【5-1651】H28-30年度
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

CYCLEX
CYCLone collection of PM2.5 followed by EXposure experiments

◎研究代表者：奥田知明（慶應大理工）
○研究分担者：高野裕久（京大院都市環境工）

研究実施期間：2016/6/1-2019/3/31　　累積予算額：94,754,935円

粒子状物質に関する疫学的報告

粒子濃度と相関が報告されている健康影響

1）全死亡率、慢性閉塞性肺疾患、心疾患による死亡率
2）高齢者の全死亡率、心肺疾患による死亡率、呼吸器疾患による救急受診数、脳血管障害に基づく入院数
3）小児の死亡率、呼吸器疾患による死亡率、突然死数、呼吸器疾患による救急受診数
4）アレルギー素因を持つ小児の呼吸器症状
5）喘息の症状、病態（薬剤の使用や検査値の増悪）
6）上気道感染症、気管支炎、喘息による受診数

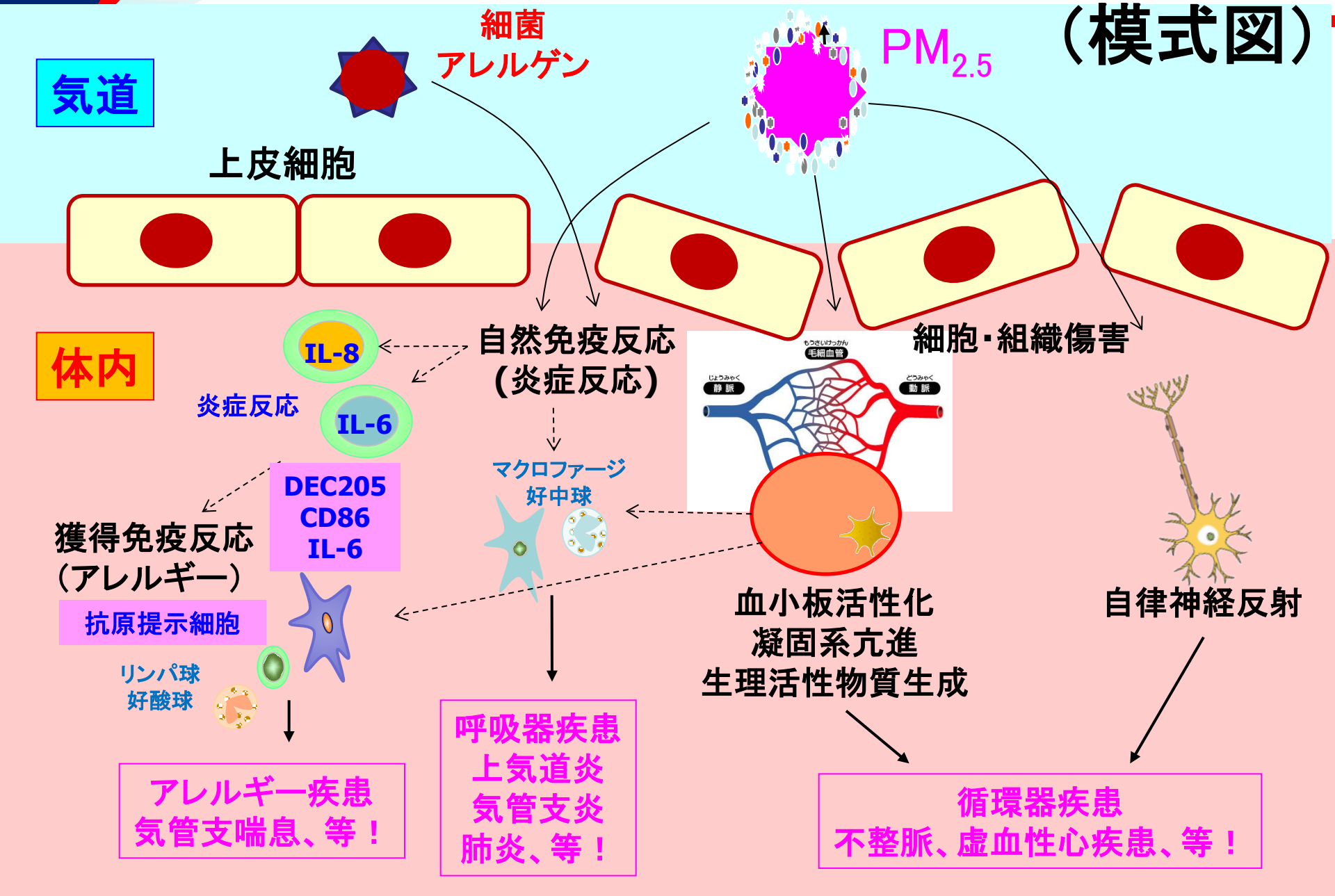
PM2.5による呼吸器系影響の想定メカニズム

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うる。

3) 呼吸器感染の感受性を増加する。

PM2.5による健康影響の想定メカニズム（模式図）



PM2.5採取における従来法の問題点

フィルター法（従来法）による粒子状物質採取では、以下のような理由のため、生体影響評価実験へ応用することが難しかった

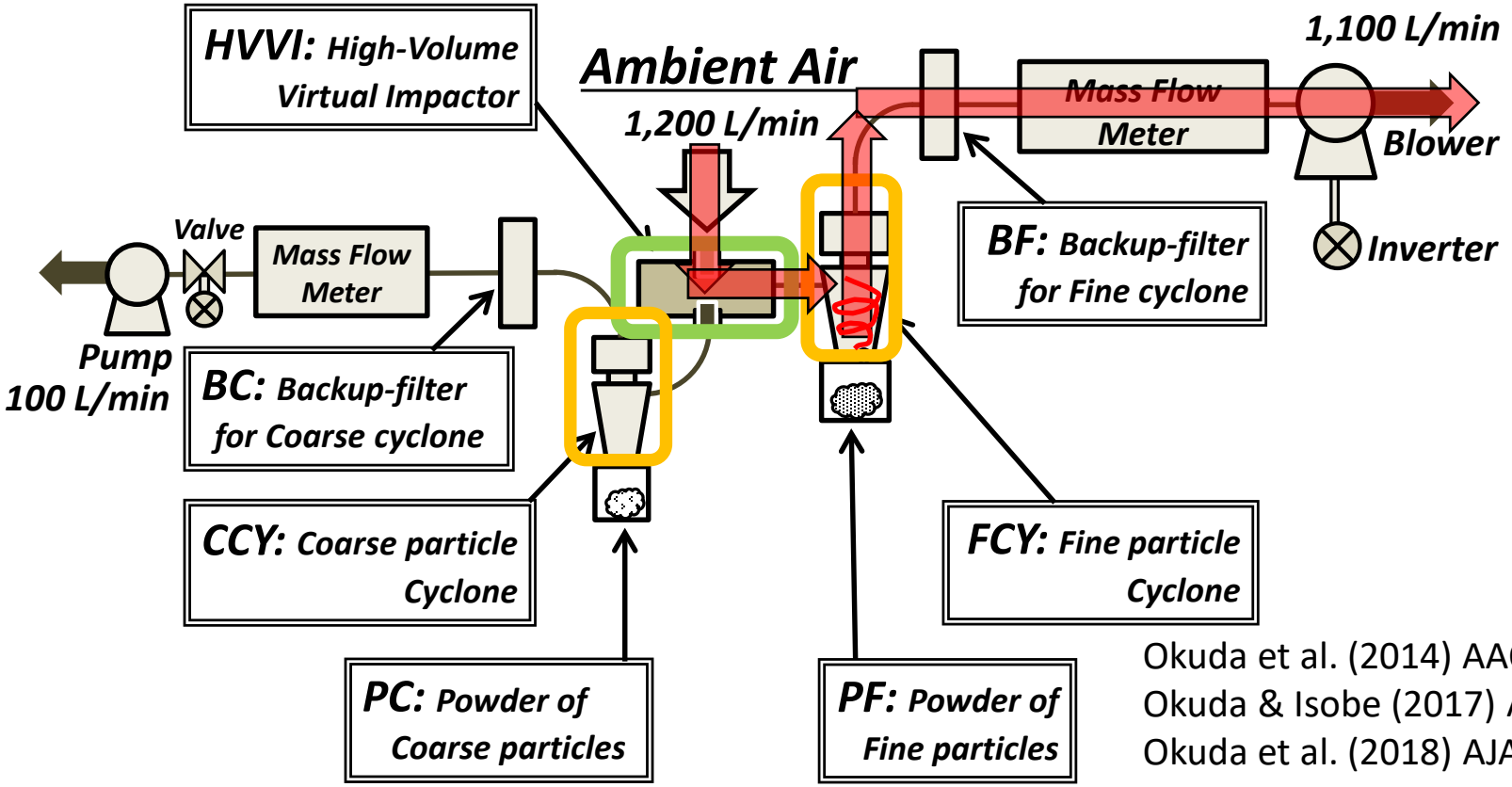
(1) 生体影響評価に必要な数十mg以上の粒子を「**粉体**」として取り出すことが困難

(2) 抽出物の曝露では「**粒子そのもの**」の影響を見ることが不可能

(3) フィルター素材による結果への影響

サイクロンによる大気粒子の採取

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と粗大粒子の大流量同時採取装置

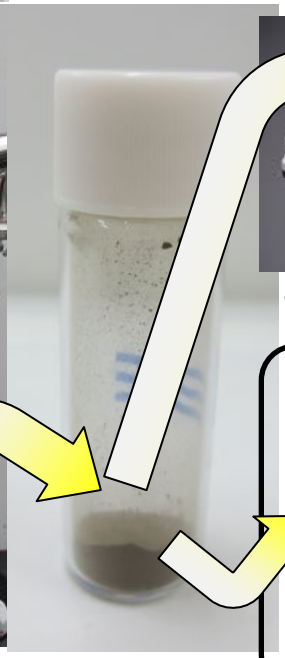


Okuda et al. (2014) AAQR
Okuda & Isobe (2017) AJAE
Okuda et al. (2018) AJAE

バーチャルインパクターでPM2.5と粗大粒子に分離
下流に設置されたそれぞれのサイクロンで粉体として捕集

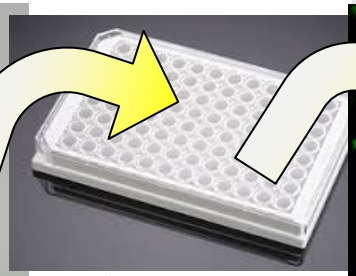
試料採取地点と実施内容

サイクロン式大流量
PM2.5新規採取装置
（福岡大・慶應大・
埼玉県に設置）

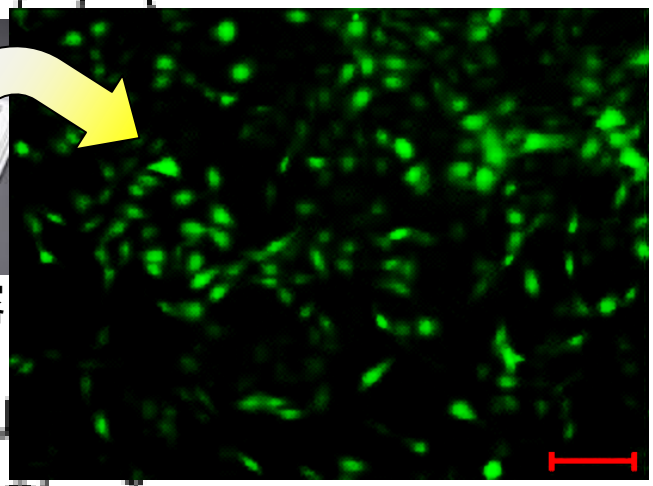


得られた
PM2.5粉体試料

化学分析
（慶應大・
京都大・
埼玉県
にて実施）



細胞・動物曝露



曝露影響評価
（京都大にて実施）

埼玉：郊外
国内二次生成

横浜：首都圏・大都市
国内一次発生源

福岡：大都市・越境影響
国外起源越境汚染寄与推算

研究開発目的と意義

PM2.5粒子そのものを用いて、健康影響を決定する真の要因や化学成分を同定する

(1) PM2.5粒子をアーティファクトなく大量に採取可能な新規手法の確立

(2) 発生源や化学性状が異なる複数地点で採取したPM2.5試料の包括的な成分解析

(3) PM2.5粒子そのものの細胞・動物への曝露影響評価

化学成分と影響評価指標の相関解析による健康影響決定要因の同定

- 本研究は、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の推進という行政ニーズに、正に合致するものであり、本研究の成果を我が国における将来的なPM2.5対策に反映させることが期待できる

