

- 1 生活環境中の粒子状物質等による個人暴露量測定手法の開発に関する研究

代表者：松下秀鶴

1 研究従事者

- | | |
|---------------------|--------------------|
| ○松下秀鶴（静岡県環境衛生科学研究所） | 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） | 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 13 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 μm 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、暴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 期研究の第 2 年度にあたる本年度は、昨年度までに得られた研究成果の上に立って、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

新たに PM2.5 個人暴露計測手法として、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う。また、有害成分の高感度簡易分析法の開発は、環境ホルモン作用が疑われているフタル酸エステルを中心に行うと共に、気道刺激性が強いアルデヒド類のパッシブサンプリング法の検討を行う。

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 サンプラー等を用いた浮遊粒子調査として、静岡市における室内、室外の粒径分布調査および個人暴露濃度の予備的調査、東京都における室内外空気浮遊粒子の変異原性粒径分布の調査を行うほか、アンダーセン・ロープレッシャーインパクターで捕集された東京大気浮遊粒子について PAH と変異原性の詳細な粒径分布調査等を行う。また、ハイボリュームサンプラーで過去 26 年間捕集され、冷凍保存された札幌の大気浮遊粒子に含まれるニトロアレーン等の測定を行い、大気汚染の長期汚染実態を明らかにする。

3 平成 13 年度の研究の対象および方法

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 およ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、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) PM_{2.5} 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

・ PM_{2.5} の個人暴露計測法の開発

個人の携帯に適し、かつ正確に PM_{2.5} 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、それらに含まれる分析目的物質を溶媒抽出、または加熱脱着し、GC/MS 法で分離分析する方法を開発した。また、揮発性アルデヒド類に対してパッシブサンプラーを用いる捕集、HPLC による分離分析法の検討を行いつつある。

(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

・ 真菌の免疫化学的検出法の開発

アスペルギルス、ペニシリウム、クラドスポリウム、アルテルナリア、カンジダの5属の真菌を対象とした。EPS で免疫したウサギの抗血清から調製した IgG 分画を一次抗体、アフィニティカラムで精製した抗体のビオチン標識体を二次抗体として用いる蛍光 ELISA の測定系を組み立てて、その測定感度を調べた。また、この蛍光 ELISA の測定系を用いて、エアサンプラーで捕集した室内外の空気試料から EPS の検出を試みた。サンプリングは室内では 2.5 L/min の流量で 24 時間、室外では 25L/min の流量で 14 時間行った。

真菌各属の代表的な種、合計 40 種の菌株から培養物を調製した。その培養上清に対する ELISA の反応性を調べることにより、各属の EPS-ELISA の属内、属間における交差反応性を解析した。

・ PCI サンプラーによる室内空気中の真菌測定法の評価

PCI サンプラーを用いて室内空気中の真菌測定を、2001 年 2 月～2002 年 2 月までの間、通気量 3 L/分、1 回 7 日間の連続サンプリングを実施した。3 段階に分級された各粒子層の真菌数を培養法で測定し、比較検討した。本年度は特に分級捕集フィルター上での粒子状物質の状態を電顕等で調べ、真菌サンプリング手法との関係を検討した。

・ 真菌細胞内蛋白定量

生活環境中の主要真菌である *Cladosporium* (クロカビ) 18 株の孢子細胞の蛋白測定を行い、同属間での孢子蛋白量を比較検討した。さらに各種の真菌菌糸体中の蛋白含量を 20 菌株で検討した。クロカビでは寒天培養、菌糸体では液体培養によりそれぞれの細胞を回収した。細胞破碎後、蛋白量を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

・ 浮遊粒子および PAH

静岡市において、PCI サンプラー (10 μm 以上、10～2.5 μm、2.5 μm 以下に 3 分級) および個

人サンプラー (PM_{2.5}) を用い、一般家庭の室内、室外空気中の浮遊粒子濃度および個人暴露濃度を測定した。

また、アンダーセン・ロープレッシャーインパクターを用いて、12 μm 以上から 0.06 μm 以下まで 13 段階に分級捕集された東京都大気浮遊粒子中の PAH23 種類を超音波抽出→溶媒転換→前段濃縮・HPLC・分光蛍光検出・コンピューターシステムで分離分析した。

・変異原性

2001 年 11～12 月、港区白金台にある国立公衆衛生院屋上においてアンダーセン・ロープレッシャーインパクターを用いて粒径別に採取された空気浮遊粒子の変異原性 (マイクロサスペンション法) を測定した。また、2000 年 8～12 月、東京都 23 区内にある一般家庭 (22 家庭、うち喫煙者 8 家庭) において PCI サンプラーを用いて粒径別に採取された室内・室外空気浮遊粒子の変異原性を測定した。

・ニトロアレーン

1974 年 12 月から 2000 年 11 月までの毎月 5～15 日間、札幌市の住居地域に位置する北海道環境科学研究センター屋上 (地上 10m) において、ハイボリュームサンプラーを用いて採取・保存されてきた大気浮遊粉じんを研究対象試料とした。各年の季節別試料を採取した。これらのジクロロメタン抽出物について、1-ニトロピレン (1-NP)、1,3-ジニトロピレン (1,3-DNP)、1,6-ジニトロピレン (1,6-DNP)、1,8-ジニトロピレン (1,8-DNP) の分析を HPLC により行った。

4 平成 13 年度の研究成果

1) PM_{2.5} 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

(1) PM_{2.5} 個人暴露計測手法の開発に関する研究

我々は低騒音のカスケード インパクター (25L/min、以下 CI サンプラーという) とパーソナルカスケード インパクター (3L/min、以下 PCI サンプラーという) をメーカーと協同して開発し、環境大気や室内・室外空気中の浮遊粒子の 3 段階 (10 μm 以上、2.5～10 μm、2.5 μm 以下) 分級捕集に適用して、浮遊粒子やそれに含まれる PAH 等の粒径分布等を明らかにしてきた。

一方、我々は空気質を異にする室内・室外環境で日常生活を営んでいる。したがって、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、各人がサンプラーを 1～数日間携帯して浮遊粒子を捕集する必要がある。

このためのサンプラーの性能としては、小型、軽量、低騒音、優れた装着性、操作の簡易性および、優れた正確性と再現性が要求される。しかし、これらの諸条件をみたす個人サンプラーは開発されていない。

我々は上記諸条件を満たす個人サンプラーの開発に関して、昨年度は 3 段階分級サンプリングヘッドの試作とその性能を調べた結果、個人サンプラーとしては PM_{2.5} のみを捕集するシステムの方が測定精度、装着性や携帯性の点から望ましいことが判った。

本年度は小型ポンプの試作、改良を繰り返しつつあるが、3 名の被験者に仮の PM_{2.5} 個人サンプラー (PM_{2.5} サンプリングヘッドに PCI サンプラーのポンプをつないだもの) を 2 台ずつ 1 日中携帯させて得た浮遊粒子濃度のサンプラー間の変動は、それぞれ 3、4、7 % と小さいことを

認めた。現在、約 20 名に仮の個人サンプラーを 24 時間携帯させて、改善すべき点を調べるなど、より小型で低騒音のポンプの作成を目指して試作、性能点検、改良を行っている。

(2) 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。しかし、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げられる。また、大気中で粒子状とガス状の両状態で存在する可能性がある。これらのことを考慮に入れて、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、これらを別々に分離分析する手法の開発につとめた。

その結果、昨年度作成した分析法を改良したフィルター捕集・溶媒抽出・GC/MS 法を開発した。すなわち、窒素気流中 350℃ で 2 時間加熱処理した石英フィルターとアセトン・トルエン(7:3 V/V)で超音波洗浄したカーボンディスクフィルターとを重ね合わせて、環境空气中的粒子状成分を石英フィルターに、ガス状成分をカーボンディスクフィルターに 10L/min で 24 時間吸引捕集し、これをアセトン・トルエン(7:3)混合溶媒で超音波抽出し、その一定量を分取し、キャピラリー GC/MS で分離分析する方法を見出した。本法はブランク値が一般に極めて低く、フィルターからの分析目的物質の回収率も粒子状成分 94%以上、ガス状成分 90%以上と高い特徴を有している。

