

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

新規採取法及び細胞・動物曝露実験による PM_{2.5}の健康影響決定要因の同定 (5-1651)

平成28年度～平成30年度

Identification of the Factors Responsible for the Health Effects of PM_{2.5}
by Newly Developed Sampling Methods and Exposure Experiments

〈研究代表機関〉

学校法人慶應義塾

〈研究分担機関〉

京都大学

〈研究協力機関〉

埼玉県環境科学国際センター

福岡大学

東京ダイレック株式会社

2019年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 健康影響評価に資するPM2.5 新規採取法の開発及びPM2.5 成分組成の解明	15
（学校法人慶應義塾）	
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 細胞・動物曝露実験によるPM2.5 の健康影響決定要因の同定	35
（京都大学）	
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
III. 英文Abstract	57

I. 成果の概要

課題名 5-1651 新規採取法及び細胞・動物曝露実験によるPM2.5の健康影響決定要因の同定
 課題代表者名 奥田 知明（学校法人慶應義塾 慶應義塾大学理工学部応用化学科准教授）
 研究実施期間 平成28～30年度
 累計予算額 94,755千円
 （うち平成28年度：32,094千円、平成29年度：32,134千円、平成30年度：30,527千円）
 累計予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード PM2.5、生体影響、大気粒子状物質、化学組成、曝露影響評価、サイクロン、細胞曝露、動物曝露、炎症活性、免疫反応

研究体制

- (1)健康影響評価に資するPM2.5 新規採取法の開発及びPM2.5 成分組成の解明(学校法人慶應義塾)
- (2)細胞・動物曝露実験によるPM2.5 の健康影響決定要因の同定(京都大学)

研究協力機関

埼玉県環境科学国際センター、福岡大学、東京ダイレック株式会社

1. はじめに(研究背景等)

微小粒子状物質(PM2.5)が生体に深刻な被害を及ぼす可能性があることは以前から指摘されていたが、2009年の我が国におけるPM2.5の環境基準の制定や、2013年の国際がん研究機関による粒子状物質の「ヒトに対し発がん性がある物質」への指定、さらには2013年と2015年に発生した中国北京市周辺における極めて深刻なPM2.5汚染とその日本への影響の懸念の高まりを受けて、これまで以上にPM2.5研究を推進する緊急性・重要性が高まっている。PM2.5の有害性は物理化学的特性に依存するため、成分組成の相違に着目した健康影響評価研究の推進は喫緊の課題であるが、従来のPM2.5採取法であるフィルター捕集では、実環境大気中PM2.5を大量に採取できずに細胞や動物曝露に用いることが困難なことや、フィルター捕集中にガス状物質の吸着や粒子との化学反応や半揮発性成分の揮散等が起こることが大きな問題となっている。しかし、これまで行われてきたPM2.5研究は、その多くがフィルター捕集を前提に進められているため、試料量の制限や試料採取中の変質の影響を避けられていなかった。そこで、フィルターを用いずにPM2.5粒子を採取した上で化学分析や曝露実験を行い、PM2.5の有害性に関連する物理化学的特性を明らかにすることが求められている。

2. 研究開発目的

微小粒子状物質(PM2.5)の有害性は物理化学的特性に依存するため、成分組成の相違に着目した健康影響評価研究の推進は喫緊の課題であり、特に、気管支喘息を代表とする呼吸器系や免疫系に対するPM2.5のリスクに係る信頼性の高い科学的知見の蓄積が求められている。しかし現状では、実環境大気中のPM2.5粒子全体(PM2.5粒子そのもの)を曝露して健康影響を直接評価できる手法はなく、その一部成分の影響が評価されているに過ぎない。その主な理由は、従来のPM2.5採取法であるフィルター捕集では実環境大気中PM2.5を大量に採取できず、細胞や動物曝露に用いることが困難なためである。また、フィルター捕集した粒子を物理的あるいは化学的手法により回収して曝露実験に用いた場合、フィルターそのものに由来する混入物の影響が避けられず、真にPM2.5の影響評価と見なすには問題が多い。例えば先行研究の結果では、化学的手法による抽出物を曝露実験に用いた場合、フィルター本体の抽出物の影響の存在が示唆されている。さらに、フィルター捕集中に予期せぬアーティファクト、すなわち、ガス状物質の吸着や粒子との化学反応、半揮発性成分の揮散等が起こることも大きな問題である。そこで本研究では、フィルターを用いずにPM2.5の採取を可能とするサイクロンを基幹技術とした新規装置により得られたPM2.5粒子全体を用いて化学分析や曝露実験を行うことで、PM2.5

の健康影響を決定する真の要因や化学成分を同定することを目的とする。

3. 研究開発の方法

(1) 健康影響評価に資するPM2.5 新規採取法の開発及びPM2.5成分組成の解明

バーチャルインパクトとサイクロンを組み合わせたPM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置K-ViC (Keio-Virtual impactor with Cyclone)を製作し、その性能評価を行った。バーチャルインパクトの分級性能はAPS (Aerodynamic Particle Sizer, TSI APS3321)、またサイクロンの分級性能はSMPS (Scanning Mobility Particle Sizer, TSI nanoscan 3910)を用いてそれぞれ測定した。本装置を福岡、埼玉、および横浜に設置し、3地点でPM2.5粒子の採取を開始した。流量は約1,200 L/minとし、1回につき約3～4週間の連続稼働を行い、採取されたPM2.5粒子の化学分析を行った。元素分析はエネルギー分散型蛍光X線分析装置(リガク社製EDXL300/NEXCG)および酸分解/誘導結合プラズマ質量分析法(Agilent 7500cx ICP-MS)を、また水溶性イオン成分分析は超純水抽出後イオンクロマトグラフィー(Shimadzu, LC-10ATvp series)を用いて行った。炭素成分分析は熱分離光学補正法(Sunset EC/OC analyzerおよびDRI Model 2001A, IMPROVE protocol, TOR method)により行った。試料からのPAH誘導体ならびにPAHの抽出は、粒子にサロゲート物質として重水素化PAH, NPAH, OPAHを所定量添加し、ジクロロメタンを抽出溶媒として30分間超音波抽出を行った。抽出液は濃縮後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による測定に供した。PAHの同定・定量には蛍光検出HPLCを、NPAHとOPAHの同定・定量にはインライン還元-蛍光検出HPLCを用いた。なお、PM2.5粒子と並行して採取される粗大粒子についても同様に採取と分析を行った。なお、本業務の一部は以下の通り再委託を行った。PAH類の分析業務: 京都大学大学院エネルギー科学研究科・東野達教授・亀田貴之准教授、埼玉におけるPM2.5粒子採取および炭素成分分析業務: 埼玉県環境科学国際センター・長谷川就一専門研究員、福岡におけるPM2.5粒子採取業務: 福岡大学・林政彦教授・原圭一郎助教・西田千春博士、PM2.5粒子採取装置の設置業務: 東京ダイレック株式会社・井上浩三部長。

(2) 細胞・動物曝露実験によるPM2.5 の健康影響決定要因の同定

(1) 横浜においてサイクロン捕集された粒子を、既報告に準じ、超音波発生機(UD-100、トミー精工)を用いてpower 99あるいは40、1～3分の条件で処理した。粒子を位相差顕微鏡(BZ-9000、キーエンス)にて観察後、ソフトウエアを用いて粒径測定を行った。(2) 横浜においてサイクロン捕集された粒子と従来法(フィルター)で採取した粒子の抽出物を、気道上皮細胞とリコンビナントマウス顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子によって分化誘導させた骨髄由来抗原提示細胞に24時間曝露した。細胞活性を、Water soluble tetrazolium-1(WST-1)を用いた比色法により、異物の取り込みや異物情報の提示に関わる細胞表面マーカーに関する解析をフローサイトメトリーにより、催炎症性サイトカインの産生をEnzyme linked immuno sorbent assay(以下ELISA)法により、それぞれ解析した。(3) 横浜においてサイクロン捕集された粒子を鼻腔上皮細胞に24時間曝露し、細胞活性と催炎症性サイトカインの産生を解析した。(4) 横浜、埼玉、福岡においてサイクロン捕集された粒子を気道上皮細胞に24時間曝露し、細胞活性と催炎症性サイトカインの産生を解析した。(5) 横浜、埼玉、福岡においてサイクロン捕集された粒子を抗原提示細胞に24時間曝露し、細胞活性、催炎症性サイトカインの産生および細胞表面分子の発現を解析した。(6) サイクロン捕集された粒子中の化学的および生物的成分と各種細胞に対する影響の相関解析を行なった。(7) 動物への曝露実験は、ICRマウス(雄性6wk)を用い、横浜においてサイクロン捕集された粒子を気管内投与した。24時間後に、肺と気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、肺の病理学的変化をヘマトキシリン・エオジン染色により、BALF中の総細胞数および細胞成分(単核球および多核球)をディフ・クイック染色により測定した。

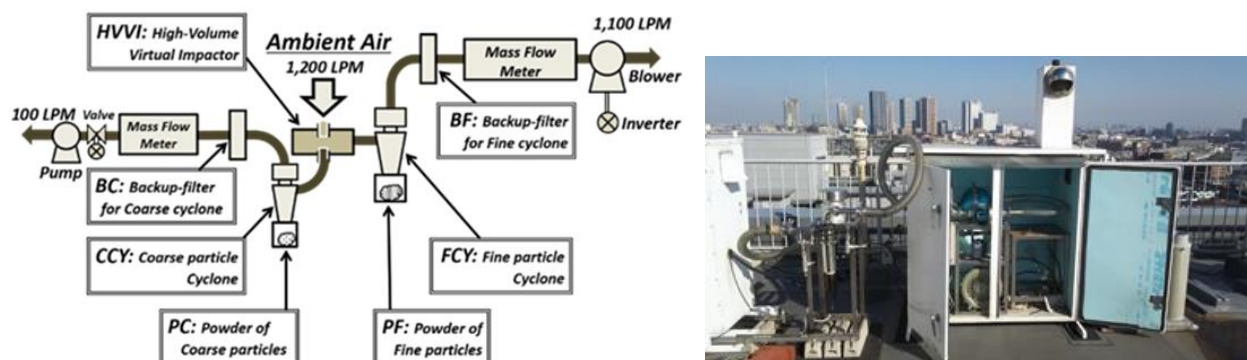
4. 結果及び考察

(1) 健康影響評価に資するPM2.5 新規採取法の開発及びPM2.5成分組成の解明

1) PM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置

分級技術としてバーチャルインパクトとサイクロンを組み合わせたPM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置を製作し、横浜(慶應義塾大学矢上キャンパス屋上)、埼玉(埼玉県環境科学国際センター展示館屋上)、

福岡(福岡大学理学部18号館屋上)にそれぞれ設置した。装置概略図と写真を図(1)-1に示す。本装置は大きく分けて、PM2.5と粗大粒子を分級するバーチャルインパクト部、PM2.5を捕集する微小側と、粗大粒子を捕集する粗大側からなる。本装置に用いるバーチャルインパクトは主流流量を1,100 L/min、副流流量を100 L/min、全流量を1,200 L/minと設定した。この流量において、本装置のバーチャルインパクトによってPM2.5(粒子の空気動学的50%分粒径が $2.5\ \mu\text{m}$ の大気粉塵)を分粒する設計とした。



図(1)-1 PM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置(KIVI-2C-1200Z)概略図と写真(横浜)

2) PM2.5と粗大粒子の大流量同時採取装置の大気導入部分(Virtual Impactor)の分級性能評価

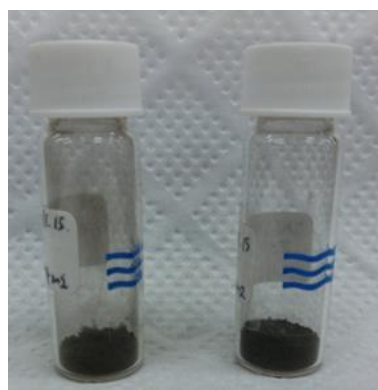
本装置のVirtual ImpactorとReal Impactor(HVI2.5)は共に、JIS Z 8851: 2008で規定されているPM2.5の分級性能である、「50 %分粒径 (Dp_{50}) が $2.5 \pm 0.2\ \mu\text{m}$ 、80 %分粒径に対する20 %分粒径の比で規定する傾き (Dp_{20}/Dp_{80}) が1.5以下」を満たしていた。つまり、新規装置で用いられているVirtual Impactorは、従来法で用いられているReal Impactorと同等の分級性能を持つと言える。

3) 微小側(PM2.5採取用)および粗大側(粗大粒子採取用)サイクロンの分級性能評価

NaCl粒子を用いて、微小側サイクロンの分級性能評価を行った。サイクロンの1,100 L/minにおける50%分粒径は、 $0.27\ \mu\text{m}$ 程度であることがわかった。このことから、バーチャルインパクトと組み合わせて粒径 $2.5 \sim 0.27\ \mu\text{m}$ の粒子の大部分をサイクロンで捕集することができると考えられる。次に、環境大気粒子を用いて、粗大側サイクロンの分級性能評価を行った。流量100 L/minのときの50%分粒径は $0.7\ \mu\text{m}$ 程度となった。このことより、粗大側サイクロンによって、バーチャルインパクトによって分級された $2.5\ \mu\text{m}$ 以上の粗大粒子のほとんどを捕集できていると考えられる。

(4) PM2.5と粗大粒子試料採取結果

横浜、埼玉、福岡にてPM2.5と粗大粒子の大流量同時採取装置により採取された粉体試料の例を図(1)-2に、また試料の記録を表(1)-1に示す。年間を通して、1回のサンプリングにつき3～4週間程度の採取期間で46～678 mgの大気粒子を得ることができた。



図(1)-2 採取された粉体試料の例 (左:粗大粒子 右:微小粒子(PM2.5))

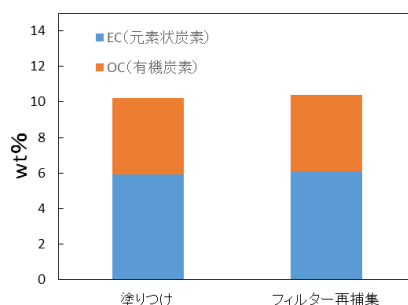
表(1)-1 本研究におけるPM2.5と粗大粒子の大流量同時採取装置による粉体試料採取結果

試料No.	地点	捕集期間	捕集時間 [days]	積算流量 [m ³]	微小粒子 捕集粉体量 [mg]	粗大粒子 捕集粉体量 [mg]
CYCLEX-1	神奈川	2016/04/28~05/18	20.9	37,159	678	195
	神奈川	2017/02/15~03/10	23.1	43,648	434	619
CYCLEX-2	埼玉	2017/02/17~03/15	26.1	49,055	290	213
	福岡	2017/02/16~03/21	32.7	61,613	183	92
CYCLEX-3	神奈川	2017/05/10~06/06	26.7	51,614	238	267
	埼玉	2017/05/10~06/06	27.0	50,639	200	134
	福岡	2017/05/11~06/08	28.0	52,443	168	137
CYCLEX-4	神奈川	2017/07/14~08/07	23.6	47,068	115	105
	埼玉	2017/07/14~08/07	23.9	44,849	96	54
	福岡	2017/07/21~08/17	24.0	50,631	98	56
CYCLEX-5	神奈川	2017/10/18~11/16	29.0	56,424	173	75
	埼玉	2017/10/20~11/15	25.8	48,454	149	119
	福岡	2017/10/19~11/16	27.9	52,281	196	55
CYCLEX-6	神奈川	2018/01/16~02/09	23.0	47,299	334	76
	埼玉	2018/01/18~02/14	25.8	50,322	205	127
	福岡	2018/01/12~02/08	25.8	50,328	200	46
CYCLEX-7	神奈川	2018/05/15~06/05	20.0	39,771	308	281
	埼玉	2018/05/10~06/05	24.7	48,209	293	136
	福岡	2018/05/11~06/07	25.9	50,436	259	124

(5) 炭素成分分析における粉体試料の前処理方法の検討

PM2.5の炭素成分分析の公定法である熱分離光学補正法は、一般にフィルター試料を測定することに用いる方法であり、粉体試料を分析する際の規定の方法は定められていない。本装置(サイクロン)で採取された粉体試料の炭素成分を分析する手法としては、1 cm²のフィルターに粉体を塗布する方法と、粉体を再発塵させフィルターに再捕集させる方法が考えられる。フィルターに塗布する方法は簡便で少量の試料で済むが、フィルター上に均一に粉体試料を塗布することは困難である。これに対して再発塵させフィルターに再捕集させる方法では、任意の面積の平面上に均一に粉体を捕集することができる反面、フィルター上に500 μgの試料量を確保するためには10 mg程度の粉体試料の再発塵が必要であり、また処理工程も多い作業であるという特徴がある。そこで、簡便な手法である塗布する方法が有効な方法であるかを確かめるために、粉体を塗布する方法と再発塵・再捕集させる方法で試料を作成し、炭素成分の分析結果を比較することで両者が同等の結果とみなせるかどうかを調べた。

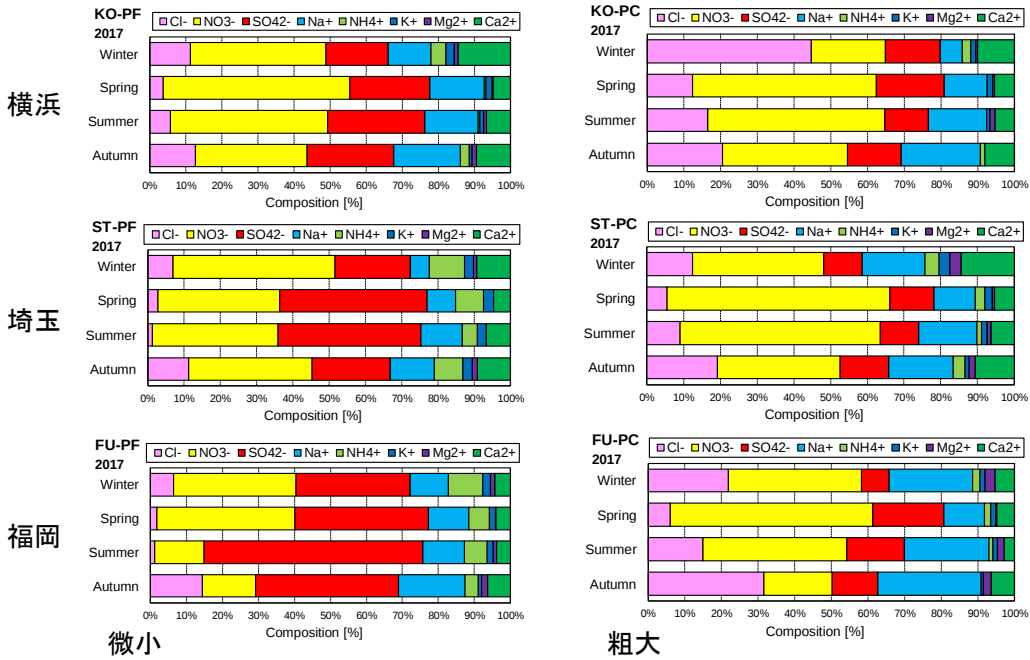
約10 mgの粉体試料(CRM#28)を再発塵装置で再発塵させ、石英繊維フィルター上に捕集し再発塵捕集試料とした。この時、フィルター上に捕集された粉体は約500 μgであった。また、同様の粉体試料約500 μgを、フィルター上に塗りつけることで塗布試料とした。各前処理による試料中の炭素成分の分析結果を図(1)-3に示す。この結果より、粉体試料の炭素分析において、塗布と再発塵による結果は概ね同等とみなせると考えられたため、以降は塗布する方法にて分析を行った。



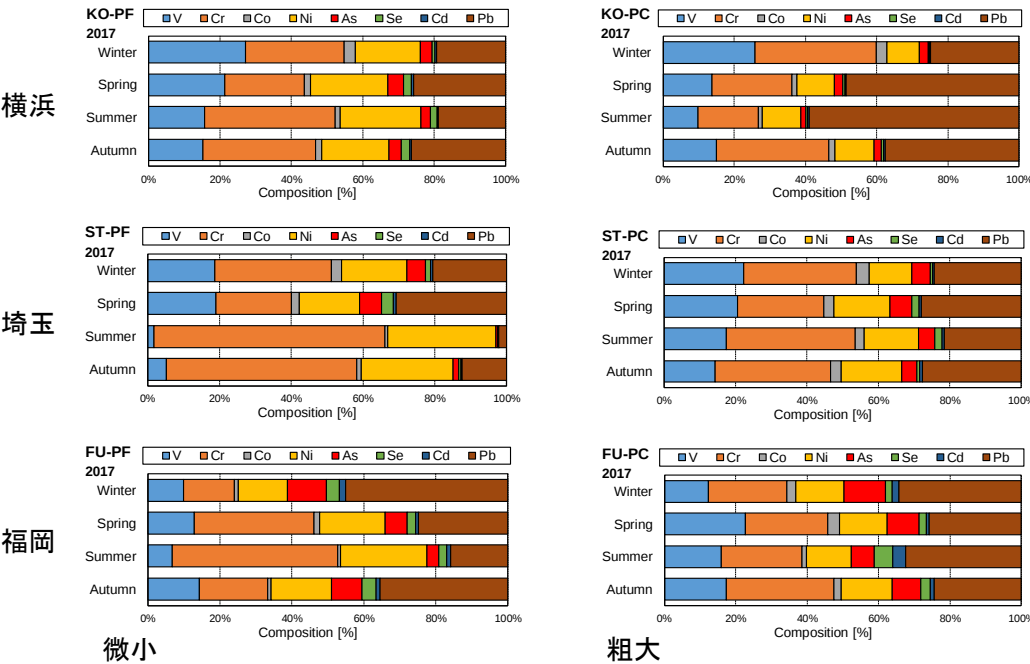
図(1)-3 前処理方法の違い(塗布および再発塵)による粉体試料の炭素分析結果の比較

(6) 横浜・埼玉・福岡で得られた大気粒子の化学組成の特徴

国内3地点においてPM2.5と粗大粒子の大流量同時採取装置を用いて捕集した大気粒子(2017年の冬・春・夏・秋、CYCLEX2~5)の化学組成を図(1)~4に示す。PM2.5の化学組成は、横浜と埼玉と比較して福岡では相対的に水溶性イオン成分の割合が大きく、特に硫酸イオンの割合が大きくなっていた。金属成分では、同様にヒ素や鉛の割合が福岡で大きくなっていた。これらの結果は、福岡において主に石炭燃焼起源粒子越境による影響が、他の地点と比較して大きく現れていることを示していると考えられる。微小と粗大の比較では、微小側と比較して粗大側において塩化物イオンや硝酸イオン、カルシウムイオンなどが多く、海塩や土壌粒子等の発生源を持つ比較的粗大側の粒子の影響が大きいことが見て取れた。



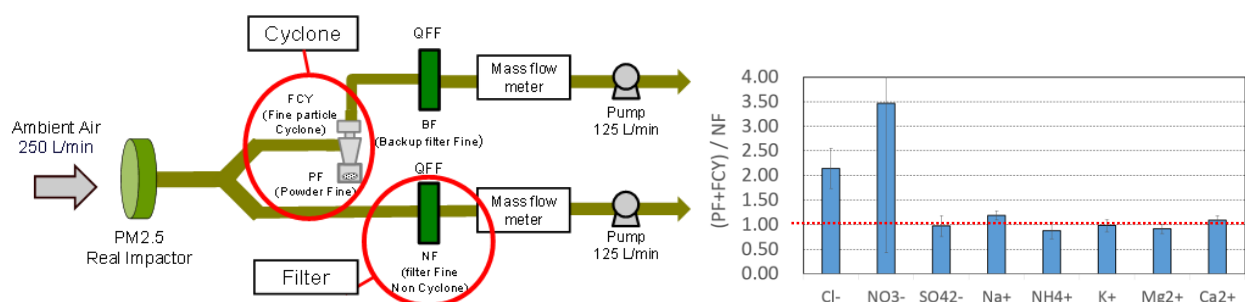
図(1)-4(a) 横浜・埼玉・福岡で得られた大気粒子の化学組成(水溶性イオン成分)



図(1)-4(b) 横浜・埼玉・福岡で得られた大気粒子の化学組成(微量金属成分)

(7) サイクロン法とフィルター法により採取されたPM2.5の化学成分組成の比較

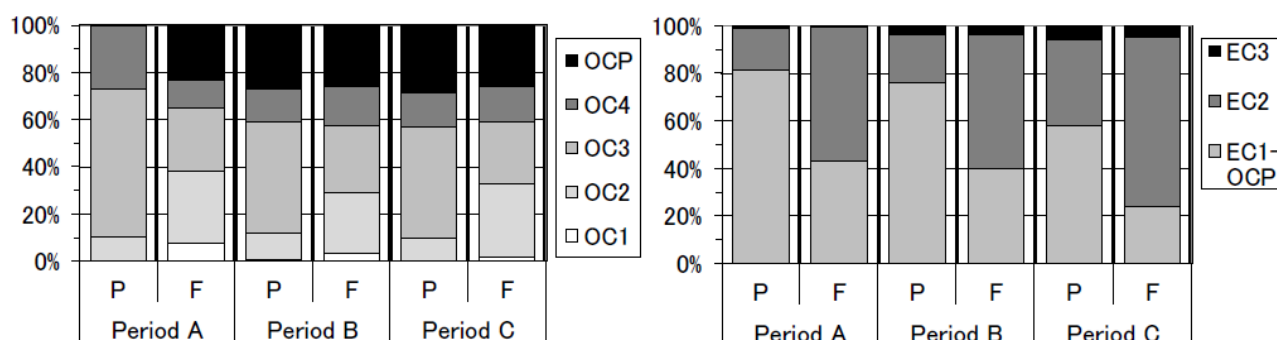
サイクロン捕集では、フィルター捕集と比較するとアーティファクトの影響を回避できる可能性がある。そこで、図(1)-5のような実験系を行い、サイクロン捕集とフィルター捕集により採取されたPM2.5の化学成分組成の比較を行った。この実験系では、リアルインパクトで分級したPM2.5をサイクロンとフィルターのそれぞれの経路で採取した。サイクロンの経路については、粉体(PF)だけではなく、サイクロン洗浄水(FCY)、バックアップフィルター(BF)についてサンプリングを行った。また、並列に設置したフィルター(NF)についても同様にサンプリングを行った。流量は125 L/minとした。採取した試料については、イオンクロマトグラフを用いて、水溶性イオン成分の比較を行った。サイクロン法とフィルター法により得られた成分の比、すなわち(PF+FCY)/NFの値について、 NO_3^- では1.91~8.90、 Cl^- では1.98~2.56という値をとった。これより、フィルター捕集では、 NO_3^- と Cl^- について損失する可能性があり、サイクロンを用いたサンプリングでは、その影響を回避できる可能性があることが示された。



図(1)-5 サイクロン法とフィルター法によるPM2.5粒子の採取実験系と水溶性イオン成分の測定結果

(8) サイクロン法により採取されたPM2.5粉体試料の炭素成分組成

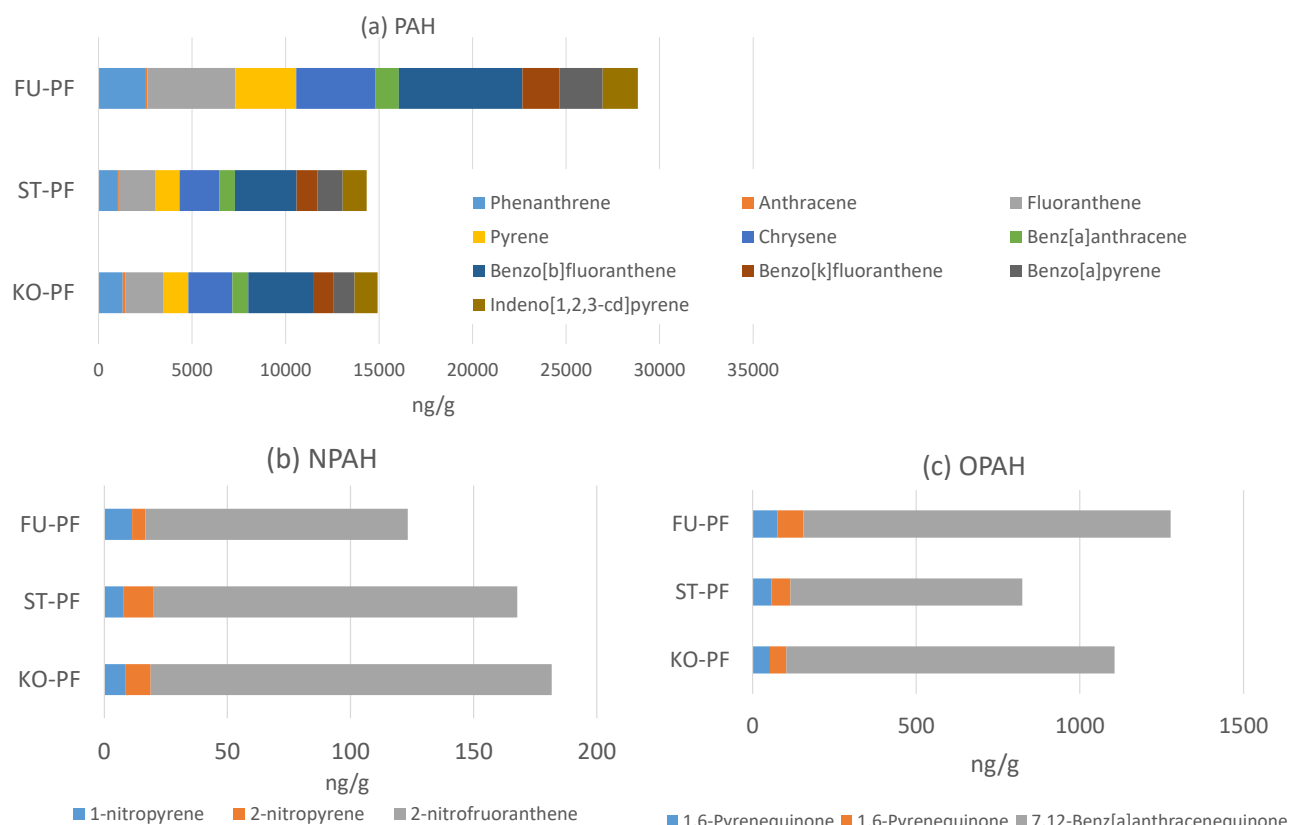
埼玉県環境科学国際センター(加須)において、2017年2月17日~3月15日(Period A)、3月22日~4月18日(Period B)、5月10日~6月6日(Period C)にそれぞれ採取された粉体試料について、炭素成分は熱分離・光学補正法(IMPROVE プロトコル, 反射光補正, DRI Model2001A)により測定した。炭素成分のフラクション割合を図(1)-6に示す。OC については、3試料とも OC2 の割合が小さく、OC3 の割合が大きかったのが特徴的であった。これは、フィルター試料による既知の知見と異なっており、同地点においてPM2.5ローボリュームサンプラー(FRM-2025, Thermo)を用いて、同期間に24 時間ごとにサンプリングした試料の平均と比較すると、明らかに異なっていた。この違いは、粉体試料の OC2 濃度がフィルター試料に比べて低いことによる。このように粉体試料において、冬季から春季にかけての異なる時期の試料でも OC2 の割合が小さいという特徴は、横浜と福岡における同時期の試料でも同様であった。また、冬季(2~3 月)のフィルター試料ではOC1 がみられるが、粉体試料ではみられなかった。EC については、フィルター試料と比較して粉体試料では char-EC(=EC1-OCpyro)の割合が大きい傾向であった。こうした違いを生じている原因として、アーティファクト(正と負の両方)が関係している可能性が考えられた。