研究体制とサブテーマ分担

【研究代表者】 ◎奥田知明（慶應大・理工）

サブテーマ（1） ◎奥田知明（慶應大・理工）（研究代表者）

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

－大流量PM2.5新規採取装置の製作・設置、元素分析

－PAHとその誘導体分析→再委託先：東野達、亀田貴之（京大・エネ科）

－二次生成化合物分析→再委託先：長谷川就一（埼玉県環科国際セ）

PM2.5粉体試料の採取と提供
化学分析結果の提供

曝露実験結果の
フィードバック

化学成分と曝露
影響評価指標間
の相関解析

サブテーマ（2） ○高野裕久（京大・工）（研究分担者）

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

－PM2.5高感受性群（呼吸器・免疫系）を対象とする細胞・動物曝露実験

主な結果(1):粉体採取と化学成分

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
	神奈川	2017/05/10~06/06	26.7	51,614	238	267
CYCLEX-3	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
	神奈川	2017/07/14~08/07	23.6	47,068	115	105
CYCLEX-4	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
	神奈川	2017/10/18~11/16	29.0	56,424	173	75
CYCLEX-5	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
	神奈川	2018/01/16~02/09	23.0	47,299	334	76
CYCLEX-6	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
	神奈川	2018/05/15~06/05	20.0	39,771	308	281
CYCLEX-7	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

予備実験用サンプル

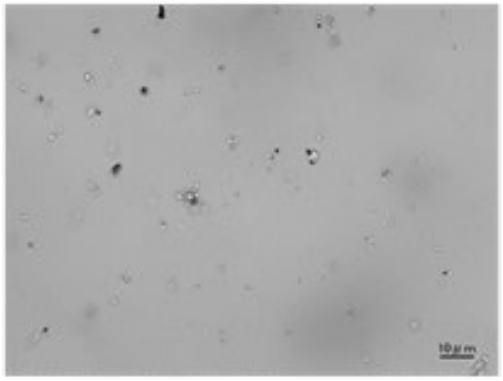
重点検討サンプル
・粉体vs抽出曝露
・粉体vsフィルター
・動物曝露

本実験サンプル
・化学成分
・細胞曝露

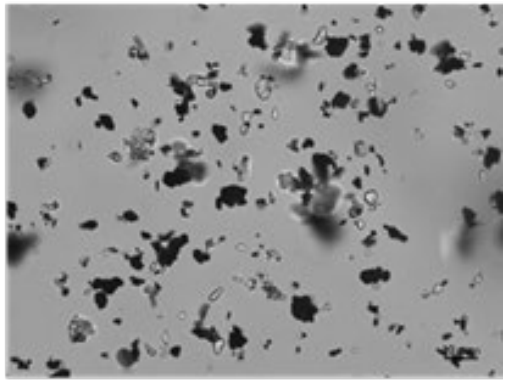
追加検討用サンプル

主な結果(1):粉体採取と化学成分

A



"Fine particle (PM2.5)"



"Coarse particle"

B

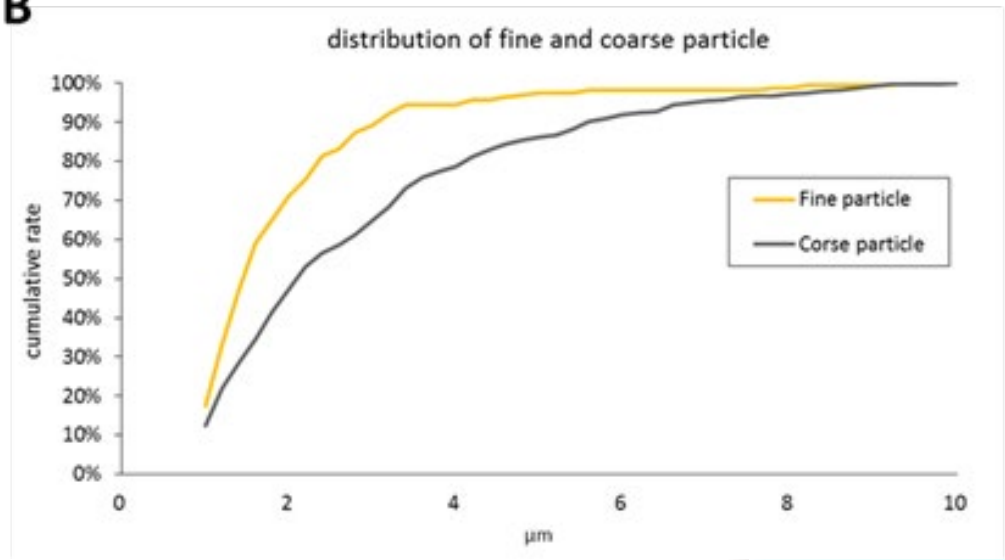
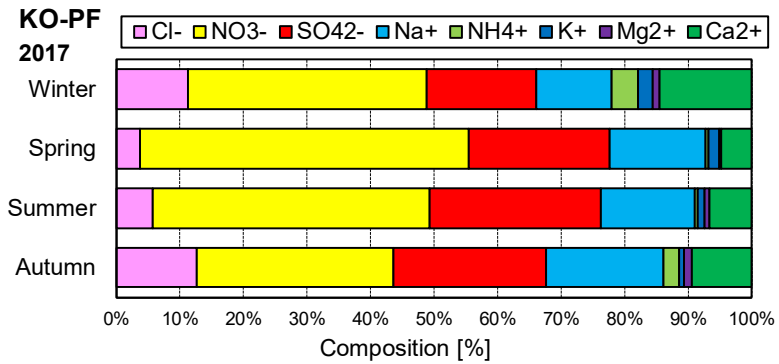


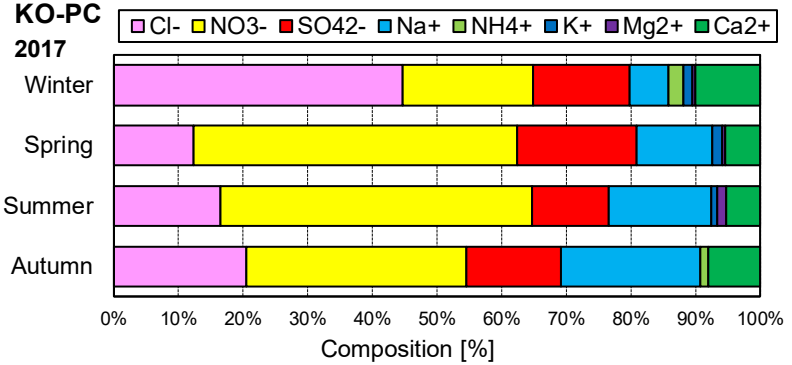
Figure S2. (A) Morphology of fine particle (left) and coarse particle (right) and (B) size distribution of particles collected by cyclone. Particles were observed with a microscope (BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan) equipped with 1000 × magnification. The particle size was analyzed with software BZ-II Analyzer and BZ-HIC Dynamic cell count (Keyence). The particles less than 1 μm or larger than 10 μm were excluded due to limits of optical resolutions.