さらに本年度は、新たにフィルター捕集・加熱脱着・GC/MS 法も開発した。すなわち、上記の加熱処理をほどこした石英フィルターに 5 L/min の流量で 30~100 分間試料空気を捕集し、このフィルターを石英型の小型チャンバー(容量 100mL)に入れ、ヘリウムを通気しながらチャンバーを昇温して分析目的物質を脱着させ、Tenax TA に再捕集する。次いで Tenax TA からフタル酸エステル類を加熱脱着させ、クライオフォーカスを行った後、これを加熱脱着して GC/MS で分離分析する方法を開発した。本法は捕集試料中の分析目的成分全量を GC/MS で分離分析するため、極めて高感度であり、室内・室外空气中的フタル酸エステルの経時変動をしうる利点がある。事実、本法を用いて室内フタル酸エステル濃度の低下に換気が極めて有効であることを気中濃度の経時変化計測から確認している。なお、本法で用いた GC/MS の定量下限値(検量線の最低濃度の繰り返し測定から得た標準偏差の 10 倍)も DHP(Di-n-hexyl phthalate)の 54ng を除くと、4.5~24.7ng と低い。なお、本研究では有機リン化合物とフタル酸エステル計 27 成分の一斉分析法として、TC カラムを用いる GC/MS 法も開発している。

参考のため、表 1 に加熱脱着法による室内外の代表的フタル酸エステルの濃度の測定結果の一例を示す。室外に較べて室内濃度が著しく高いことが判る。また、図 1 は有機リン化合物とフタル酸エステル類の一斉分析時のガスクロマトグラムの一例を示したものである。図中 ① と ② は分離不能であるが、分子量が異なるので SIM により容易に分別定量しうることを確認している。

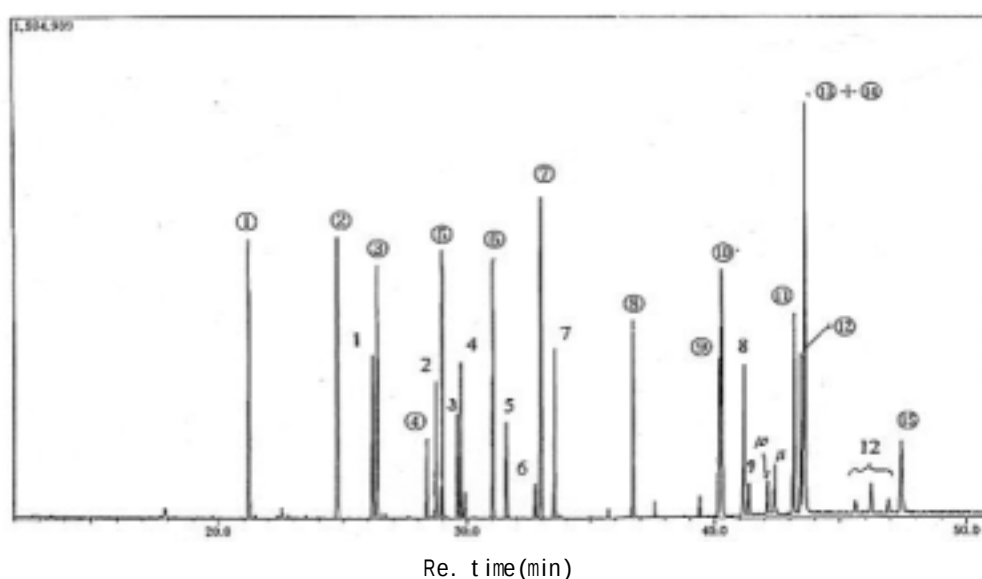
このほか、気道刺激性の強いアルデヒド類の分析に関しては、すでにアクティブサンプリング・HPLC 法により 10 種程度のアルデヒド類の高感度一斉分析法を開発したが、より容易に個人暴露調査を行いやすいようにパッシブサンプラーを用いる方法を、アクティブサンプラーとの併用実験により検討中であり、現在までにパッシブサンプラーを 3 日程度室内に設置すれば、ホルムアルデヒドのほか、プロピオンアルデヒドやアセトアルデヒドを定量しうることなどを認めつつある。

表1 加熱脱着法による室内・外空気中のフタル酸エステル測定結果の一例

オフィス	築年数 用途	採取量 (L)	濃度 (ng / m ³)		
			DEP	DBP	DEHP
A	20 年、事務所	150	291	>500	229
B	30 年、会議室	300	113	317	184
C	1 ヶ月、会議室	450	11	177	24
外気		500	1.4	2.7	0.8

DEP:Diethyl phthalate DBP: Di-n-butyl phthalate

DEHP:Di-(2-ethylhexyl)phthalate



- | | |
|------------------------------|---|
| : Dimethyl phthalate | 1 : Tributyl phosphate |
| : Diethyl phthalate | 2 : Tris (2-chloroethyl) phosphate |
| : Di-isopropyl phthalate | 3 : Tris (β-chloroisopropyl) phosphate |
| : Diallyl phthalate | 4 : Diazinon |
| : Di-n-propyl phthalate | 5 : Chlorpyrifosmethyl |
| : Di-isobutyl phthalate | 6 : Fenitrothion |
| : Di-n-butyl phthalate | 7 : Fention |
| : Dipentyl phthalate | 8 : Triphenyl phosphate |
| : Di-n-hexyl phthalate | 9 : Tris (2-butoxyethyl) phosphate |
| : Butyl benzyl phthalate | 10 : Pyridaphent ion |
| : Dicyclohexyl phthalate | 11 : Tris (2-ethylhexyl) phosphate |
| : Diheptyl phthalate | 12 : Tricresyl phosphate |
| : Di-(2-ethylhexyl)phthalate | |
| : Diphenyl phthalate | |
| : Dioctyl phthalate | |

図1 有機リン化合物とフタル酸エステル類の一斉分析 (標準物質)

2) 気中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

(1) 真菌の免疫化学的検出法の開発

生活環境中の真菌は主に培養法によって検出されている。本研究では培養法よりもより簡便、迅速に生活環境中の真菌の存在状況を把握することを目的として、真菌の細胞外多糖体 (extracellular polysaccharides、以下 EPS) を免疫化学的に検出する方法の開発を進めている。昨年度は比色法を用いた Sandwich ELISA 測定法の検討を行ったが、さらに高感度化を図るために、今年度は、蛍光 ELISA 測定法についての検討を行い、また同一属内の真菌、あるいは異なった属の真菌に対して EPS-ELISA がどのような交差反応性を示すのかについて解析した。

・ 蛍光 ELISA 測定法の開発

アフィニティ精製抗体を使用した蛍光法による各真菌に対する EPS-ELISA の検出感度は表 2 に示したとおりで、昨年度報告した比色法と比べておよそ 10 倍の感度の上昇がみられた。

この ELISA で測定した空気試料中の EPS 量は、冬期室内でサンプリングした試料はすべて検出限界以下であった。室外のサンプリング (n=5) ではアルテルナリアが 155 ~ 465 pg/m³、アスペルギルスが < 2 ~ 34 pg/m³ 検出されたが、他の真菌 EPS は検出限界以下であった。今後、真菌が多いと考えられる高温多湿な時期も含めて調査し、本法の有効性を検討する予定である。