図(1)-6 埼玉における3期間の粉体試料(P)とフィルター試料(F)のOC(左)およびEC(右)のフラクション割合

(9) サイクロン法により採取されたPM2.5粉体試料のPAHs組成

国内3地点において採取されたPM2.5(CYCLEX3～5)のPAHs類の測定を行った。結果を図(1)～7に示す。含有量で見ると、PAHs類は福岡で高かったのに対し、PAHsニトロ化体は福岡で最も低かった。この違いを明確化するため、PAHs総量に対するPAHsニトロ化体の総量の比(NPAH/PAH)を取ると、福岡で低く、埼玉と横浜で高い値を示した。(NPAH/PAH)比が高いと石油燃焼起源が示唆され、この値が低いと石炭燃焼起源が示唆されることから、福岡でこの値が低いのは石炭燃焼活動が卓越する大陸からの越境輸送の影響を受けているものと推察された。



図(1)～7 国内3地点において採取されたPM2.5中のPAHs類の測定結果(単位質量当たりの含有量)

(a) PAHs (b) PAHsニトロ化体 (c) PAHsキノン類

(10) サイクロン法により採取された大気粒子の化学組成データを用いた主成分分析

国内3地点において採取されたPM2.5(2017年の冬・春・夏・秋、CYCLEX2～5)の化学組成データを基に、化合物群毎に主成分分析を行った。水溶性イオン成分については、二次生成粒子としての硫酸アンモニウムと、土壌や海塩由来と考えられる塩化物イオン、硝酸イオン、カルシウムが明確に区別された。金属成分では、Al, Ti, Mn, Feなどの鉱物系の元素は比較的似た位置となることがわかった。多環芳香族炭化水素類(PAHs)では相互によく関連していた(例えば官能基なしの5-6環のPAHs)。特にPAHsキノン類とPAHsニトロ化体類はそれぞれ近い位置にあり、概ね、5-6環のPAHs、4環のPAHs、PAHsニトロ化体、PAHsキノン類、というグループに分類することができた。

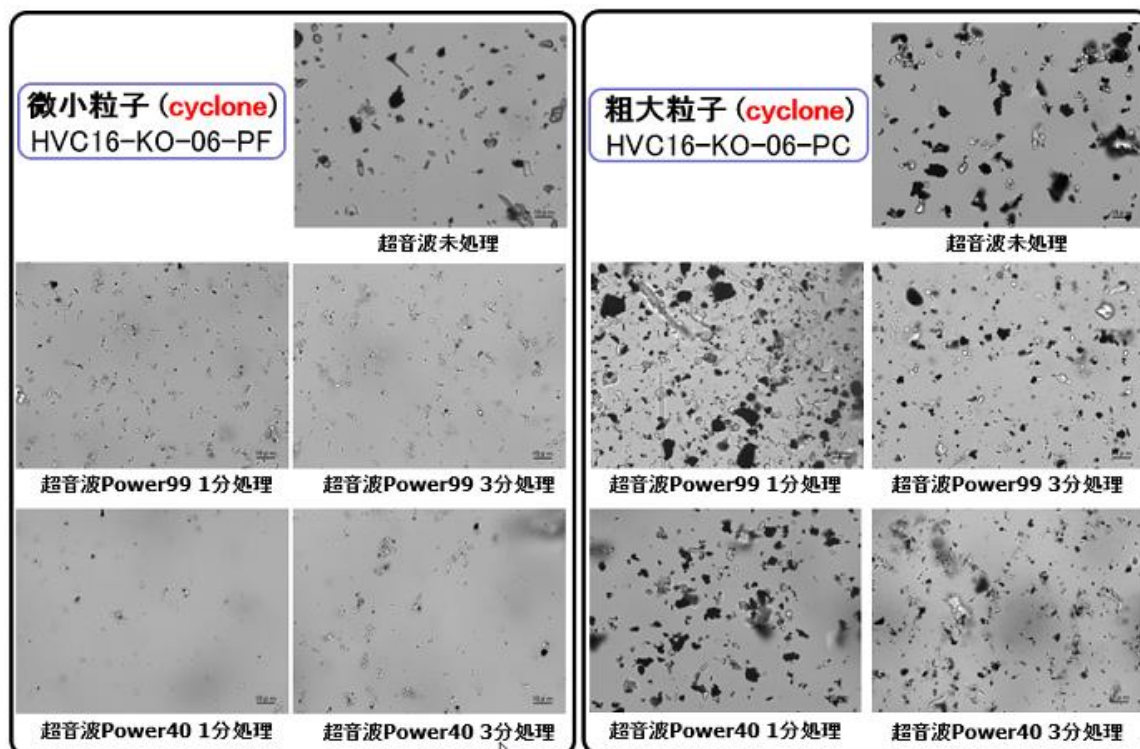
(11) 事前の計画・スケジュールに対する研究の進捗状況

初年度にPM2.5粒子の新規採取装置の性能評価と各地点への設置および得られた粒子の化学成分の実施、二年目には通年での粒子採取と分析、三年目はサブテーマ(2)の結果と合わせた粒子の化学成分と曝露影響評価指標間の統計解析を行うスケジュールを、ほぼ事前の計画通りに達成することができた。なお曝露影響評価指標間の統計解析結果は次節に詳述する。

(2)細胞・動物曝露実験によるPM2.5 の健康影響決定要因の同定

(1) サイクロンにより得られた粉体試料の顕微鏡観察結果

試料コードHVC16-KO-06PFおよびPC(横浜、試料採取期間:2016/7/25~8/6)を被検試料とした、超音波処理前後の顕微鏡観察結果を図(2)-1に示す。超音波未処理の試料では、溶液中において粒子の凝集が見られた。一方で、超音波処理を行った試料では、いずれの処理条件によっても、粒子が均一に分散されていることが確認された。微小粒子と粗大粒子では、粒子のサイズが明確に異なっていた。特に、微小粒子に関しては、超音波処理によって、大部分の粒子が2.5 μm 以下であることが確認された。

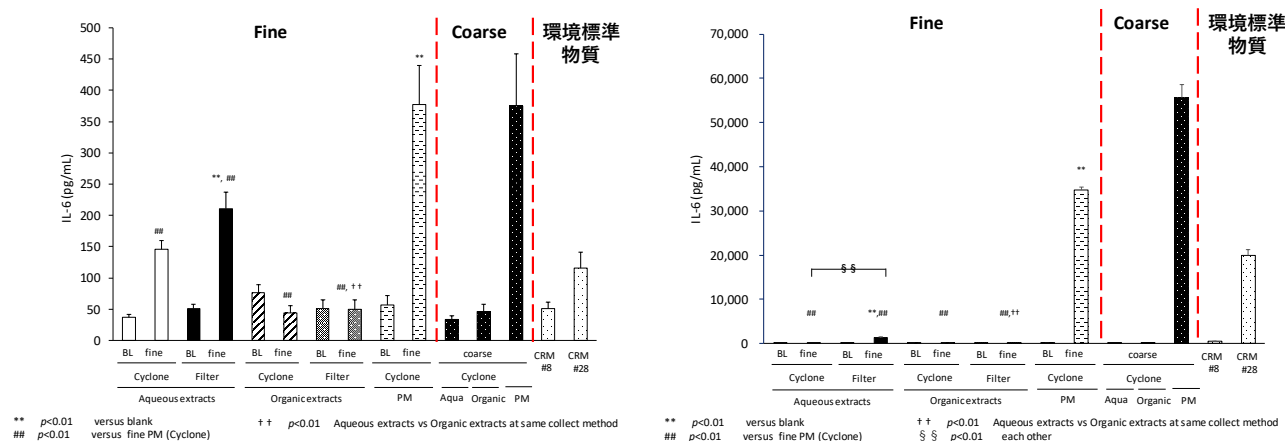


図(2)-1 超音波処理前後の粉体試料の顕微鏡観察結果(試料採取期間:2016/7/25~8/6)

(2) 曝露影響評価実験における本法と従来法の比較

本法ではサイクロンにより採取された大気粒子そのものを細胞や動物に曝露できるのに対し、従来法ではフィルター採取された大気粒子を水または有機溶媒を用いて抽出し、その抽出液を曝露している。本項では、同じ場所で同一の時期に採取されたサイクロン粒子(CYCLEX-2、横浜)とフィルター粒子を用いて、本法と従来法の比較を行った。その結果を図(2)-2に示す。これより、本法(新規採取法、サイクロン)で回収した粒子そのものは、従来法(フィルター)で採取した粒子の抽出物と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。また、同じ図において、同一のサイクロン粒子を用いて、本法(サイクロン粒子そのものを曝露したもの)と従来法(サイクロン粒子の抽出物を曝露したもの)の結果も示されている。本法で回収した粒子そのものを曝露した場合は、同一の粒子そのものの抽出物を曝露した場合と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。上記より、PM2.5等の粒子状物質の健康影響を考える上で、粒子をフィルター採取し抽出物曝露する従来法では、十分な健康影響評価ができていない可能性が示された。なお今回の実験では大気粒子を溶媒等で抽出した後の残渣(すなわち物理的影響としての粒子状物質)の評価は行っていないが、これについては既報により、溶媒抽出や加熱処理などにより共存成分の影響を除いた黄砂粒子やディーゼル排出粒子(DEP)は、未処理の粒子と比較して生体への影響が弱くなることが確認されている。本研究では、実環境中より採取された大気粒子そのものの曝露影響評価を行ったことで、大気粒子による真の曝露影響評価が行えるようになったことが重要な成果である。

本項は、環境研究総合推進費平成29年度中間評価結果個票中の「4. 委員の指摘および提言概要」における指摘事項、および同平成30年度終了課題成果報告会における質疑事項への回答となっている。



図(2)-2 本法と従来法の細胞曝露実験の比較(IL-6産生、左:気道上皮細胞、右:抗原提示細胞)

(3) 鼻腔上皮細胞への粉体試料の曝露実験結果

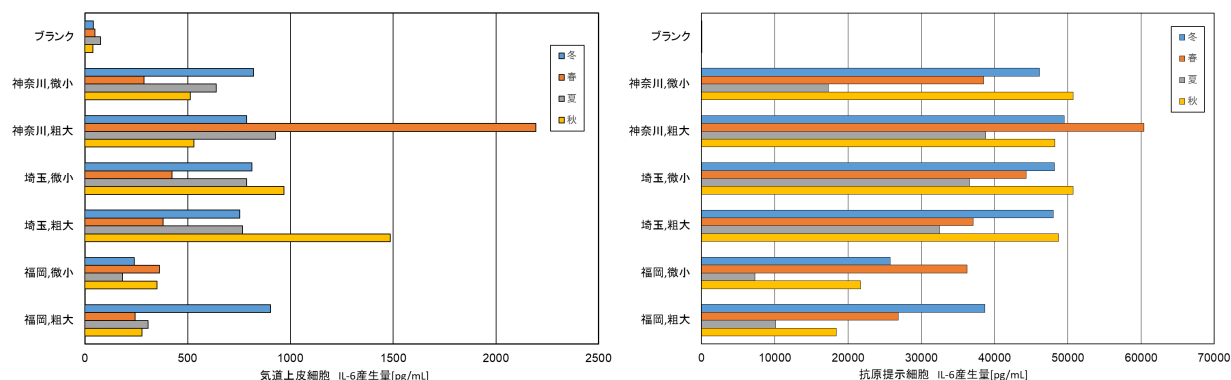
鼻腔上皮細胞としてRPMI-2650細胞を用いて、粉体試料を曝露した。微小粒子、粗大粒子ともに、コントロールと比較して細胞活性の低下を示した一方で、催炎症性サイトカインであるIL-6の産生はすべて検出限界値以下となった。

(4) 気道上皮細胞への粉体試料の曝露実験結果

気道上皮細胞としてBEAS-2B細胞を用いて、粉体試料を曝露した。曝露濃度 75 $\mu\text{g/mL}$ の条件時の結果を図(2)-3左に示す。粉体試料を気道上皮細胞に曝露した際には、細胞活性には影響しないが、炎症活性を誘導することを示した。また傾向としては、季節ごとにみると福岡では冬、埼玉では秋、また横浜では春において、それぞれ影響が大きかった。地域ごとにみると横浜と埼玉が似た傾向を示しているのに対して福岡はそれらよりも低い値を示した。

(5) 抗原提示細胞への粉体試料の曝露実験結果

抗原提示細胞としてアトピー素因を有するマウスであるNC/NgaTndCrIjマウスの骨髄細胞を用いて、粉体試料を曝露した。曝露濃度 75 $\mu\text{g/mL}$ の条件時の結果を図(2)-3右に示す。粉体試料を抗原提示細胞に曝露した際には、細胞の生存率に30%~50%程度の減少を引き起こし、また極めて強い炎症活性を引き起こすことがわかった。炎症活性の地域による差では気道上皮細胞と同様に横浜、埼玉で似た傾向を示し、福岡がそれらの地域よりも低い値を示す結果となった。DEC-205陽性細胞率については地域差はあまり見受けられず、どの地域でも20~30%程度が陽性を示す結果となった。



図(2)-3 粉体試料を細胞に曝露した際のIL-6産生量(左:気道上皮細胞、右:抗原提示細胞)

(6) 大気粒子中の化学的および生物的成分と細胞曝露影響評価指標の相関解析

粒子の成分データと各種細胞に及ぼす生体影響とを合わせてピアソンの相関解析を実施し、 $P < 0.01$ かつ相関係数 $R > 0.7$ の成分を、強い相関を持つ成分として抽出し、生体に影響を及ぼしうる化学成分あるいは生物成分の同定をめざした。

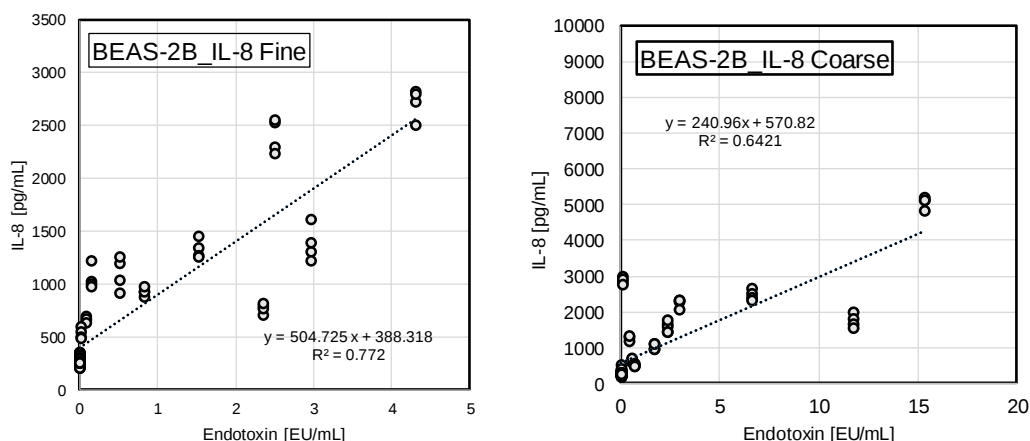
まず、気道上皮細胞への曝露結果と水溶性イオン成分で強い相関を示したのはIL-6の産生と Ca^{2+} のみであり、気道上皮細胞の生存率や炎症活性に水溶性イオン成分はあまり寄与していないと考えられた。次に、水溶性イオン成分と抗原提示細胞への曝露結果との相関を調べた結果、生存率と K^{+} に、IL-6産生と Ca^{2+} に、IL-1 β 産生と Ca^{2+} に、TNF- α 産生と Ca^{2+} に、DEC-205陽性細胞率と Na^{+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} に強い相関が認められた。

金属成分と気道上皮細胞への曝露結果との間では、IL-6産生とSi、Ti、V、Mn、Fe、Co、Cu、Znに、またIL-8産生とSi、Ti、Mn、Feに強い相関が認められた。特にSiは $R = 0.935$ と非常に強い相関を示し、またSi、Ti、Feなど土壌由来と考えられる成分との相関がいずれも高かった。同様に、金属成分と抗原提示細胞への曝露結果との間では、生存率とTi、V、Feに、IL-6産生とSi、Al、Ti、V、Mn、Fe、Cu、Znに、IL-1 β 産生とSi、Ti、V、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Pbに、TNF- α 産生とSi、Al、Ti、V、Mn、Fe、Cu、Znに、DEC-205陽性細胞率とSi、Al、Ti、V、Mn、Fe、Cu、Zn、As、Se、Pbに強い相関が認められた。特にSi、Ti、V、Mn、Fe、Znはいずれの影響とも非常に強い相関を示した。

PAHs成分と気道上皮細胞への曝露結果との間では、IL-6産生と2-ニトロピレン、2-ニトロフルオランテンに、IL-8産生と2-ニトロピレンに強い相関が認められた。同様に、PAHs成分と抗原提示細胞への曝露結果との間では、IL-6産生と2-ニトロピレンに、IL-1 β 産生とベンズ[a]アントラセン、ベンゾ[a]ピレン、インデノ[1,2,3-cd]ピレン、2-ニトロピレン、2-ニトロフルオランテンに、TNF- α 産生と2-ニトロピレン、2-ニトロフルオランテンに、DEC-205陽性細胞率とフェナントレン、アントラセン、フルオランテン、ピレン、クリセン、ベンズ[a]アントラセン、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[k]フルオランテン、ベンゾ[a]ピレン、インデノ[1,2,3-cd]ピレン、2-ニトロピレン、1,6-ピレンキノ、1,8-ピレンキノ、7,12-ベンズ[a]アントラセンキノに強い相関が認められた。

生物成分と気道上皮細胞への曝露結果との間では、IL-8産生とエンドトキシンに強い相関が認められた。ここで、エンドトキシンが1サンプルのみ飛び抜けて高かったことから、全体の相関がこの点に影響されている可能性がある。そこで、このエンドトキシンが高かったデータを削除した上で、改めて相関を取ったものが図(2)-4である。これより、外れ値を除外した場合においても、IL-8産生とエンドトキシンに強い相関が認められた。また、生物由来成分と抗原提示細胞への曝露結果との間では、強い相関を示す生物由来成分は存在しなかった。なお本項は、環境研究総合推進費平成30年度終了課題成果報告会における指摘事項への回答となっている。

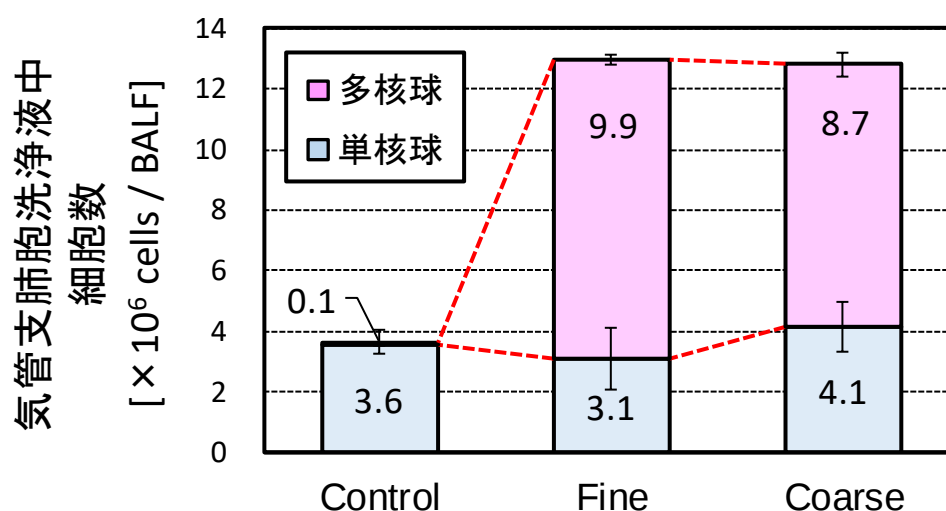
上述したこれらの化学的および生物的成分が呼吸器、免疫系に影響し、呼吸器疾患の悪化に寄与することが示された。特に、土壌由来成分Siは、気道上皮細胞および抗原提示細胞のIL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α と強い相関を示したことから、気道に炎症を惹起させる可能性が高いことが考えられた。また、これまで、大気中粒子が、抗原提示細胞によりどのように認識され、その後の生体・免疫応答が活性化されるのか、十分に解明されていなかった。本検討結果から、生体・免疫応答の活性化には、抗原提示細胞のDEC205分子が重要であることが示唆されるとともに、認識されうる粒子成分を新たに示すことができた。



図(2)-4 粉体試料中の生物由来成分と気道上皮細胞のIL-8産生との相関(外れ値を除外)

(7) 動物への粉体試料の曝露実験結果

粒子曝露マウス肺の病理学的変化を観察したところ、微小粒子または粗大粒子の曝露によって、肺に炎症細胞の浸潤が認められた。これにより、微小および粗大粒子は、曝露により共にマウスの肺に炎症を誘導した。次に、粒子曝露マウスBALF中の細胞数(単核球および多核球)を図(2)-5に示す。粒子を曝露した際に、BALF中の単核球細胞数には明確な増減は見られなかった一方で、多核球細胞数は有意に増加した。急性炎症時には、単核球ではなく、多核球である好中球が増加することが知られている。したがって、この多核球は、炎症時に組織に浸潤する好中球であると考えられる。これらのことから、微小および粗大粒子は、共に、曝露によって肺に炎症を明確に誘導したと言える。このことは、大気粒子が、細胞レベルだけでなく生体レベルでも明確に炎症を誘導することを証明した重要な成果である。



図(2)-5 粒子曝露マウスBALF中の細胞数(単核球および多核球)

(微小粒子または粗大粒子の曝露によって、炎症の誘導を示す多核球の増加が顕著に認められる)

(8) 事前の計画・スケジュールに対する研究の進捗状況

初年度にPM2.5粒子の細胞曝露実験における影響評価指標の確立、二年目には前年度に引き続き細胞曝露実験の実施とPM2.5粒子の健康影響決定要因の絞り込み、三年目は細胞曝露実験の継続と動物曝露実験の実施、およびサブテーマ(1)の結果と合わせた粒子の化学成分と曝露影響評価指標間の統計解析を行うスケジュールを、ほぼ事前の計画通りに達成することができた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- 福岡、埼玉、および横浜において、バーチャルインパクターとサイクロンを組み合わせたPM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置を安定的に稼働させることができた。これにより、カット特性確認済みの粉体採取装置による粉体採取拠点を国内3地点に構築することができた。そして、3地点・4季節・2粒径の、それぞれ特徴的な化学組成を有する大気粒子サンプルを粉体として採取することができた。これまでに我が国におけるフィルター法のPM2.5採取地点は無数に存在するが、サイクロンによるPM2.5粉体の採取拠点は他に例がなく、極めて独自性の高い成果であると言える。
- サイクロンを用いた新規採取法で採取したサンプルは、超音波処理することにより均一に分散し、かつ、微小粒子、粗大粒子として矛盾しないものであることを世界で初めて示すことができた。
- PM2.5の炭素成分分析の公定法である熱分離光学補正法は、一般にフィルター試料を測定することに用いる方法であり、粉体試料を分析する際の規定の方法は決められていなかった。本研究により、フィルターに

粉体を塗布する方法と、粉体を再発塵させフィルターに再捕集させる方法には大きな違いがないことが示された。これにより、簡便な手法である塗布法により、サイクロンで採取された粉体中の炭素成分を測定することが可能となった。

- (d) サイクロンにより採取されたPM2.5中に含まれる元素炭素と有機炭素の比は、サイクロン下流のバックアップフィルター中のものと異なる値を示した。また、サイクロン法とフィルター法を並行して行った試験では、塩化物イオンや硝酸イオンについてフィルター法による値が明らかに低くなった。これは、フィルター法では不可避であった有機炭素やガス状硝酸等のアーティファクト、つまりフィルターへのガス状成分の吸着を、サイクロン法により回避できている可能性を示すものである。
- (e) フィルターを用いた従来法では、抽出操作後の成分(全体のおよそ7割程度)の曝露影響の評価のみにとどまり、かつ、サンプルの抽出効率の違いによる不確定要因も存在した。一方、本法では、実環境に存在する粒子そのもの(粒子全体)を曝露し、その影響を見ることが初めて可能となった。すなわち、抽出操作なしに、一般環境粒子そのものの曝露影響を簡便に評価することが初めて可能となった。
- (f) 本法で回収した粒子そのものは、従来法(フィルター)で採取した粒子の抽出物と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。また、本法で回収した粒子そのものを曝露した場合は、同一の粒子そのものの抽出物を曝露した場合と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。すなわち、PM2.5等の粒子状物質の健康影響を考える上で、粒子をフィルター採取し抽出物曝露する従来法では、十分な健康影響評価ができていない可能性が示された。
- (g) 新規採取法で採取したサンプルは、微小粒子、粗大粒子ともに、抗原提示細胞を強く活性化すること、概して、リファレンス粒子より影響が大きいことを世界で初めて明らかにした。また、実大気環境中の粒子全体を曝露することで、影響が明確になる傾向も初めて見出した。
- (h) 新規採取法で採取した粒子による細胞曝露影響は、粒子の採取地域により明確に異なっていた。具体的には、福岡で採取された粒子の細胞曝露影響は、多くの場合で横浜および埼玉のものとは異なっていた。これは、粒子の曝露影響評価を行う際に、地域差を考慮する必要性を示すものである。
- (i) 新規採取法では抽出操作が不要であり、曝露実験時のハンドリング性が飛躍的に向上した。これにより、粒子状物質の健康影響評価を短期間で迅速に行うことが可能となった。その結果、多くの健康影響データを用いて成分と影響の相関解析を実施することが科学的に可能となり、正確な健康影響決定要因の同定に繋がらう。
- (j) 粒子中の特定の化学成分と細胞曝露影響評価指標が密接に関与し、これらの成分が呼吸器疾患の悪化の規定要因になり得ることが示された。
- (k) これまで、大気中粒子が、抗原提示細胞によりどのように認識され、その後の生体・免疫応答が活性化されるのか、十分に解明されていなかった。本検討結果から、生体・免疫応答の活性化には、抗原提示細胞のDEC205分子が重要であることが示唆されるとともに、認識される粒子成分を新たに示すことができた。
- (l) 細胞曝露実験のみならず、動物曝露実験の結果、微小および粗大粒子共に、マウスの肺に炎症を誘導した。このことは、大気粒子が、細胞レベルだけでなく生体レベルでも明確に炎症を誘導することを証明した重要な成果である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

平成31年3月の中央環境審議会大気・騒音振動部会微小粒子状物質等専門委員会(第9回)において、本研究成果である、大気粒子そのものを直接細胞や動物に曝露可能な手法とその実験結果を提示し、PM2.5に関する近年の科学的知見を示す資料の一つとして活用された。また、環境省請負「平成30年度微小粒子状物質(PM2.5)総合対策推進業務」の微小粒子状物質(PM2.5)精度ワーキンググループ(第1回)において、精度管理用粉体の作製方法として、本研究成果である、サイクロンによる大気粒子の採取方法が選択肢の一つとして検討された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- (a) 本法(サイクロン法による大気粒子の採取)の有用性が実証され、今後公的機関の認証を受けることができれば、大気観測や健康影響評価の分野で新たな市場が発生する。現在我が国における浮遊粒子状物質濃度の公的観測地点は全国で1500箇所を超えており、研究機関による需要も考慮すると、将来的には数千箇所規模の市場発生が見込まれる。また本法は世界的にも新規性・独自性が高いことから、国際標準や認証取得を視野に入れることで、国内のみならず国外にも市場が広がり、特に大気汚染の激しい地域では需要が高まることが予想される。これらの総合的な環境産業の創出と発展により、国内外におけるPM2.5の採取・分析・健康影響評価が進むことによってPM2.5の健康影響決定要因が個々の化合物レベルまで解明されれば、我が国のみならず世界的なPM2.5対策の有効性と効率性の向上に多大な貢献をすることができる。
- (b) PM2.5粒子を大量に粉体として採取できる本法は、成分分析の精度管理のためのPM2.5標準粒子の作製法としての応用が今後期待できる。現在、一般に入手可能なエアロゾルの標準粒子としては、NISTのSRM1649bや国環研のCRM#28等がある。しかし、前者は米国の、後者は中国北京市のエアロゾル粒子であり、国内で採取されたエアロゾルの標準粒子が存在しておらず、国内の特にPM2.5の標準粒子の潜在的な需要は高い。
- (c) 粒子の一部ではなく、粒子全体を用いた曝露・影響評価が可能となったこと、抽出操作等が不要になりハンドリング性が向上したことは、粒子状物質の健康影響評価を正確かつ効率的に行うために、非常に重要な成果であると考えられる。
- (d) 本研究における粒子状物質の呼吸器へ曝露影響評価の範囲では、PM2.5と粗大粒子ではそれぞれ細胞曝露実験の結果が異なる場合が多く、PM2.5よりも粗大粒子の方がより影響が強い場合も散見された。このことは、粒子状物質の健康影響を考える上ではPM2.5のみならず粗大側の粒子にも着目する必要があるものであり、今後の環境政策の方向性を検討する際の示唆が得られた。
- (e) PM2.5に代表される浮遊粒子状物質の健康影響評価を進める上では、従来法であるフィルター法を用いている限り、十分な量の試料確保と採取中のアーティファクトが大きな障壁であったが、本研究で用いるサイクロン方式の新規採取装置により、従来法と比較して約数十倍の試料量確保が可能となったことで、細胞曝露実験がより効率的に行えるようになり、さらに従来検出が困難であった微量化学成分を分析することも容易になることが期待できる。
- (f) 粒子中の特定の化学成分と細胞曝露影響評価指標が密接に関連し、これらの成分が呼吸器疾患の悪化の規定要因になり得ることが示されたことで、成分組成の相違に着目した我が国におけるPM2.5の呼吸器系等へのリスクに係る研究が推進され、将来的なPM2.5対策に反映されることが期待できる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Okuda, T., Isobe, R. (2017) Improvement of a high-volume aerosol particle sampler for collecting submicron particles through the combined use of a cyclone with a smoothened inner wall and a circular cone attachment, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **11** (2), 131-137.
- 2) Okuda, T., Shishido, D., Terui, Y., Fujioka, K., Isobe, R., Iwaki, Y., Funato, K., Inoue, K. (2018) Development of a high-volume simultaneous sampler for fine and coarse particles using virtual impactor and cyclone techniques, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **12** (1), 78-86.
- 3) Onishi, T., Honda, A., Tanaka, M., Chowdhury, P.H., Okano, H., Okuda, T., Shishido, D., Terui, Y., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Hayashi, M., Nishita-Hara, C., Hara, K., Inoue, K., Yasuda, M., Hirano, S., Takano, H. (2018) Ambient fine and coarse particles in Japan affect nasal and bronchial epithelial cells differently and elicit varying immune response, *Environmental Pollution*, **242**, 1693-1701.