Onishi *et al.* (2018) *Environ. Pollut. B,* **242**, 1693-1701

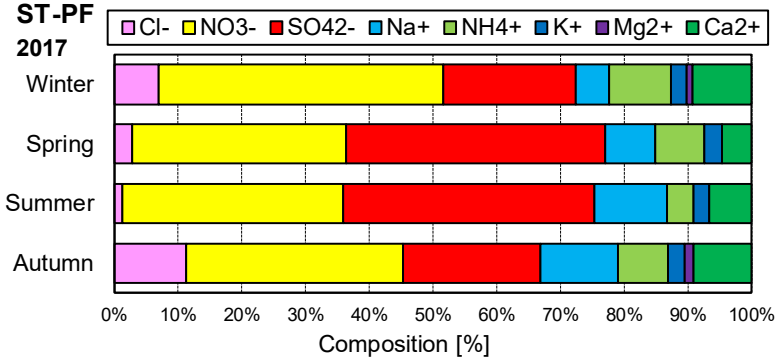
地点・季節毎の水溶性イオン成分組成

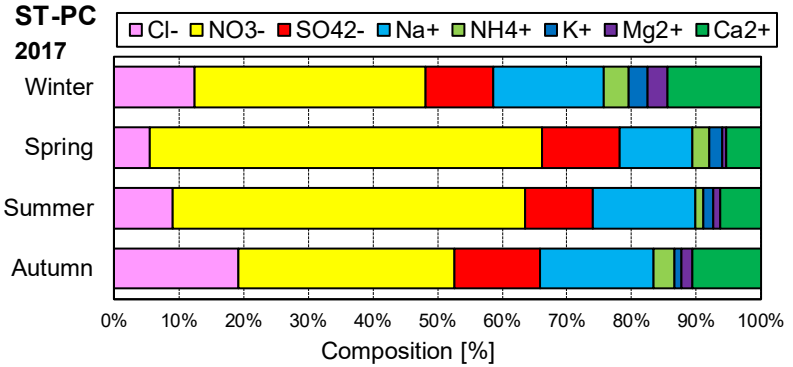
横浜



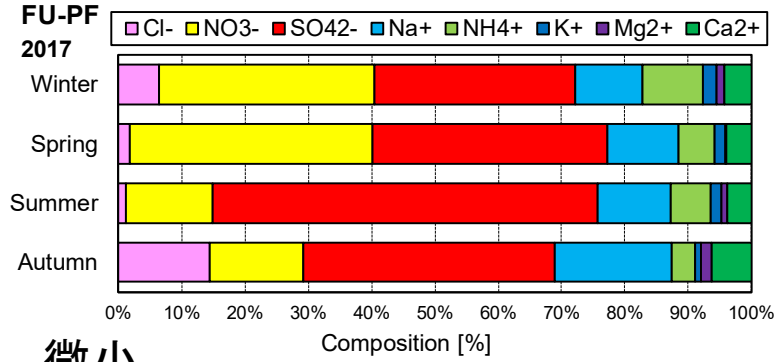


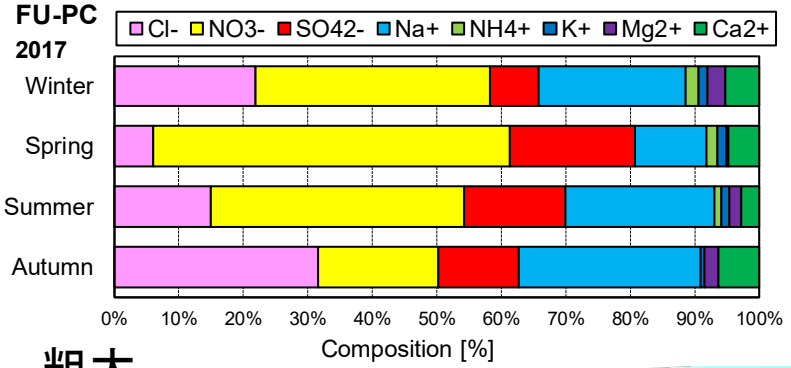
埼玉





福岡



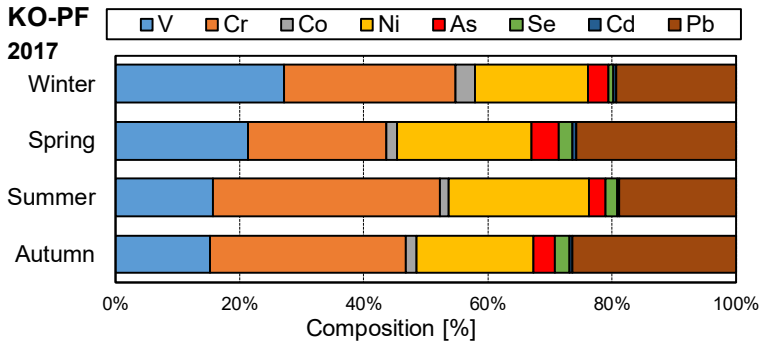


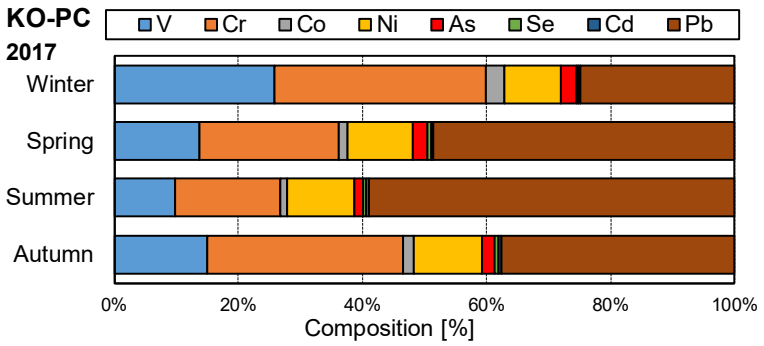
微小

粗大

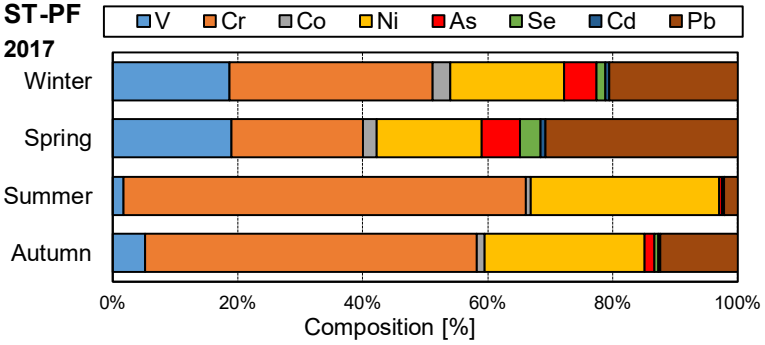
地点･季節毎の微量金属成分組成

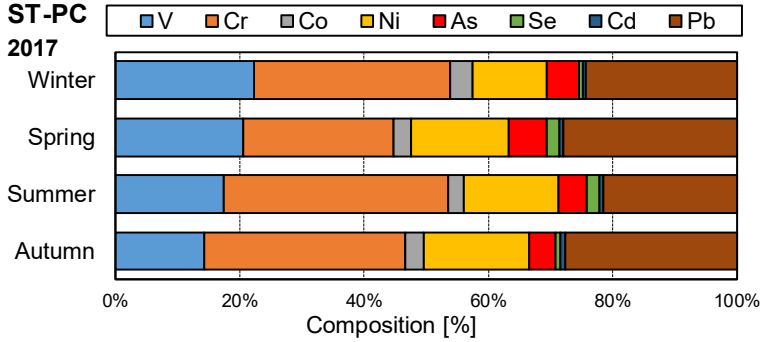
横浜



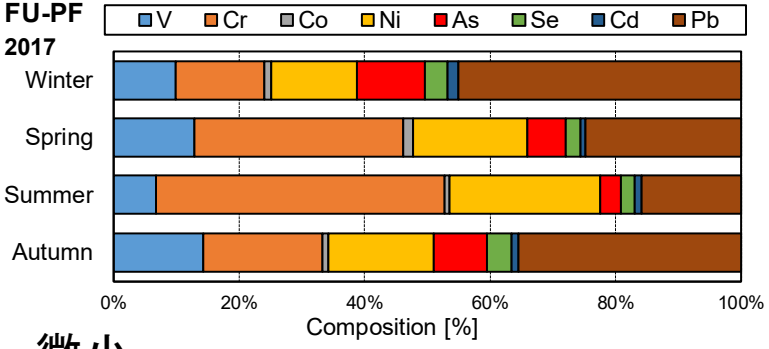


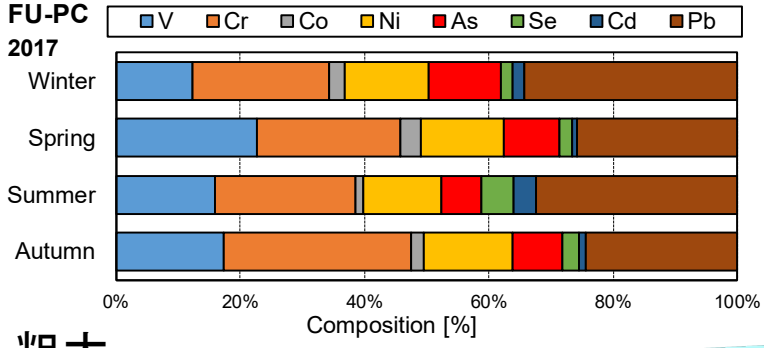
埼玉





福岡





微小

粗大

主な結果(1):粉体採取と化学成分

この項目のまとめ:

1) バーチャルインパクターとサイクロンを組み合わせた微小粒子と粗大粒子の大流量同時採取装置を開発、福岡・埼玉・神奈川にて2年半にわたる粉体採取を実施、3地点×2粒径×4季節の化学成分と細胞曝露試験結果セットを取得

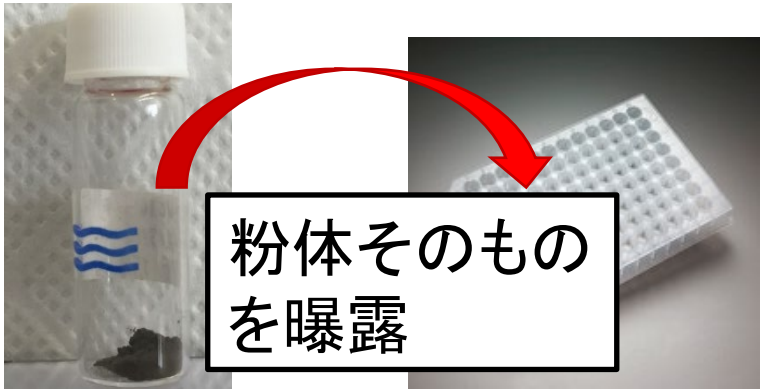
2) うち1サンプルについては、本法と従来法の比較を重点的に検討(粉体vs抽出曝露、粉体vsフィルター)、さらに動物曝露を実施

3) それぞれの地点・粒径・季節による化学組成の相違を確認

主な結果(2):細胞曝露実験

【本法と従来法との比較】

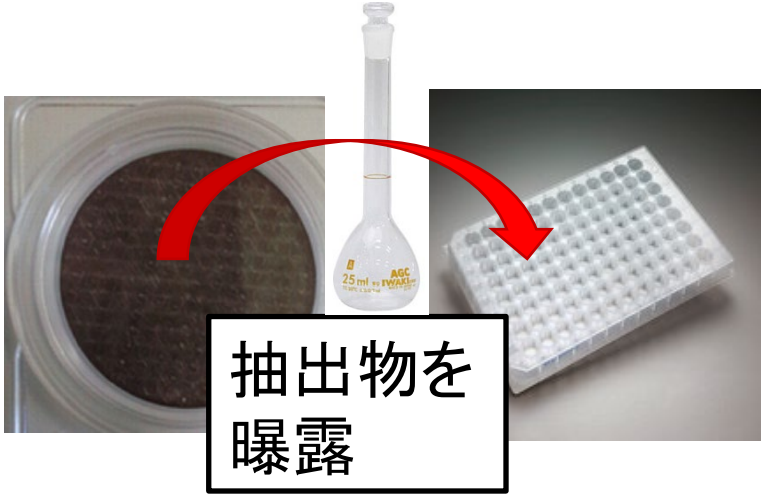
本法
(新規採取法)



サイクロン採取粒子
→粒子そのものを曝露

本当に
違いが
出るのか？

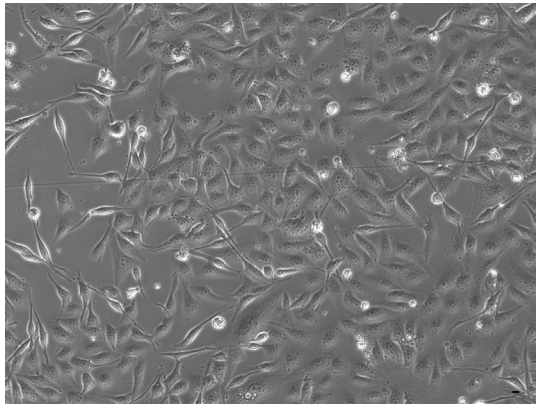
従来法



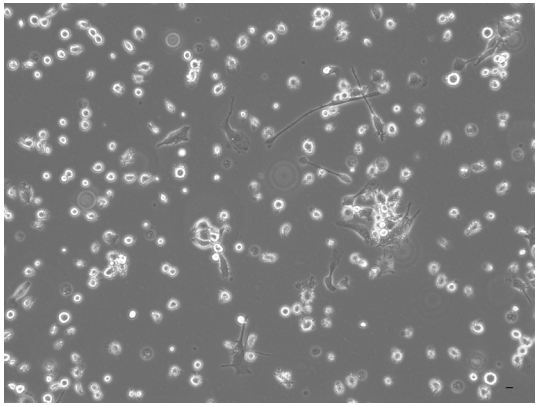
フィルター採取粒子
→抽出した液を曝露

本法と従来法による粒子の細胞曝露影響比較

細胞



気道上皮細胞



抗原提示細胞

曝露
サンプル

新規採取法(Cyclone)
微小　粒子
　　水溶性画分
　　脂溶性画分
粗大　粒子
　　水溶性画分
　　脂溶性画分

従来法(Filter)
微小　水溶性画分
　　脂溶性画分

本法と従来法による粒子の細胞曝露影響比較

曝露濃度

45 μg/mL (CRMは75 μg/mL)

※粒子は超音波Power40 (1min)処理を行い調製

評価項目

気道上皮細胞

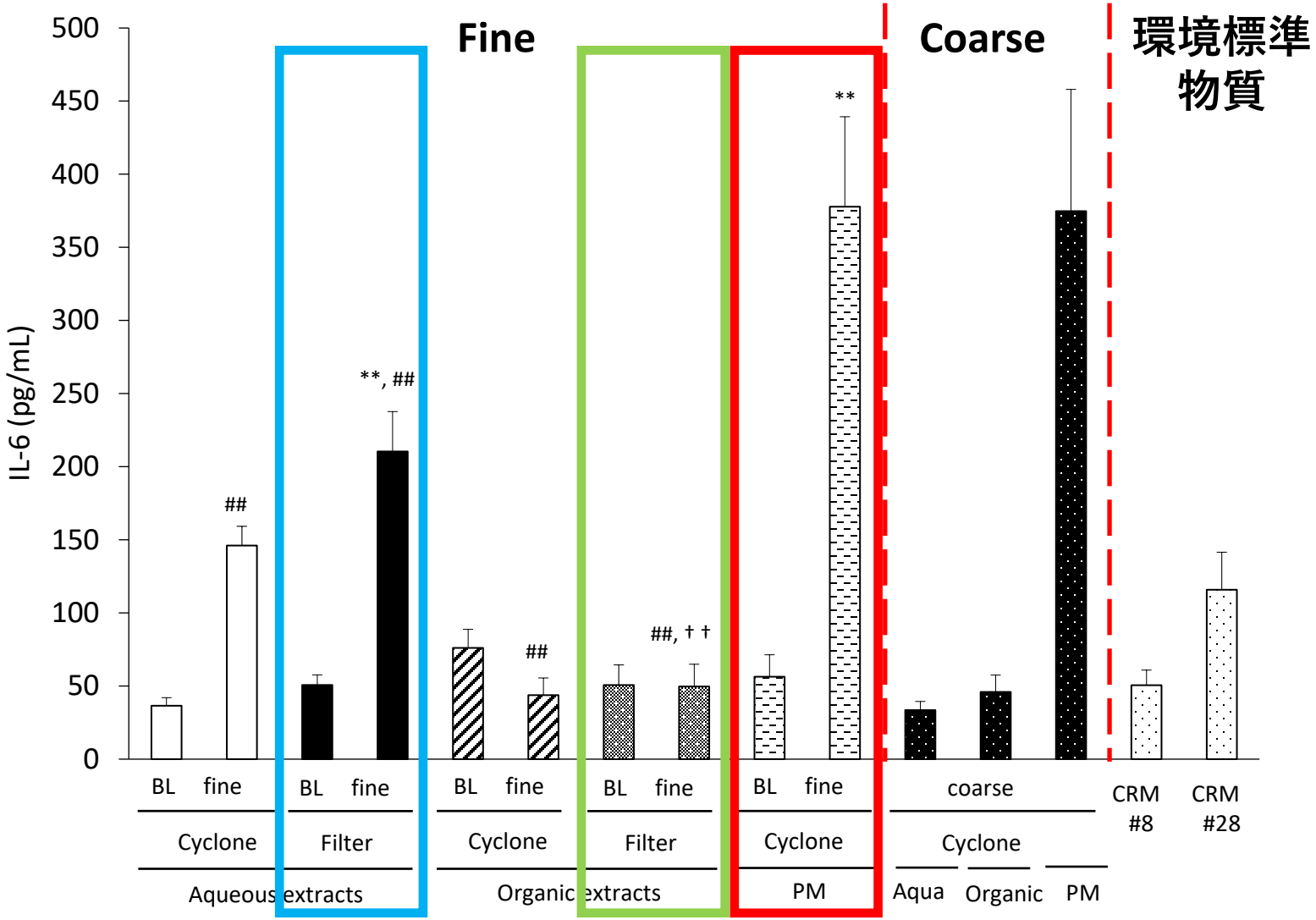
1. 24 h 曝露 → IL-6, IL-8 (ELISA測定)
2. 3 h 曝露 → HO-1, CYP1A1遺伝子発現 (リアルタイムPCR)