表 2 蛍光法 sandwich ELISA における代表的真菌 EPS の検出下限

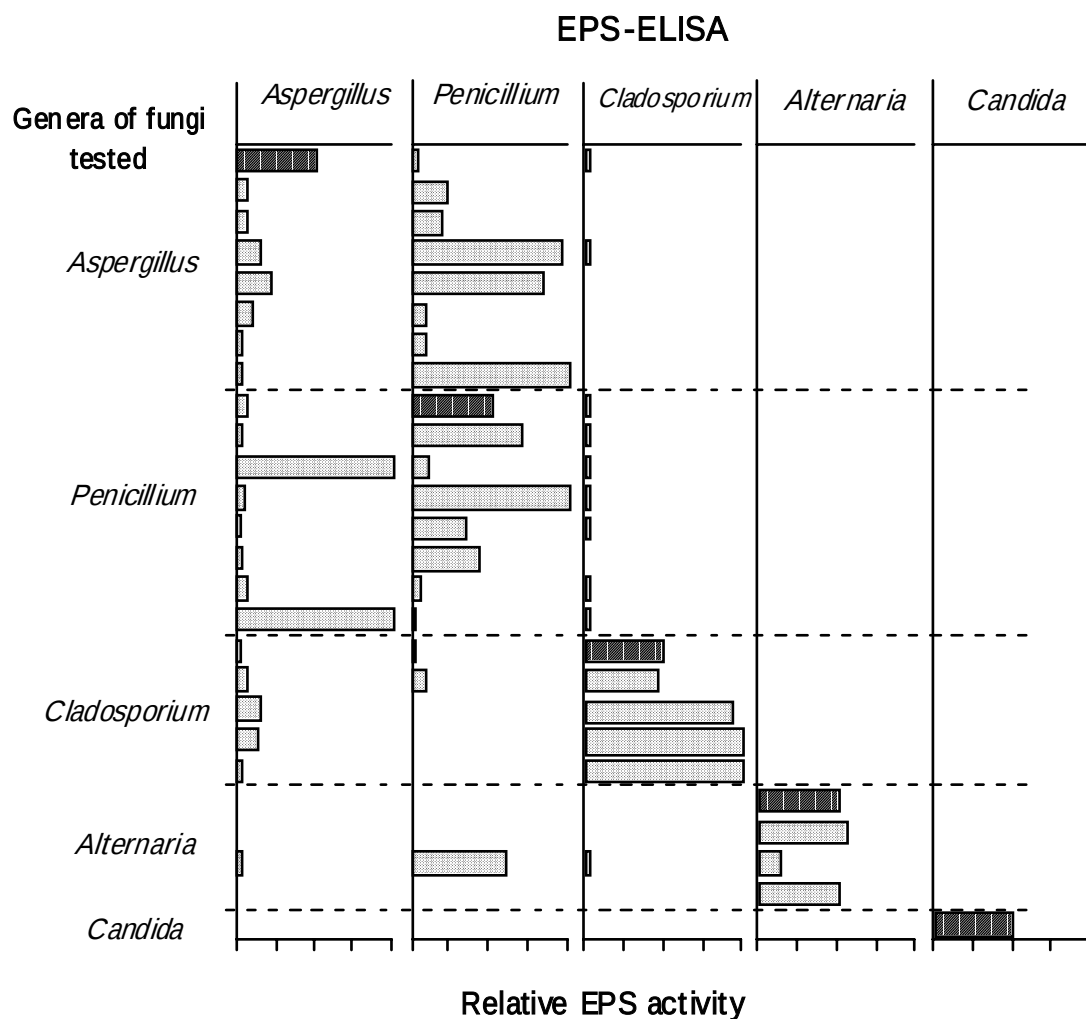
EPS	検出下限 (ng/ml)	
アスペルギルス	0.01	(0.1)
ペニシリウム	0.03	(0.5)
クラドスポリウム	0.3	(10)
アルテルナリア	0.3	(3)
カンジダ	0.1	(0.5)

かっこ内は昨年度報告した比色法における検出下限

・ 属内、属間における交差反応性の検討

アスペルギルス、ペニシリウム、クラドスポリウム、アルテルナリア、カンジダの 5 属の真菌の属内、属間における反応性の関係を図 2 に示した。属間における交差反応性に関しては、クラドスポリウム、アルテルナリア、カンジダの EPS-ELISA においては他属の EPS は全く反応せず、属レベルでの特異性が保たれていたが、アスペルギルスとペニシリウムの EPS-ELISA では両者はお互いに強く交差反応し、さらにクラドスポリウム属、アルテルナリア属の一部の菌株とも反応した。一方、属内における反応性に関しては、とくにアスペルギルス属とペニシリウム属の EPS-ELISA では菌株ごとで反応性に大きな差があり、ほとんど反応しない菌株がいくつか見出された。

5 属以外の真菌 EPS の反応性を調べた結果、クラドスポリウムの EPS-ELISA においてはオーレオバシディウム属の真菌との間に、アルテルナリアの EPS-ELISA においてはカーヴラリア属の真菌との間に交差反応性がみられた。



**図2 5属の真菌の属内、属間における交差反応性
(黒いカラムは抗血清の作成に用いた菌株)**

(2) PCI サンプラーによる室内空気中の真菌測定法の評価

PCI サンプラーを用いて室内浮遊真菌の粒径別捕集を1回7日間ずつ、12カ月間にわたって行い、各粒径に捕集された真菌数を培養法で測定した。その結果、2.5~10 μm の層に捕集されるものが最も多く、10 μm 以上がこれに次ぎ、2.5 μm 以下の層に捕集された真菌数は著しく少なかった。この傾向は昨年度の結果とほぼ同様であり、真菌数でみる限り、PCI サンプラーは真菌の捕集に有効な手法と判断された。また、各段のフィルターに捕集された粒子の状態を走査電顕像より調べた結果、例えば2.5~10 μm の捕集フィルターには明瞭な真菌などの粒子状の集塊像、2.5 μm 以下の捕集フィルターには全面に微粒子の分散像など、真菌数との相関を示唆する結果が得られた。

(3) 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、主

要真菌中の蛋白質量を測定した。まず、クラドスポリウム（クロカビ）18 株の孢子細胞に含まれる蛋白量を測定した結果、大部分のクロカビの孢子細胞 10^6 ケ中の蛋白質量は 30～50 μg の範囲にあり、菌種菌株による差異は少ないことが判った。

次いで各種真菌の菌糸体中の蛋白量を 20 菌株について検討した結果、図 3 に示す如く、菌糸体 1g あたり 300～7400 μg と菌株により蛋白量が大きく異なることを見出した。

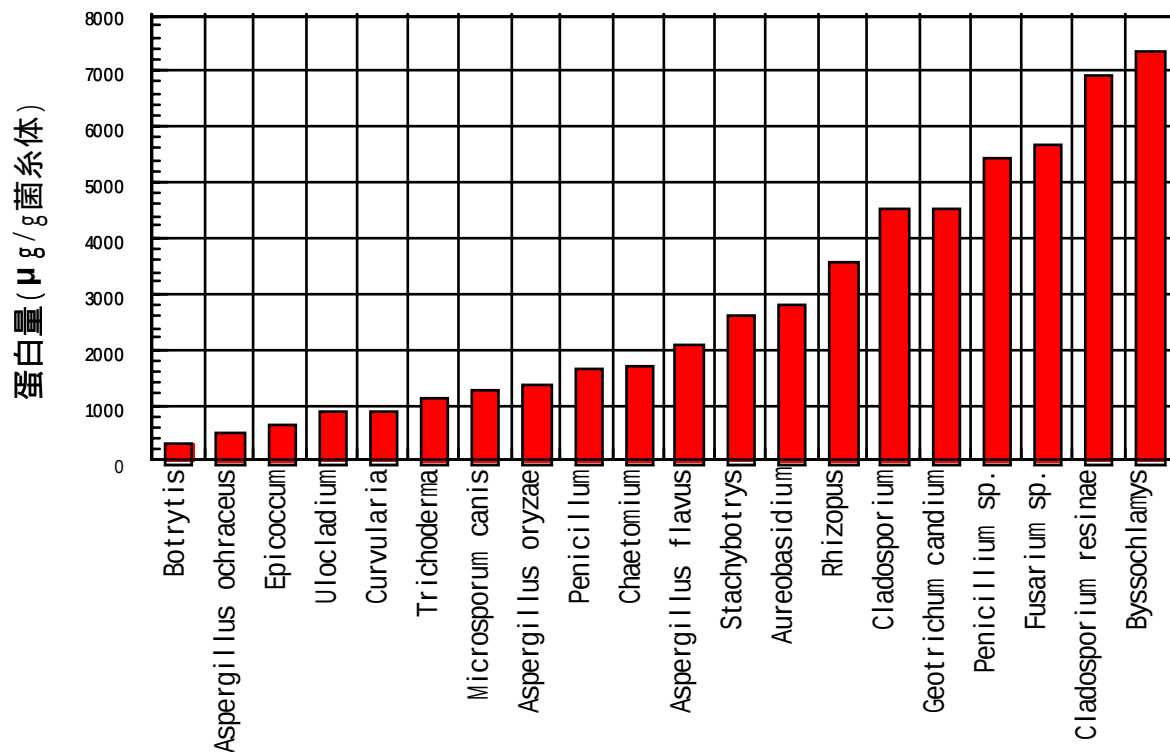


図3 真菌における菌糸体の蛋白量

3) 環境大気や室内空気の汚染実態調査

(1) 浮遊微小粒子濃度および PAH

静岡市において、PCI サンプラーを一般家庭の居間、寝室、屋外および各人の職場に設置して 24 時間サンプリングを行うと同時に、仮の個人サンプラー（新たに開発した小型 PM2.5 サンプリングヘッドに PCI サンプラーのポンプ部分を接続したもの）を 24 時間携帯してもらい、室内外や職場の浮遊粒子濃度、さらには個人暴露濃度を求めつつある。その結果、