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) Okuda, T., Shishido, D., Terui, Y., Funato, K., Inoue, K. (2017) Development of the high volume simultaneous sampler for fine and coarse aerosol particles using a combination of virtual impactor and multi-cyclone. *10th Asian Aerosol Conference*, Jeju, Republic of Korea, July 5, 2017.
- 2) 長谷川就一、奥田知明 (2017) サイクロン法により採取されたPM2.5粉体試料の成分組成、第58回大気環境学会年会、兵庫医療大学、兵庫県神戸市、2017年9月6日。
- 3) 完戸大輝、照井凱大、奥田知明 (2017) 大流量PM2.5採取におけるアーティファクトの影響の検討、第58回大気環境学会年会、兵庫医療大学、兵庫県神戸市、2017年9月6日。
- 4) 奥田知明、完戸大輝、照井凱大、佐藤摘歩実、本田晶子、大西俊範、田中満崇、高野裕久、亀田貴之、東野達、長谷川就一、西田千春、原圭一郎、林政彦、井上浩三 (2018) サイクロン法により採取された粒子状物質の曝露実験による健康影響評価、第35回エアロゾル科学・技術研究討論会、名古屋大学、愛知県名古屋市、2018年8月1日。
- 5) Okuda, T., Takano, H., Honda, A., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Onishi, T., Tanaka, M., Hayashi, M., Hara, K., Nishita-Hara, C., Shishido, D., Terui, Y., Sato, T., Inoue, K. (2018) Identification of the factors responsible for the health effects of atmospheric fine particles by cyclone collection method and exposure experiments, *10th International Aerosol Conference*, St. Louis, USA, September 7, 2018.
- 6) 奥田知明、本田晶子、大西俊範、田中満崇、高野裕久、長谷川就一、亀田貴之、東野達、西田千春、原圭一郎、林政彦、完戸大輝、照井凱大、佐藤摘歩実、井上浩三 (2018) 福岡・埼玉・神奈川でサイクロン採取された粒子状物質の曝露実験による健康影響評価ー推進費CYCLEXプロジェクト進捗報告ー、第59回大気環境学会年会、九州大学、福岡県福岡市、2018年9月11日。
- 7) 田中満崇、大西俊範、本田晶子、Pratiti H Chowdhury、岡野人士、奥田知明、長谷川就一、亀田貴之、東野達、林政彦、西田千春、原圭一郎、井上浩三、高野裕久 (2018) 実環境中の微小および粗大粒子が呼吸器、免疫系に及ぼす影響と影響規定成分の特定、第25回免疫毒性学会、第74回日本産業衛生学会アレルギー免疫毒性研究会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、2018年9月18日。
- 8) Shishido, D., Okuda, T., Takano, H., Honda, A., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Onishi, T., Tanaka, M., Hayashi, M., Hara, K., Nishita-Hara, C., Terui, Y., Sato, T., Inoue, K. (2018) Cyclone collection of fine and coarse particles followed by exposure experiments, *Joint International Symposium of 14th CACGP & 15th IGAC*, Takamatsu, Japan, September 26, 2018.
- 9) Okuda, T., Goto, T., Takano, H., Honda, A., Onishi, T., Tanaka, M., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Hayashi, M., Hara, K., Nishita-Hara, C., Inoue, K. (2019) Factors responsible for the biological responses of exposure to atmospheric fine and coarse particles collected by cyclone in three Japanese cities. *11th Asian Aerosol Conference*, Hong Kong, China, May 28–30, 2019 (presentation accepted).

7. 研究者略歴

研究代表者

奥田 知明

東京都立大学理学部卒業、同大学院理学研究科修了、東京農工大学大学院連合農学研究科博士課程修了、博士(農学)、現在慶應義塾大学理工学部准教授

研究分担者

1) 高野 裕久

京都府立医科大学卒業、博士(医学)、国立環境研究所環境健康研究領域領域長を経て、現在京都大学工学研究科教授

II. 成果の詳細

II-1 健康影響評価に資するPM2.5 新規採取法の開発及びPM2.5 成分組成の解明

学校法人慶應義塾

慶應義塾大学理工学部 応用化学科

奥田 知明

平成28～30年度累計予算額：61,505千円

（うち平成28年度：20,393千円、平成29年度：21,085千円、平成30年度：20,027千円）

累計予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

分級技術としてバーチャルインパクターとサイクロンを組み合わせたPM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置を製作し、横浜、埼玉、福岡の3地点にそれぞれ設置した。2016～2018年の期間に、3地点×2粒径（微小粒子および粗大粒子）×6セットの大気粒子サンプルを粉体として採取し、化学成分（炭素成分、金属成分、水溶性イオン成分）の測定を行った。炭素成分分析については、フィルター法により採取されたPM2.5の炭素分析の公定法である熱分離光学補正法を、本研究におけるサイクロン法により採取された粉体試料の分析のために最適化を行った。また、サイクロン法とフィルター法による並行サンプリングを行い、得られたPM2.5中の化学成分を調べたところ、フィルター捕集では、 NO_3^- と Cl^- についてフィルター捕集では損失する可能性があり、サイクロンを用いたサンプリングでは、その影響を回避できる可能性があることが示された。PM2.5の化学組成は、横浜と埼玉と比較して福岡では相対的に水溶性イオン成分の割合が大きく、特に硫酸イオンの割合が大きくなっており、また金属成分では同様にヒ素や鉛の割合が福岡で大きくなっていった。また、PAHs類の含有量は福岡で高かったのに対し、PAHsニトロ化体は福岡で最も低かった。これは、福岡において、主に石炭燃焼起源粒子越境による影響が、他の地点と比較して大きく現れていることを示していると考えられる。

【キーワード】

PM2.5、大気粒子状物質、化学組成、サイクロン、曝露影響評価

1. はじめに

微小粒子状物質（PM2.5）が生体に深刻な被害を及ぼす可能性があることは以前から指摘されていたが、2009年の我が国におけるPM2.5の環境基準の制定や、2013年の国際がん研究機関による粒子状物質の「ヒトに対し発がん性がある物質」への指定、さらには2013年と2015年に発生した中国北京市周辺における極めて深刻なPM2.5汚染とその日本への影響の懸念の高まりを受けて、これまで以上にPM2.5研究を推進する緊急性・重要性が高まっている。PM2.5の有害性は物理化学的特性に依存するため、成分組成の相違に着目した健康影響評価研究の推進は喫緊の課題であるが、従来のPM2.5採取法であるフィルター捕集では、実環境大気中PM2.5を大量に採取できずに細胞や動物曝露に用いることが困難なことや、フィルター捕集中にガス状物質の吸着や粒子との化学反応や半揮発性成分の揮散等が起こることが大きな問題となっている。しかし、これまで行われてきたPM2.5研究は、その多くがフィルター捕集を前提に進められているため、試料量の制限や試料採取中の変質の影響を避けられていなかった。そこで、フィルターを用いずにPM2.5粒子を採取した上で化学分析や曝露実験を行い、PM2.5の有害性に関連する物理化学的特性を明らかにすることが求められている。

2. 研究開発目的

微小粒子状物質（PM2.5）の有害性は物理化学的特性に依存するため、成分組成の相違に着目した健康影響評価研究の推進は喫緊の課題であり、特に、気管支喘息を代表とする呼吸器系や免疫系に対するPM2.5のリスクに係る信頼性の高い科学的知見の蓄積が求められている。しかし現状では、実環境大気中のPM2.5粒子全体（PM2.5粒子そのもの）を曝露して健康影響を直接評価できる手法はなく、その一部成分の影響が評価されているに過ぎない。その主な理由は、従来のPM2.5採取法であるフィルター捕集では実環境大気中PM2.5を大量に採取できず、細胞や動物曝露に用いることが困難なためである。また、フィルター捕集した粒子を物理的あるいは化学的手法により回収して曝露実験に用いた場合、フィルターそのものに由来する混入物の影響が避けられず、真にPM2.5の影響評価と見なすには問題が多い。例えば先行研究の結果では、化学的手法による抽出物を曝露実験に用いた場合、フィルター本体の抽出物の影響の存在が示唆されている。さらに、フィルター捕集中に予期せぬアーティファクト、すなわち、ガス状物質の吸着や粒子との化学反応、半揮発性成分の揮散等が起こることも大きな問題である。そこで本研究では、フィルターを用いずにPM2.5の採取を可能とするサイクロンを基幹技術とした新規装置により得られたPM2.5粒子全体を用いて化学分析や曝露実験を行うことで、PM2.5の健康影響を決定する真の要因や化学成分を同定することを目的とする。

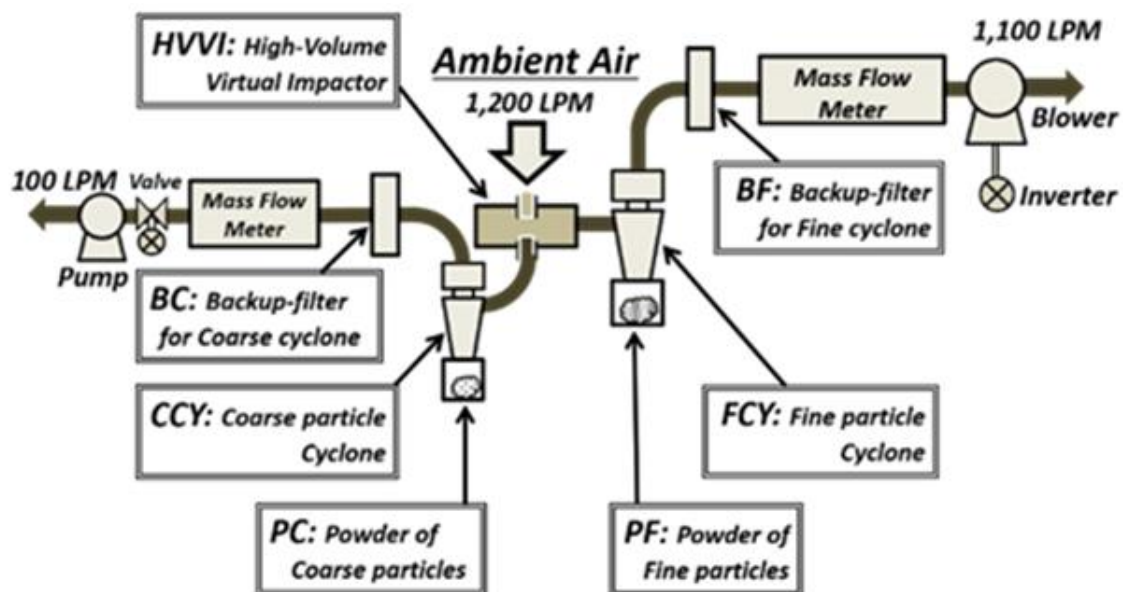
3. 研究開発方法

バーチャルインパクトとサイクロンを組み合わせたPM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置K-ViC (Keio-Virtual impactor with Cyclone) を製作し、その性能評価を行った。バーチャルインパクトの分級性能はAPS (Aerodynamic Particle Sizer, TSI APS3321)、またサイクロンの分級性能はSMPS (Scanning Mobility Particle Sizer, TSI nanoscan 3910) を用いてそれぞれ測定した。本装置を福岡、埼玉、および横浜に設置し、3地点でPM2.5粒子の採取を開始した。流量は約1,200 L/min とし、1回につき約3～4週間の連続稼働を行い、採取されたPM2.5粒子の化学分析を行った。元素分析はエネルギー分散型蛍光X線分析装置（リガク社製EDXL300/NEXCG）および酸分解/誘導結合プラズマ質量分析法（Agilent 7500cx ICP-MS）を、また水溶性イオン成分分析は超純水抽出後イオンクロマトグラフィー（Shimadzu, LC-10ATvp series）を用いて行った。炭素成分分析は熱分離光学補正法（Sunset EC/OC analyzerおよびDRI Model 2001A, IMPROVE protocol, TOR method）により行った。試料からのPAH誘導体ならびにPAHの抽出は、粒子にサロゲート物質として重水素化PAH, NPAH, OPAHを所定量添加し、ジクロロメタンを抽出溶媒として30分間超音波抽出を行った。抽出液は濃縮後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による測定に供した。PAHの同定・定量には蛍光検出HPLCを、NPAHとOPAHの同定・定量にはインライン還元ー蛍光検出HPLCを用いた。なお、PM2.5粒子と並行して採取される粗大粒子についても同様に採取と分析を行った。なお、本業務の一部は以下の通り再委託を行った。PAH類の分析業務：京都大学大学院エネルギー科学研究科・東野達教授・亀田貴之准教授、埼玉におけるPM2.5粒子採取および炭素成分分析業務：埼玉県環境科学国際センター・長谷川就一専門研究員、福岡におけるPM2.5粒子採取業務：福岡大学・林政彦教授・原圭一郎助教・西田千春博士、PM2.5粒子採取装置の設置業務：東京ダイレック株式会社・井上浩三部長。

4. 結果及び考察

1) PM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置

分級技術としてバーチャルインパクトとサイクロンを組み合わせたPM2.5と粗大粒子の新規大流量同時採取装置を製作した。装置概略図を図(1)-1に、横浜（慶應義塾大学矢上キャンパス屋上）、埼玉（埼玉県環境科学国際センター展示館屋上）、福岡（福岡大学理学部18号館屋上）にそれぞれ設置した装置の写真を図(1)-2に示す。本装置は大きく分けて、PM2.5と粗大粒子を分級するバーチャルインパクト部、PM2.5を捕集する微小側と、粗大粒子を捕集する粗大側からなる（図(1)-3）。



図(1)-1 PM_{2.5}と粗大粒子の新規大流量同時採取装置 (K0VI-2C-1200Z) 概略図



横浜



埼玉



福岡

図(1)-2 装置設置地点の写真 (上：横浜、下左：埼玉、下右：福岡)



図(1)-3 PM_{2.5}と粗大粒子の大流量同時採取装置の写真 (横浜、PM_{2.5}採取側)

本装置に用いるバーチャルインパクトは主流流量を1,100 L/min、副流流量を100 L/min、全流量を1,200 L/minと設定した。この流量において、本装置のバーチャルインパクトによってPM2.5（粒子の空気動学的50%分粒径が2.5 μmの大気粉塵）を分粒する設計とした。バーチャルインパクトは(1)式に示す関係式により仕様を決定してある¹⁾。

$$Dp_{50} = \sqrt{\frac{9 \times \mu \times Stk_{50} \times N \times \pi \times (D_0)^3}{4 \times C \times Q_0 \times \rho_{0,P}}} \quad \dots (1)$$

Dp_{50} : エアロゾル粒径、 2.5×10^{-4} cm

C : カニンガムの補正係数、 $1.00 + 0.16 \times 10^{-4} / Dp_{50}$

Q_0 : 吸引流量、 $1,200 \times 10^3$ cm³/min

$\rho_{0,P}$: 粒子の密度、1.00 g/cm³

μ : 空気の粘度、 1.8×10^{-4} g/cm³・s

Stk_{50} : 50%分離径に対するストークス数、 $0.4 < Stk_{50} < 0.5$

N : ジェットノズル数、20

D_0 : ジェットノズル孔径、0.476 cm

ここで、JIS Z7152では50%分離径に対するストークス数 Stk_{50} は $0.4 < Stk_{50} < 0.5$ の範囲と定められ、この設計では0.5とした。また、ジェットノズル数 N は空気を通る総面積を大きくすることで圧力損失を抑えることを考え20個と設定した。大流量PM2.5粒子サンプラーのバーチャルインパクト部分の写真を図(1)-4に示す。

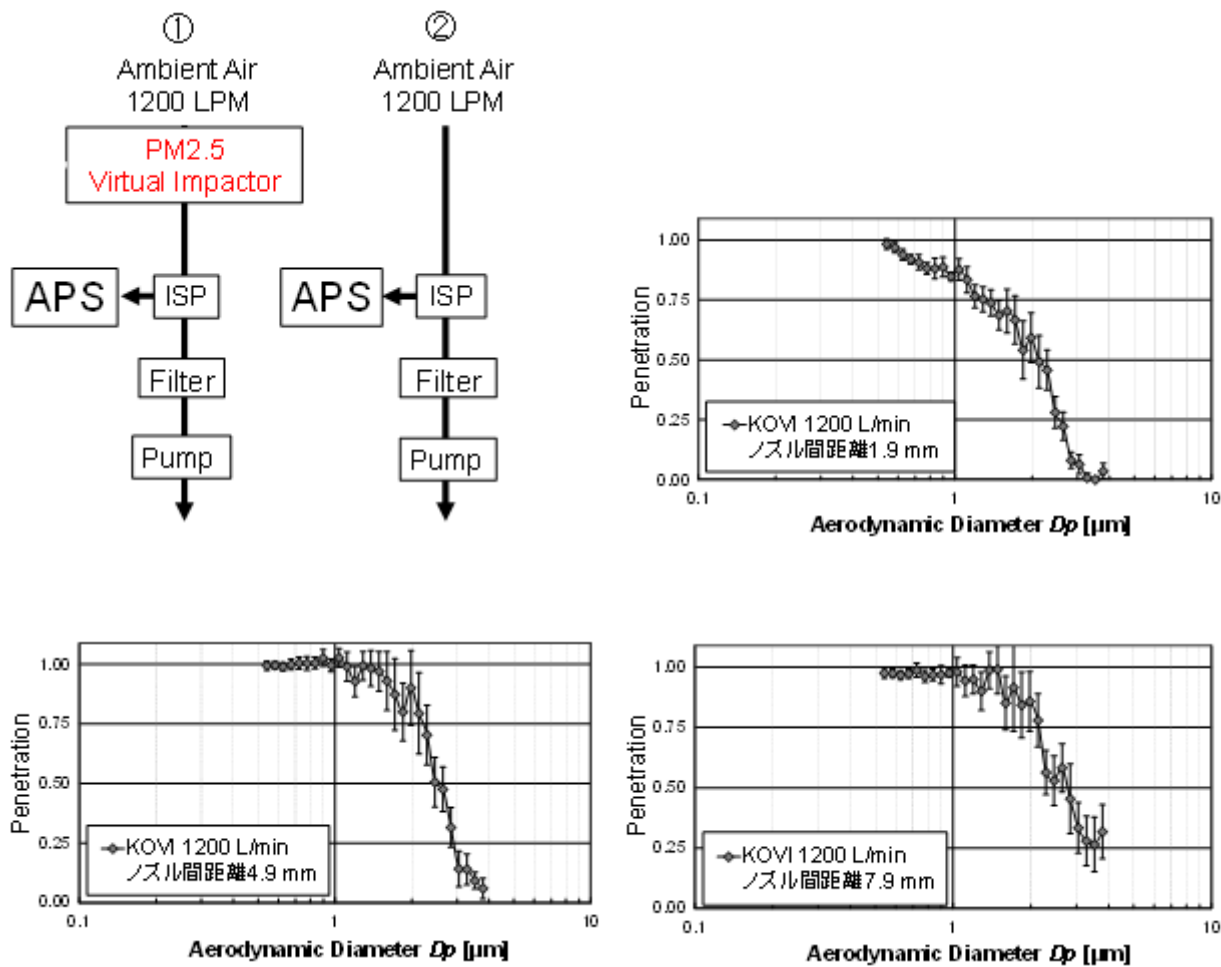


図(1)-4 バーチャルインパクトの写真 左：全体 右：ノズル部分

本装置のPM2.5捕集部である微小側で使用するサイクロンは、当初は通気流量1,100 L/minの条件においてPM0.1を分粒することができると報告されているCS3 Inc. 製HVS3を用いていたが²⁾³⁾、現在は、これと同等の寸法であり、サイクロン内部をバフ研磨したステンレス製の自作サイクロンを使用している。また、粗大粒子捕集用サイクロン（URG-2000-30EH）は流量16.7 L/min時の50%分粒径が2.5 μmに設計されたサイクロンであり、本研究では100 L/minで使用した。

2) PM2.5と粗大粒子の大流量同時採取装置の大気導入部分（Virtual Impactor）の分級性能評価

バーチャルインパクトの粒子加速ノズルの出口と捕集ノズルの入口の距離（ノズル間距離）を1.9 mm, 4.9 mm, 7.9 mmと変化させ、分級性能評価を行った。実験概略図と性能評価実験の結果を図(1)-5に、またPM2.5の分級性能の指標となる50 %分粒径（ Dp_{50} ）と80 %分粒径に対する20 %分粒径の比で規定する傾き（ Dp_{20}/Dp_{80} ）の値を表(1)-1に示す。

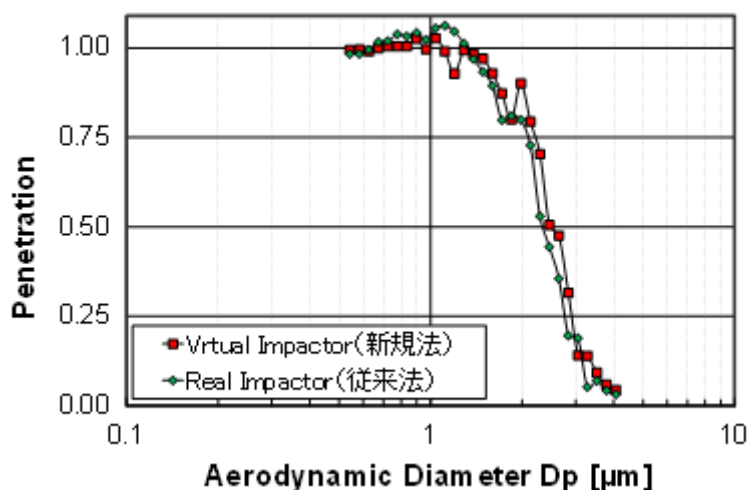


図(1)-5 実験概略図とVirtual Impactor性能評価実験の結果

表(1)-1 ノズル間距離ごとの50 %分粒径 (D_{p50}) と、80 %分粒径に対する20 %分粒径の比で規定する傾き (D_{p20}/D_{p80}) の値

Virtual Impactor ノズル間距離 [mm]	D_{p50} [μm]	D_{p20}/D_{p80} [-]
1.9 mm	2.1	2.3
4.9 mm	2.5	1.4
7.9 mm	2.8	-

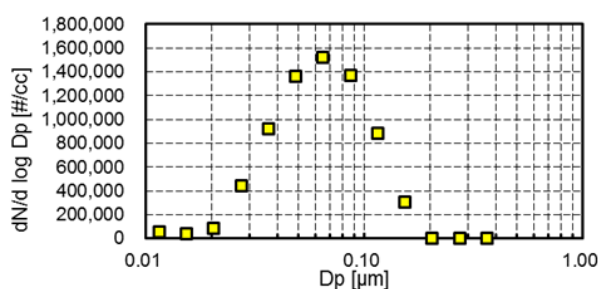
JIS Z 8851: 2008⁴⁾で規定されているPM2.5の分級性能である、「50 %分粒径 (D_{p50}) が $2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 、80 %分粒径に対する20 %分粒径の比で規定する傾き (D_{p20}/D_{p80}) が1.5以下」を踏まえると、ノズル間距離4.9 mmのときにこの条件を満たしていた。つまり、PM2.5と粗大粒子の大流量同時採取装置の大気流入部分（バーチャルインパクト）では、ノズル間距離を4.9 mmにすることによってPM2.5を分級できるということが言える。次に、Virtual ImpactorとReal Impactor (HVI2.5)⁵⁾の分級性能の試験結果を図(1)-6に示す。両者共に、JIS Z 8851の条件を満たしていた。つまり、新規装置で用いられているVirtual Impactorは、従来法で用いられているReal Impactorと同等の分級性能を持つと言える。



図(1)-6 本装置のVirtual ImpactorとReal Impactor (HVI2.5) の分級性能の試験結果

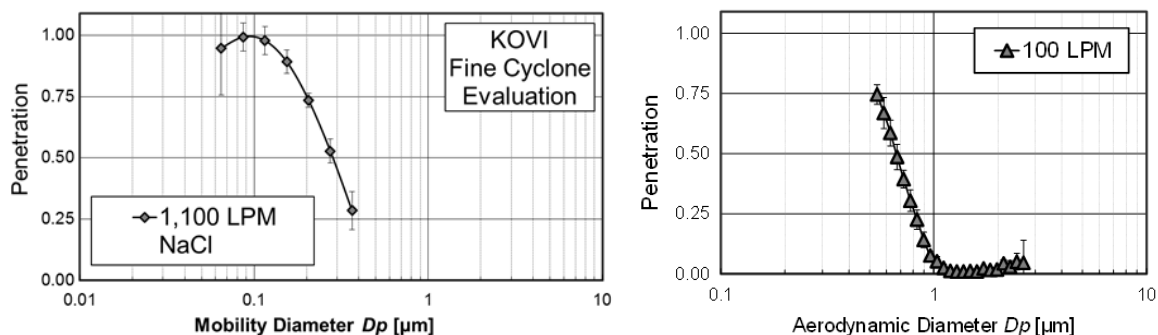
3) 微小側 (PM_{2.5}採取用) および粗大側 (粗大粒子採取用) サイクロンの分級性能評価

NaCl粒子を用いて、微小側サイクロンの分級性能評価を行った。アトマイザー (TSI Model3079-US) を用いて濃度0.01 mol/L のNaCl水溶液から発生させた粒子の粒径分布を図(1)-7に示す。



図(1)-7 0.01 mol/L のNaCl水溶液から発生させた粒子の粒径分布の例

微小側サイクロンの粒子透過率測定結果を図(1)-8左に示す。サイクロンの1,100 L/minにおける50%分粒径は、0.27 μm程度であることがわかった。このことから、バーチャルインパクターと組み合わせて粒径2.5~0.27 μmの粒子の大部分をサイクロンで捕集することができると考えられる。次に、環境大気粒子を用いて、粗大側サイクロンの分級性能評価を行った結果を図(1)-8右に示す。流量100 L/minのときの50%分粒径は0.7 μm程度となった。このことより、粗大側サイクロンによって、バーチャルインパクターによって分級された2.5 μm以上の粗大粒子のほとんどを捕集できていると考えられる。



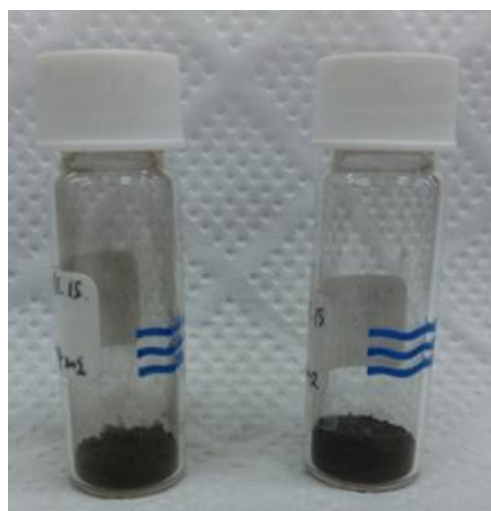
図(1)-8 左：NaCl粒子を用いた微小側サイクロンの粒子透過率測定結果
右：環境大気粒子を用いた粗大側サイクロンの粒子透過率測定結果

(4) PM_{2.5}と粗大粒子試料採取結果

横浜、埼玉、福岡にてPM_{2.5}と粗大粒子の大流量同時採取装置により採取された試料の記録を表(1)-2に示した。年間を通して、1回のサンプリングにつき3～4週間程度の採取期間で46～678 mgの大気粒子を得ることができた。採取された粉体試料の例を図(1)-9に示す。

表(1)-2 本研究におけるPM_{2.5}と粗大粒子の大流量同時採取装置による粉体試料採取結果

試料No.	地点	捕集期間	捕集時間 [days]	積算流量 [m ³]	微小粒子 捕集粉体量 [mg]	粗大粒子 捕集粉体量 [mg]
CYCLEX-1	神奈川	2016/04/28~05/18	20.9	37,159	678	195
	神奈川	2017/02/15~03/10	23.1	43,648	434	619
CYCLEX-2	埼玉	2017/02/17~03/15	26.1	49,055	290	213
	福岡	2017/02/16~03/21	32.7	61,613	183	92
CYCLEX-3	神奈川	2017/05/10~06/06	26.7	51,614	238	267
	埼玉	2017/05/10~06/06	27.0	50,639	200	134
	福岡	2017/05/11~06/08	28.0	52,443	168	137
CYCLEX-4	神奈川	2017/07/14~08/07	23.6	47,068	115	105
	埼玉	2017/07/14~08/07	23.9	44,849	96	54
	福岡	2017/07/21~08/17	24.0	50,631	98	56
CYCLEX-5	神奈川	2017/10/18~11/16	29.0	56,424	173	75
	埼玉	2017/10/20~11/15	25.8	48,454	149	119
	福岡	2017/10/19~11/16	27.9	52,281	196	55
CYCLEX-6	神奈川	2018/01/16~02/09	23.0	47,299	334	76
	埼玉	2018/01/18~02/14	25.8	50,322	205	127
	福岡	2018/01/12~02/08	25.8	50,328	200	46
CYCLEX-7	神奈川	2018/05/15~06/05	20.0	39,771	308	281
	埼玉	2018/05/10~06/05	24.7	48,209	293	136
	福岡	2018/05/11~06/07	25.9	50,436	259	124



図(1)-9 採取された粉体試料の例 (左：粗大粒子 右：微小粒子(PM_{2.5}))

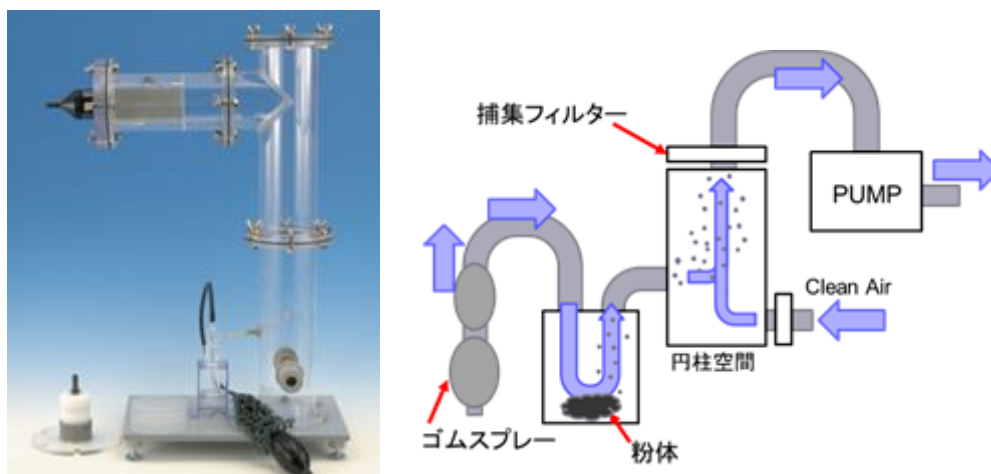
(5) 炭素成分分析における粉体試料の前処理方法の検討

PM2.5の炭素成分分析の公定法である熱分離光学補正法は、一般にフィルター試料を測定することにより用いる方法であり、粉体試料を分析する際の規定の方法は定められていない。本装置（サイクロン）で採取された粉体試料の炭素成分を分析する手法としては、1 cm²のフィルターに粉体を塗布する方法と、粉体を再発塵させフィルターに再捕集させる方法が考えられる（図(1)-10）。フィルターに塗布する方法は簡便で少量の試料で済むが、フィルター上に均一に粉体試料を塗布することは困難である。これに対して再発塵させフィルターに再捕集させる方法では、任意の面積の平面上に均一に粉体を捕集することができる反面、フィルター上に500 µgの試料量を確保するためには10 mg程度の粉体試料の再発塵が必要であり、また処理工程も多い作業であるという特徴がある。そこで、簡便な手法である塗布する方法が有効な方法であるかを確かめるために、粉体を塗布する方法と再発塵・再捕集させる方法で試料を作成し、炭素成分の分析結果を比較することで両者が同等の結果とみなせるかどうかを調べた。



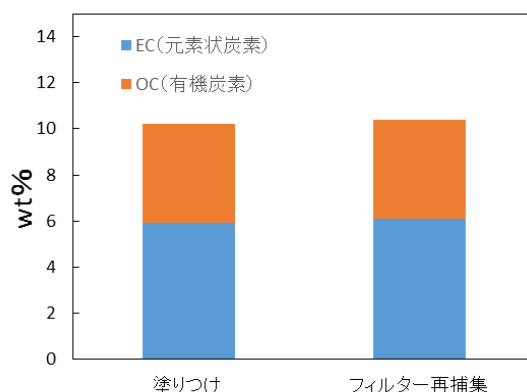
図(1)-10 炭素分析供試試料。塗布による試料（左）と再発塵による試料（右）

再発塵装置とは、粉体試料を空气中に再度拡散させる装置である（図(1)-11）。装置は2連球ゴムスプレー、粉体をためておくインピンジャー、フィルター付吸気口を持つ円柱空間部、フィルター捕集部からなる。2連球ゴムスプレーによって粉体試料に空気を送り込むことで、粉体を飛散させ円柱空間に拡散させる。この空間の空気をフィルター捕集部からポンプで吸引することで粉体をフィルターに捕集することができる。



