPS を指標とする真菌の簡易かつ高感度な評価手法や真菌の主要アレルゲンの計測法についての研究も必要である。

・環境調査に関しては、携帯型個人サンプラー、CI サンプラー、PCI サンプラー及び環境大気用に開発された種々のサンプラーを同時に稼働させて PM2.5 等に対する個人暴露濃度、室内濃度、環境大気濃度、常時監視局での大気濃度等を同時に求める作業を頻回行い、これらの結果を統合して個人暴露に影響を与える要因を明らかにしたり、個人暴露濃度を正確に推定する手法などを求める必要がある。なお、このような調査は浮遊微小粒子濃度だけでなく粒子状の各種有害成分についても行うべきであろう。このほか、本研究で開発したサンプラー等を用いて各種化学物質等（含 PM2.5）の大気濃度年平均値や個人暴露濃度年平均値を比較的容易に求めるためのサンプリングの在り方についても今後検討する必要がある。

7 社会的貢献

粒子状有害大気汚染物質に対する社会的関心は、国内的にも国際的にも急速に高まりつつある。特に、我が国では尼崎大気汚染公害訴訟第1審判決（平成12年1月31日）をはじめ、いくつかの裁判で SPM 汚染の健康被害への関与が指摘されており、また、ディーゼル排出粒子に対する自治体独自の規制策も

東京都などで検討されたりしている。

大気浮遊粒子状物質は多種多様な化学物質の混合物である。それらの組成は発生源の種類やその稼動状態、粒径、気象条件や粒子の気中滞留時間、大気中での化学反応など、様々な要因によって変動する。

したがって、粒子状有害大気汚染物質問題に適切に対応するためには当該汚染の状況を正確、かつ簡易に計測しうる手法を開発し、それを用いて環境実態調査を行い、粒子状有害大気汚染物質による汚染実態や、暴露実態、主要発生源の種類等を明らかにする必要がある。

本研究は、第4期研究の成果の上に立って、携帯型個人サンプラーの試作・評価、ガス状及び粒子状フタル酸エステルの高感度簡易分析法、さらには真菌のEPS高感度計測法の検討を行いつつある。これらが新しい環境評価手法として結実するのはそれ程遠くないと思料される。

また、札幌市、室蘭市、東京都、清水市において、先に開発した低騒音で小型なCI及びPCIサンプラー等を用いて環境大気、一般家庭の室内・室外中の浮遊粒子を3段階に分けて捕集し、その濃度を求めたり、それらに含まれる多環芳香族炭化水素（PAH）、ニトロアレーン、変異原性等の濃度を明らかにしたことは微小粒子等の健康影響評価の基礎資料として重要と考えられる。

また、第4期研究で得た各種高感度計測法をマニュアル化して多くの人々の環境モニタリングの役に立てるようにしたり、全班員による環境調査の結果を生データの形で整理、公表して一般研究者の役に立てるようにしたことは、従来みられなかった試みとして注目してよいかと思う。

【 ま と め 】

1．研究目的と研究内容

第5期研究（平成12～14年度）における本研究の目的は、近年急速に大きな関心が寄せられつつある生活環境空気中の浮遊微小粒子、特にPM2.5とそれらに含まれる各種有害成分、ならびに室内環境を中心とするアレルゲンに対する信頼性の高い個人暴露推定評価手法の確立を最終目標とし、第4期研究の成果の上に立ち、次の研究を行うことにある。

- (1) 携帯型PM2.5個人サンプラーの開発と、これにより捕集された微小粒子中の各種有害成分の高感度分析法の開発とその手法の信頼性の検討
- (2) 生活環境空気、特に室内空気中のアレルゲンのサンプリング手法や高感度計測法の開発とその信頼性の検討
- (3) 環境大気や一般家庭の室内・室外空気中の微小粒子及びそれに含まれる有害成分、ならびに室内環境中のアレルゲン実態調査

上記研究目的に従って、第5期研究初年度の平成12年度には携帯型のPM2.5個人サンプラーの試作・評価、ガス状・粒子状フタル酸エステルのサンプリング、高感度分離分析法の開発、真菌の免疫化学的検出法の開発等の暴露アセスメントに必要な計測手法の開発に関する研究と、生活環境空気中の浮遊微小粒子やそれに含まれる有害成分等の実態調査を行った。また、第4期研究において開発した分析法のマニュアル化や、汚染実態調査で得た生データを整理、公表する作業を行いつつある。以下、得られた研究成果の要点を述べる。