抗原提示細胞

1. 24 h 曝露 → IL-6, IL-1β, TNFα (ELISA測定)
2. 24 h 曝露 → DEC205, CD86 (FACS測定)

抽出液・粒子中のエンドトキシン、βグルカン濃度

気道上皮細胞　IL-6

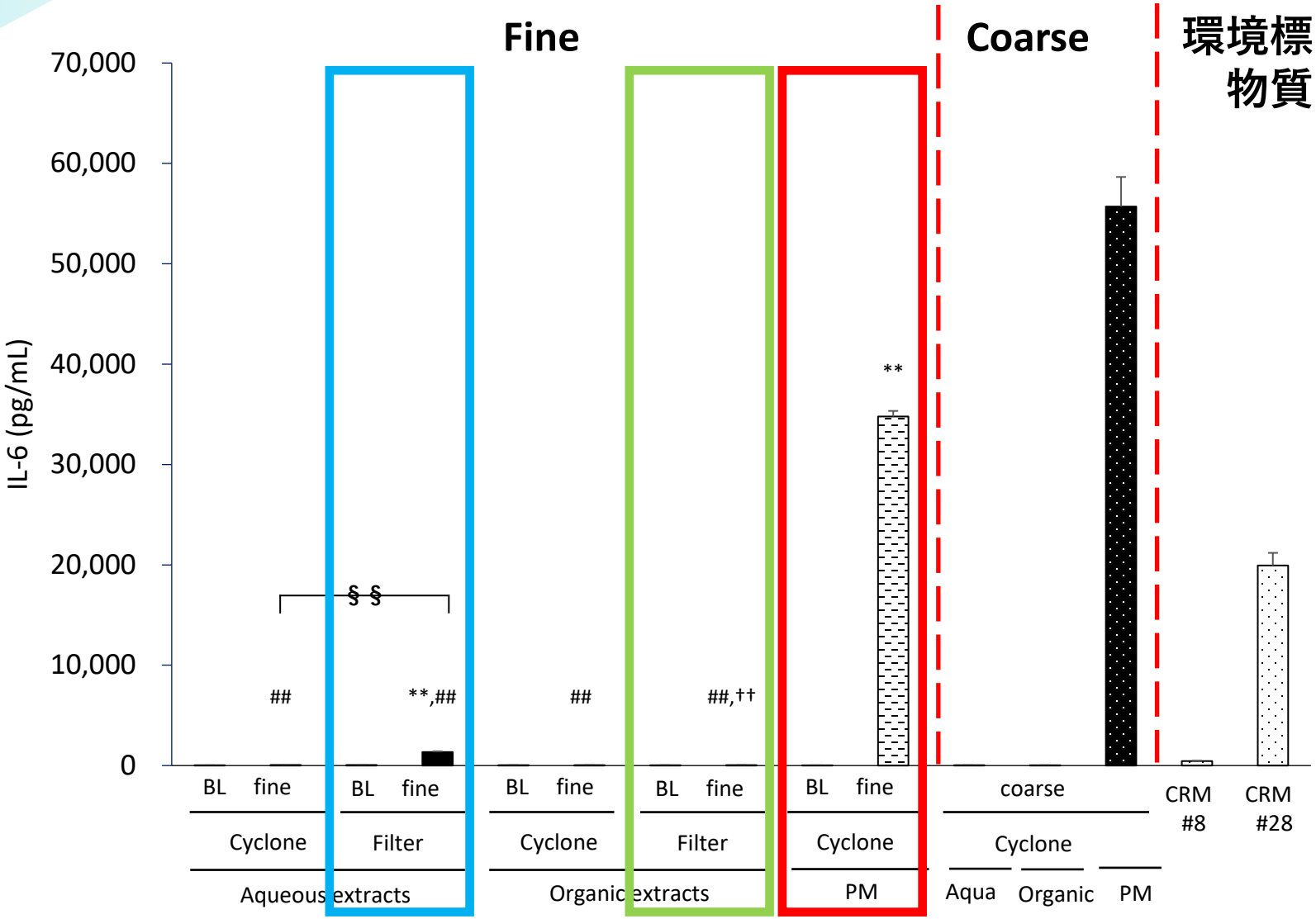


** $p<0.01$ versus blank

$p<0.01$ versus fine PM (Cyclone)

† † $p<0.01$ Aqueous extracts vs Organic extracts at same collect method

抗原提示細胞　IL-6



** $p<0.01$ versus blank

$p<0.01$ versus fine PM (Cyclone)

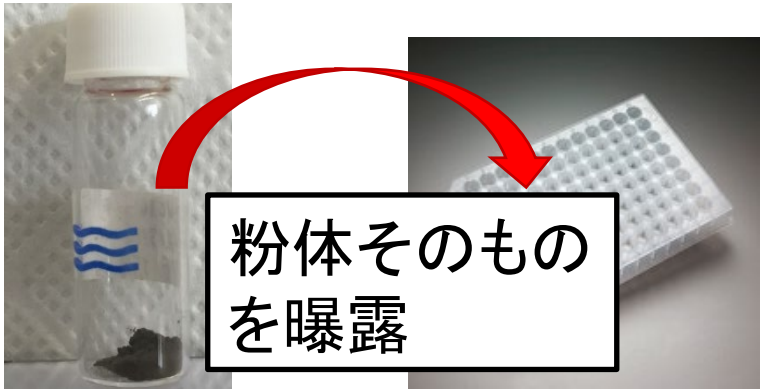
†† $p<0.01$ Aqueous extracts vs Organic extracts at same collect method

§§ $p<0.01$ each other

主な結果(2):細胞曝露実験

【本法と従来法との比較】

本法
(新規採取法)