図(1)-11 堆積粉じん再発じん装置 SKY-2型の外観（柴田科学ホームページより）とその概略図

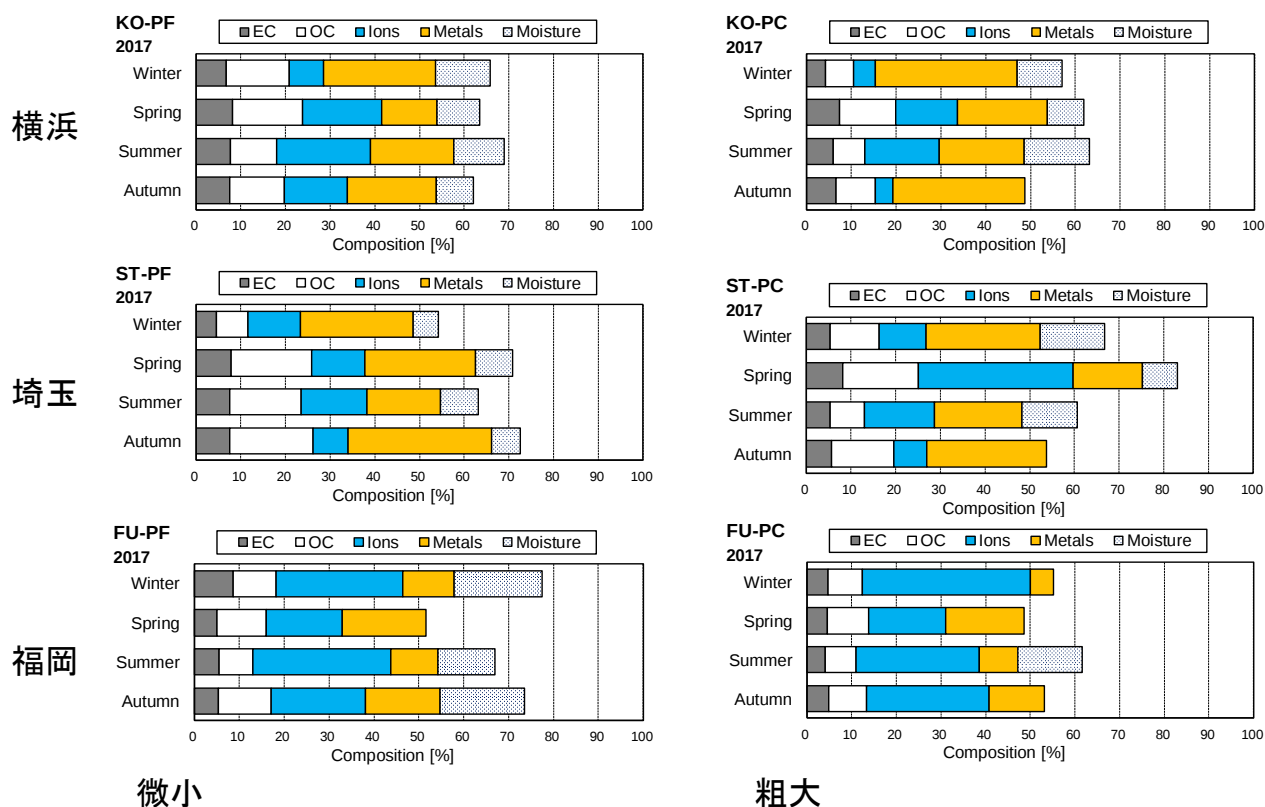
約10 mgの粉体試料（CRM#28）を再発塵装置で再発塵させ、石英繊維フィルター上に捕集し再発塵捕集試料とした。この時、フィルター上に捕集された粉体は約500 µgであった。また、同様の粉体試料約500 µgを、フィルター上に塗りつけることで塗布試料とした。各前処理による試料中の炭素成分の分析結果を図(1)-12に示す。この結果より、粉体試料の炭素分析において、塗布と再発塵による結果は概ね同等とみなせると考えられたため、以降は塗布する方法にて分析を行った。



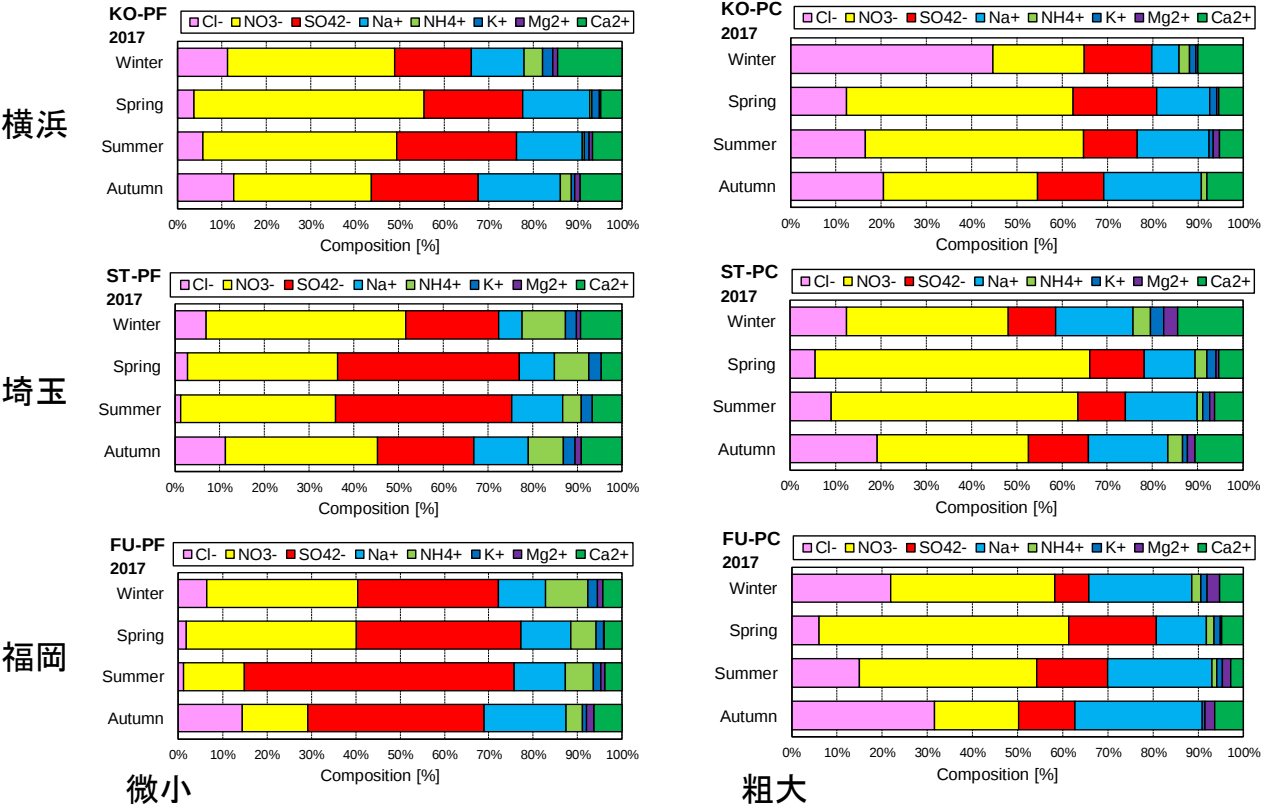
図(1)-12 前処理方法の違い（塗布および再発塵）による粉体試料の炭素分析結果の比較

(6) 横浜・埼玉・福岡で得られた大気粒子の化学組成の特徴

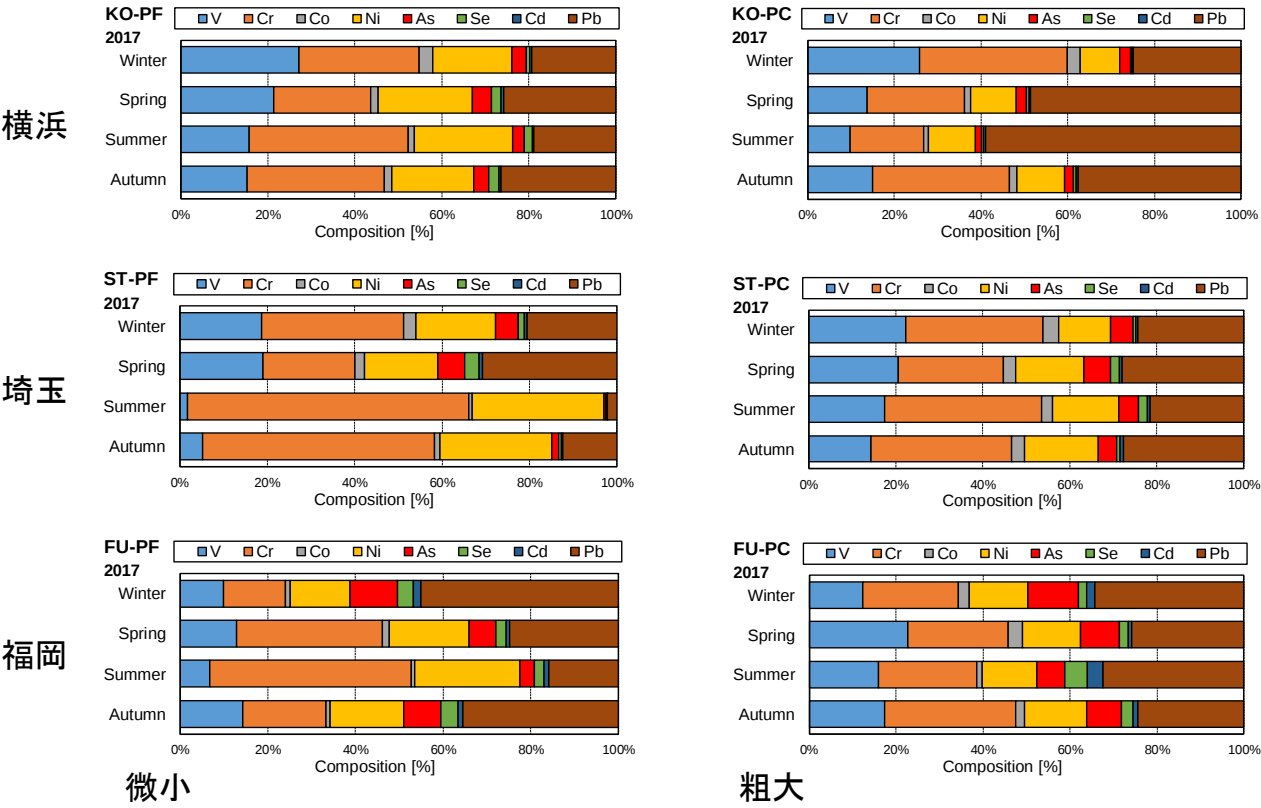
国内3地点においてPM_{2.5}と粗大粒子の大流量同時採取装置を用いて捕集した大気粒子（2017年の冬・春・夏・秋、CYCLEX2～5）の化学組成を図(1)-13に示す。PM_{2.5}の化学組成は、横浜と埼玉と比較して福岡では相対的に水溶性イオン成分の割合が大きく、特に硫酸イオンの割合が大きくなっていた。金属成分では、同様にヒ素や鉛の割合が福岡で大きくなっていた。これらの結果は、福岡において主に石炭燃焼起源粒子越境による影響が、他の地点と比較して大きく現れていることを示していると考えられる。微小と粗大の比較では、微小側と比較して粗大側において塩化物イオンや硝酸イオン、カルシウムイオンなどが多く、海塩や土壌粒子等の発生源を持つ比較的大側の粒子の影響が大きいことが見て取れた。



図(1)-13(a) 横浜・埼玉・福岡で得られた大気粒子の化学組成（全成分）



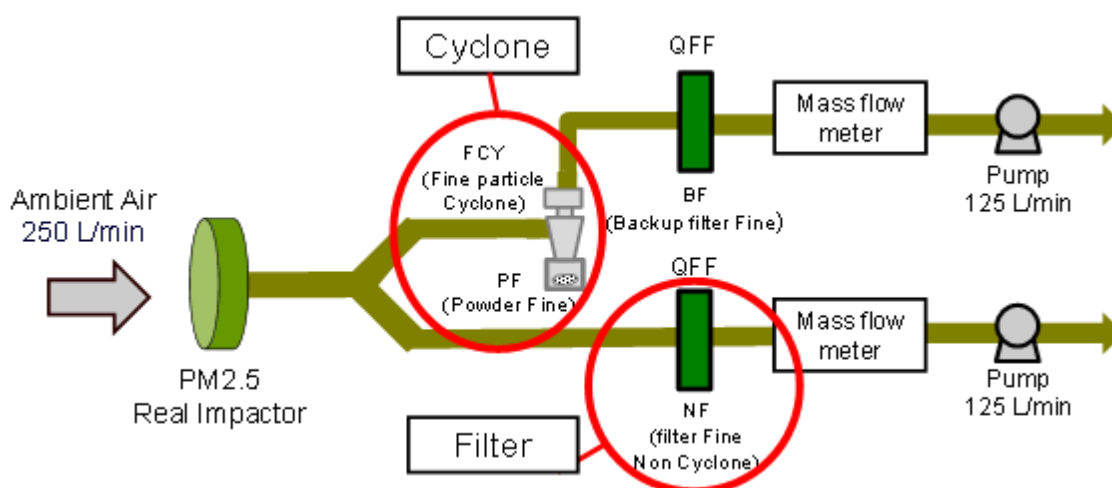
図(1)-13(b) 横浜・埼玉・福岡で得られた大気粒子の化学組成（水溶性イオン成分）



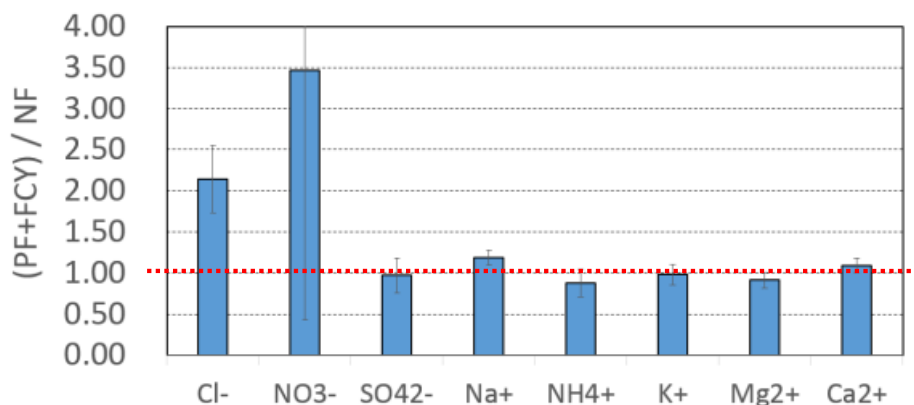
図(1)-13(c) 横浜・埼玉・福岡で得られた大気粒子の化学組成（微量金属成分）

(7) サイクロン法とフィルター法により採取されたPM_{2.5}の化学成分組成の比較

サイクロン捕集では、フィルター捕集と比較するとアーティファクトの影響を回避できる可能性がある。そこで、図(1)-14のような実験系を行い、サイクロン捕集とフィルター捕集により採取されたPM_{2.5}の化学成分組成の比較を行った。この実験系では、リアルインパクトで分級したPM_{2.5}をサイクロンとフィルターのそれぞれの経路で採取した。サイクロンの経路については、粉体(PF)だけではなく、サイクロン洗浄水(FCY)、バックアップフィルター(BF)についてサンプリングを行った。また、並列に設置したフィルター(NF)についても同様にサンプリングを行った。流量は125 L/minとした。採取した試料については、イオンクロマトグラフを用いて、水溶性イオン成分の比較を行った。



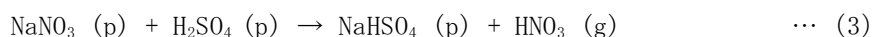
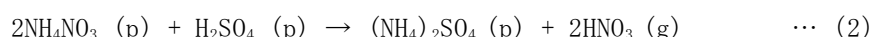
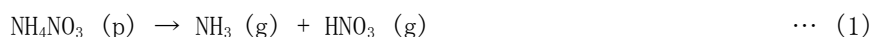
図(1)-14 サイクロン法とフィルター法によるPM_{2.5}粒子の採取実験系



図(1)-15 サイクロン法とフィルターにより採取されたPM_{2.5}中の水溶性イオン成分の測定結果の比較

サイクロン法とフィルター法により得られた成分の比、すなわち(PF+FCY)/NFの値について、NO₃⁻では1.91~8.90、Cl⁻では1.98~2.56という値をとった（図(1)-15）。つまり、NO₃⁻とCl⁻についてはフィルター捕集で損失している可能性がある。

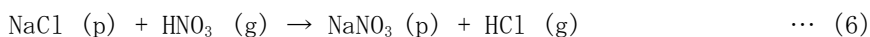
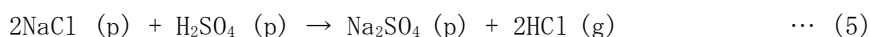
NO₃⁻については、フィルター捕集中に以下のような反応が起こることが考えられる。



(1) 式の反応が起こるとNH₃も過小評価されるが、NH₄⁺については、(PF+FCY)/NFの値が0.66~0.96となっており、フィルター捕集での過小評価は見られなかった。

Cl⁻については、フィルター捕集中に以下のような反応が起こることが考えられる。



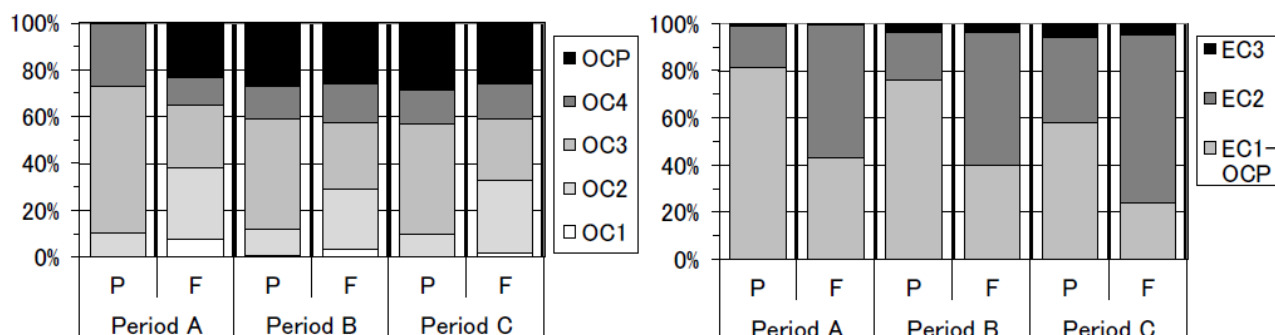


(4) 式の反応が起こると NH_3 も過小評価されるが、先ほど述べた通り NH_4^+ については、フィルター捕集での過小評価は見られなかった。

以上より、フィルター捕集では、 NO_3^- と Cl^- についてフィルター捕集では損失する可能性があり、サイクロンを用いたサンプリングでは、その影響を回避できる可能性があることが示された。

(8) サイクロン法により採取されたPM_{2.5}粉体試料の炭素成分組成

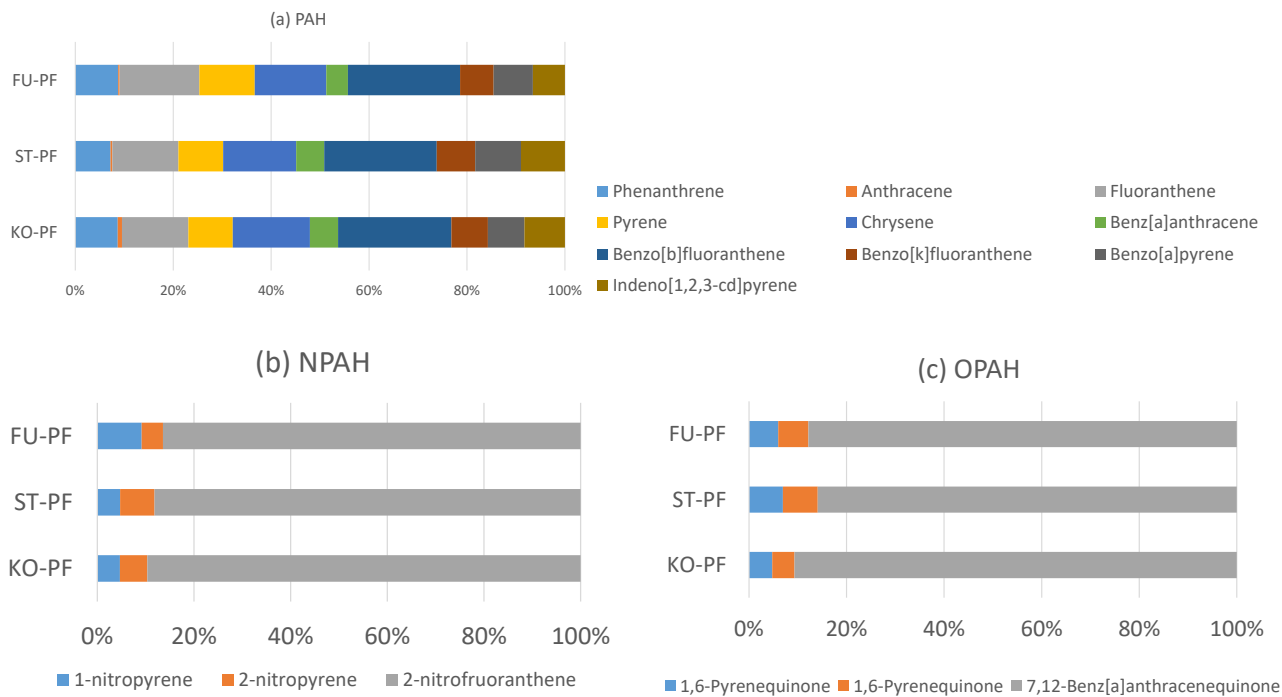
埼玉県環境科学国際センター（加須）において、2017年2月17日～3月15日（Period A）、3月22日～4月18日（Period B）、5月10日～6月6日（Period C）にそれぞれ採取された粉体試料について、炭素成分は熱分離・光学補正法（IMPROVE プロトコル，反射光補正，DRI Model2001A）により測定した。なお炭素成分分析は、空焼きした石英繊維フィルターの中央部（レーザー光が照射される部分）に粉体を極端に不均一にならないように載せ、精密天秤で粉体質量（100～130 μg 程度）を測定した上で分析した。採取された粉体の質量は200～300 mg 程度、質量濃度は 4～6 μg/m³ であった。炭素成分のフラクション割合を図(1)-16に示す。OC については、3試料とも OC2 の割合が小さく、OC3 の割合が大きかったのが特徴的であった。これは、フィルター試料による既知の知見と異なっており、同地点においてPM_{2.5}ローボリュームサンプラー（FRM-2025, Thermo）を用いて、同期間に24 時間ごとにサンプリングした試料の平均と比較すると、明らかに異なっていた。この違いは、粉体試料の OC2 濃度がフィルター試料に比べて低いことによる。このように粉体試料において、冬季から春季にかけての異なる時期の試料でもOC2 の割合が小さいという特徴は、横浜と福岡における同時期の試料でも同様であった。また、冬季（2～3 月）のフィルター試料ではOC1 がみられるが、粉体試料ではみられなかった。EC については、フィルター試料と比較して粉体試料では char-EC（=EC1-OCpyro）の割合が大きい傾向であった。こうした違いを生じている原因として、アーティファクト（正と負の両方）が関係している可能性が考えられた。



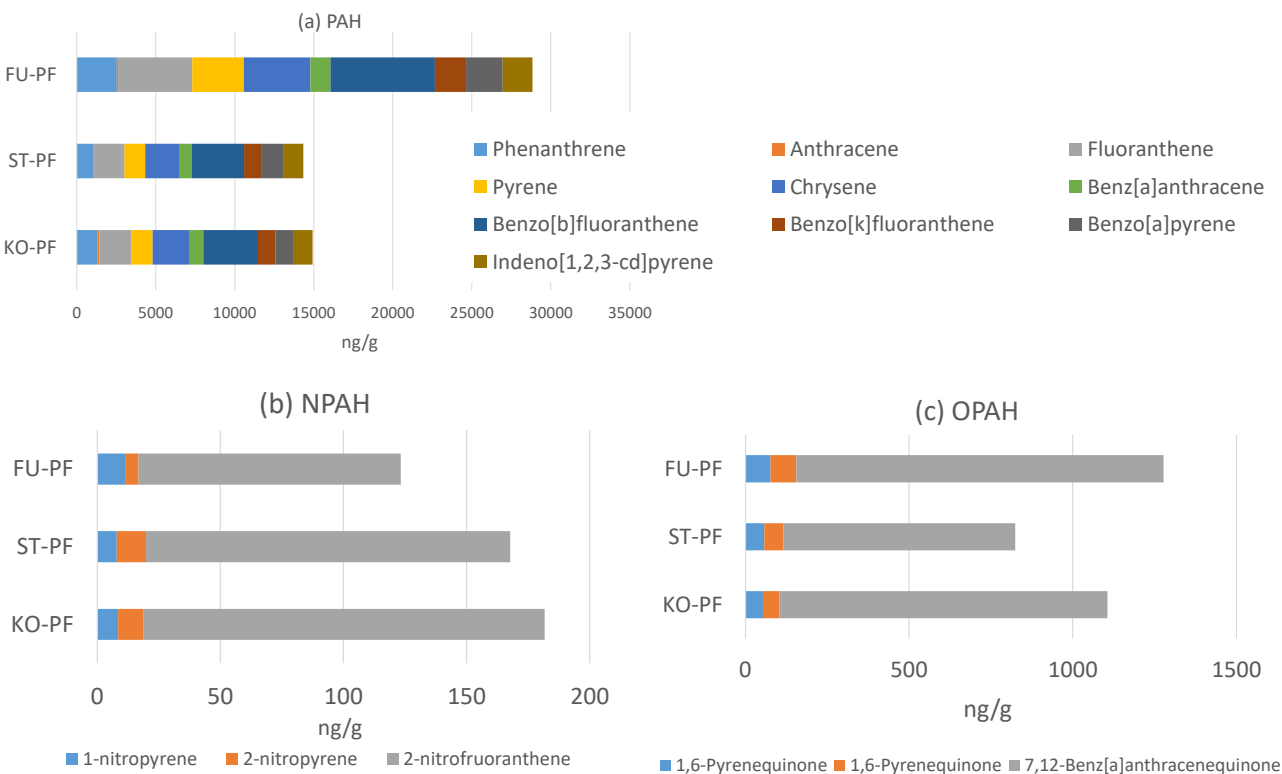
図(1)-16 埼玉における3期間の粉体試料（P）とフィルター試料（F）のOC（左）およびEC（右）のフラクション割合

(9) サイクロン法により採取されたPM_{2.5}粉体試料のPAHs組成

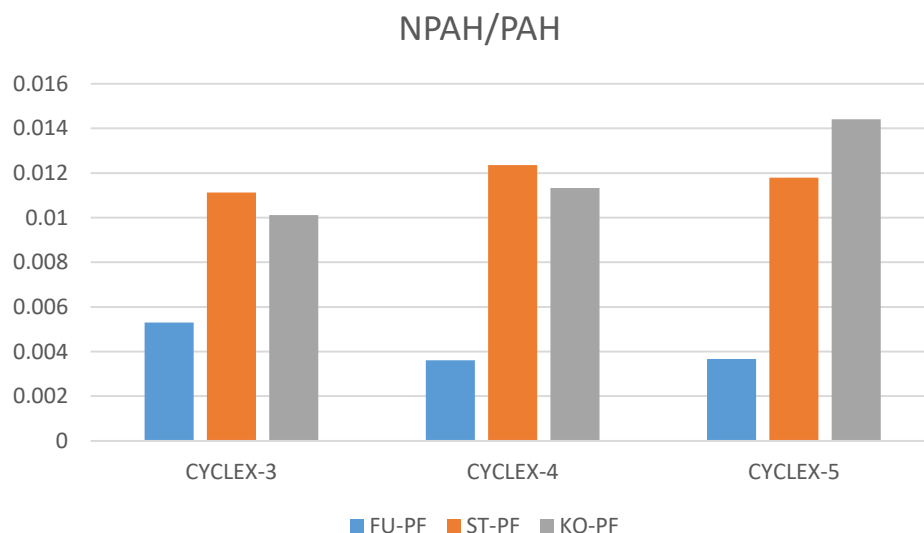
国内3地点において採取されたPM_{2.5}（CYCLEX3～5）のPAHs類の測定を行った。結果を図(1)-17に示す。まず、測定対象としたそれぞれのPAHs成分の全体を100%とした時の組成を見ると、PAHs、PAHsニトロ化体、PAHsキノン共に、地点による違いはあまりなかった。一方で、含有量で見ると、PAHs類は福岡で高かったのに対し、PAHsニトロ化体は福岡で最も低かった（図(1)-18）。この違いを明確化するため、PAHs総量に対するPAHsニトロ化体の総量の比（NPAH/PAH）を取ると、福岡で低く、埼玉と横浜で高い値を示した（図(1)-19）。（NPAH/PAH）比が高いと石油燃焼起源が示唆され、この値が低いと石炭燃焼起源が示唆される⁶⁾⁷⁾ことから、福岡でこの値が低いのは石炭燃焼活動が卓越する大陸からの越境輸送の影響を受けているものと推察された。



図(1)-17 国内3地点において採取されたPM2.5中のPAHs類の測定結果（相対組成）
(a) PAHs (b) PAHsニトロ化体 (c) PAHsキノン類



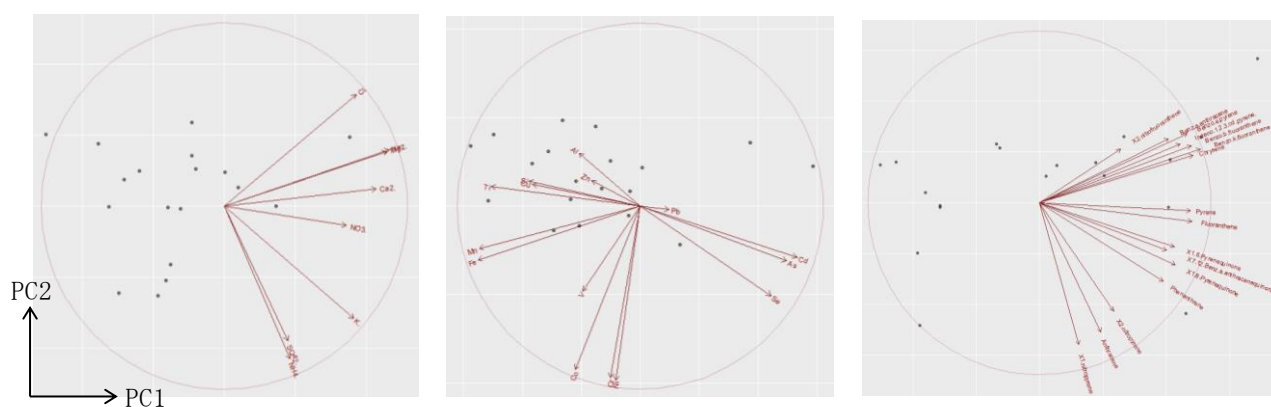
図(1)-18 国内3地点において採取されたPM2.5中のPAHs類の測定結果（単位質量当たりの含有量）
(a) PAHs (b) PAHsニトロ化体 (c) PAHsキノン類