・ PM10 の濃度範囲は、居間 (n=14) で 13.6～75.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、寝室 (n=15) で 10.1～80.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、屋外 (n=12) で 11.0～84.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、職場 (n=12) で 13.0～62.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と各空間とも測定した日や場所によって 5～8 倍の濃度変動を示した。しかし、各空間の平均値は居間 46.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、寝室 46.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、屋外 45.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、職場 39.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と職場の値が若干低いものの、その他の空間の値は相互にかなりな一致を示すことを認めた。

・ PM2.5 の PM10 に対する割合は、居間 0.56～0.97、寝室 0.48～0.97、屋外 0.49～0.90、職場 0.51～0.95 と変動するが、それらの平均値は居間 0.72、寝室 0.68、屋外 0.69、職場 0.69 と相互によく一致した値を示した。これらの結果は従来からの知見と軌を一にしている。

.PM2.5 個人暴露濃度は非喫煙者 16 名に対して 16.9 ~ 47.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均 31.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の値が得られた。これに対して喫煙者 3 名に対する値は 44.1 ~ 117 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均 74.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、副流煙の影響は非喫煙者より喫煙者のほうがかなり大きいことを示唆する結果が得られた。このことは、同一家庭で生活する喫煙者と非喫煙者の個人暴露濃度に大きな差があることから支持された。

今後、本調査で得られたアンケート結果を、より個人暴露測定に適したサンプラー、特にポンプの開発に利用すると共に、さらに調査を進め、PM2.5 個人暴露濃度を居間、寝室、屋外、職場等の気中濃度と滞在時間から推定する方法を検討する予定である。

一方、浮遊粒子に含まれる PAH の測定は、アンダーセン・ロープレッシャーインパクターで 13 段階に分級された浮遊粒子について行った。検出・定量した PAH の種類は 23 種であり、その中には発がん性や発がん促進作用を示すものも種々含まれている。

測定結果の 1 例として、図 4 に環境大気中の浮遊粒子の粒径分布と 4 環系、5 環系および 6 環系 PAH の代表として、それぞれ、ピレン、ベンゾ[a]ピレンおよびベンゾ[ghi]ペリレンを取り上げ、それらの粒径分布を示す。比較的揮発しやすいピレンの粒径分布は浮遊粒子のそれにやや近いが、微小粒子側に多く含まれることが判る。これに対してベンゾ[a]ピレンやベンゾ[ghi]ペリレンの殆どは 2.5 μm 以下の粒子に存在していることが判る。この事は難揮発性 PAH の殆どすべては PM2.5 に含まれることを示している。なお、ベンゾ[a]ピレンは大気浮遊粒子中の代表的発がん物質であり、ピレンとベンゾ[ghi]ペリレンは発がん促進物質であることが知られている。

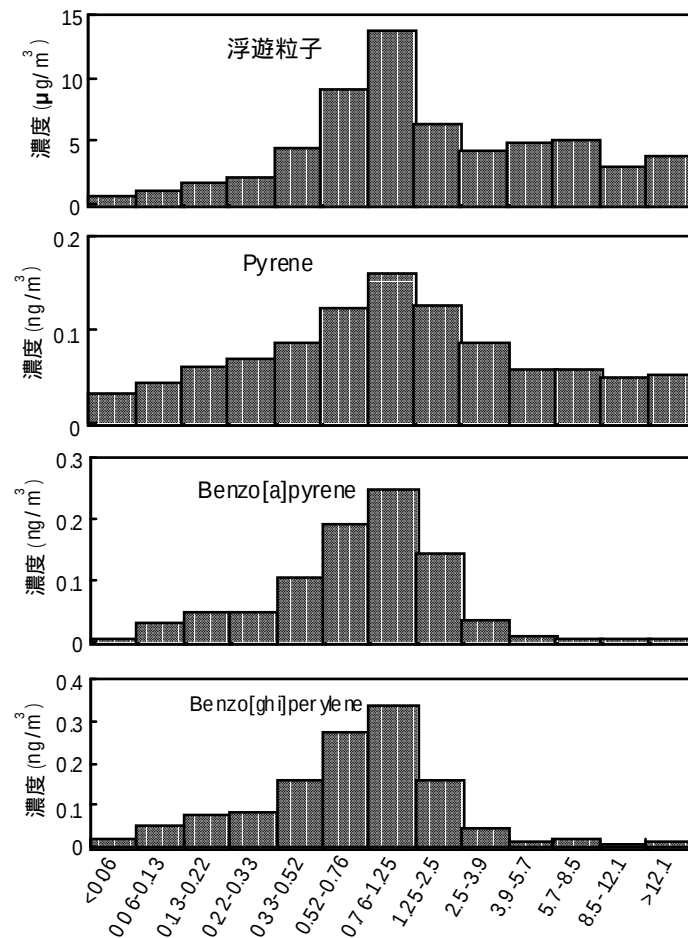


図4 ロープレッシャーインパクターで粒径別に捕集した浮遊粒子と PAH の大気中濃度 (東京都港区、2001 年 11 月 19 日~12 月 2 日)

浮遊粒子の生体影響を考察する場合、単位粒子重量当りの PAH 含量も必要である。特に、サブミクロン粒子は肺深部へ沈着しやすく、粒子数も多いことなどからこれらに含まれる PAH 含量が注目される。図 5 はその例として、ピレン、ベンゾ[a]ピレンおよびベンゾ[ghi]ペリレンの場合を図示したものであるが、ピレンでは微小粒子になるほどその含量は高くなり、ベンゾ[a]ピレンとベンゾ[ghi]ペリレンでは $0.06 \mu\text{m}$ 以下で含量の低下がみられるものの、一般に微小粒子の方が PAH 含量が高い傾向が認められた。

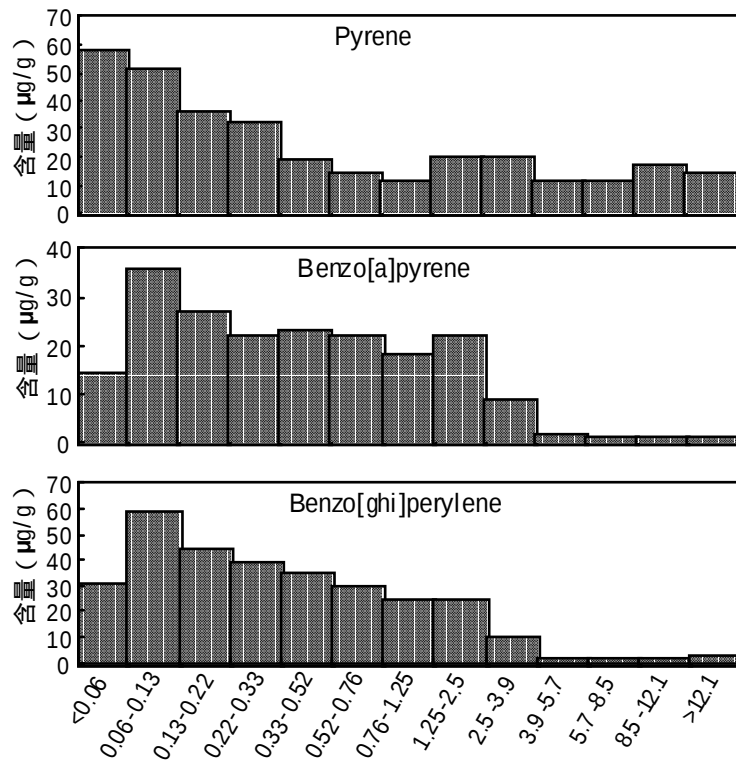


図5 ロープレッシャーインパクターで粒径別に捕集した PAH の単位粒子重量あたりの含量
(東京都港区、2001 年 11 月 19 日～12 月 2 日)

(2) 変異原性

アンダーセン・ロープレッシャーインパクターで捕集した東京試料の変異原性をサルモネラ YG1024 株を用い、-S9 条件下で測定した結果のうち、単位粒子重量あたりの比活性の粒径分布結果を図 6 に示す。この測定は 11 月 19 日から 12 月 24 日に至る 5 週間、1 回 1 週間ずつ連続サンプリングした試料に対してなされているが、得られた結果はすべて同一傾向を示し、その傾向は図 5 に示したベンゾ[a]ピレンやベンゾ[ghi]ペリレンの粒径分布と極めて類似していることを認めた。