サイクロン採取粒子
→粒子そのものを曝露

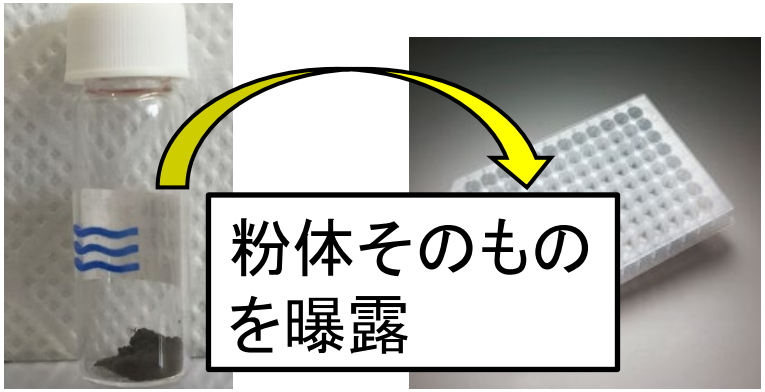
本当に
違いが
出るのか？

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

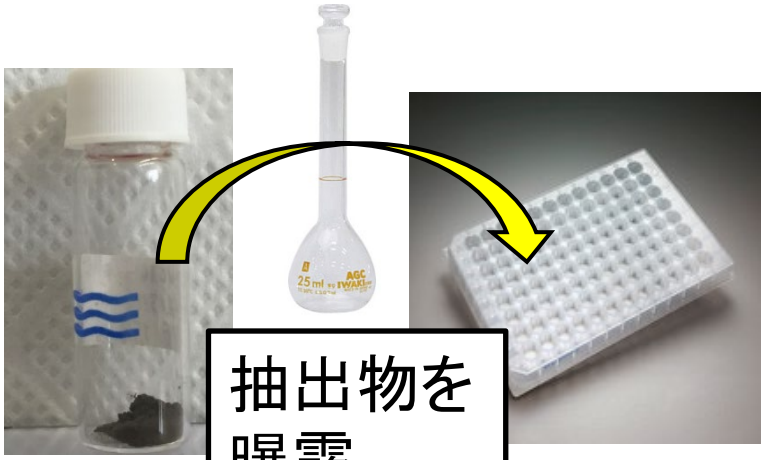
主な結果(3):細胞曝露実験

【粉体そのものの曝露と抽出物曝露との比較】

本法

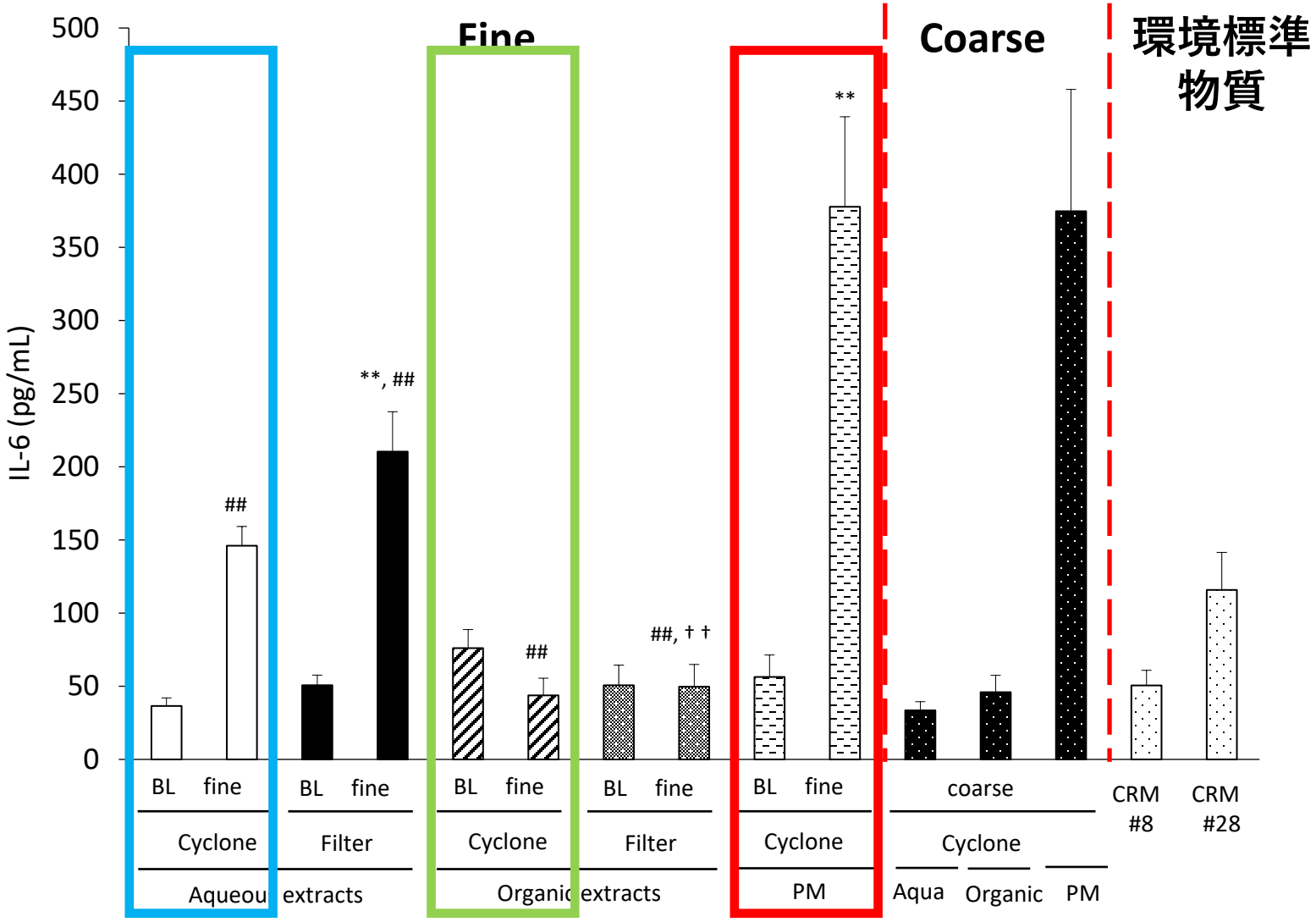


(曝露方法が)従来法



本当に違いが出るのか？

気道上皮細胞　IL-6

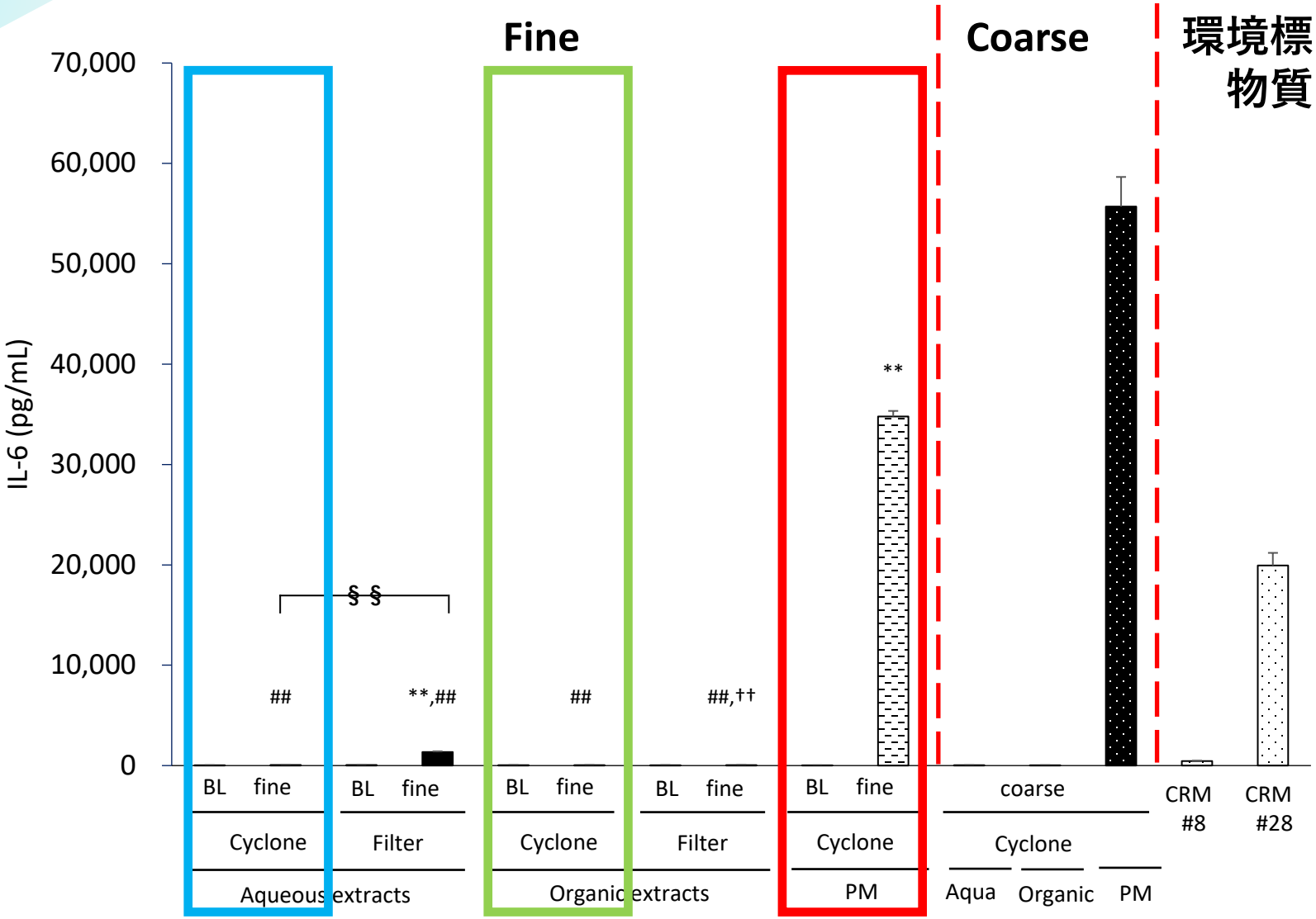


** $p<0.01$ versus blank

$p<0.01$ versus fine PM (Cyclone)

† † $p<0.01$ Aqueous extracts vs Organic extracts at same collect method

抗原提示細胞　IL-6



** $p<0.01$ versus blank

$p<0.01$ versus fine PM (Cyclone)

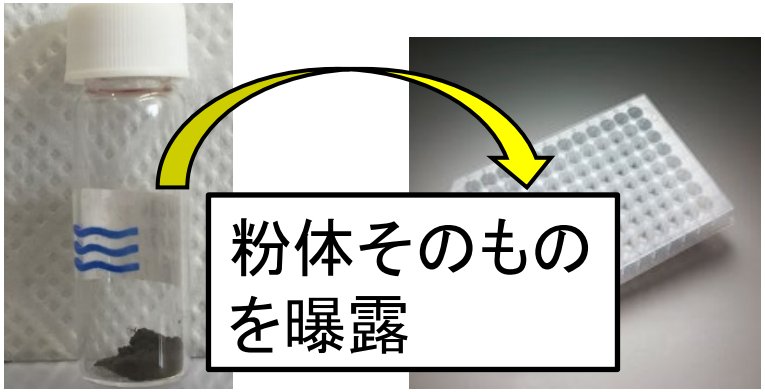
†† $p<0.01$ Aqueous extracts vs Organic extracts at same collect method

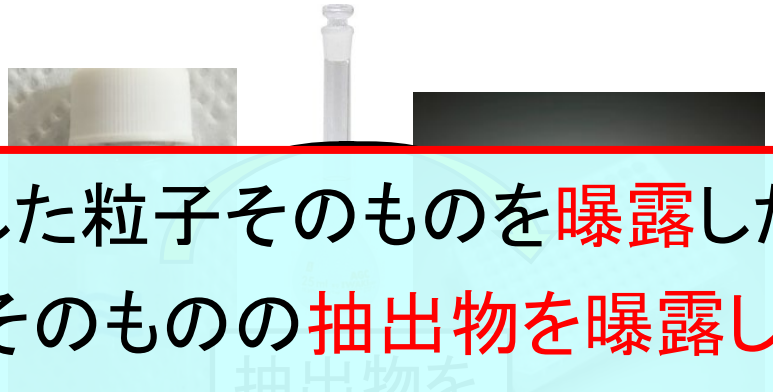
§§ $p<0.01$ each other

主な結果(3):細胞曝露実験

【粉体そのものの曝露と抽出物曝露との比較】

本法





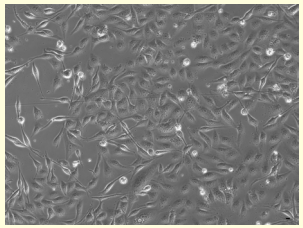
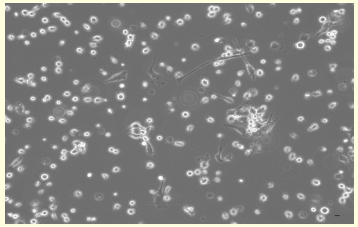
本当に違いが出るのか？

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

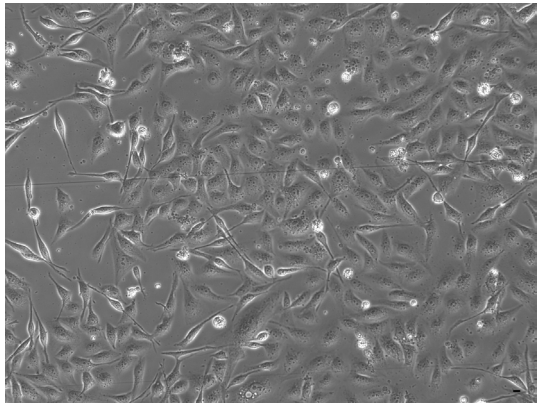
主な結果(4):細胞曝露実験
【地点・季節・粒径による違い】

I. 新規採取法によって捕集した微小・粗大粒子の曝露が
気道上皮細胞に及ぼす影響

II. 新規採取法によって捕集した微小・粗大粒子の曝露が
抗原提示細胞に及ぼす影響

	気道上皮細胞	抗原提示細胞
細胞		
評価項目	・細胞活性 ・サイトカイン産生 (IL-6, -8 等)	・細胞活性 ・細胞表面分子発現(DEC205) ・サイトカイン産生(IL-6等)

地点・季節・粒径による粒子の細胞曝露影響比較



気道上皮細胞

微小粒子(cyclone)

福岡　埼玉　横浜
Cyclex2–5 (冬、春、夏、秋)

粗大粒子(cyclone)

福岡　埼玉　横浜
Cyclex2–5 (冬、春、夏、秋)

CRM#8 (自動車排出粒子)

CRM#28 (都市大気粉塵)

[曝露濃度]

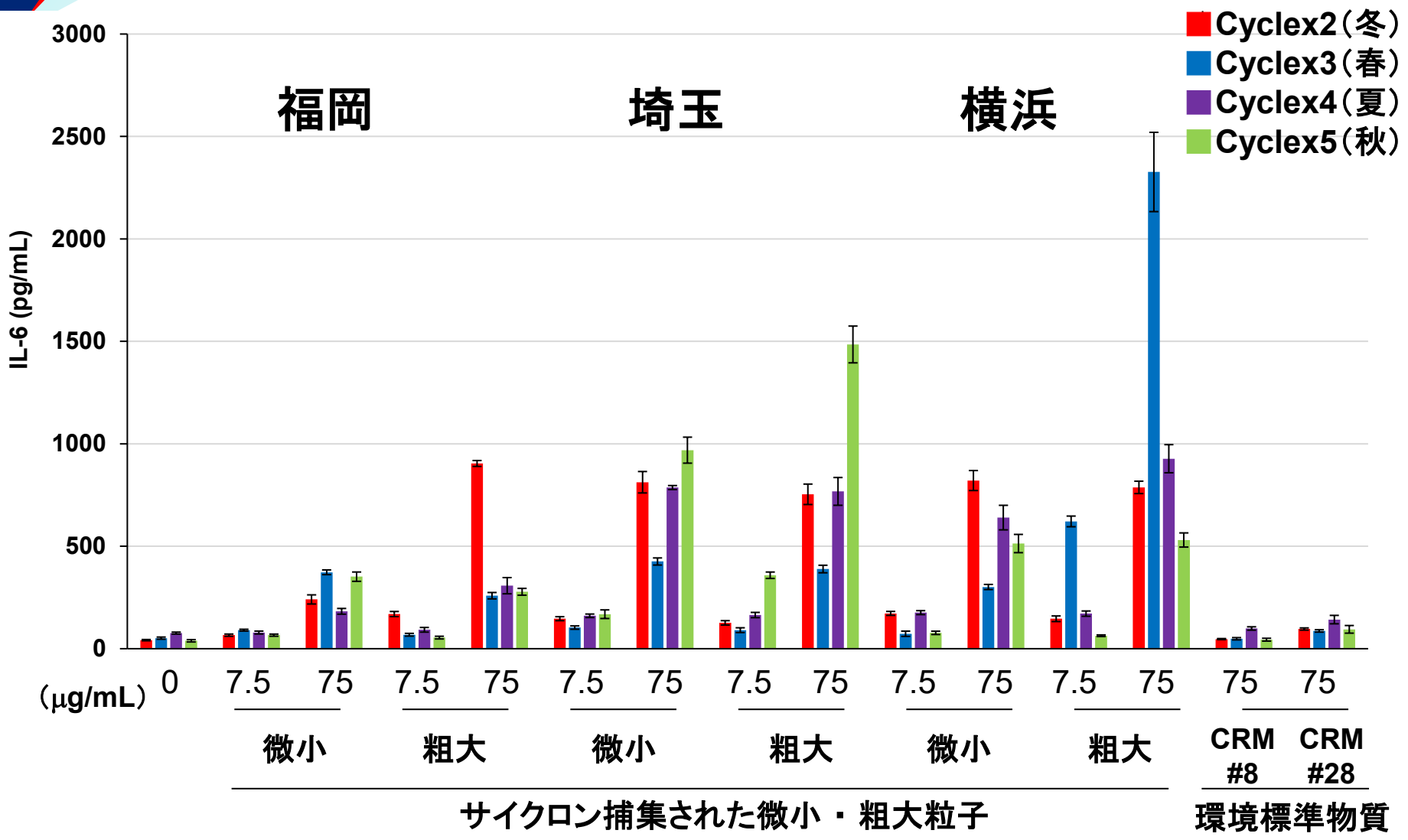
7.5, 75 μg/mL

超音波Power40
1分処理

評価項目

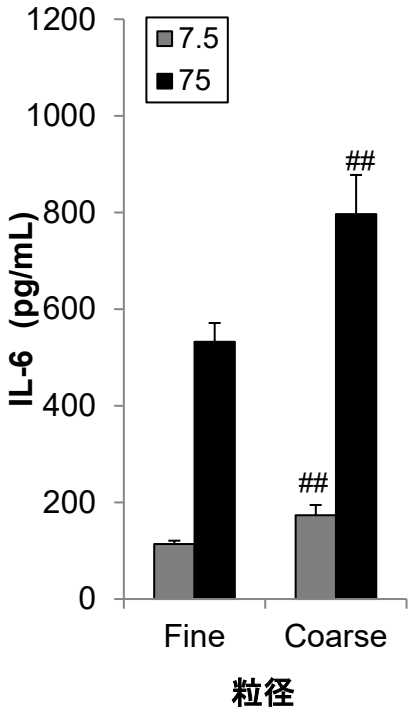
1.　24 h 曝露　→　IL-6, IL-8 (ELISA測定)