図(1)-19 国内3地点において採取されたPM2.5中の NPAH/PAH 比

(10) サイクロン法により採取された大気粒子の化学組成データを用いた主成分分析

国内3地点において採取されたPM2.5（2017年の冬・春・夏・秋、CYCLEX2～5）の化学組成データを基に、化合物群毎に主成分分析を行った。結果を図(1)-20に示す。水溶性イオン成分については、二次生成粒子としての硫酸アンモニウムと、土壌や海塩由来と考えられる塩化物イオン、硝酸イオン、カルシウムが明確に区別された。金属成分では、Al, Ti, Mn, Feなどの鉱物系の元素は比較的似た位置となることがわかった。多環芳香族炭化水素類(PAHs)では相互によく関連していた（例えば官能基なしの5-6環のPAHs）。特にPAHsキノン類とPAHsニトロ化体類はそれぞれ近い位置にあり、概ね、5-6環のPAHs、4環のPAHs、PAHsニトロ化体、PAHsキノン類、というグループに分類することができた。



図(1)-20 国内3地点において採取されたPM2.5の化学組成データを用いた主成分分析の結果

左：水溶性イオン成分 中：金属成分 右：多環芳香族炭化水素類

横軸は第1主成分、縦軸は第2主成分を表す

(11) 事前の計画・スケジュールに対する研究の進捗状況

初年度にPM2.5粒子の新規採取装置の性能評価と各地点への設置および得られた粒子の化学成分の実施、二年目には通年で粒子採取と分析、三年目はサブテーマ(2)の結果と合わせた粒子の化学成分と曝露影響評価指標間の統計解析を行うスケジュールを、ほぼ事前の計画通りに達成することができた。なお、粒子の化学成分と曝露影響評価指標間の統計解析の結果は次節（p. 43以降）に詳述する。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- (a) 福岡、埼玉、および横浜において、バーチャルインパクターとサイクロンを組み合わせたPM_{2.5}と粗大粒子の新規大流量同時採取装置を安定的に稼働させることができた。これにより、カット特性確認済みの粉体採取装置による粉体採取拠点を国内3地点に構築することができた。そして、3地点・4季節・2粒径の、それぞれ特徴的な化学組成を有する大気粒子サンプルを粉体として採取することができた。これまでに我が国におけるフィルター法のPM_{2.5}採取地点は無数に存在するが、サイクロンによるPM_{2.5}粉体の採取拠点は他に例がなく、極めて独自性の高い成果であると言える。
- (b) PM_{2.5}の炭素成分分析の公定法である熱分離光学補正法は、一般にフィルター試料を測定することに用いる方法であり、粉体試料を分析する際の規定の方法は決められていなかった。本研究により、フィルターに粉体を塗布する方法と、粉体を再発塵させフィルターに再捕集させる方法には大きな違いがないことが示された。これにより、簡便な手法である塗布法により、サイクロンで採取された粉体中の炭素成分を測定することが可能となった。
- (c) サイクロンにより採取されたPM_{2.5}中に含まれる元素炭素と有機炭素の比は、サイクロン下流のバックアップフィルター中のものと異なる値を示した。また、サイクロン法とフィルター法を並行して行った試験では、塩化物イオンや硝酸イオンについてフィルター法による値が明らかに低くなった。これは、フィルター法では不可避であった有機炭素やガス状硝酸等のアーティファクト、つまりフィルターへのガス状成分の吸着を、サイクロン法により回避できている可能性を示すものである。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省請負「平成30年度微小粒子状物質（PM_{2.5}）総合対策推進業務」の微小粒子状物質（PM_{2.5}）精度ワーキンググループ（第1回）において、精度管理用粉体の作製方法として、本研究成果である、サイクロンによる大気粒子の採取方法が選択肢の一つとして検討された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- (a) 本法（サイクロン法による大気粒子の採取）の有用性が実証され、今後公的機関の認証を受けることができれば、大気観測や健康影響評価の分野で新たな市場が発生する。現在我が国における浮遊粒子状物質濃度の公的観測地点は全国で1500箇所を超えており、研究機関による需要も考慮すると、将来的には数千箇所規模の市場発生が見込まれる。また本法は世界的にも新規性・独自性が高いことから、国際標準や認証取得を視野に入れることで、国内のみならず国外にも市場が広がり、特に大気汚染の激しい地域では需要が高まることが予想される。これらの総合的な環境産業の創出と発展により、国内外におけるPM_{2.5}の採取・分析・健康影響評価が進むことによってPM_{2.5}の健康影響決定要因が個々の化合物レベルまで解明されれば、我が国のみならず世界的なPM_{2.5}対策の有効性と効率性の向上に多大な貢献をすることができる。
- (b) PM_{2.5}に代表される浮遊粒子状物質の健康影響評価を進める上では、従来法であるフィルター法を用いている限り、十分な量の試料確保と採取中のアーティファクトが大きな障壁である。本研究で用いているサイクロン方式の新規採取装置により、これらの問題を同時に解決できる可能性が示された。特に、従来法と比較して約数十倍の試料量確保が可能となったことで、細胞曝露実験がより効率的に行えるようになり、さらに従来検出が困難であった微量化学成分を分析することも容易になることが期待できる。
- (c) PM_{2.5}粒子を大量に粉体として採取できる本法は、成分分析の精度管理のためのPM_{2.5}標準粒子の作製法としての応用が今後期待できる。現在、一般に入手可能なエアロゾルの標準粒子としては、NISTのSRM1649bや国環研のCRM#28等がある。しかし、前者は米国の、後者は中国北京市のエアロゾル粒子であり、国内で採取されたエアロゾルの標準粒子が存在しておらず、国内の特にPM_{2.5}の標準粒子

の潜在的な需要は高い。

6. 国際共同研究等の状況

本研究成果の発信により、インドの研究者 (Dr. S. G. Aggarwal、インド国立物理学研究所主任研究員) から、サイクロン方式を用いた粒子状物質採取装置に関する問い合わせがあった。これを受けて、研究代表者の奥田はインドに2回渡航し、今後の研究の展開について現地で議論を行った (渡航費は別予算から支出)。そして別予算により現地に本研究と同様のサイクロン式大気粒子サンプラーを設置し、現在まで複数の大気粒子サンプルの取得に成功している。インドでは大気中の粒子状物質が日本の約10倍高いため、日本よりもはるかに短いサンプリング期間で大量に粉体を採取することができる。このことは、本法による細胞・動物実験の有効な応用例となり得るほか、本法による大気粒子の大量採取による標準粒子の作製などといった研究の進展が今後期待できる。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Okuda, T., Isobe, R. (2017) Improvement of a high-volume aerosol particle sampler for collecting submicron particles through the combined use of a cyclone with a smoothened inner wall and a circular cone attachment, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **11** (2), 131-137.
- 2) Okuda, T., Shishido, D., Terui, Y., Fujioka, K., Isobe, R., Iwaki, Y., Funato, K., Inoue, K. (2018) Development of a high-volume simultaneous sampler for fine and coarse particles using virtual impactor and cyclone techniques, *Asian Journal of Atmospheric Environment*, **12** (1), 78-86.
- 3) Onishi, T., Honda, A., Tanaka, M., Chowdhury, P.H., Okano, H., Okuda, T., Shishido, D., Terui, Y., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Hayashi, M., Nishita-Hara, C., Hara, K., Inoue, K., Yasuda, M., Hirano, S., Takano, H. (2018) Ambient fine and coarse particles in Japan affect nasal and bronchial epithelial cells differently and elicit varying immune response, *Environmental Pollution*, **242**, 1693-1701.

<その他誌上発表 (査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

※発表済みのもの又は確実に発表する予定のものにとどめること。

- 1) Okuda, T., Terui, Y., Shishido, D., Isobe, R., Iwaki, Y., Nagai, Y., Funato, K., Inoue, K. (2016) Development of the high volume simultaneous sampler for PM_{2.5} and coarse aerosol particles. *Biomarkers and Molecular Isotopes: International Workshop of Organic Geochemistry, 2-1545*, Osaka, Japan, July 5, 2016.
- 2) 奥田知明、照井凱大、完戸大輝、磯部涼真、岩城優介、船戸浩二、井上浩三 (2016) PM_{2.5}と粗大粒子の大流量同時採取装置の開発、第33回エアロゾル科学・技術研究討論会、大阪府立大学、堺市、2016年8月31日。
- 3) 奥田知明 (2016) 大流量サイクロンサンプラーが拓くエアロゾル研究の新領域、第33回エアロゾル科学・技術研究討論会、大阪府立大学、堺市、2016年9月1日。
- 4) 奥田知明 (2016) 環境省推進費CYCLEX プロジェクトの趣旨と展望およびバーチャルインパクトとサイクロンによる大流量PM_{2.5}採取、第57回大気環境学会年会、北海道大学、札幌市、2016年9

月7日。

- 5) 亀田貴之、東野達 (2016) PM_{2.5}に含まれる多環芳香族化合物の分析、第57回大気環境学会年会、北海道大学、札幌市、2016年9月7日。
- 6) Aggarwal, S.G., Patel, P., Tsai, C.J., Soni, D., Singh, K., Okuda, T., Kotnala, R.K., Ojha, V.N., Aswal, D.K. (2017) Need of a high-volume PM_{2.5} sampler for performing better gravimetric measurements and chemical analyses. *10th Asian Aerosol Conference*, Jeju, Republic of Korea, July 4, 2017.
- 7) Okuda, T., Shishido, D, Terui, Y., Funato, K., Inoue, K. (2017) Development of the high volume simultaneous sampler for fine and coarse aerosol particles using a combination of virtual impactor and multi-cyclone. *10th Asian Aerosol Conference*, Jeju, Republic of Korea, July 5, 2017.
- 8) Hasegawa, S., Okuda, T. (2017) Estimation of influence of artifact on carbonaceous aerosol measurement by newly developed cyclone sampler. *10th Asian Aerosol Conference*, Jeju, Republic of Korea, July 5, 2017.
- 9) 完戸大輝、照井凱大、奥田知明、船戸浩二、井上浩三 (2017) PM_{2.5}と粗大粒子の大流量同時採取装置の開発と改良、第34回エアロゾル科学・技術研究討論会、芝浦工業大学、東京都江東区、2017年8月3日。
- 10) 照井凱大、完戸大輝、奥田知明、船戸浩二、井上浩三 (2017) 化学成分分析によるPM_{2.5}と粗大粒子の大流量同時採取装置の性能評価、第34回エアロゾル科学・技術研究討論会、芝浦工業大学、東京都江東区、2017年8月4日。
- 11) 長谷川就一、奥田知明 (2017) サイクロン法により採取されたPM_{2.5}粉体試料の成分組成、第58回大気環境学会年会、兵庫医療大学、兵庫県神戸市、2017年9月6日。
- 12) 完戸大輝、照井凱大、奥田知明 (2017) 大流量PM_{2.5}採取におけるアーティファクトの影響の検討、第58回大気環境学会年会、兵庫医療大学、兵庫県神戸市、2017年9月6日。
- 13) 照井凱大、完戸大輝、香取拓也、金丸葵、佐藤摘歩実、奥田知明、長谷川就一、原圭一郎、西田千春、林政彦、船戸浩二、井上浩三 (2017) 横浜・埼玉・福岡においてサイクロン法により採取されたPM_{2.5}粉体試料の特性の解明、第58回大気環境学会年会、兵庫医療大学、兵庫県神戸市、2017年9月6日。
- 14) 奥田知明 (2017) PM_{2.5}を集めて測る ～捕集と特性解明の技術～、第7回CSJ化学フェスタ、タワーホール船堀、東京都江戸川区、2017年10月17日。[Invited]
- 15) Okuda, T. (2017) Measurement of physical and chemical characteristics of atmospheric aerosols related to their adverse health effect. *International Symposium on Continuously Improvement of Air Quality: Science, Technology and Policy*, Beijing, China, December 9, 2017. [invited]
- 16) Okuda, T. (2018) Development of measurement techniques of physical and chemical characteristics of atmospheric aerosols related to their adverse health effect. *Frontiers of Atmospheric Aerosol Studies: Toward the Understanding of Their Health and Climatic Effects*, Nagoya University, Nagoya, Japan, January 24, 2018. [invited]
- 17) 奥田知明 (2018) PM_{2.5}の物理化学特性の解明と曝露実験による生体有害性評価、第88回日本衛生学会、東京工科大学蒲田キャンパス、東京都大田区、2018年3月24日。[Invited]
- 18) 香取拓也、完戸大輝、奥田知明 (2018) サイクロンを用いた微小粒子の採取、第35回エアロゾル科学・技術研究討論会、名古屋大学、愛知県名古屋市、2018年7月31日。
- 19) 照井凱大、完戸大輝、佐藤摘歩実、奥田知明、船戸浩二、井上浩三 (2018) サイクロン法により採取された大気エアロゾル粉体のDTT Assayによる酸化能測定、第35回エアロゾル科学・技術研究討論会、名古屋大学、愛知県名古屋市、2018年7月31日。
- 20) 完戸大輝、奥田知明 (2018) 大気サンプリングにおけるサイクロン捕集とフィルター捕集のアー

- ティファクトの違い、第35回エアロゾル科学・技術研究討論会、名古屋大学、愛知県名古屋市、2018年7月31日。
- 21) 奥田知明、完戸大輝、照井凱大、佐藤摘歩実、本田晶子、大西俊範、田中満崇、高野裕久、亀田貴之、東野達、長谷川就一、西田千春、原圭一郎、林政彦、井上浩三 (2018) サイクロン法により採取された粒子状物質の曝露実験による健康影響評価、第35回エアロゾル科学・技術研究討論会、名古屋大学、愛知県名古屋市、2018年8月1日。
 - 22) 長谷川就一、奥田知明 (2018) サイクロン法により採取されたPM_{2.5}と粗大粒子の粉体試料の成分組成、第35回エアロゾル科学・技術研究討論会、名古屋大学、愛知県名古屋市、2018年8月1日。
 - 23) Shishido, D., Okuda, T. (2018) Difference in the sampling artifacts during aerosol collection between cyclone and filter, *10th International Aerosol Conference*, St. Louis, USA, September 4, 2018.
 - 24) Terui, Y., Shishido, D., Kanemaru, A., Sato, T., Okuda, T. (2018) Chemical analysis and DTT assay of powder form of atmospheric particles collected by cyclone, *10th International Aerosol Conference*, St. Louis, USA, September 6, 2018.
 - 25) Okuda, T., Takano, H., Honda, A., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Onishi, T., Tanaka, M., Hayashi, M., Hara, K., Nishita-Hara, C., Shishido, D., Terui, Y., Sato, T., Inoue, K. (2018) Identification of the factors responsible for the health effects of atmospheric fine particles by cyclone collection method and exposure experiments, *10th International Aerosol Conference*, St. Louis, USA, September 7, 2018.
 - 26) 奥田知明、本田晶子、大西俊範、田中満崇、高野裕久、長谷川就一、亀田貴之、東野達、西田千春、原圭一郎、林政彦、完戸大輝、照井凱大、佐藤摘歩実、井上浩三 (2018) 福岡・埼玉・神奈川でサイクロン採取された粒子状物質の曝露実験による健康影響評価 ―推進費CYCLEXプロジェクト進捗報告―、第59回大気環境学会年会、九州大学、福岡県福岡市、2018年9月11日。
 - 27) Shishido, D., Okuda, T., Takano, H., Honda, A., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Onishi, T., Tanaka, M., Hayashi, M., Hara, K., Nishita-Hara, C., Terui, Y., Sato, T., Inoue, K. (2018) Cyclone collection of fine and coarse particles followed by exposure experiments, *Joint International Symposium of 14th CACGP & 15th IGAC*, Takamatsu, Japan, September 26, 2018.
 - 28) Okuda, T., Takano, H., Honda, A., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Onishi, T., Tanaka, M., Hayashi, M., Hara, K., Nishita-Hara, C., Shishido, D., Terui, Y., Sato, T., Inoue, K. (2018) Factors responsible for the health effects of atmospheric fine and coarse particles by cyclone collection and exposure experiments. *China-Japan-Korea Joint International Symposium on Continuously Improvement of Air Quality, 2018 Annual Meeting of AAE-CSES*, Qingdao, China, November 3, 2018. [invited]
 - 29) Okuda, T., Goto, T., Takano, H., Honda, A., Onishi, T., Tanaka, M., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Hayashi, M., Hara, K., Nishita-Hara, C., Inoue, K. (2019) Factors responsible for the biological responses of exposure to atmospheric fine and coarse particles collected by cyclone in three Japanese cities. *11th Asian Aerosol Conference*, Hong Kong, China, May 28-30, 2019 (presentation accepted).
 - 30) Katori, T., Shishido, D., Okuda, T. (2019) Comparison of PM_{2.5} chemical composition collected with cyclone and filter. *11th Asian Aerosol Conference*, Hong Kong, China, May 28-30, 2019 (presentation accepted).
 - 31) Saito, K., Okuda, T. (2019) Chemical speciation of chromium in atmospheric particulate matter collected with filter and cyclone by XAFS method, *11th Asian Aerosol Conference*, Hong Kong, China, May 28-30, 2019 (presentation accepted).

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 奥田知明、第57回大気環境学会年会における特別集会（一般公開）「新規採取法及び細胞・動物曝露実験によるPM_{2.5}の健康影響決定要因の同定－環境省推進費CYCLEXプロジェクトの趣旨と展望」を主催（於：北海道大学、札幌市、2016年9月7日、聴講者約70名）
- 2) 奥田知明、一般市民対象展示会「第17回慶應科学技術展」に「PM_{2.5}粒子による健康影響メカニズムを探る」出展（於：東京国際フォーラム、東京都千代田区、2016年12月16日、来場者約2,000名）
- 3) 奥田知明、一般市民対象展示会「テクニカルショウヨコハマ」に「バーチャルインパクトとダブルサイクロンを用いたPM_{2.5}と黄砂粒子の大量同時採取装置」出展（於：パシフィコ横浜、横浜市西区、2017年2月1-3日、来場者約31,000名）
- 4) 奥田知明、慶應義塾湘南藤沢高等部2年生向けの講演における研究成果概要紹介（2017年6月24日、聴講者約80名）
- 5) 奥田知明、一般市民対象講演会「第7回CSJ化学フェスタ」における招待講演「PM_{2.5}を集めて測る～捕集と特性解明の技術～」において研究成果紹介（於：タワーホール船堀、東京都江戸川区、2017年10月17日、聴講者約100名）
- 6) 奥田知明、一般市民対象展示会「第18回慶應科学技術展」に「PM_{2.5}粒子の生体影響評価のための大流量サイクロンサンプラーの新展開」出展（於：東京国際フォーラム、東京都千代田区、2017年12月15日、来場者約2,000名）
- 7) 奥田知明、一般市民対象講演会「大学間技術職員交流研修会第11回化学系ワークショップ」における招待講演「PM_{2.5}の現状とその生体有害性に関連する物理化学特性の解明」において研究成果紹介（於：慶應義塾大学矢上キャンパス、横浜市港北区、2018年3月8日、聴講者約30名）
- 8) 奥田知明、一般市民対象講演会「第88回日本衛生学会学術総会 シンポジウム、ミクロ～マクロ（グローバル）視点でPM_{2.5}の健康影響を評価する」において「PM_{2.5}の物理化学特性の解明と曝露実験による生体有害性評価」と題して研究成果紹介（於：東京工科大学蒲田キャンパス、2018年3月24日、来場者約800名）
- 9) 奥田知明、一般市民対象講演会「第5回カノマックス国際エアロゾルワークショップ」における招待講演「Recent Advances in Elucidation of Physical and Chemical Characteristics of Ambient Aerosols related to their Adverse Health Effect」において研究成果紹介（於：AP品川、東京都港区、2018年5月18日、聴講者約100名）
- 10) 奥田知明、第59回大気環境学会年会における健康影響分科会（一般公開）において講演「福岡・埼玉・神奈川でサイクロン採取された粒子状物質の曝露実験による健康影響評価－推進費CYCLEXプロジェクト進捗報告－」（於：九州大学、福岡市、2016年9月7日、聴講者約70名）
- 11) 奥田知明、慶應義塾湘南藤沢高等部2年生向けの講演における研究成果概要紹介（2018年9月29日、聴講者約230名）
- 12) 奥田知明、一般市民対象展示会「エコプロ2018」に「サイクロン採取されたPM_{2.5}粒子の細胞曝露による生体影響評価」出展（於：東京ビッグサイト、東京都江東区、2018年12月6-8日、来場者約162,000名）
- 13) 奥田知明、一般市民対象展示会「第19回慶應科学技術展」に「CYCLEXプロジェクト：新規採取法による大気粒子の細胞曝露影響評価」出展（於：東京国際フォーラム、東京都千代田区、2018年12月14日、来場者約2,000名）

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

- 1) 授賞者：日本エアロゾル学会、賞名：井伊谷賞、受賞者：奥田知明、理由：「大流量サイクロンサンプラーが拓くエアロゾル研究の新領域」による、受賞年月日：2016年9月1日

8. 引用文献

- 1) JIS Z 7152 (2013) バーチャルインパクトによる排ガス中のPM10/PM2.5質量濃度測定方法.
- 2) Rule, A.M., Geyh, A.S., Ramos-Bonilla, J.P., Mihalic, J.N., Margulies, J.D., Polyak, L.M., Kesavan, J., Breysse, P.N. (2010) Design and characterization of a sequential cyclone system for the collection of bulk particulate matter, *Journal of Environmental Monitoring* **12**, 1807-1814.
- 3) Okuda, T., Isobe, R., Nagai, Y., Okahisa, S., Funato, K., Inoue, K. (2015) Development of a high-volume PM_{2.5} particle sampler using impactor and cyclone techniques. *Aerosol and Air Quality Research* **15**, 759-767.
- 4) JIS Z 8851 (2008) 大気中のPM2.5測定用サンプラ.
- 5) 兼保直樹 (2010) ハイボリューム・エアサンプラー用PM_{2.5}インパクト(HVI_{2.5})の開発, *大気環境学会誌* **45** (4), 171-174.
- 6) Tang, N., Hattori, T., Taga, R., Igarashi, K., Yang, X.Y., Tamura, K., Kakimoto, H., Mishukov, V.F., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K. (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulates and their relationship to emission sources in the Pan-Japan Sea countries. *Atmospheric Environment* **39**, 5817-5826.
- 7) Hayakawa, K., Tang, N., Kameda, T., Toriba, A. (2007) Atmospheric Behaviors of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in East Asia, *Asian Journal of Atmospheric Environment* **1**, 19-27.

II-2 細胞・動物曝露実験によるPM2.5の健康影響決定要因の同定

京都大学大学院工学研究科

高野 裕久

平成28～30年度累計予算額：33,250千円

(うち平成28年度：11,701千円、平成29年度：11,049千円、平成30年度：10,500千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

サイクロン法で捕集された粒子は、従来法であるフィルター捕集されたサンプルと比較して、飛躍的に曝露実験時のハンドリング性が向上し、かつ影響も強く観察された。これにより、サイクロン法は、一般環境粒子そのものの真の健康影響評価を可能とすることが明らかとなった。また、サイクロン捕集された粒子は、気道上皮細胞の炎症反応や、抗原提示細胞の異物取り込み、炎症反応を誘導し、呼吸器疾患の悪化に寄与していることが示された。粒径差、地域差、季節差も認められた。また、曝露影響評価指標と有意な相関を示す成分を見出し、これらの成分が呼吸器疾患の悪化の規定要因になりうることも示した。さらに、サイクロン捕集された粒子は、動物個体に肺炎を誘導した。

【キーワード】

生体影響、細胞曝露、動物曝露、炎症活性、免疫反応

1. はじめに

近年、国内外由来の2.5 μm以下の微小粒子状物質 (PM2.5) の健康影響が注目されている。統計学的に、PM2.5の上昇と関連する健康影響として、発癌、全死亡率、呼吸器系や循環器系の疾患による死亡率、それらの疾患の悪化、中でも、気管支炎や気管支喘息の悪化、アレルギーに関わる疾患や症状の悪化等が挙げられている¹⁾。また、PM2.5による死亡率および有症率の増加や症状悪化を理論づける病態生理学的メカニズムに関しても、多くの仮説と実験的知見が提唱され、これらをまとめ、理解する試みも進展してきている。例えば、呼吸器系、循環器系にPM2.5が影響をもたらす想定メカニズムとして、現時点では、以下が挙げられている¹⁾。

・呼吸器系について

- 1) 気道や肺に炎症反応を誘導し、より高濃度な曝露の場合、肺障害が発現する。
- 2) 気道の抗原反応性を増強し、喘息やアレルギー性鼻炎を悪化させる。
- 3) 呼吸器感染の感受性を増加する。

・循環器系について

- 1) 呼吸器刺激や自律神経機能への影響等を介し、不整脈等、心機能に変化を生じやすくする。
- 2) 生理活性物質や過酸化物の増加等を起こし、血管系の構造変化を促進する。
- 3) 血小板や血液凝固系の活性化、血栓形成の誘導等を介し、血管狭窄性病変を起こしやすくし、心臓に直接的、間接的悪影響を及ぼす。

一方、PM2.5の構成成分は多様であり、移送時の二次生成・変化も存在するため、健康影響の発現や悪化に寄与する主な成分や要因は明らかにされていない。PM2.5の健康影響を決定する成分や要因を特定するために、最終的には、実際の成分測定を担う大気観測研究とともに、当該成分や要因と健康影響の相関性を検証する疫学的研究が必要となる。しかし、膨大な構成成分よりなり、二次生成・変化を受けるPM2.5のいかなる要素に注目すべきかを明らかにするためには、実験研究的アプローチを先行させることが不可欠である。換言すれば、病態生理学的メカニズムに立脚したPM2.5成分・要因の影響評価研究を進め、健康影響を決定する真の要因や化学成分を同定し、健康影響をエンドポイントとするPM2.5成分モニタリング対象候補物質(群)の特定につなげることが、極めて重要である。

当研究グループは、気管支喘息の悪化に寄与する主なPM2.5成分や要因を明らかにするため、大気環境汚染物質と呼吸器系との最初の物理化学的接点である気道上皮細胞やアレルギー・アトピー成立に関わ

る抗原提示及び免疫応答を担う免疫担当細胞など、細胞を用いた実験研究的アプローチを進めてきた。例えば、日本の2地域より採取したPM2.5の水溶性および脂溶性抽出成分を気道上皮細胞や免疫担当細胞に曝露し、呼吸器・免疫系に及ぼす影響の評価を実施した²⁾。これに先行し、まず、PM2.5成分の影響評価を行うために適切な捕集フィルターの検討を行った。PTFEフィルターに関しては、抽出操作のみによって、細胞に影響を及ぼしうることが明らかになった、次に、石英フィルターの抽出物を用い、日本のA市（工業地域）、B市（越境汚染が懸念される地域）において採取したPM2.5の水溶性抽出成分、脂溶性抽出成分の曝露実験を実施した。PM2.5の脂溶性抽出成分曝露により、気道上皮細胞からの炎症性サイトカインの産生は濃度依存的に増大し、B市よりA市の影響がより大きかった。抗原提示細胞については、脂溶性抽出成分の曝露により、免疫応答の開始点にあり抗原の取り込みや提示を担う樹状細胞マーカーであるDEC205陽性細胞率が濃度依存的に増大し、やはり、B市よりA市の影響がより大きかった。一方、水溶性抽出成分では顕著な変化は認められなかった。複数の免疫担当細胞が含まれる脾細胞については、脂溶性抽出成分により、細胞増殖能が低下し、T細胞のマーカーであるTCR陽性細胞率が増加し、B細胞のマーカーであるCD19陽性細胞率が減少した。以上より、PM2.5成分は、気道上皮に対しては催炎症性作用を、骨髄由来細胞に対しては活性化効果を、脾細胞に対しては細胞増殖能の抑制と構成細胞比率の変化を示し、その影響は、概して、PM2.5の脂溶性抽出成分に顕著であることが示唆された。また、影響は地域によっても異なる可能性も示された。

しかし、フィルターからの抽出物を用いた従来の研究では、PM2.5に含まれる‘抽出可能’な成分の影響を評価することは可能であるものの、「不溶性の粒子を含むPM2.5そのもの（全体）の影響を評価することはできない」という致命的な問題を残していた。換言すれば、「PM2.5の構成要素の、一部のみの影響評価が実践できているだけ」という状況であった。また、大気中に存在するPM2.5中の成分を、あるがままの化学形態で評価ができていないのかも不明であった。もちろん、これらの問題を考えるにあたり、最大の障壁は、実環境大気中の性状を保持したPM2.5を、健康影響評価に十分な量、採取することが不可能だったという点にある。

2. 研究開発目的

本研究では、フィルターを用いずにサイクロンにより採取されたPM2.5粒子そのものを用いて曝露実験を行うことで、PM2.5の健康影響を決定する真の要因や化学成分を同定することを目的とした。

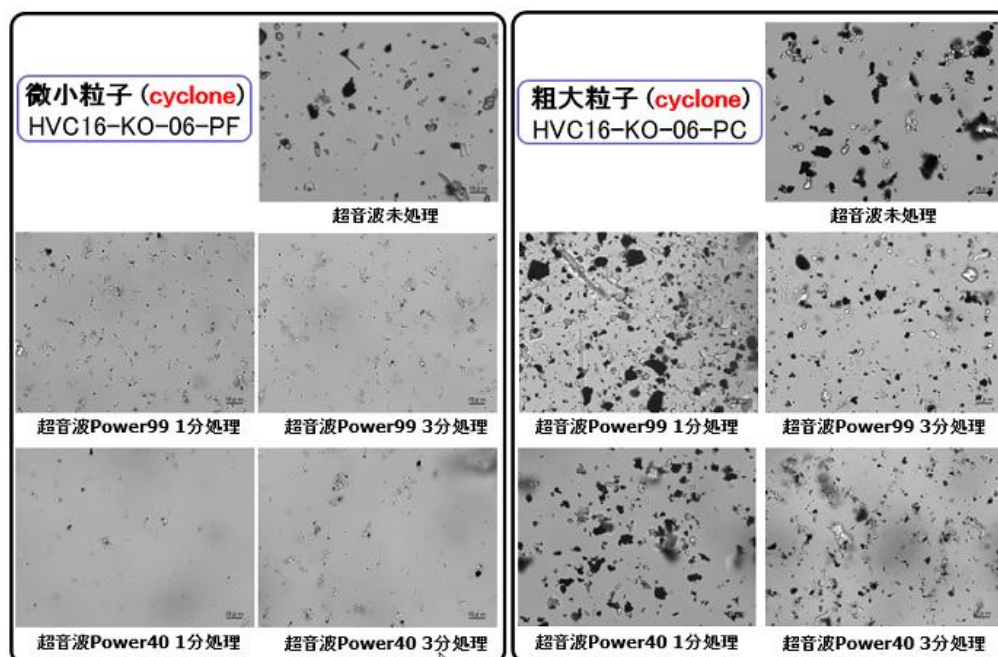
3. 研究開発方法

(1) 横浜においてサイクロン捕集された粒子を、既報告に準じ、超音波発生機(UD-100、トミー精工)を用いてpower 99あるいは40、1～3分の条件で処理した。粒子を位相差顕微鏡(BZ-9000、キーエンス)にて観察後、ソフトウエアを用いて粒径測定を行った。(2) 横浜においてサイクロン捕集された粒子と従来法(フィルター)で採取した粒子の抽出物を、気道上皮細胞とリコンビナントマウス顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子によって分化誘導させた骨髄由来抗原提示細胞に24時間曝露した。細胞活性を、Water soluble tetrazolium-1(WST-1)を用いた比色法により、異物の取り込みや異物情報の提示に関わる細胞表面マーカーに関する解析をフローサイトメトリーにより、催炎症性サイトカインの産生をEnzyme linked immuno sorbent assay(以下ELISA)法により、それぞれ解析した。(3) 横浜においてサイクロン捕集された粒子を鼻腔上皮細胞に24時間曝露し、細胞活性と催炎症性サイトカインの産生を解析した。(4) 横浜、埼玉、福岡においてサイクロン捕集された粒子を気道上皮細胞に24時間曝露し、細胞活性と催炎症性サイトカインの産生を解析した。(5) 横浜、埼玉、福岡においてサイクロン捕集された粒子を抗原提示細胞に24時間曝露し、細胞活性、催炎症性サイトカインの産生および細胞表面分子の発現を解析した。(6) サイクロン捕集された粒子中の化学的および生物的成分と各種細胞に対する影響の相関解析を行なった。(7) 動物への曝露実験は、ICRマウス(雄性6wk)を用い、横浜においてサイクロン捕集された粒子を気管内投与した。24時間後に、肺と気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、肺の病理学的変化をヘマトキシリン・エオジン染色により、BALF中の総細胞数および細胞成分(単核球および多核球)をディフ・クイック染色により測定した。