2．平成12年度の主な研究成果

- ・携帯用PM2.5個人サンプラーの開発に関する研究

より正確な PM2.5 の個人暴露評価にあたって、携帯用サンプラーの開発は極めて重要である。本研究においては、まず、個人携帯用サンプラーに必要な条件を探り、次いで3段分級型の小型・軽量サンプリングヘッドを試作し、その性能を調べた結果、PM2.5 の測定に関しては十分な精度が得られることが判った。そこで、装着性等も考慮に入れてより小型の PM2.5 サンプラーを試作し、現在、その性能を評価中である。また、当該サンプラー用として小型軽量の吸引ポンプも試作中である。

- ・フタル酸エステルの高感度分離分析法の開発に係る研究

フタル酸エステルの中には内分泌攪乱作用の疑いのある物質が含まれているが、それらの気中濃度に関する知見は極めて乏しい。そこで、フタル酸エステルをガス状と粒子状に分けて捕集し、それらに含まれるフタル酸エステルをキャピラリーGC/MS で分離分析する手法を見出した。この方法を予備的に室内環境調査に適用した結果、内分泌攪乱作用の疑いのあるものを含めて9種類のフタル酸エステルの存在を認めた。現在、本法はさらなる高感度化を図りつつある。

- ・真菌の免疫化学的検出法の開発に関する研究

これまで、生活環境中の真菌は培養法により検出・定量されてきたが、より簡便、迅速に真菌を検出・定量する方法を開発すべく免疫化学的手法の検討を行った。すなわち、真菌のうちアレルゲンとして代表的な5属の真菌(アスペルギルス、アルテルナリア、クラドスポリウム、ペニシリウム及びカンジダ)を研究対象とし、これらの菌が増殖する時に産生・放出する細胞外多糖体(EPS)に対する比色法によるELISA測定システムを開発した。

さらに、この方法の高感度化をアルテルナリアに対するELISAシステムについて検討した結果、酵素活性の検出を比色法から蛍光法へ、ピオチン化2次抗体をIgG分画からアフィニティ精製抗体に転換することにより約100倍高感度化しうることを見出した。また、EPSの抗原性は一部の例外を除き、属のレベルで特異性を有していることを見出した。したがって、本法は将来、生活環境中の多様な真菌による汚染レベルを属単位で評価することを可能にするものと期待される。また、近年注目されているシックハウス症候群と室内真菌の関連性追究にも有益な手段を提供するものと思われる。現在、試験対象とした5属真菌に対する高感度検出・定量法を検討中である。

- ・生活環境空気中の浮遊微小粒子やそれに含まれる有害成分等の実態調査

PCIサンプラーを含む種々のサンプラーを用いて、札幌・室蘭市、東京都及び清水市で調査を行った。すなわち、浮遊粒子の粒径分布調査の一環として、PM2.5/PM10の値を札幌・室蘭市、清水市で求めた結果、環境大気に対するこれらの値は札幌・室蘭市の暖房期を除くと、夏期も冬期も65%前後であることを認めた。この値は第4期研究での結果と軌を一にしている。

また、東京都の大気浮遊粒子を0.13 μ m以下から12.1 μ m以上まで12段階に分けて捕集し、その中のPAHを測定した結果、PAHの粒径分布は粒径2.5 μ m以下では、浮遊粒子のそれと比較的類似しているが、2.5 μ m以上では全く異なることを見出した。また、浮遊粒子単位重量当りのPAH含量は、粒径が2.5 μ mより小さくなるにつれて急激に増大して粒径0.33~0.52 μ mでピークに達し、以後、ほぼフラットになることを認めた。また、大気中PAH、ニトロアレーン、変異原性の殆どは微小粒子中に含まれていることを認めた。これらの知見は、浮遊微粒子の健康影響を考察する上で重要かと思われる。

- ・その他の研究成果としては、気中浮遊真菌に対する適切なサンプリング法を確立し、5ヶ月間に亘っ

て室内汚染の実態調査を行ったことや、真菌アレルゲン検索の一環として蛋白量の測定が 37 菌株についてなされたこと、さらには先に開発した有機リン化合物 12 種に対する測定手法についての定量下限値が明らかにされたことなどがあげられる。

・環境問題の解決には、長期間に亘る地道な調査研究が不可欠である。浮遊微粒子等への暴露アセスメントや健康影響評価をより正確に行うためには多くの研究者の緊密な連携が必要なことはいうまでもない。ところで、従来の研究報告の多くは各研究者がそれぞれ行った実験ないし調査データをある視点から整理した形で出され、考察が加えられたものとなっている。若し、類似の調査が多くの研究者によってなされ、それらの生データを通覧することが出来るならば、各研究者の視点とは異なった新しい視点や俯瞰的視点に立った解析が可能になるであろう。そこで、本研究班においては第 4 期研究において開発された諸高感度分析法等のマニュアル化を図ることや、各種の調査で得た生データを整理、公表し、多くの研究者の研究に供するためのデータ集を作成した。このことも新しい試みとして評価してよいのではないかと考える。