気道上皮細胞　IL-6


Cyclex2（冬）
Cyclex3（春）
Cyclex4（夏）
Cyclex5（秋）
福岡
埼玉
横浜
IL-6 (pg/mL)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
（μg/mL）
0
7.5
75
微小
粗大
CRM #8
CRM #28
サイクロン捕集された微小・粗大粒子
環境標準物質

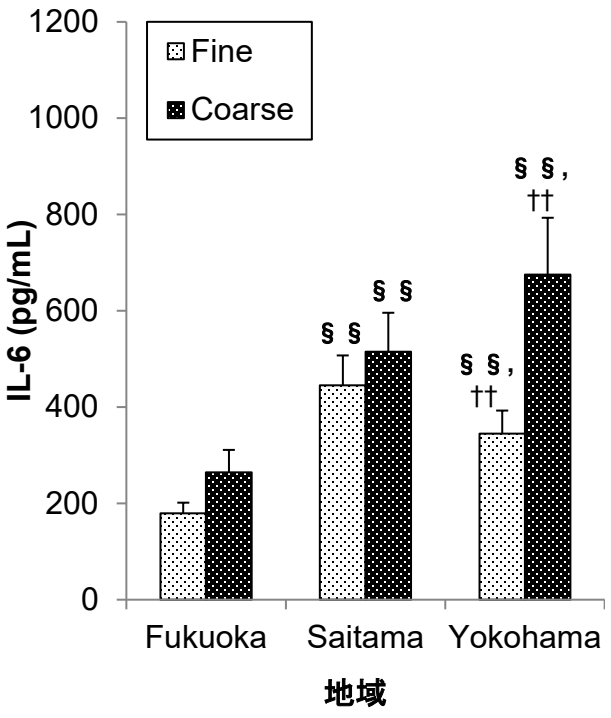
気道上皮細胞　IL-6

【 粒径 × 濃度 】



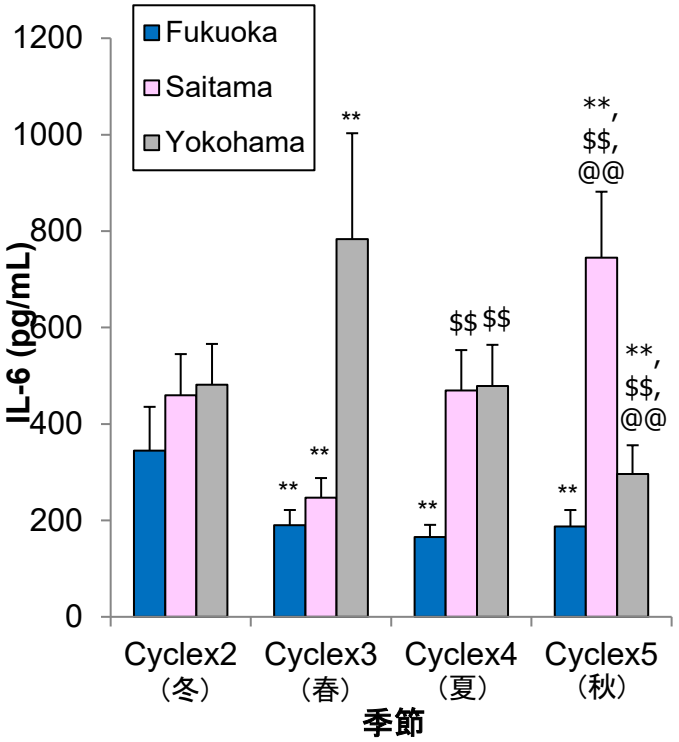
##p<0.01 vs Fine

【 地域 × 粒径 】



§ §p<0.01 vs Fukuoka
††p<0.01 vs Saitama

【 季節 × 地域 】



** p<0.01 vs Cyclex2 (冬)
$$ p<0.01 vs Cyclex3 (春)
@@ p<0.01 vs Cyclex4 (夏)

微小粒子より粗大粒子の影響が大きい

微小粒子は、埼玉、横浜、福岡の順で、粗大粒子は、横浜、埼玉、福岡の順で影響が大きい

福岡では、Cyclex2（冬）が、埼玉では、Cyclex5（秋）が、横浜では、Cyclex3（春）の影響が大きい

主な結果(4):細胞曝露実験

【地点・季節・粒径による違い・まとめ】

微小粒子、粗大粒子ともに、濃度依存的なIL-6, IL-8の上昇を示し、サイクロン捕集した粒子は、気道上皮細胞の催炎症性反応を介して、呼吸器疾患を悪化させる可能性が示唆された。

地域差では、微小粒子は、埼玉、横浜、福岡の順で、粗大粒子は、横浜、埼玉、福岡の順で影響が大きかった。

季節差では、福岡では Cyclex2(冬)が、埼玉では Cyclex5(秋)が、横浜では Cyclex3(春)の影響が大きかった。

粒径差では、微小粒子より、粗大粒子の方が影響が大きかった。

主な結果(5):化学成分と細胞曝露

【化学成分と曝露影響評価指標間の相関解析】

化学成分

・イオン:Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, Na^+, NH_4^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}

・炭素成分:OC1-4 および EC1-3

・金属:Al, Si, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb

・多環芳香族炭化水素 :

Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Chrysene, Benz[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, 1-nitropyrene, 2- nitropyrene, 2-nitrofruoranthene

生物成分

・エンドトキシン, β-グルカン

曝露影響評価

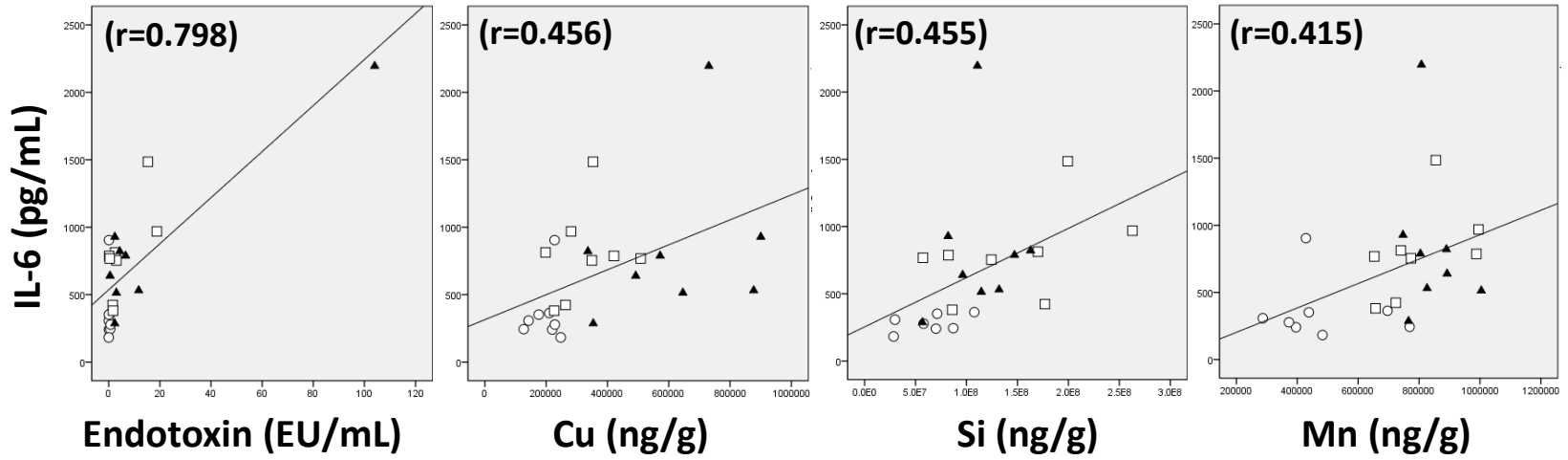
*CYCLEX-2のみ実施

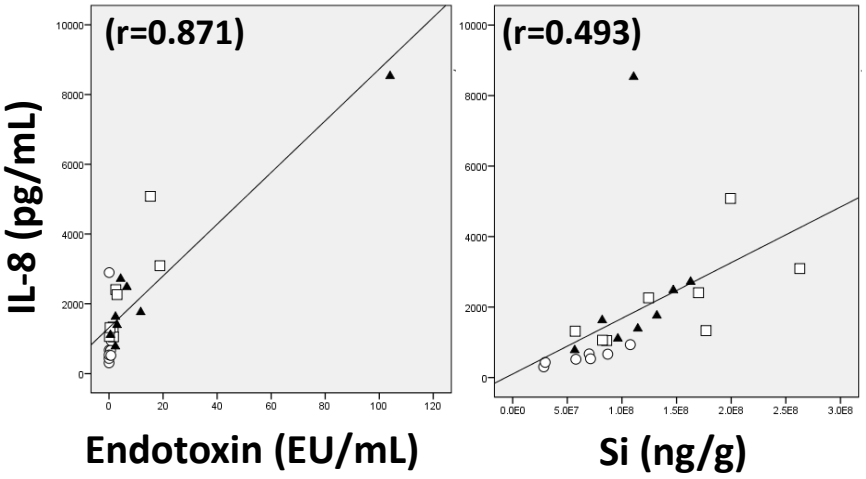
・気道上皮細胞(BEAS-2B), 抗原提示細胞(APC), 鼻腔上皮細胞(RPMI-2650)*