4. 結果及び考察

(1) サイクロンにより得られた粉体試料の顕微鏡観察結果

試料コードHVC16-K0-06PFおよびPC（横浜、試料採取期間：2016/7/25～8/6）を被検試料とした、超音波処理前後の顕微鏡観察結果を図(2)-1に示す。超音波未処理の試料では、溶液中において粒子の凝集が見られた。一方で、超音波処理を行った試料では、いずれの処理条件によっても、粒子が均一に分散されていることが確認された。微小粒子と粗大粒子では、粒子のサイズが明確に異なっていた。特に、微小粒子に関しては、超音波処理によって、大部分の粒子が2.5 μm以下であることが確認された。



図(2)-1 超音波処理前後の粉体試料の顕微鏡観察結果（試料採取期間：2016/7/25～8/6）

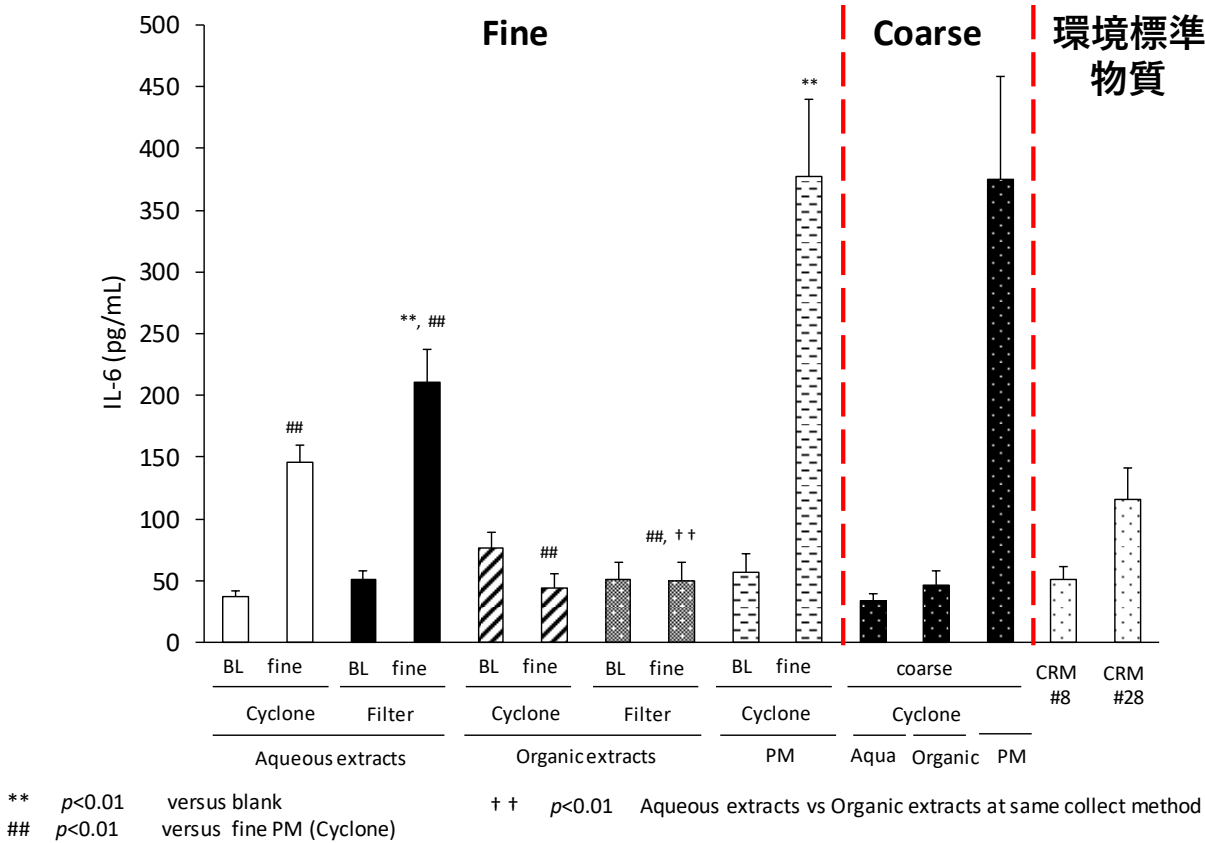
(2) 曝露影響評価実験における本法と従来法の比較

本法ではサイクロンにより採取された大気粒子そのものを細胞や動物に曝露できるのに対し、従来法ではフィルター採取された大気粒子を水または有機溶媒を用いて抽出し、その抽出液を曝露している。本項では、同じ場所で同一の時期に採取されたサイクロン粒子（CYCLEX-2、横浜）とフィルター粒子を用いて、本法と従来法の比較を行った。その結果を図(2)-2,3に示す。これより、本法（新規採取法、サイクロン）で回収した粒子そのものは、従来法（フィルター）で採取した粒子の抽出物と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。

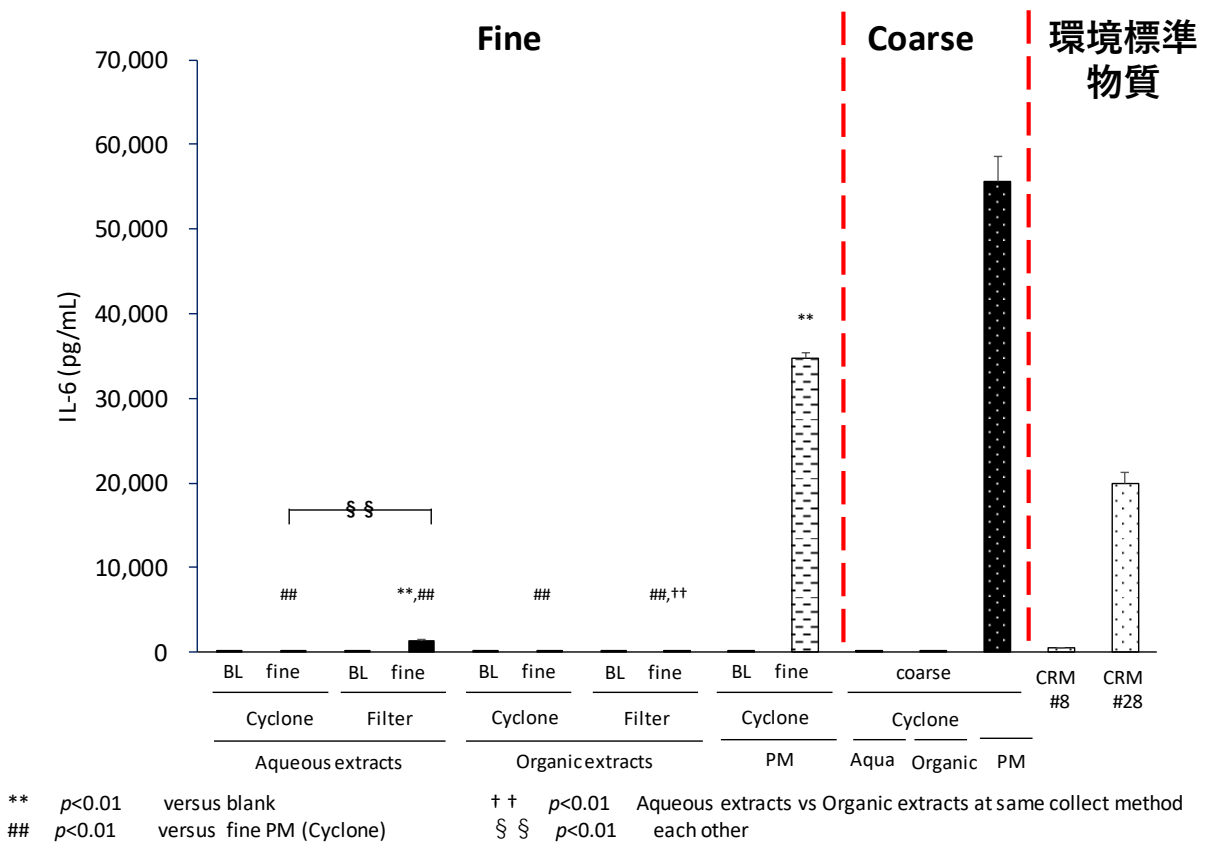
また、同じ図において、同一のサイクロン粒子を用いて、本法（サイクロン粒子そのものを曝露したもの）と従来法（サイクロン粒子の抽出物を曝露したもの）の結果も示されている。本法で回収した粒子そのものを曝露した場合は、同一の粒子そのものの抽出物を曝露した場合と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。

上記より、PM2.5等の粒子状物質の健康影響を考える上で、粒子をフィルター採取し抽出物曝露する従来法では、十分な健康影響評価ができていない可能性が示された。なお今回の実験では大気粒子を溶媒等で抽出した後の残渣（すなわち物理的影響としての粒子状物質）の評価は行っていないが、これについては既報³⁾⁴⁾により、溶媒抽出や加熱処理などにより共存成分の影響を除いた黄砂粒子やディーゼル排出粒子(DEP)は、未処理の粒子と比較して生体への影響が弱くなることが確認されている。本研究では、実環境中より採取された大気粒子そのものの曝露影響評価を行ったことで、大気粒子による真の曝露影響評価が行えるようになったことが重要な成果である。

本項は、環境研究総合推進費平成29年度中間評価結果個票中の「4. 委員の指摘および提言概要」における指摘事項、および同平成30年度終了課題成果報告会における質疑事項への回答となっている。



図(2)-2 細胞曝露実験における本法と従来法の比較 (気道上皮細胞、IL-6産生)



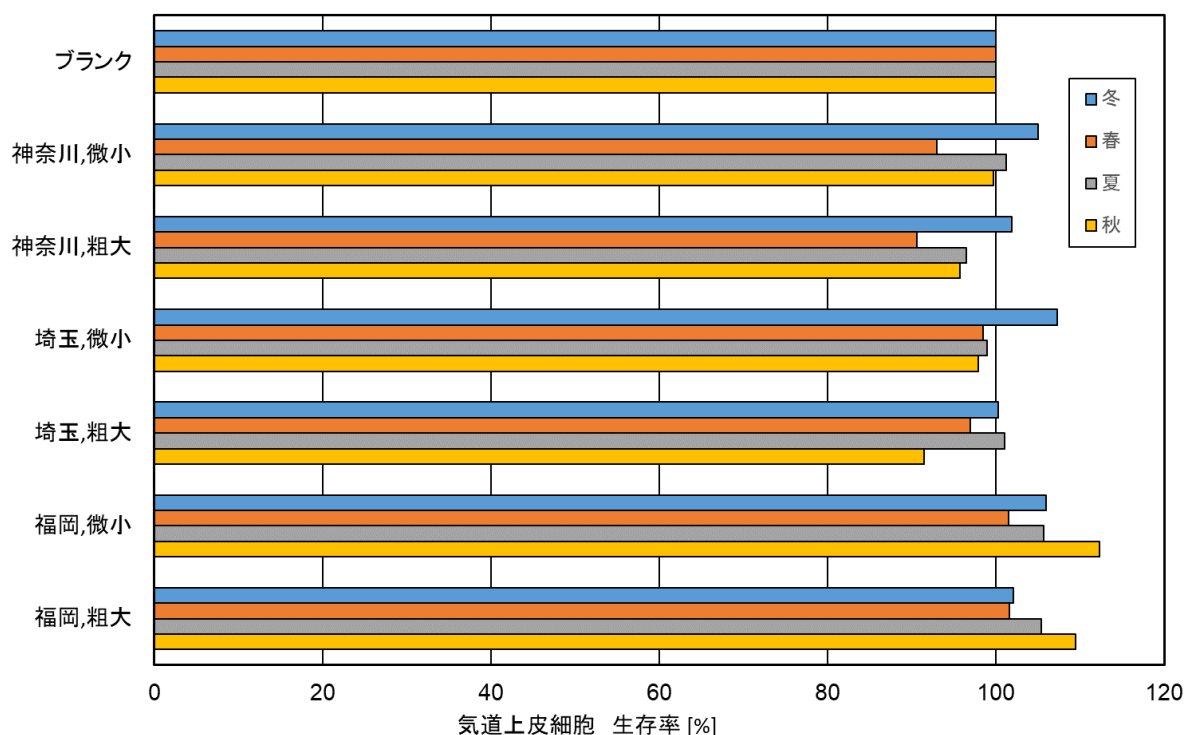
図(2)-3 細胞曝露実験における本法と従来法の比較 (抗原提示細胞、IL-6産生)

(3) 鼻腔上皮細胞への粉体試料の曝露実験結果

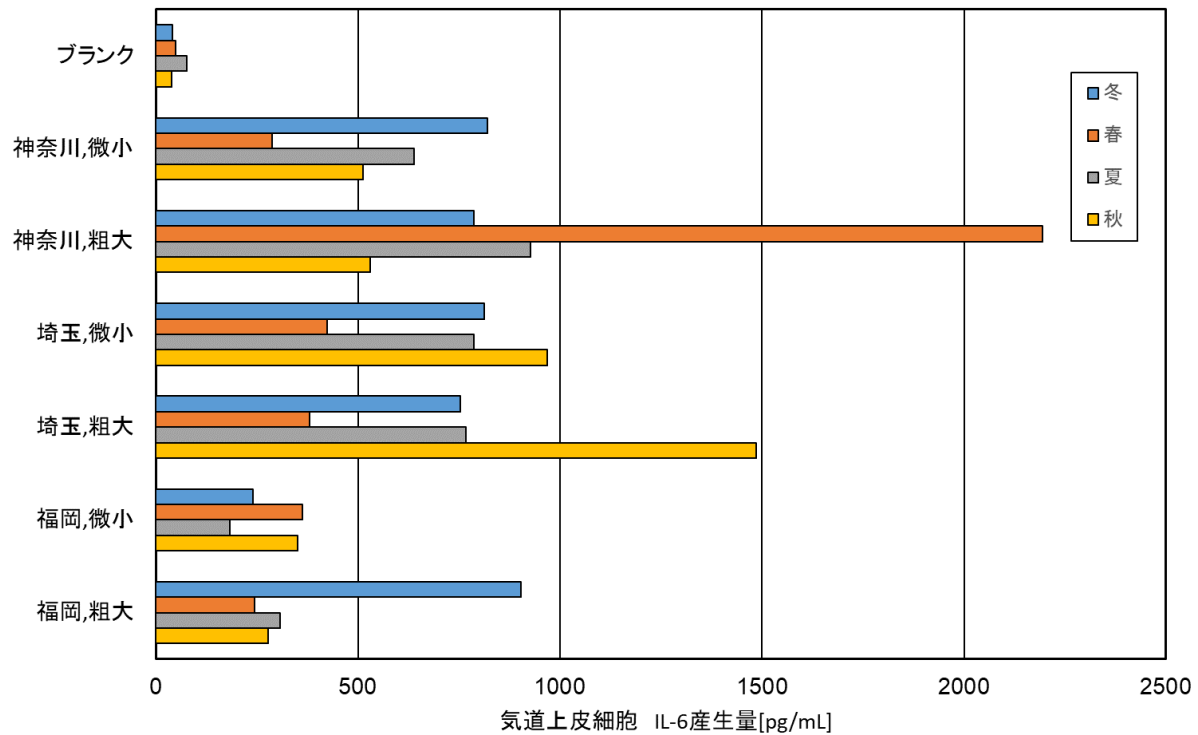
鼻腔上皮細胞としてRPMI-2650細胞を用いて、粉体試料を曝露した。微小粒子、粗大粒子ともに、コントロールと比較して細胞活性の低下を示した一方で、催炎症性サイトカインであるIL-6の産生はすべて検出限界値以下となった。

(4) 気道上皮細胞への粉体試料の曝露実験結果

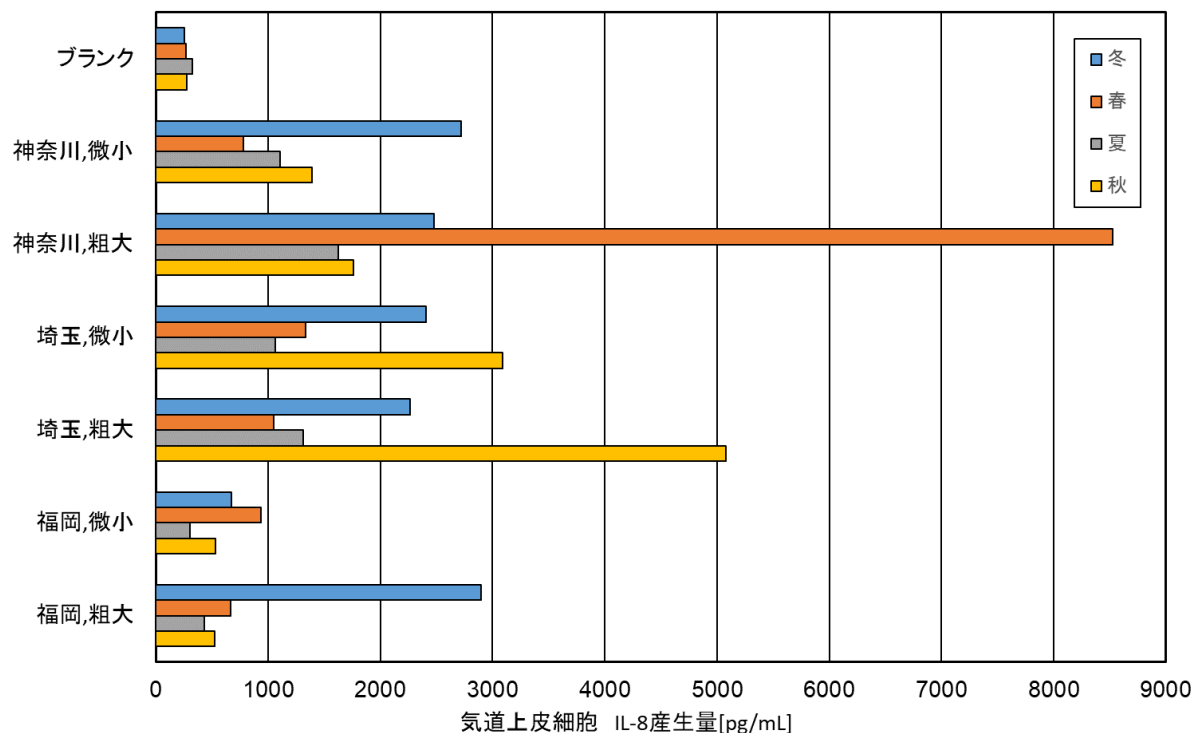
気道上皮細胞としてBEAS-2B細胞を用いて、粉体試料を曝露した。曝露濃度 75 $\mu\text{g/mL}$ の条件時の結果を図(2)-4, 5, 6に示す。粉体試料を気道上皮細胞に曝露した際には、細胞活性には影響しないが、炎症活性を誘導することを示した。また傾向としては、季節ごとにみると福岡では冬、埼玉では秋、また横浜では春において、それぞれ影響が大きかった。地域ごとにみると横浜と埼玉が似た傾向を示しているのに対して福岡はそれらよりも低い値を示した。



図(2)-4 粉体試料を気道上皮細胞に曝露した際の細胞活性



図(2)-5 粉体試料を気道上皮細胞に曝露した際のIL-6産生量

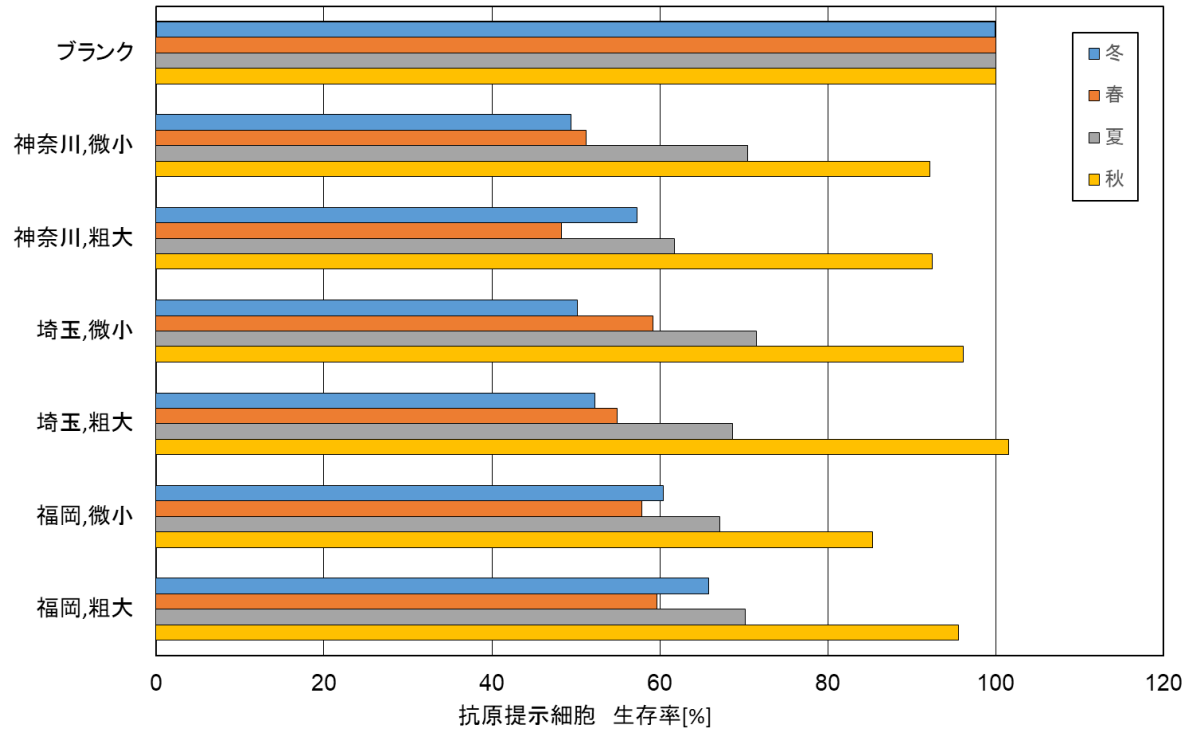


図(2)-6 粉体試料を気道上皮細胞に曝露した際のIL-8産生量

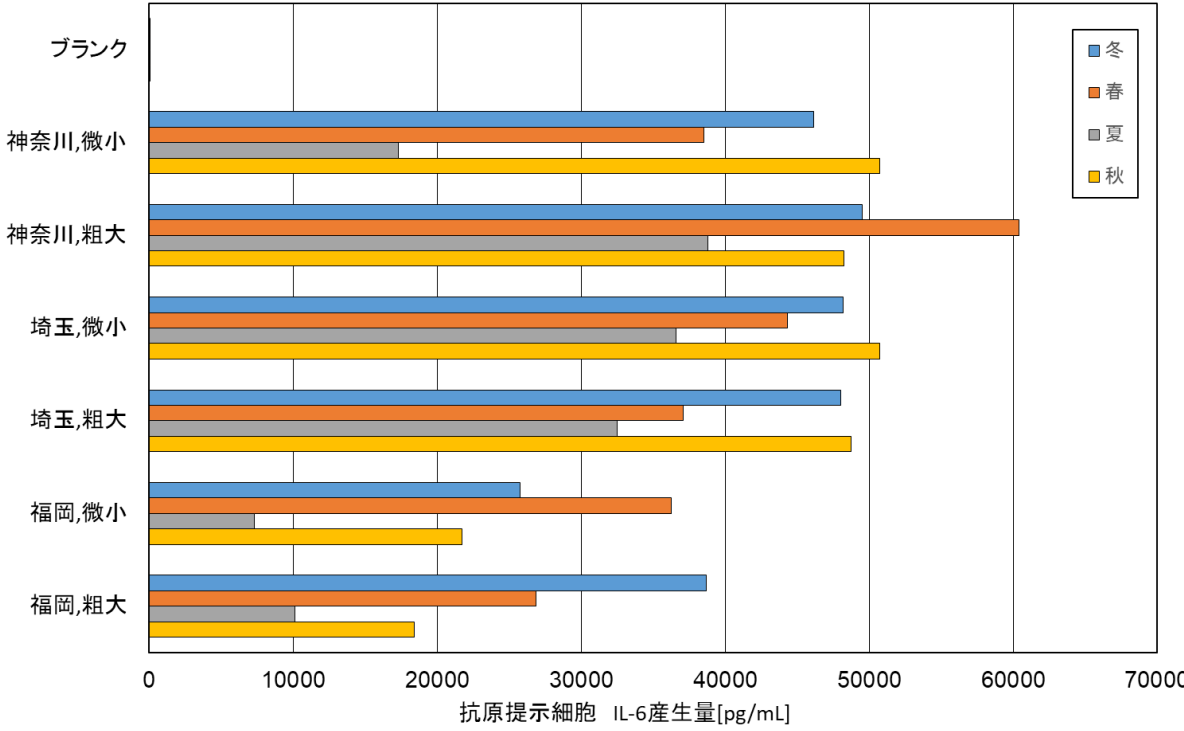
(5) 抗原提示細胞への粉体試料の曝露実験結果

抗原提示細胞としてアトピー素因を有するマウスであるNC/NgaTndCr1jマウスの骨髄細胞を用いて、粉体試料を曝露した。曝露濃度 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件時の結果を図(2)-7~11に示す。粉体試料を抗原提示細胞に曝露した際には、細胞の生存率に30%~50%程度の減少を引き起こし、また極めて強い炎症活性を

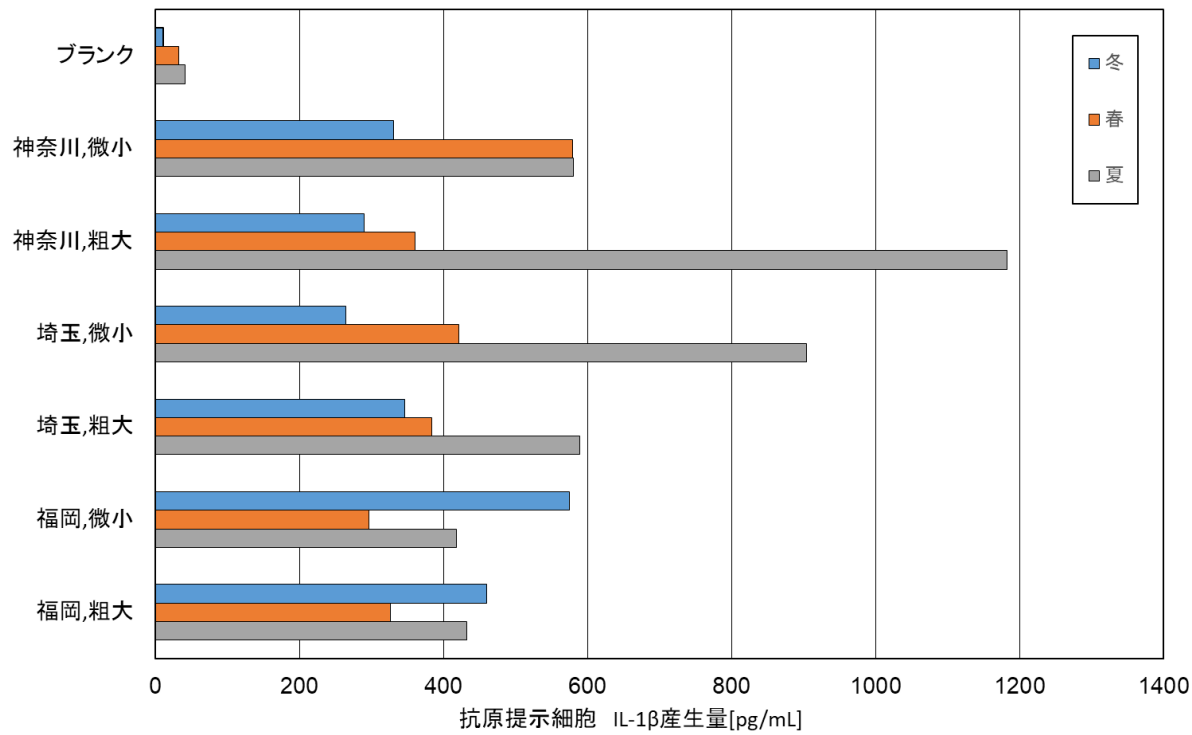
引き起こすことがわかった。炎症活性の地域による差では気道上皮細胞と同様に横浜、埼玉で似た傾向を示し、福岡がそれらの地域よりも低い値を示す結果となった。DEC-205陽性細胞率については地域差はあまり見受けられず、どの地域でも20～30％程度が陽性を示す結果となった。