また、本研究では、PCI サンプラーを種々の家庭の居間と屋外に設置して、それぞれ 24 時間ずつサンプリングし、得た浮遊粒子の変異原性も調べた。その結果を図 7 に示す。現在までに測定した 21 の家庭のうち、サンプリング中に喫煙と調理がなされた室 (A～D) では D を除いて室内空気の変異原性が屋外大気のものより若干高いこと、D では若干、室外大気のものの方が高いが喫煙本数は 1 本であった。

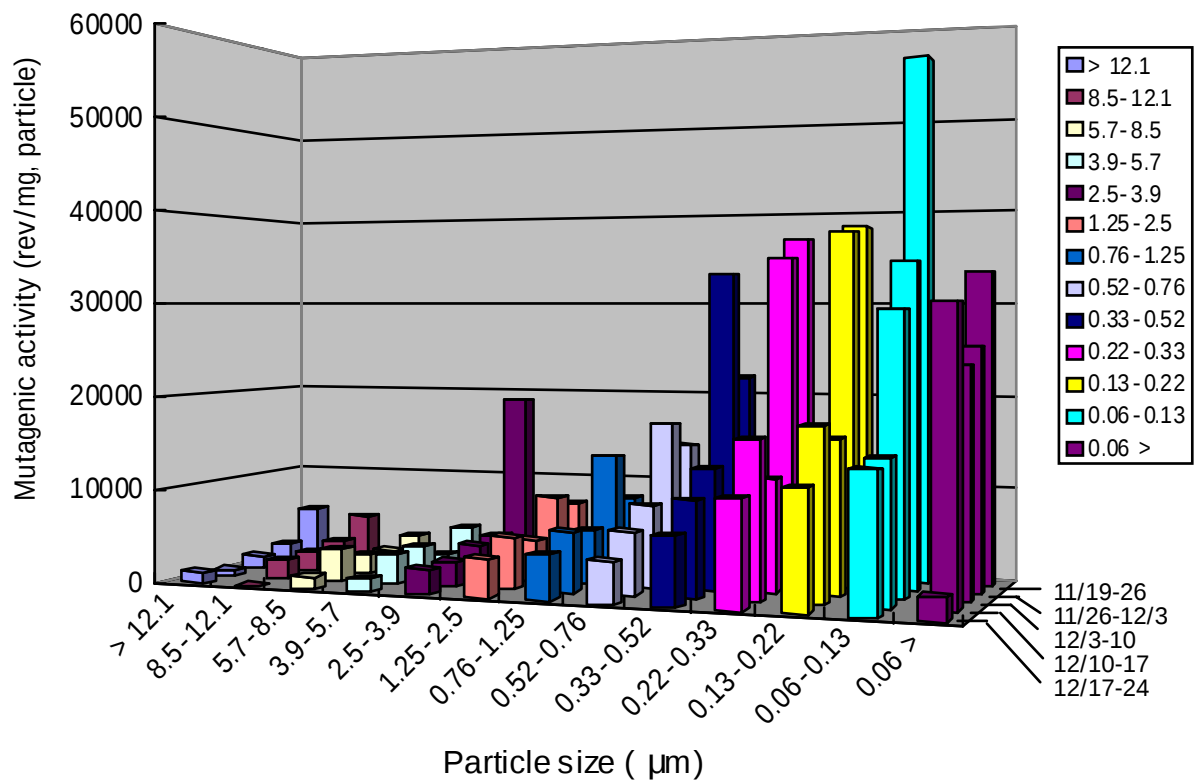


図6 アンダーセン・ロープレッシャーインパクター試料の変異原性
(東京、2001年) (YG1024-S9: 単位粒子重量あたり)

左: 室内空気 右: 室外空気 ■ 2.5 μm ■ 2.5 μm ~ 10 μm ■ 10 μm

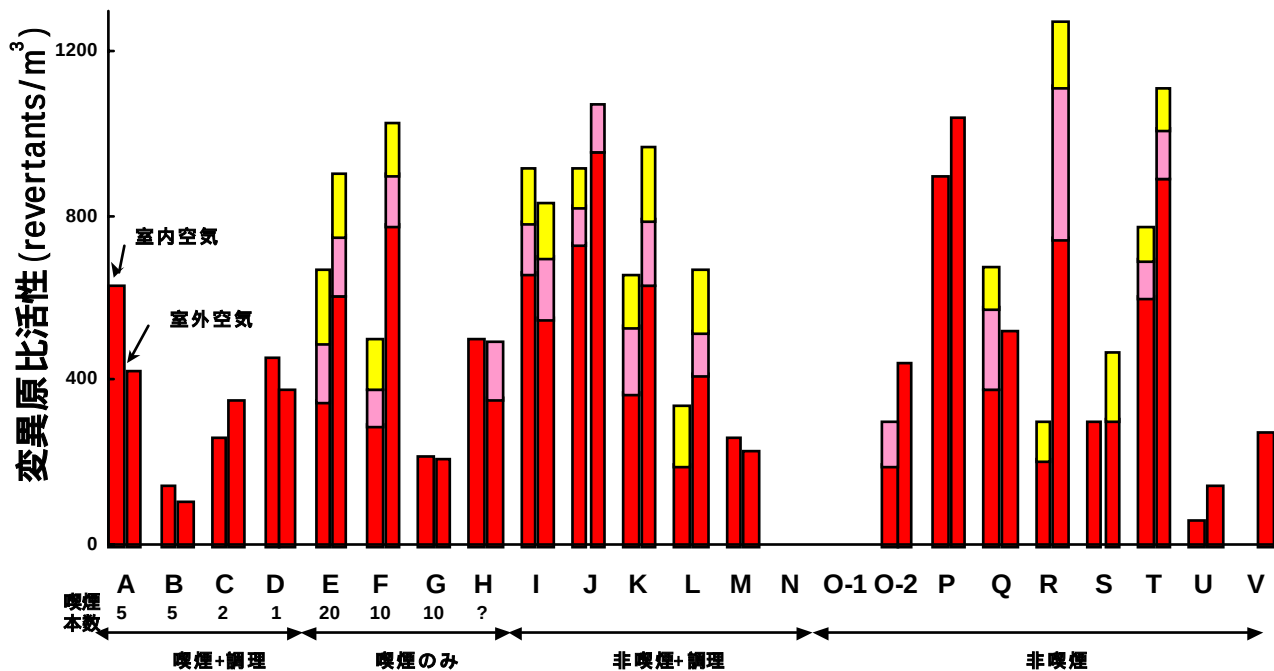


図7 PCI サンプラー試料の変異原比活性 (YG1024-S9 mix)
(東京、一般家庭、2000年8~12月)

一方、喫煙のみが行われていた室の変異原性と室外大気のそれとを比較すると、前者は後者より若干低いか、同等であることから、直接変異原活性に対する喫煙影響はそれ程大きくないと推測された。さらに、(非喫煙+調理)群と非喫煙群とを比較すると、前者には室内の方が室外よりやや高いものが2例、その逆が3例あるのに対して、後者すなわち非喫煙群では7例中6例が室内より室外の方が高い変異原性を示した。これらの結果、室内の変異原性は喫煙や調理が行われていない場合、室外大気のそれより低いか同程度であるが、喫煙と調理は室内の変異原性を若干増大させ、室内の方が室外より高い値を示す場合もあることを示している。

(3) ニトロアレーン

大気浮遊粒子の健康影響は浮遊粒子に長期間暴露された後に現れることが多い。特にがんは長期の潜伏期間を経て発症するから、発がん和大気汚染との関係を詳細に追跡するためには長期間、少なくとも20年またはそれ以上にわたって大気浮遊粒子濃度や浮遊粒子に含まれる発がん関連物質の濃度が観測されている必要がある。

幸い、本研究班に属する松本班員の研究所(北海道環境科学研究センター)では1974年12月から今日まで浮遊粉じんをハイボリュームサンプラーで捕集し続け、捕集試料は適切に冷凍保存されていた。そこで本研究では当該試料を用いて26カ年にわたる1-ニトロピレン(1-NP)と3種のジニトロピレン(1,3-, 1,6-, 1,8-DNP)や浮遊粉じん、ベンゾ[a]ピレンの測定を行った。

測定結果の1例として、図8に浮遊粉じん、ベンゾ[a]ピレン、1-NPおよび3種のジニトロピレン(DNPs)の26年間における季節変動を示す。浮遊粉じんはスパイクタイヤによる土砂の巻き上げなどの影響で、一般に春に高い値を示すが、それらの値は90年代初頭まで $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を超え、近年ようやく $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下となりつつある。