・影響評価指標:IL-6, IL-8, DEC205等

主な結果(5):化学成分と細胞曝露

【化学成分と曝露影響評価指標間の相関解析】





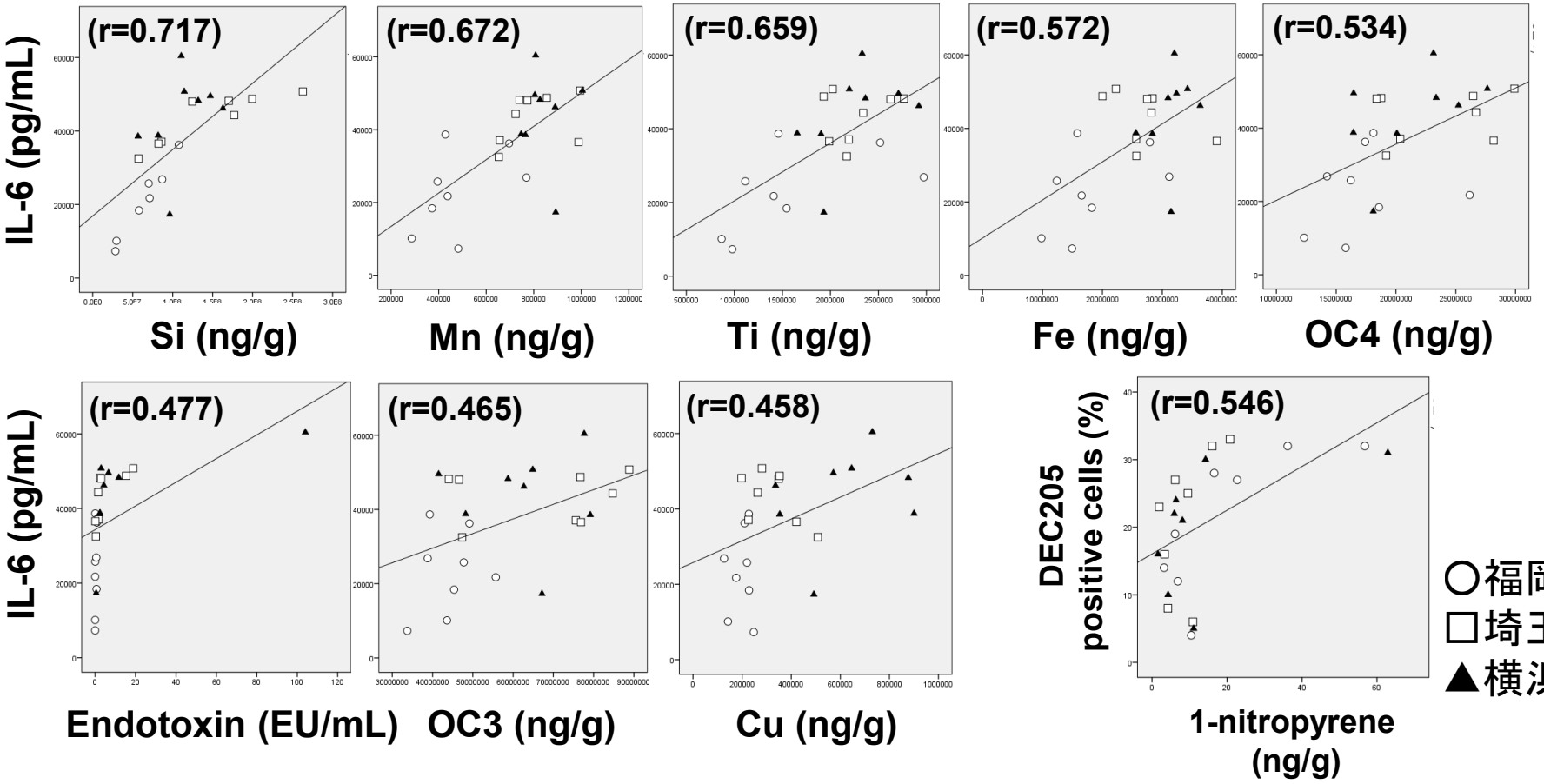
<u>気道上皮細胞</u>

IL-6産生と正の相関:
エンドトキシン, Cu, Si, Mn

IL-8産生と正の相関:
エンドトキシン, Si

主な結果(5):化学成分と細胞曝露

【化学成分と曝露影響評価指標間の相関解析】



抗原提示細胞

DEC205発現と正の相関:1-nitropyrene

IL-6産生と正の相関:Si, Mn, Ti, Fe, OC4, エンドトキシン, OC3,

主な結果(5):化学成分と細胞曝露

【化学成分と曝露影響評価指標間の相関解析】

【まとめ】

下記の化学成分と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。

気道上皮細胞の催炎症性分子の誘導:

エンドトキシン, Cu, Si, Mn

抗原提示細胞の異物の取り込み:

1-nitropyrene

抗原提示細胞の催炎症性分子の誘導:

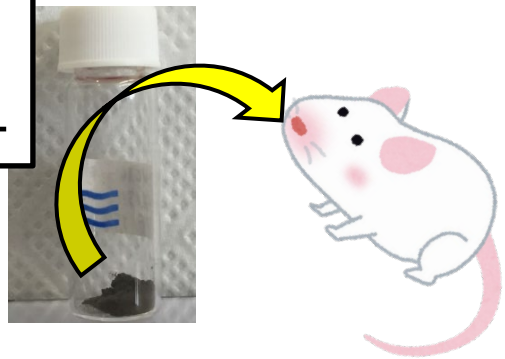
Si, Mn, Ti, Fe, OC4, エンドトキシン, OC3, Cu

主な結果(6):動物曝露実験

粒子そのものを動物に曝露した場合に、
本当に何らかの影響を誘導するのか？

実験対象および手順

粉体を
気管内投与



動物　ICRマウス　雄性6 wk

曝露サンプル　Cyclex2、横浜、微小粒子、粗大粒子

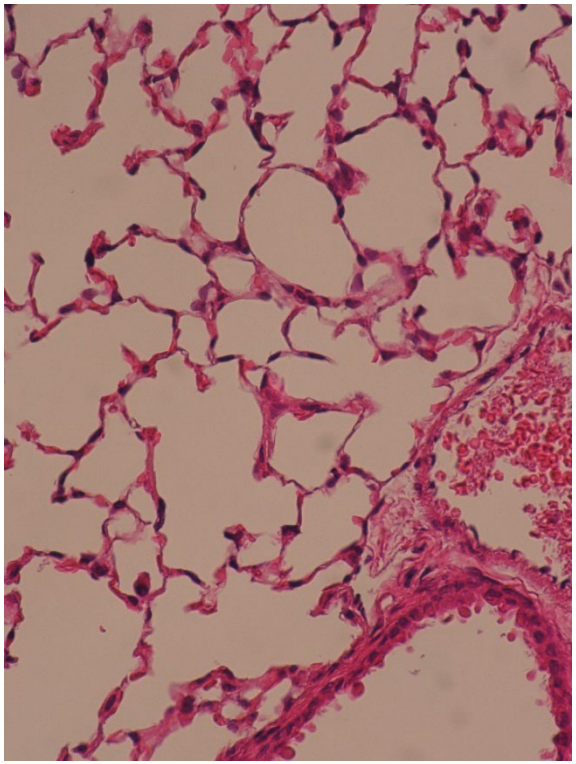
**曝露濃度
時間**　500 μg/mouse、24時間曝露
※粒子は超音波 Power40 (1min) 処理を行い調製

評価項目
1. 肺の病理学的変化　→　ヘマトキシリン・エオジン染色
2. 気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数、細胞成分

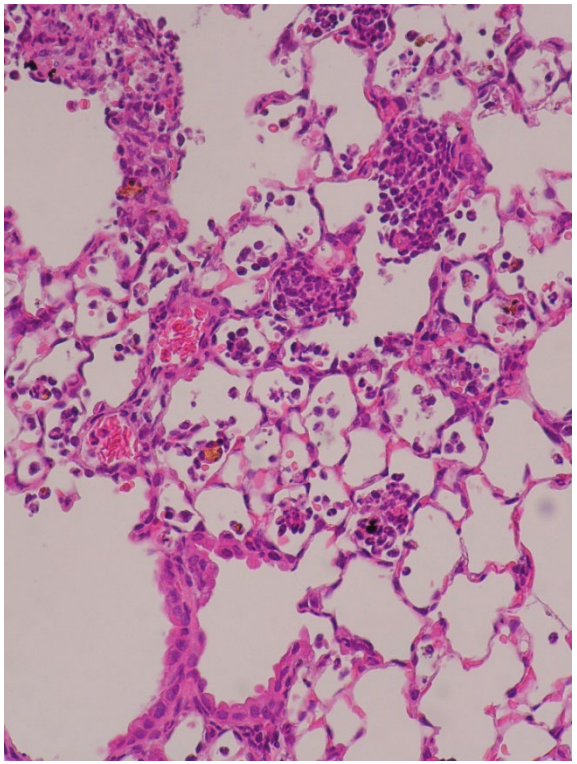
主な結果(6):動物曝露実験

粒子曝露マウス肺の病理学的変化

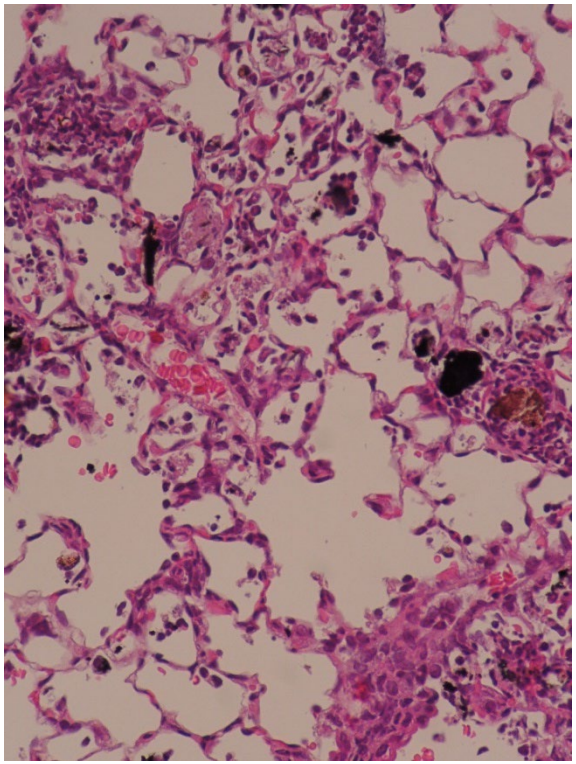
Control



Fine

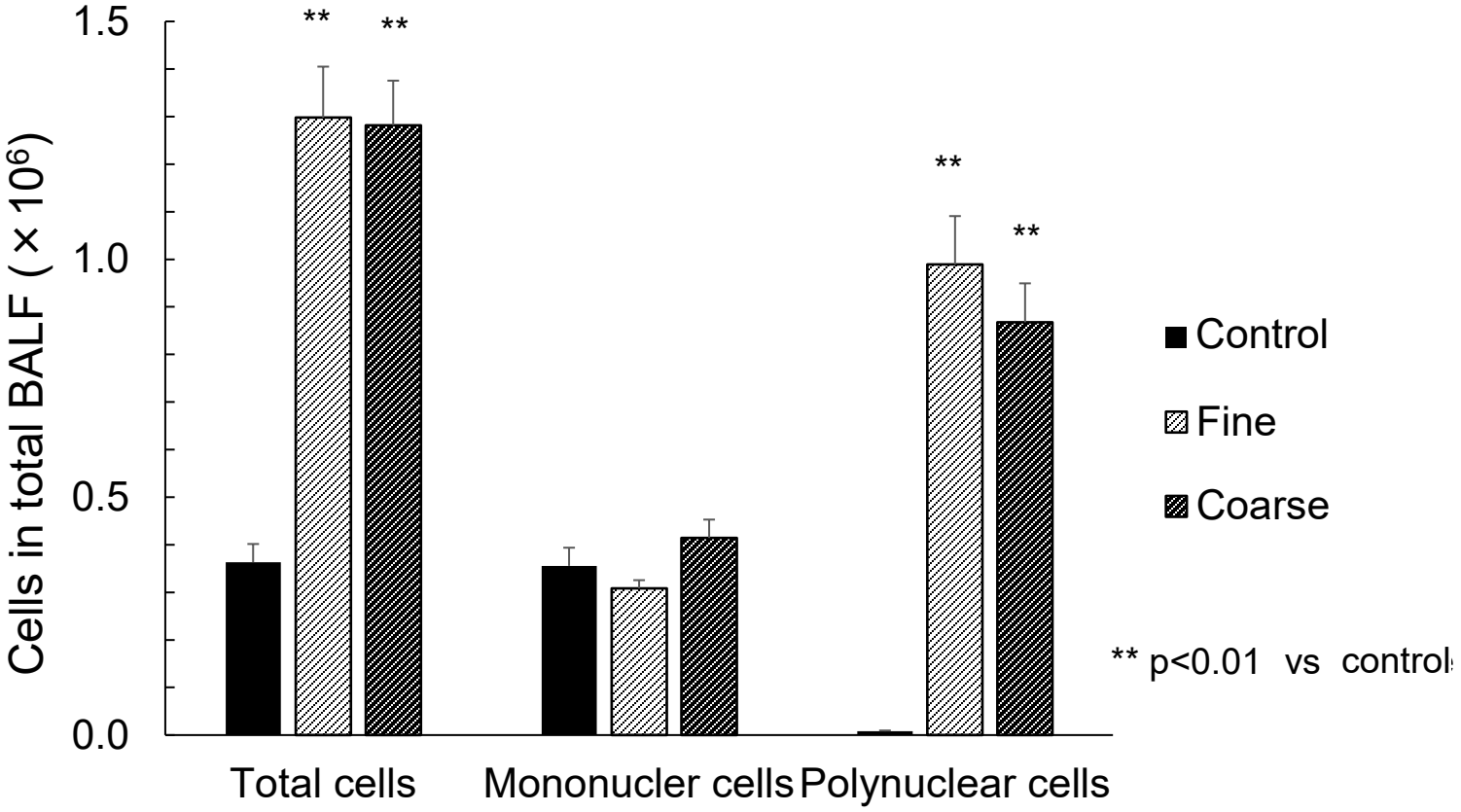


Coarse



微小粒子と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
→微小および粗大粒子共に、肺に炎症を誘導した