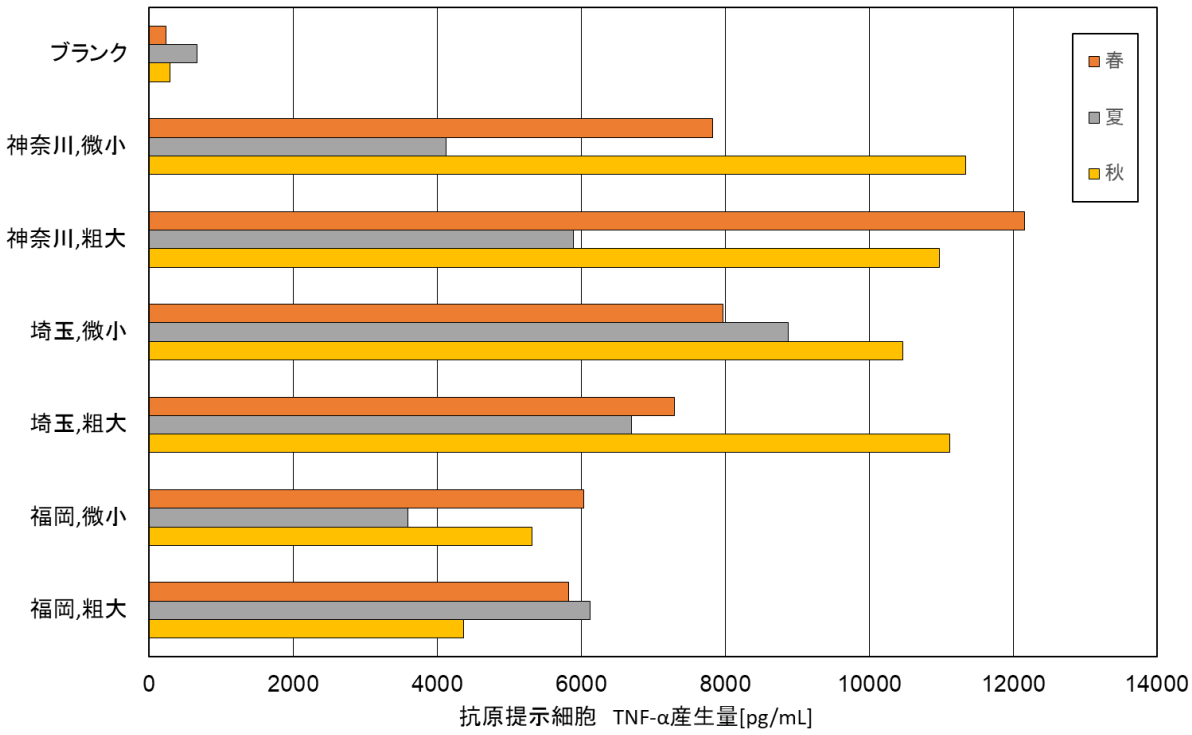
図(2)-7 粉体試料を抗原提示細胞に曝露した際の細胞活性



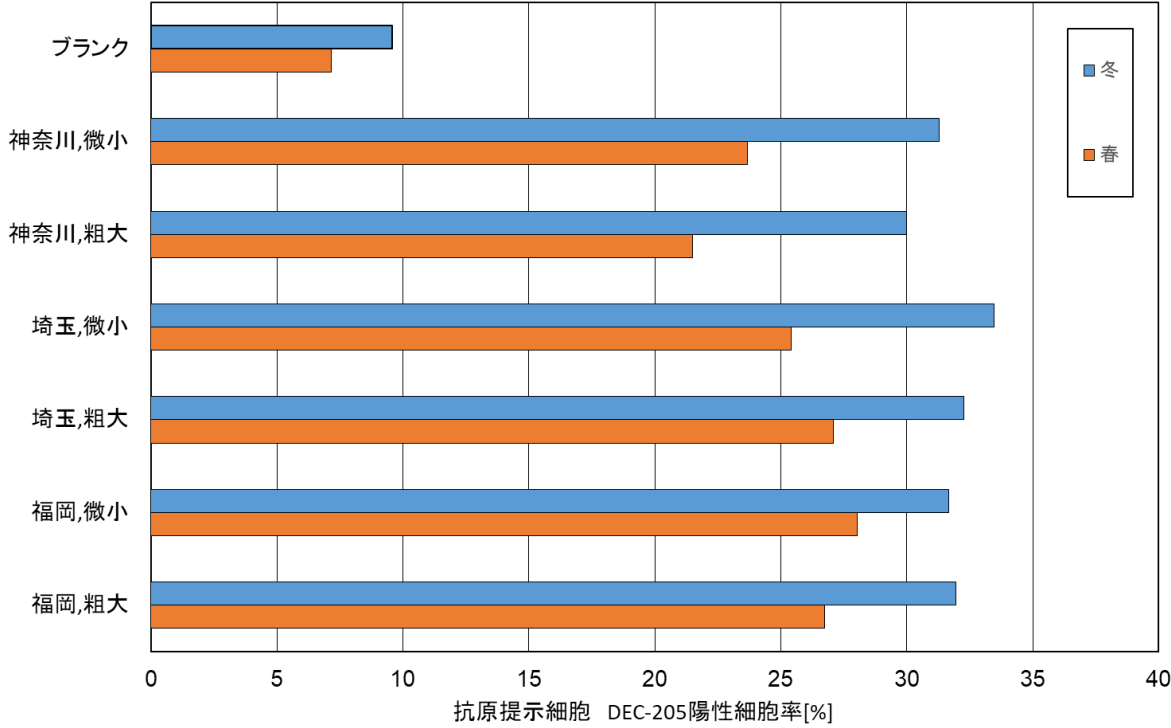
図(2)-8 粉体試料を抗原提示細胞に曝露した際のIL-6産生量



図(2)-9 粉体試料を抗原提示細胞に曝露した際のIL-1 β 産生量



図(2)-10 粉体試料を抗原提示細胞に曝露した際のTNF- α 産生量

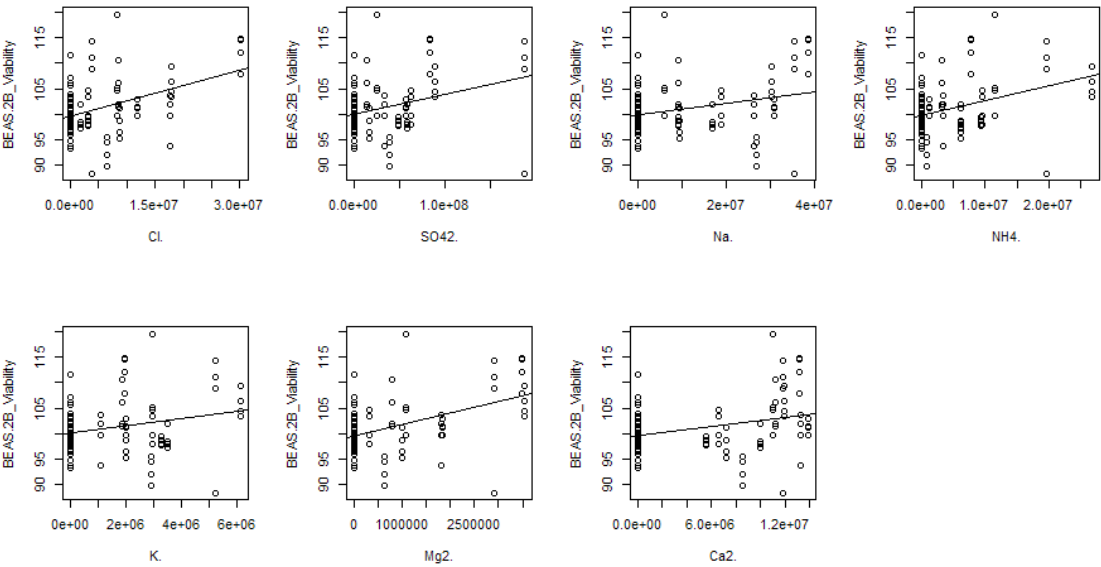


図(2)-11 粉体試料を抗原提示細胞に曝露した際のDEC-205陽性細胞率

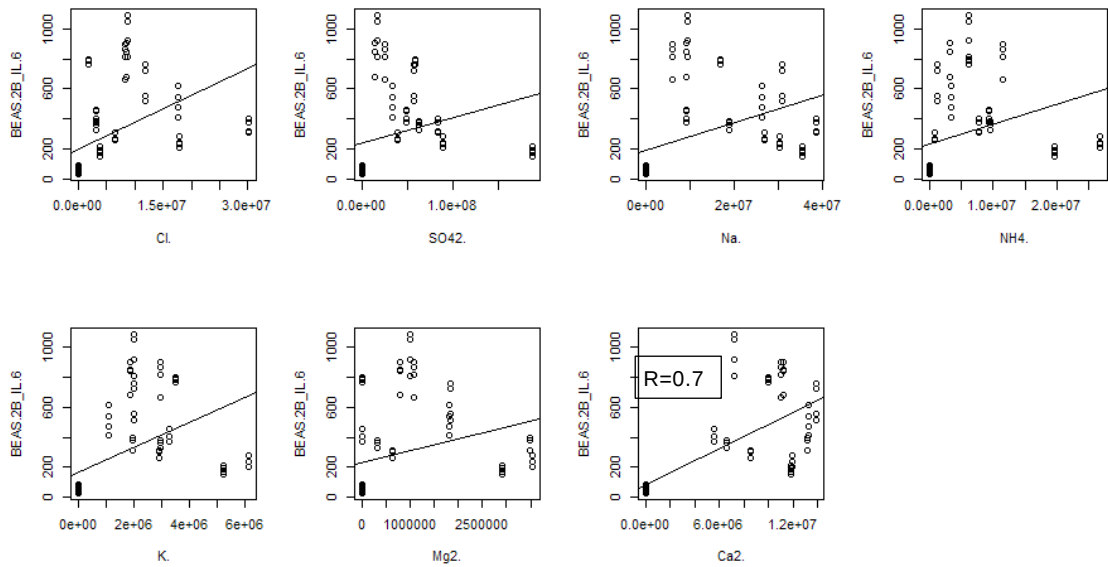
(6) 大気粒子中の化学的および生物的成分と細胞曝露影響評価指標の相関解析

粒子の成分データと各種細胞に及ぼす生体影響とを合わせてピアソンの相関解析を実施し、 $P < 0.01$ かつ相関係数 $R > 0.7$ の成分を、強い相関を持つ成分として抽出し、生体に影響を及ぼしうる化学成分あるいは生物成分の同定をめざした。なお本項の成果は、サブテーマ(1)と(2)の連携により得られたものである。

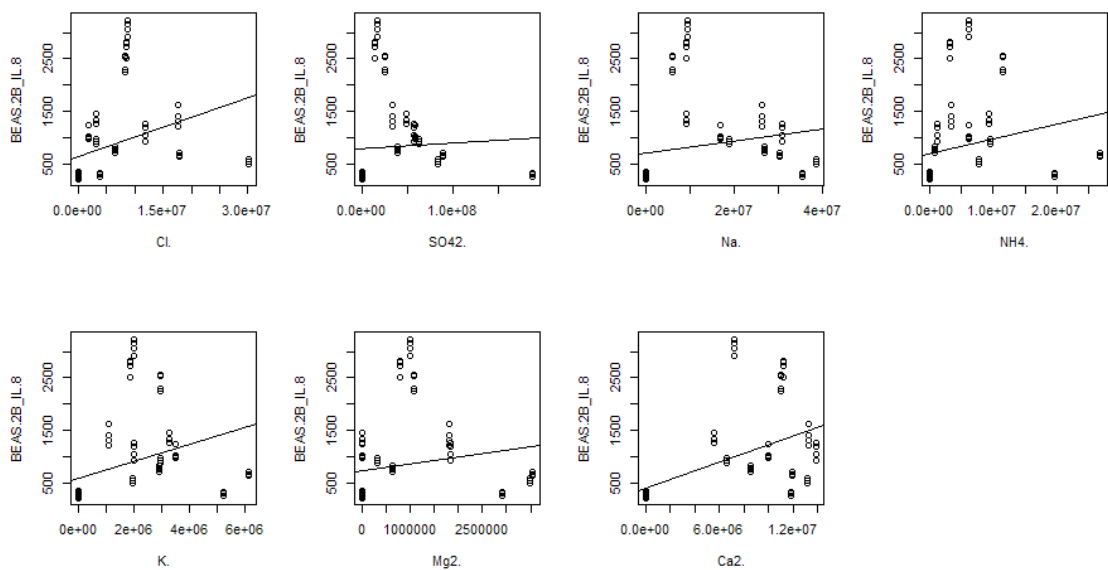
まず、水溶性イオン成分と気道上皮細胞への曝露結果との相関を図(2)-12, 13, 14に示す。気道上皮細胞への曝露結果と水溶性イオン成分で強い相関を示したのはIL-6の産生と Ca^{2+} のみであり($r=0.73$)、気道上皮細胞の生存率や炎症活性に水溶性イオン成分はあまり寄与していないと考えられる。



図(2)-12 粉体試料中の水溶性イオン成分と気道上皮細胞の生存率との相関

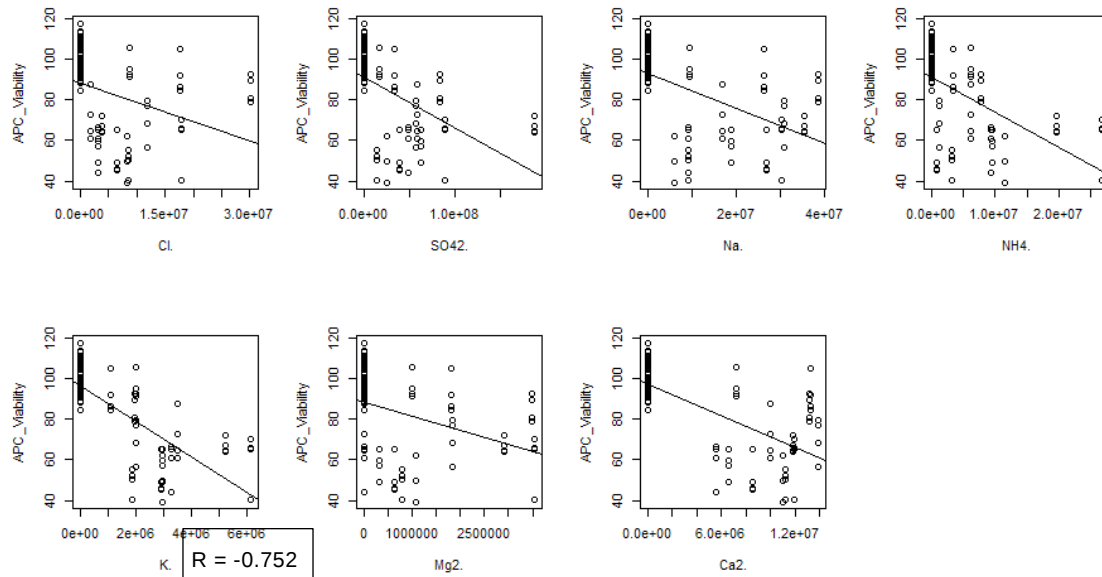


図(2)-13 粉体試料中の水溶性イオン成分と気道上皮細胞のIL-6産生との相関

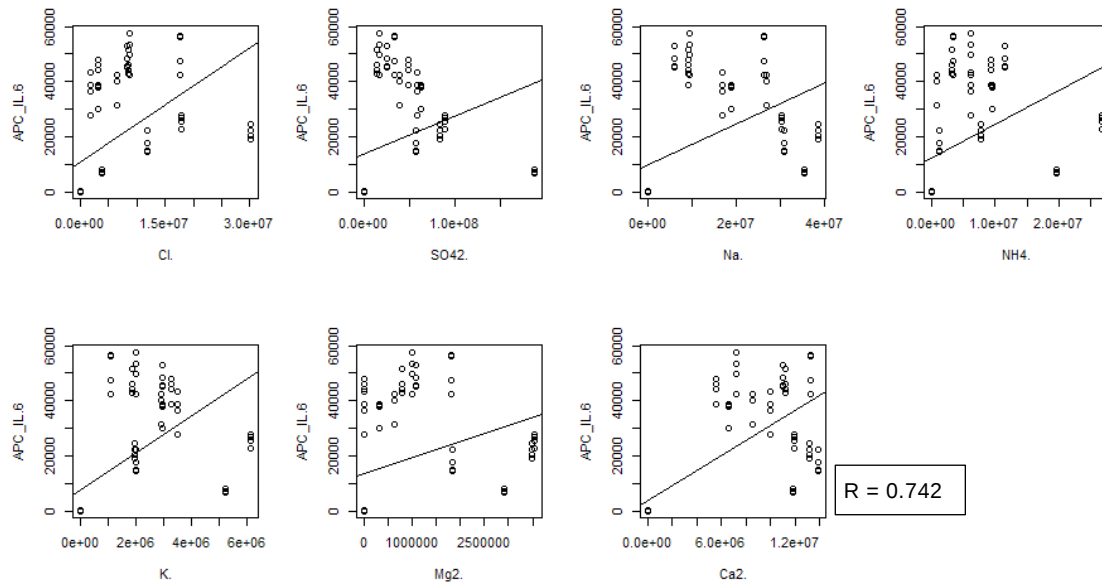


図(2)-14 粉体試料中の水溶性イオン成分と気道上皮細胞のIL-8産生との相関

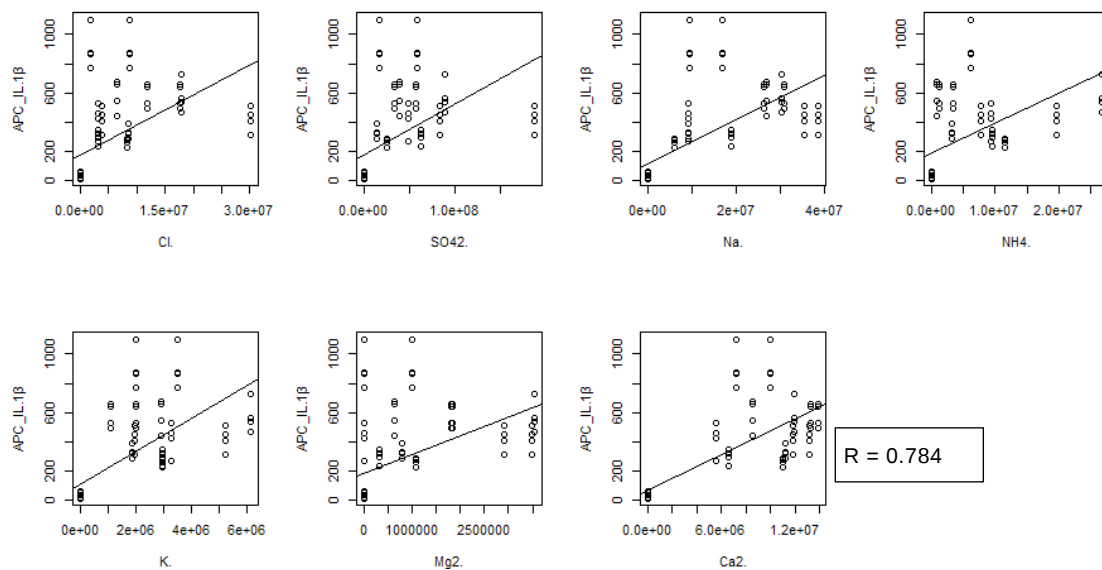
次に、水溶性イオン成分と抗原提示細胞への曝露結果との相関を図(2)-15～19に示す。その結果、生存率と K^+ に、IL-6産生と Ca^{2+} に、IL-1 β 産生と Ca^{2+} に、TNF- α 産生と Ca^{2+} に、DEC-205陽性細胞率と Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} に強い相関が認められた。



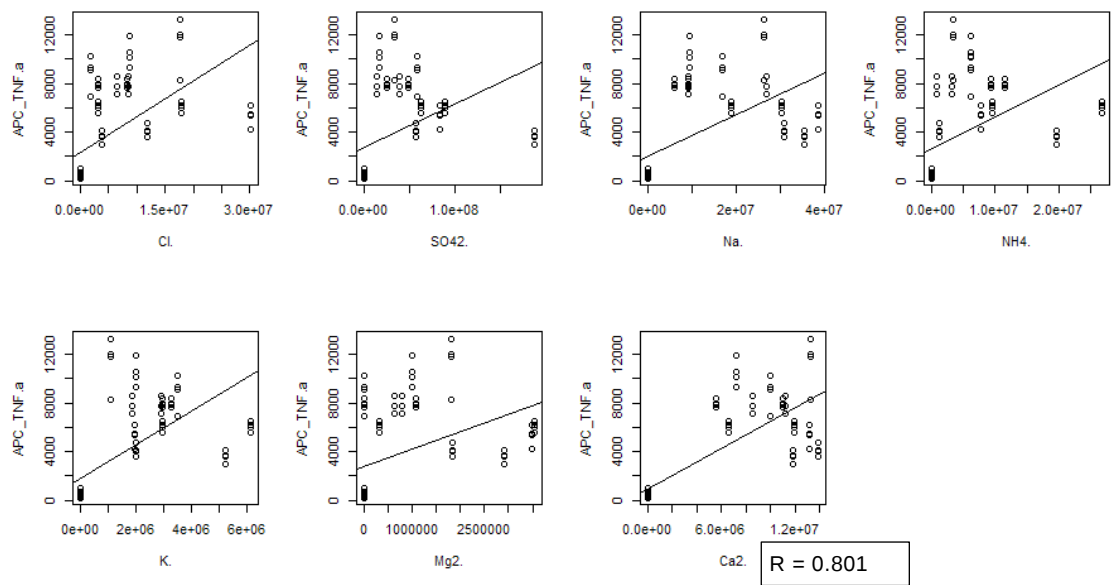
図(2)-15 粉体試料中の水溶性イオン成分と抗原提示細胞の生存率との相関



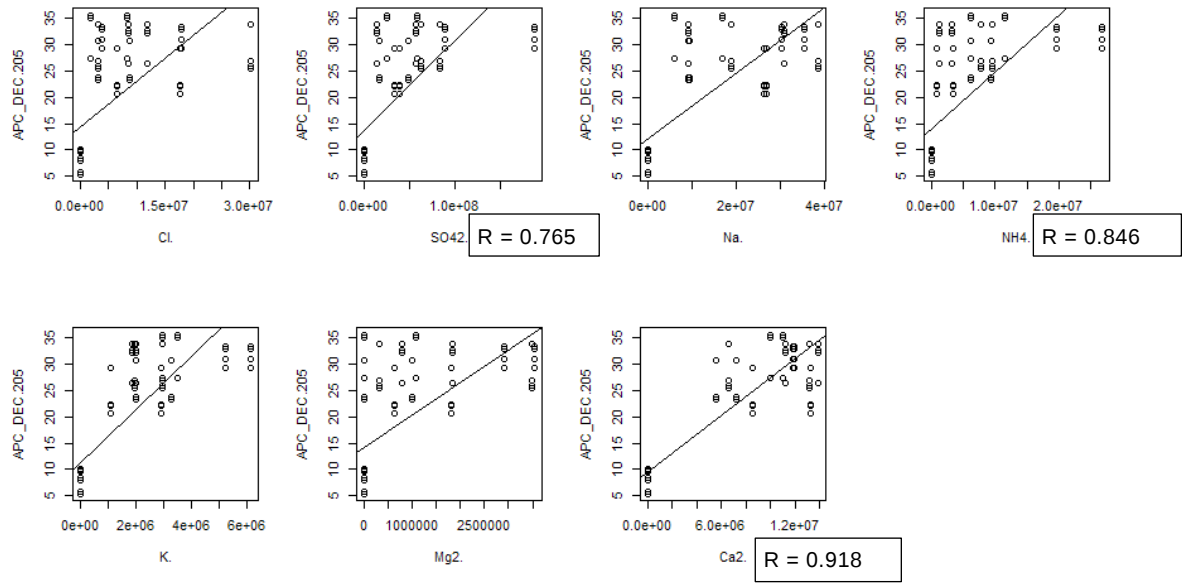
図(2)-16 粉体試料中の水溶性イオン成分と抗原提示細胞のIL-6産生との相関



図(2)-17 粉体試料中の水溶性イオン成分と抗原提示細胞のIL-1 β 産生との相関

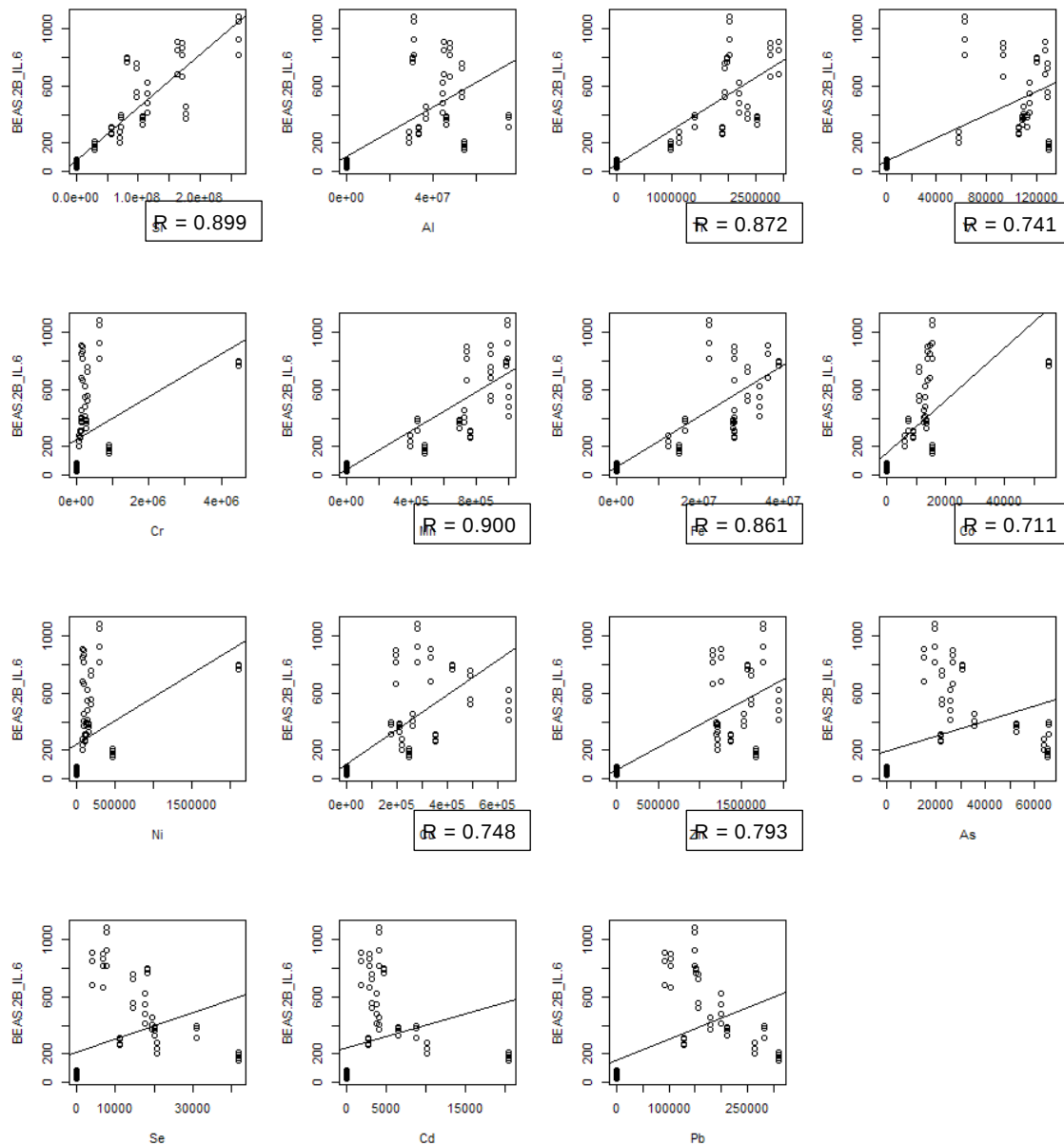


図(2)-18 粉体試料中の水溶性イオン成分と抗原提示細胞のTNF- α 産生との相関



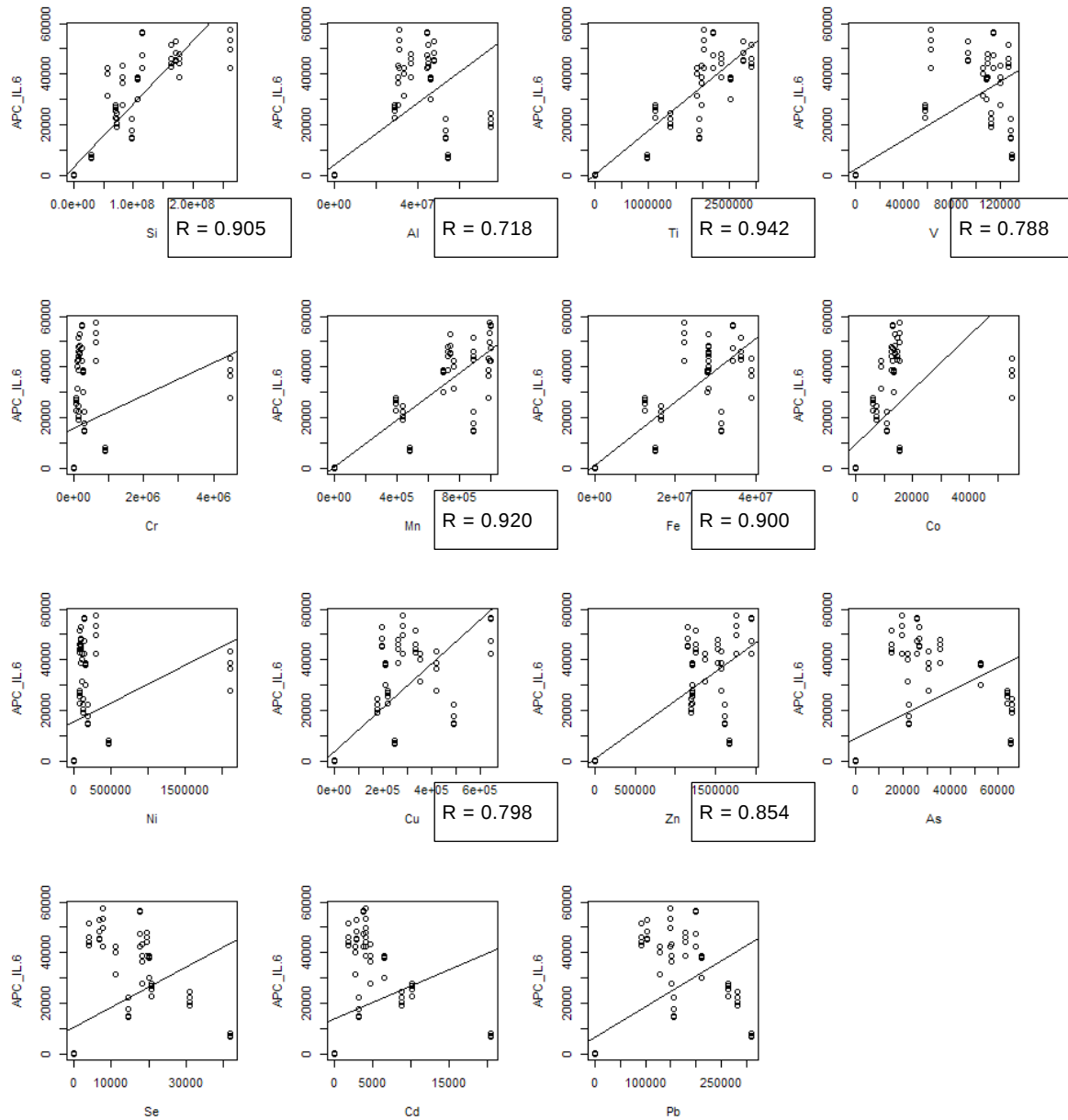
図(2)-19 粉体試料中の水溶性イオン成分と抗原提示細胞のDEC-205陽性細胞率との相関

次に、金属成分と気道上皮細胞への曝露結果との相関を図(2)-20に示す。ここではIL-6産生の結果のみ示す。金属成分と気道上皮細胞への曝露結果との間では、IL-6産生とSi、Ti、V、Mn、Fe、Co、Cu、Znに、またIL-8産生とSi、Ti、Mn、Feに強い相関が認められた。特にSiは $R = 0.935$ と非常に強い相関を示し、またSi、Ti、Feなど土壌由来と考えられる成分との相関がいずれも高かった。