ベンゾ[a]ピレン濃度は一般に冬期に高いが、75年から90年までの間低減しつづけ、90年以降は、各季節とも $2 \text{ng}/\text{m}^3$ 以下の値となっている。これに対して、1-NPとDNPsの大気中濃度は一般に冬季に高く、気中濃度の年平均は1975年から1990年代初めにかけてゆるやかな増加傾向を示した。これは、この間におけるディーゼル車数の経年的増加との関係があるものと推測される。一方、1990年代の中頃から2000年にかけて、これらニトロアレーンの濃度は明らかな減少傾向を示しており、ディーゼル車燃料である軽油に対する低硫黄化対策やディーゼル車排出粒子抑制対策などの自動車排出ガス対策が効を奏したものと考えられる。

図9は浮遊粉じんから抽出した有機物質1gあたりの1-NP含量およびDNPs含量の季節変化を26カ年にわたって示したものである。1-NPのパターンとDNPsのそれとを比較してみると、DNPsは75年から90年初期にかけて夏季の含量がその他の季節のそれより高い特徴が認められる。この原因は必ずしも明らかではないが、当時は軽油中の硫黄含量が高かったから浮遊粉じん中の硫酸や硝酸の濃度が高かったことと、夏場は紫外線が強いことから、大気浮遊粒子中で1-NPがDNPsへ変化しやすい条件にあったのではないかと推測される。

いずれにしても、本研究で得られたデータは国際的にみても極めて貴重なものであり、今後、疫学における暴露評価の推定などに利用されるものと思われる。

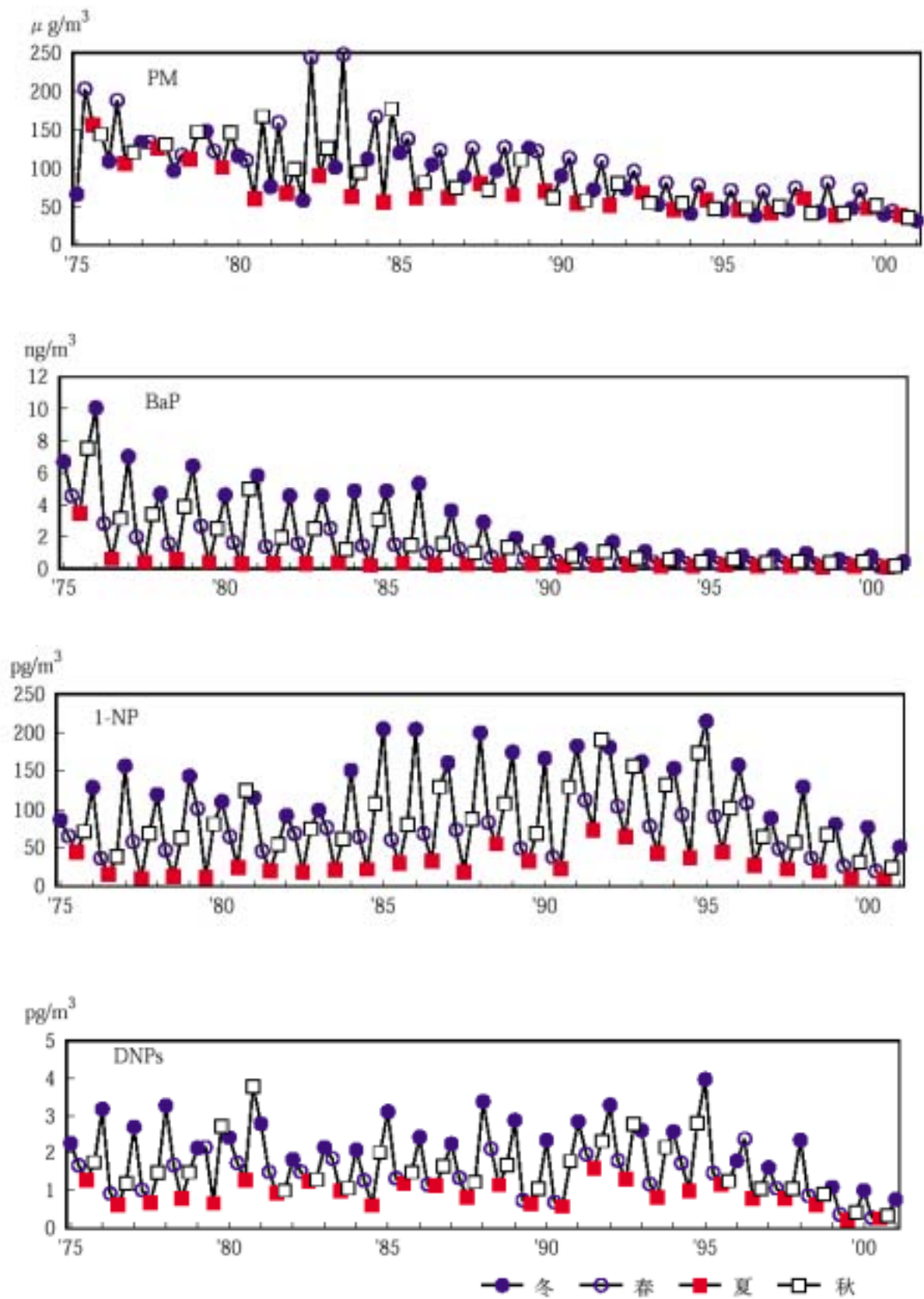


図8 札幌市における大気中 PM, BaP, 1-NP および DNPs 濃度の季節別長期変動

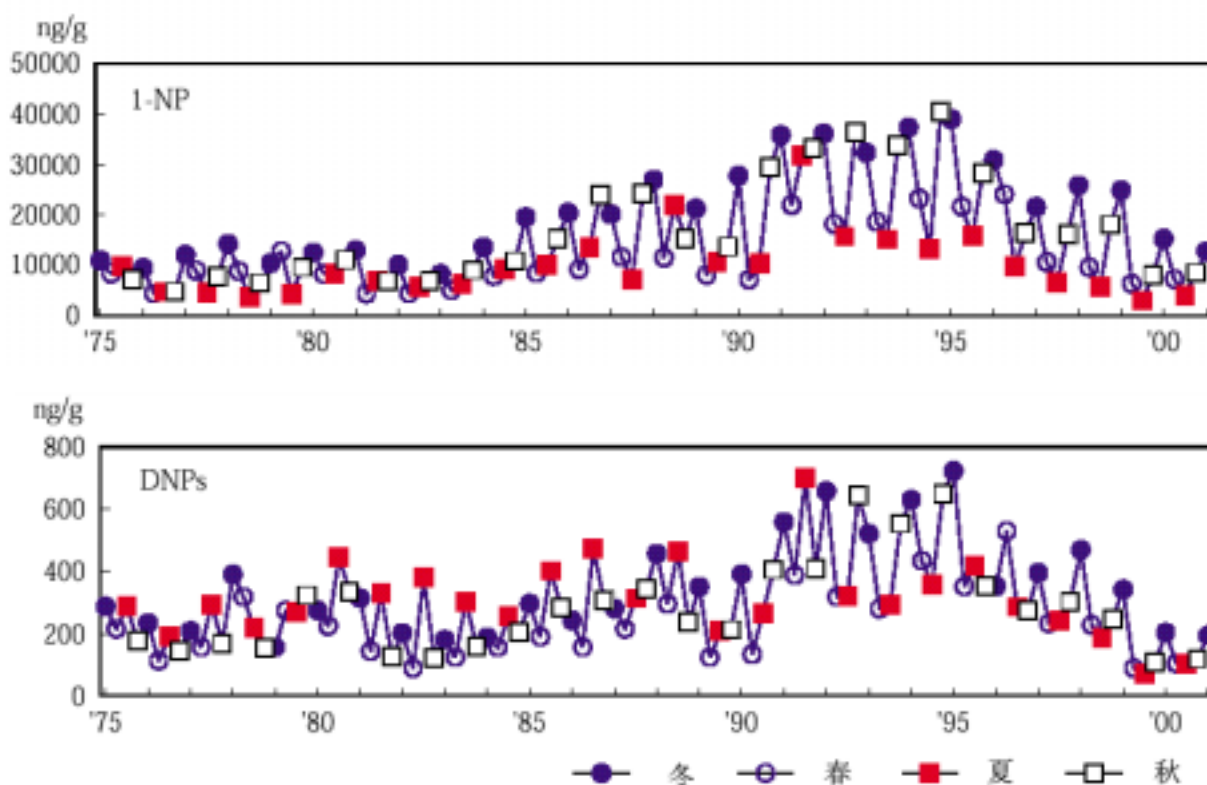


図9 札幌大気浮遊粉じん抽出有機物質に含まれる1-NP, DNP's 濃度(ng/g)の季節別長期変動

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てから今日まで、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PM_{2.5}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、PM_{2.5}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または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およ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する手法を種々開発、検討し、これらを環境調査に適用して、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。また、近年その重要度がますます増大しつつあるアレルギー対策の基礎として、空气中アレルゲンの存在実態の定量は極めて重要であるが、感度や簡易さに欠けるうらみがあり、計測法の改良が強く望まれていた。