主な結果(6):動物曝露実験



微小粒子と粗大粒子の曝露によって、BALF中の総細胞数と多核球が増加
→微小および粗大粒子共に、肺に炎症を誘導した

本研究により得られた主な成果（科学的・技術的意義）

1) バーチャルインパクターとサイクロンを組み合わせた微小粒子と粗大粒子の大流量同時採取装置を実用化し、福岡・埼玉・神奈川で3地点×2粒径×4季節の粒子の化学成分と細胞曝露試験結果セットを取得した
2) 本法による粒子そのものは、従来法（フィルター抽出物）と比較して、細胞曝露により顕著に強い影響を示した
3) 粒子そのものを曝露した場合は、抽出物曝露の場合と比較して、細胞曝露により顕著に強い影響を示した
4) サイクロン捕集粒子は、気道上皮細胞の催炎症性反応を介して、呼吸器疾患を悪化させる可能性が示唆された
5) 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
6) 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

本研究による成果の主な活用（環境政策への貢献等の観点）

1) 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、粒子そのものの有害性を正しく評価できていない可能性が示された。このことは、今後のPM2.5の環境基準等の見直しが必要となった場合に有用な知見となると考えられる。

2) 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あり、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を示すものであり、そうした観点からも、環境政策の方向性を再検討することを視野に入れる必要がある。

3) 本研究により、粒子中の特定の化学成分と曝露影響評価指標が密接に関与し、これらの成分が臨床症状の悪化の規定要因になり得ることが示された。このことは、これまで質量のみで管理されていたPM2.5の環境基準等について、今後の化学成分レベルでの環境基準等の設定に向けた重要な知見になると考えられる。

従来法との比較による本法の特色

項目	従来法 （フィルター採取）	本法 （サイクロン採取）
粒子状物質採取量	少量（数mg、ローボリューム エアサンプラー使用の場合）	多量（数百mg、 3週間稼働の場合）
粒子とガスの接触	空気流と粒子が フィルター上で常に接触	空気流と粒子は分離
曝露・影響評価の対象	一部の抽出成分のみ	抽出成分を含む粒子全体
採取粒子あたりの サンプル数	水溶性、脂溶性抽出成分の二つ	全体として一つ
曝露実験時の コンタミネーション	フィルター由来の成分が 実験結果に影響	影響なし
ハンドリング （抽出操作の有無等）	複雑かつ不確実 （不安定）	簡便かつ確実 （安定）
影響評価の明瞭性	抽出成分により変動かつ不明確	明確

関連業績 抜粋

■公表済論文（査読有）

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.

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.

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.

投稿準備中：3報 and more…

■学会発表：　国際8件、国内12件

■招待講演：　国際6件、国内2件

■受賞等：　1件

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

「国民との科学・技術対話」の実施

2016/ 4　研究代表者のウェブサイトにプロジェクト概要を紹介（約1,600アクセス/年）
2016/ 9　市民対象シンポ：大気環境学会公開シンポジウム（北大）（約70名）
2016/12 市民対象展示会：第17回慶應科学技術展（東京国際F）（来場者約2,000名）
2017/ 2　市民対象展示会：テクニカルショウヨコハマ（パシフィコ横浜）（来場者約31,000名）

2017/ 6　理科授業等：慶應義塾湘南藤沢高等部3年生、プロジェクト概要紹介（80名）
2017/10 市民対象シンポ：第7回CSJ化学フェスタ招待講演（聴講者約100名）
2017/12 市民対象展示会：第18回慶應科学技術展（東京国際F）（来場者約2,000名）
2018/ 3　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WS（約30名）

2018/ 5　市民対象シンポ：第5回カノマックス国際エアロゾルWS（聴講者約100名）
2018/ 9　市民対象シンポ：大気環境学会公開分科会（九大）（約70名）
2018/ 9　理科授業等：慶應義塾湘南藤沢高等部2年生、プロジェクト概要紹介（230名）
2018/12 市民対象展示会：エコプロ（ERCAブース、東京Bサイト）（来場者約162,000名）
2018/12 市民対象展示会：第19回慶應科学技術展（東京国際F）（来場者約2,000名）

研究プロジェクト マネジメント経緯

2016/ 2　採択内定、慶應大（横浜）にて粉体採取開始
2016/ 4　共通実験用試料 CYCLEX-1 採取（横浜）

2016/ 6　プロジェクト正式契約（6/1付）
2016/ 7　キックオフミーティング（代表者、分担者、環境省、PO）
2016/ 9　プロジェクトに関する公開シンポ（北大・大気環境学会年会）
　　関係者連絡会議（参画メンバー、アドバイザー、PO）
2016/10　サンプラーを埼玉県環境科学国際セ、福岡大に設置
2017/ 1　AD会合(1)（参画メンバー、アドバイザー、環境省、PO）
2017/ 2　共通実験用試料 CYCLEX-2 採取（横浜・埼玉・福岡）→〃-7まで継続
2017/ 3　委託業務完了報告書（1年目）提出

2017/ 5　中間研究等成果報告書・政策決定者向けサマリー提出
2017/ 7　AD会合(2)（参画メンバー,アドバイザー,環境省,ERCA,PO）
2017/ 7　中間評価（総合評点A、必要性A、有効性A、効率性A）
2018/ 5　委託研究実績報告書（2年目）提出

2018/ 7　AD会合(3)（参画メンバー,アドバイザー,環境省,ERCA,PO）
2018/ 8　プロジェクトに関するシンポ（名古屋大・エアロゾル科学・技術討論会）
2019/ 3　終了課題成果報告会（本日）

2019/ 5　委託研究実績報告書（3年目）提出

CYCLEXプロジェクト 関係者一覧

研究代表者	慶應義塾大学	奥田知明
研究分担者	京都大学	高野裕久
共同研究者	京都大学	東野達・亀田貴之
共同研究者	京都大学	本田晶子
共同研究者	埼玉県環科国セ	長谷川就一
共同研究者	福岡大学	林政彦・原圭一郎・西田千春
装置製作業者	東京ダイレック	井上浩三
アドバイザー	金沢大学	早川和一
アドバイザー	大分県立看科大	市瀬孝道
アドバイザー	慶應義塾大学	南美穂子

（敬称略）

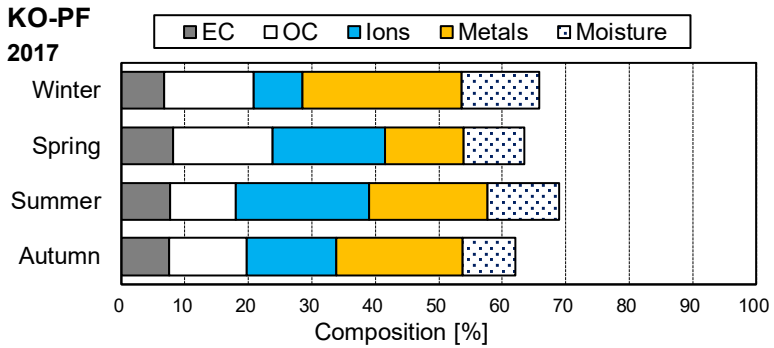
CYCLEX
CYCLone collection of PM2.5
followed by EXposure experiments

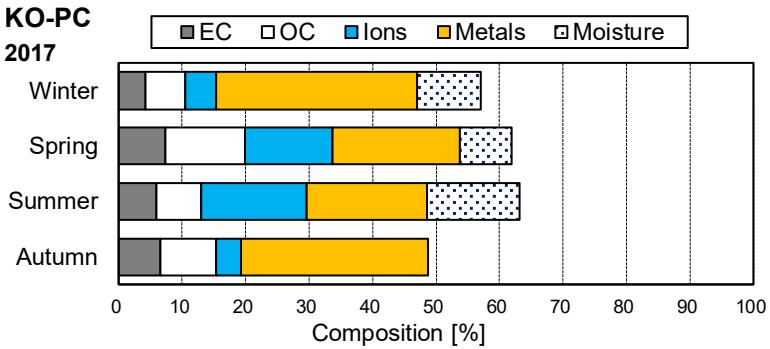
地点・季節毎の粒子化学組成

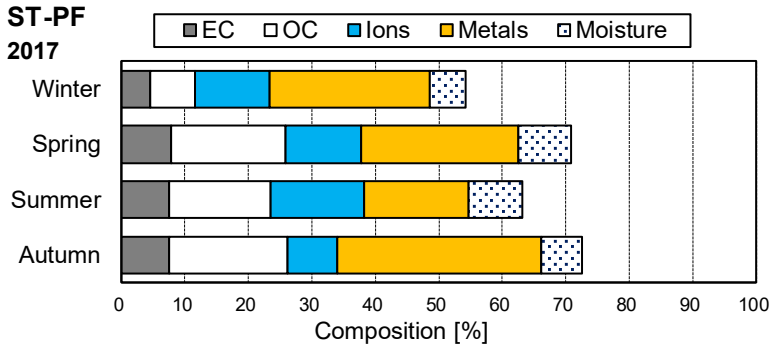
横浜

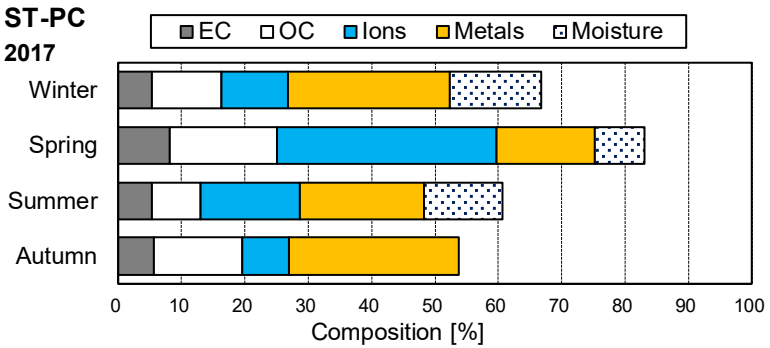
埼玉

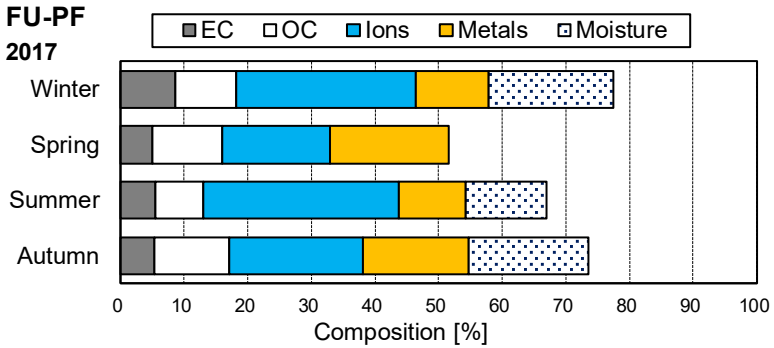
福岡

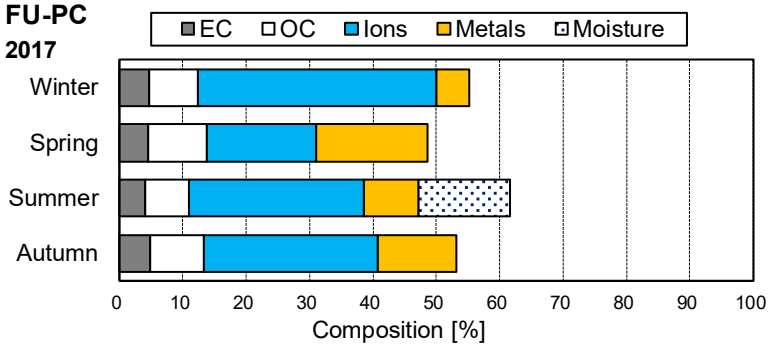












微小

粗大