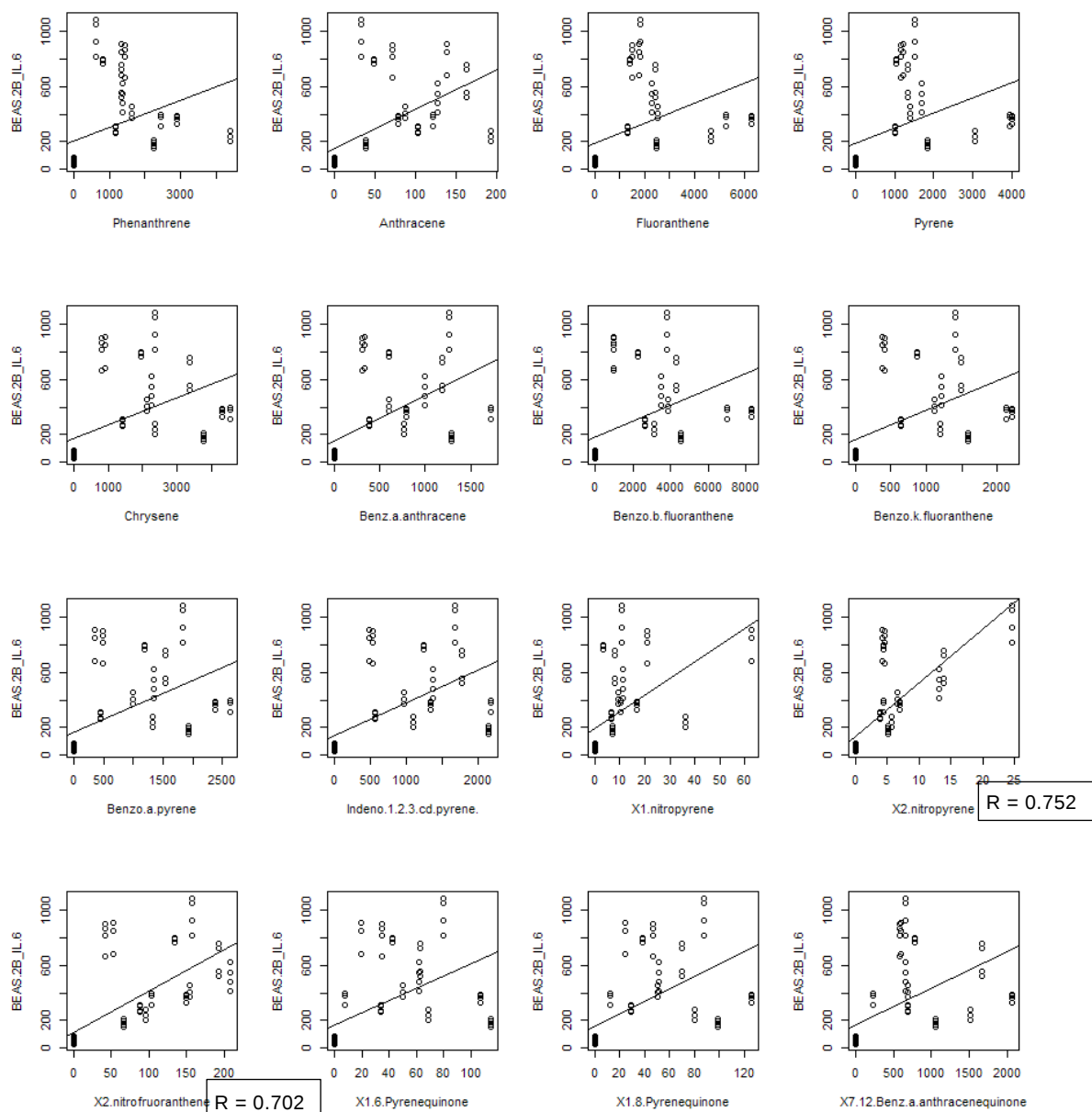
図(2)-20 粉体試料中の金属成分と気道上皮細胞のIL-6産生との相関

同様に、金属成分と抗原提示細胞への曝露結果との相関を図(2)-21に示す。ここではIL-6産生の結果のみ示す。金属成分と抗原提示細胞への曝露結果との間では、生存率とTi、V、Feに、IL-6産生とSi、Al、Ti、V、Mn、Fe、Cu、Znに、IL-1 β 産生とSi、Ti、V、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Pbに、TNF- α 産生とSi、Al、Ti、V、Mn、Fe、Cu、Znに、DEC-205陽性細胞率とSi、Al、Ti、V、Mn、Fe、Cu、Zn、As、Se、Pbに強い相関が認められた。特にSi、Ti、V、Mn、Fe、Znはいずれの影響とも非常に強い相関を示した。



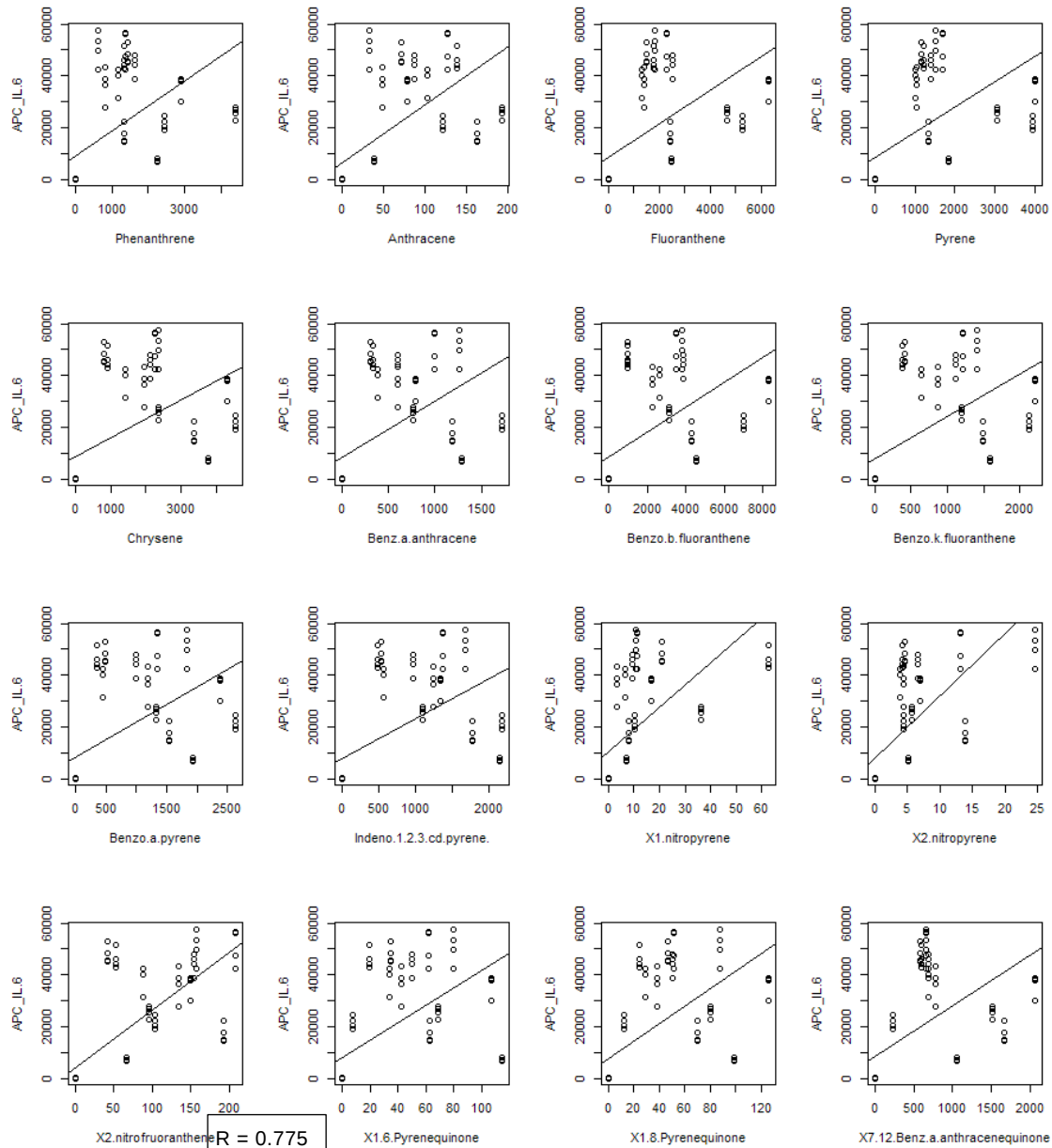
図(2)-21 粉体試料中の金属成分と抗原提示細胞のIL-6産生との相関

次に、PAHs成分と気道上皮細胞への曝露結果との相関を図(2)-22に示す。ここではIL-6産生の結果のみ示す。PAHs成分と気道上皮細胞への曝露結果との間では、IL-6産生と2-ニトロピレン、2-ニトロフルオランテンに、IL-8産生と2-ニトロピレンに強い相関が認められた。



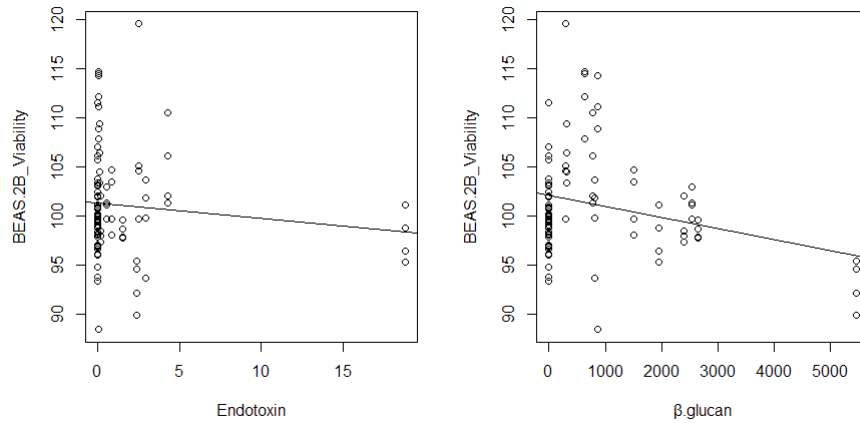
図(2)-22 粉体試料中のPAHs成分と気道上皮細胞のIL-6産生との相関

同様に、PAHs成分と抗原提示細胞への曝露結果との相関を図(2)-23に示す。ここではIL-6産生の結果のみ示す。PAHs成分と抗原提示細胞への曝露結果との間では、IL-6産生と2-ニトロピレンに、IL-1 β 産生とベンズ[a]アントラセン、ベンゾ[a]ピレン、インデノ[1,2,3-cd]ピレン、2-ニトロピレン、2-ニトロフルオランテンに、TNF- α 産生と2-ニトロピレン、2-ニトロフルオランテンに、DEC-205陽性細胞率とフェナントレン、アントラセン、フルオランテン、ピレン、クリセン、ベンズ[a]アントラセン、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[k]フルオランテン、ベンゾ[a]ピレン、インデノ[1,2,3-cd]ピレン、2-ニトロピレン、1,6-ピレンキノン、1,8-ピレンキノン、7,12-ベンズ[a]アントラセンキノンに強い相関が認められた。

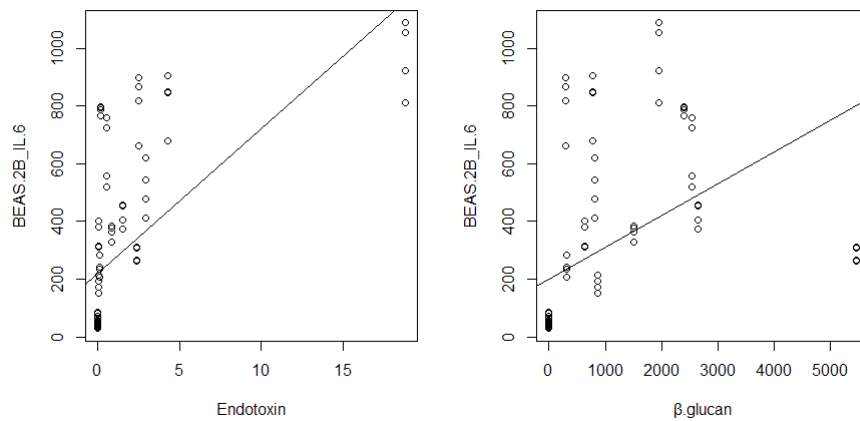


図(2)-23 粉体試料中のPAHs成分と抗原提示細胞のIL-6産生との相関

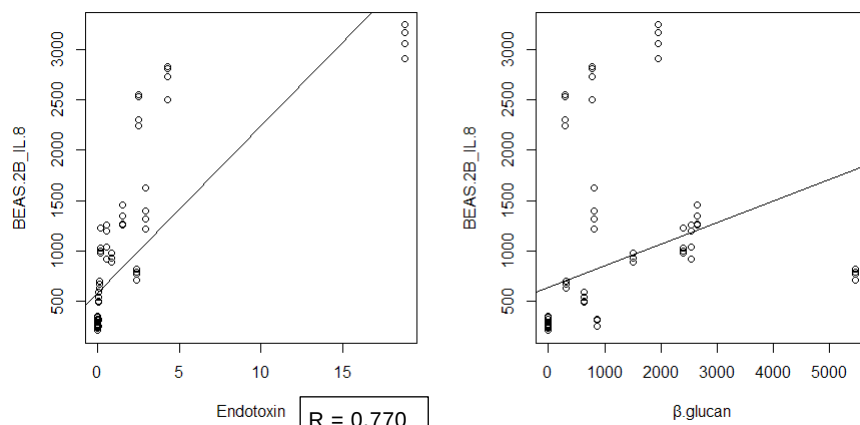
次に、生物由来成分と気道上皮細胞への曝露結果との相関を図(2)-24, 25, 26に示す。生物成分と気道上皮細胞への曝露結果の間では、IL-8産生とエンドトキシンに強い相関が認められた。



図(2)-24 粉体試料中の生物由来成分と気道上皮細胞の生存率との相関

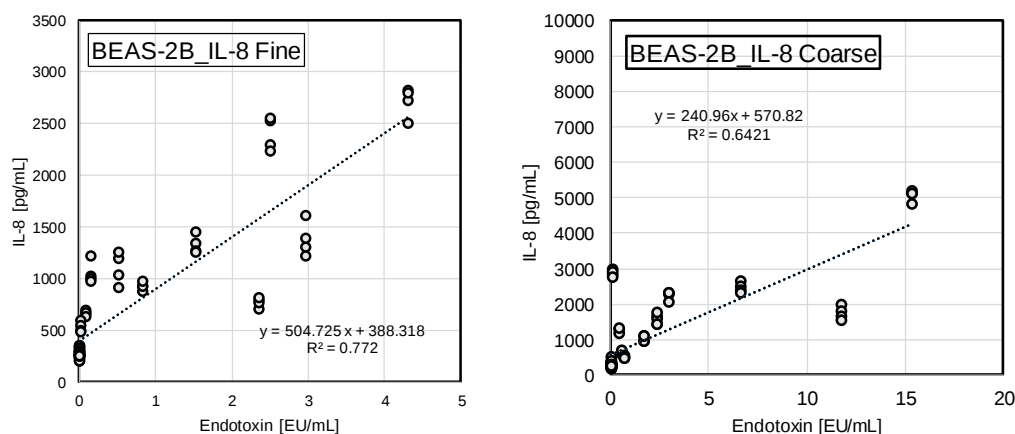


図(2)-25 粉体試料中の生物由来成分と気道上皮細胞のIL-6産生との相関



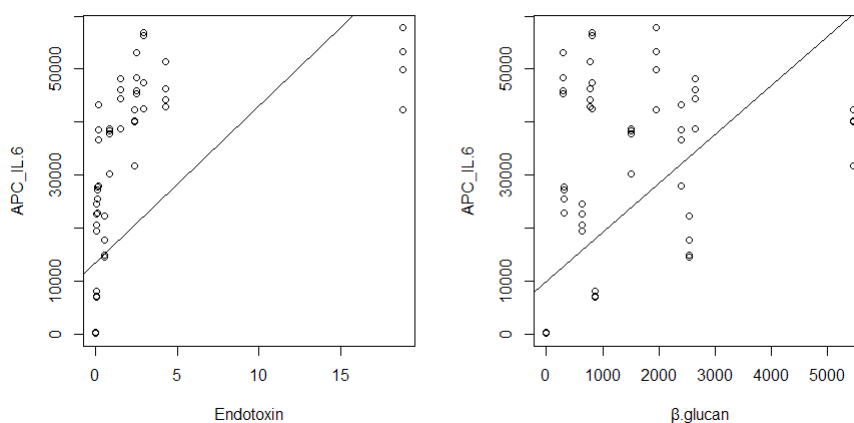
図(2)-26 粉体試料中の生物由来成分と気道上皮細胞のIL-8産生との相関

ここで、エンドトキシンが1点のみ飛び抜けて高かったことから、全体の相関がこの点に影響されている可能性がある。そこで、このエンドトキシンが高かったデータを削除した上で、改めて相関を取ったものが図(2)-27である。これより、外れ値を除外した場合においても、IL-8産生とエンドトキシンに強い相関が認められた。なお本項は、環境研究総合推進費平成30年度終了課題成果報告会における指摘事項への回答となっている。



図(2)-27 粉体試料中の生物由来成分と気道上皮細胞のIL-8産生との相関（外れ値を除外）

最後に、生物由来成分と抗原提示細胞への曝露結果との相関を図(2)-28に示す。ここではIL-6産生の結果のみ示す。生物由来成分と抗原提示細胞への曝露結果との間では、強い相関を示す生物由来成分は存在しなかった。



図(2)-28 粉体試料中の生物由来成分と抗原提示細胞のIL-6産生との相関

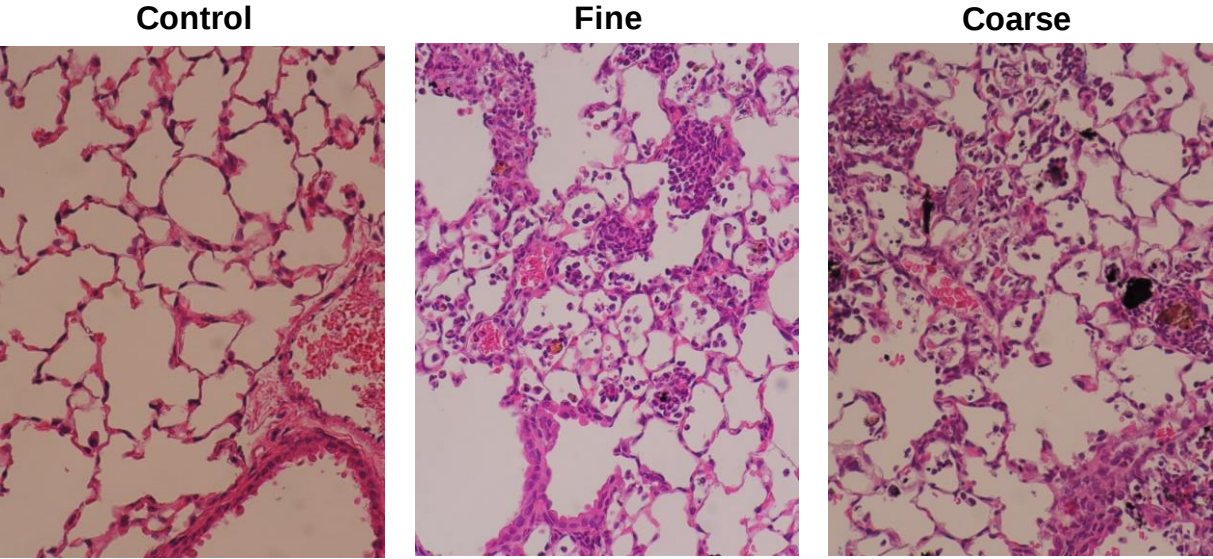
上述したこれらの化学的および生物的成分が呼吸器、免疫系に影響し、呼吸器疾患の悪化に寄与していることが示された。特に、土壌由来成分Siは、気道上皮細胞および抗原提示細胞のIL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α と強い相関を示したことから、気道に炎症を惹起させる可能性が高いことが考えられた。また、これまで、大気中粒子が、抗原提示細胞によりどのように認識され、その後の生体・免疫応答が活性化されるのか、十分に解明されていなかった。本検討結果から、生体・免疫応答の活性化には、抗原提示細胞のDEC205分子が重要であることが示唆されるとともに、認識されうる粒子成分を新たに示すことができた。

(7) 動物への粉体試料の曝露実験結果

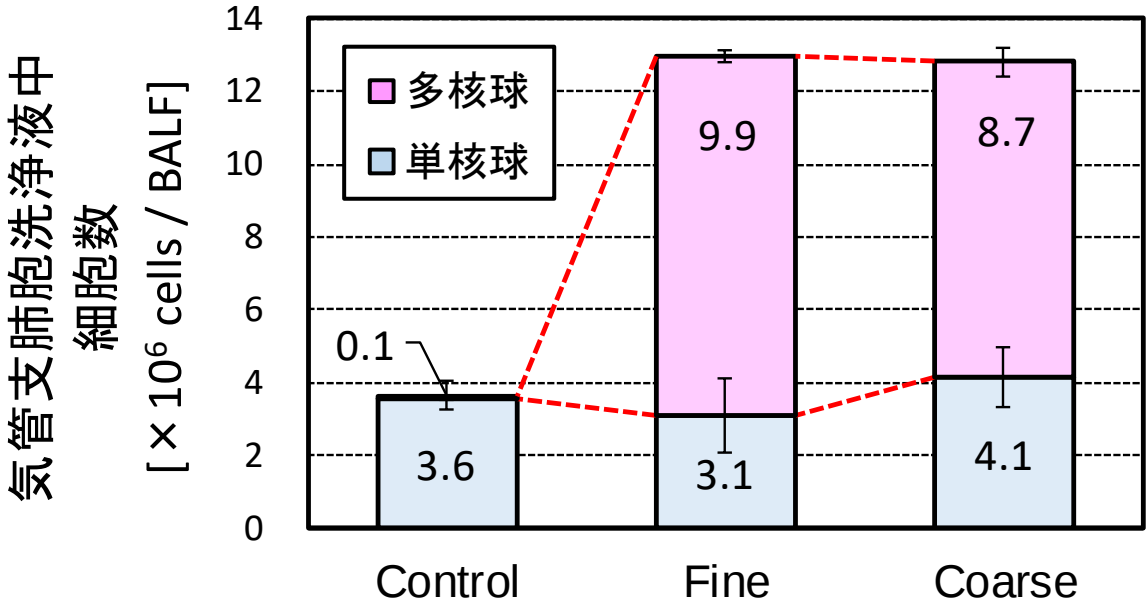
粒子曝露マウス肺の病理学的変化を観察したところ、微小粒子または粗大粒子の曝露によって、肺に炎症細胞の浸潤が認められた（図(2)-29）。これにより、微小および粗大粒子は、曝露により共にマウスの肺に炎症を誘導した。

次に、粒子曝露マウスBALF中の細胞数（単核球および多核球）を図(2)-30に示す。粒子を曝露した際に、BALF中の単核球細胞数には明確な増減は見られなかった一方で、多核球細胞数は有意に増加した。急性炎症時には、単核球ではなく、多核球である好中球が増加することが知られている。したがって、この多核球は、炎症時に組織に浸潤する好中球であると考えられる。これらのことから、微小および粗

大粒子は、共に、曝露によって肺に炎症を明確に誘導したと言える。このことは、大気粒子が、細胞レベルだけでなく生体レベルでも明確に炎症を誘導することを証明した重要な成果である。



図(2)-29 粒子曝露マウス肺の病理学的変化
(微小粒子または粗大粒子の曝露によって、肺に炎症細胞の浸潤が認められる)



図(2)-30 粒子曝露マウスBALF中の細胞数（単核球および多核球）
(微小粒子または粗大粒子の曝露によって、炎症の誘導を示す多核球の増加が顕著に認められる)

(8) 事前の計画・スケジュールに対する研究の進捗状況

初年度にPM2.5粒子の細胞曝露実験における影響評価指標の確立、二年目には前年度に引き続き細胞曝露実験の実施とPM2.5粒子の健康影響決定要因の絞り込み、三年目は細胞曝露実験の継続と動物曝露実験の実施、およびサブテーマ(1)の結果と合わせた粒子の化学成分と曝露影響評価指標間の統計解析を行うスケジュールを、ほぼ事前の計画通りに達成することができた。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- (a) サイクロンを用いた新規採取法で採取したサンプルは、超音波処理することにより均一に分散し、かつ、微小粒子、粗大粒子として矛盾しないものであることを世界で初めて示すことができた。
- (b) フィルターを用いた従来法では、抽出操作後の成分（全体のおよそ7割程度）の曝露影響の評価のみにとどまり、かつ、サンプルの抽出効率の違いによる不確実要因も存在した。一方、本法では、実環境に存在する粒子そのもの（粒子全体）を曝露し、その影響を見ることが初めて可能となった。すなわち、抽出操作なしに、一般環境粒子そのものの曝露影響を簡便に評価することが初めて可能となった。
- (c) 本法で回収した粒子そのものは、従来法（フィルター）で採取した粒子の抽出物と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。また、本法で回収した粒子そのものを曝露した場合は、同一の粒子そのものの抽出物を曝露した場合と比較して、多くの評価項目において顕著に強い影響を示した。すなわち、PM2.5等の粒子状物質の健康影響を考える上で、粒子をフィルター採取し抽出物曝露する従来法では、十分な健康影響評価ができていない可能性が示された。
- (d) 新規採取法で採取したサンプルは、微小粒子、粗大粒子ともに、抗原提示細胞を強く活性化すること、概して、リファレンス粒子より影響が大きいことを世界で初めて明らかにした。また、実大気環境中の粒子全体を曝露することで、影響が明確になる傾向も初めて見出した。
- (e) 新規採取法で採取した粒子による細胞曝露影響は、粒子の採取地域により明確に異なっていた。具体的には、福岡で採取された粒子の細胞曝露影響は、多くの場合で横浜および埼玉のものとは異なっていた。これは、粒子の曝露影響評価を行う際に、地域差を考慮する必要性を示すものである。
- (f) 新規採取法では抽出操作が不要であり、曝露実験時のハンドリング性が飛躍的に向上した。これにより、粒子状物質の健康影響評価を短期間で迅速に行うことが可能となった。その結果、多くの健康影響データを用いて成分と影響の相関解析を実施することが科学的に可能となり、正確な健康影響決定要因の同定に繋がりうる。
- (g) 粒子中の特定の化学成分と細胞曝露影響評価指標が密接に関与し、これらの成分が呼吸器疾患の悪化の規定要因になり得ることが示された。
- (h) これまで、大気中粒子が、抗原提示細胞によりどのように認識され、その後の生体・免疫応答が活性化されるのか、十分に解明されていなかった。本検討結果から、生体・免疫応答の活性化には、抗原提示細胞のDEC205分子が重要であることが示唆されるとともに、認識されうる粒子成分を新たに示すことができた。
- (i) 細胞曝露実験のみならず、動物曝露実験の結果、微小および粗大粒子共に、マウスの肺に炎症を誘導した。このことは、大気粒子が、細胞レベルだけでなく生体レベルでも明確に炎症を誘導することを証明した重要な成果である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

平成31年3月の中央環境審議会大気・騒音振動部会微小粒子状物質等専門委員会（第9回）において、本研究成果である、大気粒子そのものを直接細胞や動物に曝露可能な手法とその実験結果を提示し、PM2.5に関する近年の科学的知見を示す資料の一つとして活用された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- (a) 本研究における粒子状物質の呼吸器へ曝露影響評価の範囲では、PM2.5と粗大粒子ではそれぞれ細胞曝露実験の結果が異なる場合が多く、PM2.5よりも粗大粒子の方がより影響が強い場合も散見された。このことは、粒子状物質の健康影響を考える上ではPM2.5のみならず粗大側の粒子にも着目する必要があるものであり、今後の環境政策の方向性を検討する際の示唆が得られると言える。
- (b) 粒子の一部ではなく、粒子全体を用いた曝露・影響評価が可能となったこと、抽出操作等が不要に

なりハンドリング性が向上したことは、粒子状物質の健康影響評価を正確かつ効率的に行うために、非常に重要な成果であると考えられる。

- (c) PM2.5に代表される浮遊粒子状物質の健康影響評価を進める上では、従来法であるフィルター法を用いている限り、十分な量の試料確保と採取中のアーティファクトが大きな障壁であったが、本研究で用いるサイクロン方式の新規採取装置により、従来法と比較して約数十倍の試料量確保が可能となったことで、細胞曝露実験がより効率的に行えるようになることが期待できる。
- (d) 粒子中の特定の化学成分と細胞曝露影響評価指標が密接に関連し、これらの成分が呼吸器疾患の悪化の規定要因になり得ることが示されたことで、成分組成の相違に着目した我が国におけるPM2.5の呼吸器系等へのリスクに係る研究が推進され、将来的なPM2.5対策に反映されることが期待できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Onishi, T., Honda, A., Tanaka, M., Chowdhury, P.H., Okano, H., Okuda, T., Shishido, D., Terui, Y., Hasegawa, S., Kameda, T., Tohno, S., Hayashi, M., Nishita-Hara, C., Hara, K., Inoue, K., Yasuda, M., Hirano, S., Takano, H. (2018) Ambient fine and coarse particles in Japan affect nasal and bronchial epithelial cells differently and elicit varying immune response, *Environmental Pollution*, 242, 1693-1701.

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 高野裕久、本田晶子（2016）PM2.5健康影響評価研究の現状と展望、第57回大気環境学会年会、北海道大学、札幌市、2016年9月7日
- 2) 本田晶子、高野裕久（2017）浮遊粒子状物質の呼吸器疾患悪化作用、2017年度生命科学系学会合同年次大会（第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会）、大阪大学および横浜市立大学、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市、2017年12月8日
- 3) 田中満崇、大西俊範、本田晶子、Pratiti H Chowdhury、岡野人士、奥田知明、長谷川就一、亀田貴之、東野達、林政彦、西田千春、原圭一郎、井上浩三、高野裕久（2018）実環境中の微小および粗大粒子が呼吸器、免疫系に及ぼす影響と影響規定成分の特定、第25回免疫毒性学会、第74回日本産業衛生学会アレルギー免疫毒性研究会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、2018年9月18日

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 中央環境審議会大気環境部会 (2009) 微小粒子状物質環境基準専門委員会報告
- 2) 日本環境衛生センター (2014) 微小粒子状物質等大気汚染物質に係る毒性学調査研究業務報告書 (平成25年度)
- 3) 環境省 (2007) 微小粒子状物質曝露影響調査報告書
- 4) Ren, Y., Ichinose, T., He, M., Song, Y., Yoshida, Y., Yoshida, S., Nishikawa, M., Takano, H., Sun, G., Shibamoto, T. (2014) Enhancement of OVA-induced murine lung eosinophilia by co-exposure to contamination levels of LPS in Asian sand dust and heated dust. Allergy Asthma Clin. Immunol. 2014 Jun 9;10(1):30. doi: 10.1186/1710-1492-10-30

III. 英文Abstract

Identification of the Factors Responsible for the Health Effects of PM_{2.5} by Newly Developed Sampling Methods and Exposure Experiments

Principal Investigator: Tomoaki OKUDA

Institution: Keio University
 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-City, Kanagawa
 223-8522, JAPAN
 Tel: +81-45-566-1578 / Fax: +81-45-566-1578
 E-mail: okuda@applc.keio.ac.jp

Cooperated by: Kyoto University, Center for Environmental Science in Saitama, Fukuoka University

[Abstract]

Key Words: PM_{2.5}, Health effect, Ambient aerosol, Chemical composition, Exposure study, Cyclone, Cell exposure, Animal exposure, Inflammation activity, Immune response

Exposure to atmospheric aerosols is a serious concern for human health. However, detailed mechanisms of the cellular biochemical reactions associated with the toxicity of aerosol particles have not been elucidated well so far. Generally, cell exposure studies for aerosol particles have been conducted using particulate matter collected by vibrating aerosol-loaded filters. However, the particles used for the exposure study may not be the same as those present in ambient air. Possible contamination from the filter material should also be considered. In addition, sample handling to obtain particles for exposure experiments is highly complicated and time-consuming. Besides, the amount of particles that are collected on a filter is often insufficient to perform an exposure studies. Hence, the development of techniques that allow researchers to collect a sufficient amount of aerosol particles for exposure studies without the use of filters is needed. In this study, a high-volume simultaneous sampler for fine and coarse aerosol particles was developed using the impactor and cyclone techniques. Approximately 100-200 mg of fine and coarse aerosol particles can be collected individually as powder form for 3-4 week sampling. The sampling device developed in this study allows researchers to collect a sufficient amount of aerosol particles for cell exposure studies without the use of filters. We collected fine and coarse aerosol particles in three cities (Yokohama, Saitama, and Fukuoka) in Japan under the CYCLEX (Cyclone collection of PM_{2.5} followed by Exposure Experiments) project. Chemical analysis of the collected particles has been carried out for carbonaceous materials (EC and OC), water-soluble ionic species, metals, and polycyclic aromatic compounds, and then followed by cellular exposure experiment. Chemical compositions of collected aerosol particles were similar for Saitama and Yokohama, but different for Fukuoka. We found particle size- and sampling location-dependent response in the results of exposure experiments. Both fine and coarse particles collected at all locations decreased the viability of nasal epithelial cells and antigen presenting cells (APCs), increased the production of IL-6, IL-8, and IL-1 β from bronchial epithelial cells and APCs, and induced expression of dendritic and epithelial cell (DEC) 205 on APCs. Several chemical components showed significant correlations to inflammatory responses or cytotoxicity. These results suggest that ambient fine and coarse particles differently affect

upper and lower respiratory tract and immune response, which may depend on their diameter, the components, and other parameters caused by the difference in collection location.