本研究班は第4期研究(平成9~11年度)以来、上記課題の解決に取り組んでおり、計測手法の改良・開発や、これらの手法による環境実態の把握につとめてきた。本年度はこれらの成果の上に化学計測法の改良・開発、空气中アレルゲン、特に真菌計測法の高感度化、および環境大気や室内空気の汚染実態調査等を行った。これらの研究の主な成果は4(平成13年度の研究成果)にしるし

であるが、これらのうち、特に重要と考えられる事項について述べることにする。

化学計測法の改良・開発の主点の1つはPM2.5 個人サンプラーの開発であり、すでにサンプリングヘッドの開発は終了し、現在、これを稼働させる小型低騒音ポンプの試作を繰り返しつつあり、それ程遠くないうちに一応満足しうる携帯型個人サンプラーが出来上がるものと考えている。また、仮の個人サンプラーを被験者に携帯してもらい、サンプラーとしての問題点や個人暴露濃度と環境濃度との関係を検討中である。いずれにしても、より正確に暴露評価を行いうる個人サンプラーの開発とその有効性の検討は本研究班の大きな課題である。

化学計測法の開発に係る本年度の大きな成果としては気中フタル酸エステル類の高感度簡易分析法として、2つの方法が開発されたことをあげることができる。第1のフィルター捕集・加熱脱着・GC/MS法は、フィルターに捕集した被検成分の全量をGC/MSに導入できるため、高感度測定が可能で、個人暴露量や室内外のフタル酸エステル類濃度の日内変動の測定などに有効である。

第2のフィルター捕集・溶媒抽出・GC/MS法は、加熱脱着装置を必要とせず、GC/MSを備えた機関であればフタル酸エステル類の分析が簡単にできる等の利点を有する。但し、個人暴露量の測定に適用する場合は大量試料濃縮導入装置や濃縮法等を考慮する必要がある。なお、フタル酸エステル類を含むプラスチックは大量に社会のあらゆる場所で使用されているため、当該物質の捕集・分析に先立って、用いる捕集資材のクリーンアップ、溶媒の選択や精製のほか、分析器具や分析者等からもたらされるコンタミネーションの防止が必要であり、これらに関する諸対策を明らかにしたことは注目に値する。

空气中アレルゲンの高感度計測法の開発に関しては、第4期研究（平成9～11年度）において、ネコ、ダニ、スギ花粉の主要アレルゲンの高感度定量法として蛍光ELISA法を開発し、その有効性を示した。第5期研究においては、研究の主力を真菌におき、従来の培養法よりも簡便、迅速に高感度計測しうる方法の開発を目的として、真菌の細胞外多糖体（ESP）を免疫化学的に検出、定量する方法の検討を行った結果、昨年度の比色ELISA法より10倍高感度な蛍光ELISA法の開発に成功した。

また、EPAの属間の交差反応性について、昨年度は各属1種類の菌株のみで評価し、アスペルギルスとペニシリウム間に弱い交差反応が認められたが、それ以外の属間での交差反応は認められなかった。本年はこの事をさらに確かめるために、各属の代表種、合計40種の菌株からの培養物を用いて属内、属間の交差反応を調べた結果、クラドスポリウム、アルテルナリア、カンジダのEPS-ELISAは他属のEPSには反応しないことを確認した。しかし、アスペルギルスとペニシリウムのEPS-ELISAでは両者は互いに強く交差反応をするほか、アスペルギルスはある種のクラドスポリウムとも若干、交差反応を示すことを認めた。これらの諸事実は、本法は環境中の主要真菌のうち、クラドスポリウム、アルテルナリアおよびカンジダの3属の環境汚染レベルの評価には役立つが、アスペルギルスとペニシリウムに関しては分別評価が困難であることを示している。

一方、気中真菌のサンプリングに対して、PCIサンプラーが有効であることを1カ年間にわたるサンプリングにより確かめた。また、真菌アレルゲン検索の一環として、各種真菌中の蛋白量の測定を行い、菌糸体の蛋白含量は真菌の属・種類・菌株により大きく異なるが、クラドスポリウムに属する各種菌株の孢子中の蛋白含量は若干の例外を除くと比較的狭い範囲にあることを認めた。EPSや蛋白含量と主要アレルゲンとの関係は今後の研究課題である。

浮遊粒子状物質による環境汚染の実態調査に関して、PM2.5のPM10に対する割合が、室内（居間、寝室、職場）空気、室外大気とも極めてよく一致していたことから、室内汚染に対する大気汚染の

影響は大きいと推察された。これらの結果は今までの本研究の成果と軌を一にしている。これらの諸事実は、過去の大気中 SPM または PM10 の値から大まかに PM2.5 を推定しうることを強く示唆している。

生活環境中の浮遊微小粒子への個人曝露は喫煙者の方が、生活を共にする非喫煙者よりかなり高いことを示唆する客観的データが個人サンプラーにより得られつつあることは興味深い。

また、12.1 μm 以上から 0.06 μm 以下の 13 段階に大気浮遊粒子を分級捕集し、その中の PAH や変異原性パターンを調べた結果、難揮発性 PAH や変異原性の粒径分布は浮遊粒子のそれと大きく異なり、微小粒子にその殆どが含まれていることを認めた。また、浮遊粒子単位当量あたりの PAH や変異原性の量は 0.06 μm 以下の超微小粒子中でも比較的高いことが判った。

本研究の環境実態調査で最も注目すべきことは、1974 年 12 月から 26 カ年間にわたって、札幌市環境大気中のベンゾ(a)ピレン、1-ニトロピレンおよび 3 種のジニトロピレンの濃度推移を明らかにしたことである。これらのデータは札幌市における環境汚染要因の推移と汚染実態の関係の解明に役立つばかりでなく、さらに変異原物質への長期的曝露実態の把握を可能にするものであり、リスクアセスメントに大きく寄与するものと思われる。なお、このような長期間にわたる測定値は国際的にも見当たらない。

6 今後の課題

本研究班の最終目標は PM2.5 等の浮遊微小粒子およ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曝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。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。

1) 携帯型の PM2.5 個人サンプラーの作成とその個人曝露調査への適用

正確な曝露アセスメントの為には各個人にサンプラーを携帯してもらい、それに捕集された微小粒子を測定することが必須であり、それに適したサンプラーを作成し、その有効性を明らかにしたり、さらに優れたサンプラーの作成につながるデータを提示することは本研究の主目的であり、国際的にも重要視されている。

2) 揮発性有害化学物質への個人曝露評価手法開発の一環としてのアルデヒド類に対するパッシブサンプラーの評価、改良

現在、パッシブサンプラーで測定可能なアルデヒドはホルムアルデヒドのみであり、その他のアルデヒド類に対しては種々問題が残されている。従って、さらに多成分のアルデヒドを容易に捕集、定量するパッシブサンプラー・定量システムの開発が必要である。

3) 気中アレルゲンの高感度計測に関しては、EPS を指標とする真菌の評価法の有効性とその限界を探ると共に、場合によっては Real time PCR を利用して真菌 DNA を定量し、真菌汚染の指標とすることも模索する必要がある。

真菌の主要アレルゲンの同定・計測に関しては解明すべきことが多く、また、ダニ、ネコ、スギ花粉の浮遊アレルゲンのサンプリング法についても検討すべき課題が残されている。

4) 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 サンプラーおよび環境大気調査用に開発された種々のサンプラーを同時に稼働させて PM_{2.5} 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、これらの結果を総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や主なガス状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 PM_{2.5}）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。パッシブサンプラーを用いる揮発性有害物質の個人暴露実態や室内、室外汚染実態の把握もリスクアセスメントの一環として重要である。

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。

このような事態を背景に環境省は同省内に設置された「ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会」の平成13年度報告（平成14年3月5日）を受け、リスク評価の不確実性を踏まえつつも、予防原則の観点から、環境大気中のディーゼル排気粒子汚染の低減を図るべく、自動車単体規制の一層の強化および自動車NO_x・PM法の着実な施行を行うとともに、引き続き健康リスク評価のための調査研究を進めることとしている。

健康リスクの評価には暴露評価、すなわち問題とする物質（群）への暴露実態を正確、かつ、長期的にわたって計測し続け、それらの結果を総合的に解析する作業が不可欠である。

本研究は生活環境空気中の粒子状物質、特に健康影響と関係が深いとされる微小粒子（PM_{2.5}）のサンプリング、計測手法の開発や、それに含まれる各種有害成分の高感度分離分析法の開発、さらにはアレルギーの高感度計測法や揮発性有害成分の捕集・計測法の開発に関して、数々の成果をおさめている。これらは今後、種々の生活環境の汚染実態の把握や暴露評価に役立つものと考えられる。

また、本研究で開発した種々の計測法等を環境大気や室内外の汚染実態の把握に適用し、浮遊粒子の粒径分布、PAH（多環芳香族炭化水素）や変異原性の粒径分布、さらには26年間におよぶ札幌市大気中ニトロアレーン等各種有害物質濃度の推移等に関する知見は暴露評価のほか、環境汚染対策の基礎資料として極めて重要であると思料される。

【まとめ】

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PM_{2.5}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ギーに対して、信頼性の高い個人暴露推定評価手法を確立することを最終目的とし、各種計測法の開発やその信頼性の検討、さらには各種生活環境空気中の浮遊粒子やそれに含まれる各種有害成分、アレルギー等を調査し、これら有害成分の暴露評価や環境汚染対策の基礎資料とすることにある。本研究は3つに大別できる。以下、平成13年度に得られた主な成果を述べることにする。

(1) 携帯型 PM2.5 個人サンプラーの開発と粒子状ならびにガス状有害成分の高感度簡易分析法の開発

- ・ 携帯型 PM2.5 個人サンプラーの開発に関して、本年度は PM2.5 サンプリングヘッドを比較的に多く作成し、これを稼働させて測定値を相互に比較した結果、良好な精度が得られた。また、このサンプリングヘッドと PCI サンプラー用ポンプとをつないだものを仮の個人サンプラーとし、約 20 名の被験者に 24 時間携帯してもらい問題点を明らかにするなど、より小型で低騒音かつ携帯により適したポンプの開発をメーカーと協力して行いつつある。
- ・ フタル酸エステルには環境ホルモン作用の疑われるものが含まれている。また、当該物質はプラスチックの可塑剤等として広く使用されてきたため、その環境分布は広いが分析法上の難点等のために、フタル酸エステルによる空気汚染実態は殆ど明らかでなかった。そこで本研究では昨年度に開発したガス状と粒子状のフタル酸エステルを分別捕集し、溶媒抽出した後 GC/MS で分離分析する手法を改良してブランクを低下させ、より低濃度の汚染実態も測定可能とした。また、本年度は新たにフィルター捕集・加熱脱着・GC/MS 法を開発した。本法は超高感度で空気吸引量約 150□でも測定可能となるため、室内汚染の経時変動や汚染要因の解明に有用と考えられ、事実、この事を支持する若干の測定データが得られている。
- ・ 気道刺激性を有する気中アルデヒドの捕集・分析に関して、我々はすでにアクティブサンプラー・HPLC 法を開発したが、個人暴露評価のために必要なパッシブサンプラー・HPLC 法について検討を進め、従来から測定されてきたホルムアルデヒドのほか数種のアルデヒドの定量が可能となる条件を探りつつある。

(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

本年度は空気中の真菌の計測に焦点を絞って研究を進め、次の成果を得た。

- ・ 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、真菌のうち代表的な 5 属（アスペルギス、ペニシリウム、アルテルナリア、クラドスポリウムおよびカンジダ）を研究対象とし、これらが産生・放出する細胞外多糖体（EPS）に対する ELISA 測定システムの検討を行った。この検討は昨年度より行ってきており、昨年度は比色 ELISA 法の開発に成功した。本年度はこれらをさらに高感度化するために蛍光 ELISA 法の検討を進め、比色法より 10 倍高感度な方法を 5 属すべてについて確立した。また、本年度は各属の EPS・ELISA の属内、属間における交差反応性を精力的に調べた結果、アスペルギスとペニシリウムの EPS・ELISA は互いに強く交差反応を示すことを認めた。しかし、残りのクラドスポリウム、アルテルナリアおよびカンジダの 3 属は属間における交差反応性を示さず、属レベルでの特異性が保たれていることから環境中の上記 3 属の真菌の汚染レベルの評価に ELISA 法は有効と考えられるが、その有効性についてはさらに検討が必要である。
- ・ PCI サンプラーによる真菌のサンプリングを 1 回 7 日間、1 カ年にわたって行い、得られた試料中の真菌を培養法で調べた結果、その大部分は粒径 2.5~10 μm の粒子を捕集するフィルター部

分に存在することや、電顕像の解析などから、PCI サンプラーは浮遊真菌の捕集に有効と判断された。このほか、真菌アレルゲン検索の一環として真菌の蛋白量が測定され、同一属（クラドスポリウム）内の各種菌株間の孢子蛋白量にはあまり大きな差はないこと、菌糸体中の蛋白含量は属間のみならず属内でも菌種により大きく変動することを認めた。今後真菌アレルゲンの特定に関する研究が強く望まれる。

（３）環境大気や一般家庭の室内・室外空気中の微小粒子およびそれらに含まれる有害成分の調査

- ・ 静岡市において PCI サンプラーを用いて一般家庭の室内と室外空気および職場の室内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）に分級捕集すると同時に、仮の携帯型個人サンプラーによる PM2.5 個人暴露量を求めた。その結果、室内外の浮遊粒子濃度の平均値は相互に類似しており、PM2.5 の PM10 に対する割合の平均値は相互に良好な一致を示したことから、室内浮遊粒子の多くは環境大気に由来する可能性が高いこと、PM10（または SPM）濃度から PM2.5 濃度を大まかに推定しうることが示唆された。また、個人暴露量は生活様式により大きく変動すること、喫煙者は非喫煙者より副流煙の影響を大きく受けやすいことを示唆する結果を得た。
- ・ 東京都大気浮遊粒子を 12.1 μm 以上から 0.06 μm 以下まで 13 段階に分級捕集し、その中の PAH と変異原性を調べた。その結果、ピレン等の揮発性 PAH の粒径分布は若干、微小粒子側に偏るものの浮遊粒子のそれと類似した分布を示すが、ベンゾ(a)ピレン等の難揮発性 PAH は浮遊粒子の粒径分布と全く異なる分布を示し、その殆どは粒径 2.5 μm 以下の微小粒子に存在することを認めた。また、本調査では、その大部分が二次生成粒子と考えられている 0.06 μm 以下の粒子についても調べたが、当該粒子にも PAH や変異原性が認められた。また、同一試料に対して行った変異原性の粒径分布は難揮発性 PAH と軌を一にしていた。
- ・ 東京都在住者の家庭の室内と室外から浮遊粒子を採取し、変異原性を調べた結果、喫煙と調理とが行われた室内の変異原性は室外のそれより若干高い場合が多かったが、喫煙のみが行われた室の変異原性はその度合いがうすれ、非喫煙者の室の変異原性は室外のそれより若干低かった。これらの事実は変異原物質による室内汚染に喫煙や調理が関与するものの、その度合いはそれ程大きくなく、環境大気汚染の影響が大きいことを示唆している。
- ・ 札幌市で 1974 年 12 月から 26 年間にわたってハイボリュームサンプラーで捕集され、冷凍保存された浮遊粉じんを用いてベンゾ(a)ピレン、1-ニトロピレンおよび 1,3-、1,6-、1,8-ジニトロピレンを測定し、それらの季節変動、経年変動を明らかにすると共に汚染に及ぼす環境因子の影響を検討した。このような長期間にわたるがん・変異原物質の調査事例は欧米諸国にもみられない貴重な知見であり、今後、暴露評価や暴露の健康に及ぼす影響、さらには汚染に及ぼす環境因子の影響解明に活用されるものと思われる