

「革新的次世代低公害車総合技術開発」
事後評価報告書

平成22年2月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

平成22年2月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 村田 成二 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第32条の規定に基づき、別紙のとおり
評価結果について報告します。

目 次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	7
研究評価委員会委員名簿	8
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-19
2. 1 新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化及びバイオマス燃料利用に関する動向及び技術課題の調査	
2. 2 GTL を用いたエンジン技術の開発	
2. 3 革新的後処理システムの研究開発	
2. 4 次世代自動車の総合評価技術開発	
3. 評点結果	1-42
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「革新的次世代低公害車総合技術開発」の事後評価報告書であり、第18回研究評価委員会において設置された「革新的次世代低公害車総合技術開発」（事後評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第24回研究評価委員会（平成22年2月5日）に諮り、確定されたものである。

平成22年2月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

「革新的次世代低公害車総合技術開発」

事後評価分科会委員名簿

(平成21年9月現在)

	氏名	所属、役職
分科会長	みやもと のぼる 宮本 登	北海道大学 名誉教授
分科会長 代理	しおじ まさひろ 塩路 昌宏	京都大学 大学院エネルギー科学研究科 エネルギー変換科学専攻 教授
委員	おだ ゆうじ 小田 裕司	三菱重工業株式会社 汎用機・特車事業本部 エンジン技術部長
	さつま あつし 薩摩 篤	名古屋大学 大学院工学研究科 物質制御工学専攻 教授
	しみず かずお 清水 和夫	株式会社テクノメディア 代表取締役
	せんだ じろう 千田 二郎	同志社大学 理工学部 エネルギー機械工学科 教授
	よこた ひさし 横田 久司	(財)東京都環境整備公社 東京都環境科学研究所 調査研究科 主任研究員

敬称略、五十音順

審議経過

● 第1回 分科会（平成21年9月24日）

公開セッション

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法及び評価報告書の構成について
4. プロジェクトの概要説明

非公開セッション

5. プロジェクトの詳細説明

公開セッション

6. まとめ・講評
7. 今後の予定、その他、閉会

● 第24回研究評価委員会（平成22年2月5日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

本プロジェクトは、国家シナリオに基づく自動車排出ガスの超低公害化と言う大気環境保全上の位置づけや必要性から公共性が高く有意義な開発である。クリーンディーゼル車の実現に必要な要素技術として、燃焼・燃料・後処理に関連する事項に加えて大気影響・健康影響の評価まで研究対象とし、それぞれ先進的かつユニークな技術開発を精力的に進めて、目標を達成したことは高く評価できる。情勢の変化や中間評価での指摘に対して、体制・目標・評価対象などを柔軟かつダイナミックに見直して的確に対応しており、評価できる。

一方で、多様な技術が提案されているが、各技術の特徴を明確にして、最適な使用条件、制約条件、限界等を提示し、最大の効果を得るためのシナリオを示すことができたなら成果がより有機的に活用できる。その際、個別の要素技術の中に連携すればさらに発展が望めるようなケースも見受けられた。中間評価の指摘を受けてエンジン・各種後処理法・燃料の間での技術連携を進めてはいるが、有機的な連携あるいは相乗効果についてもっと定量的に検討すべきである。

2) 今後に対する提言

本プロジェクトでは各技術とも目標達成のポテンシャルが示された。今後は、その成果を踏まえて耐久性、小型化、低コスト化に取り組むことにより、想定される次期規制に間に合うよう実用化を急ぐ必要がある。提案された種々の新規燃焼システムと革新的後処理システムについて、それぞれのメリット・デメリットを明らかとして、様々な技術を有機的に融合することも含めて量産を想定した幾つかのケーススタディを行い、その適応性を検討する必要がある。10年間以上の信頼性と耐久性を要求される自動車において、十分な検証も必要であり、基礎的・共通的な基盤技術開発の範囲で後継プロジェクト等での支援も考える必要があるのではないかと。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

本プロジェクトは、新・国家エネルギー戦略に則ったもので、ディーゼルエンジンとその搭載車両の排気超クリーン化技術開発を柱とし、CO₂削減を図るとともに、国際競争力を高めるなどの国策上からも重要なものであり、エネルギー

ギーイノベーションプログラムの目標達成に大きく貢献している。世界でも最も厳しい水準を目指すポスト新長期規制及びその次の規制への対応はメーカーの努力だけでは困難な面があり、その遂行には広範な研究開発分野や産官学の連携を必要とすることから、事業の目的等と併せて NEDO または国の関与は妥当である。

一方で、内外で開発されている技術に対して、本プロジェクトで対象とした技術の特徴と優位性を一般にもっと分かり易い形で、特に、海外技術に対する優位性を示すことが望まれる。また、NEDO が行なうに相応しい研究開発のスキームとし、その成果を各企業で利用し易くすることが望ましかった。本プロジェクトのみの支出費用を、市場の効果に対して比較する費用対効果の評価には疑問があり、不十分であると感じられる。

2) 研究開発マネジメントについて

ポスト新長期規制の 1/3 レベルを NO_x の目標にする等、排出ガスおよび燃費に対して戦略的な目標を設定し、目標達成根拠も明確である。テーマ毎にスケジュール、予算が適切に計画され、また目標達成に必要な要素技術をほとんど網羅していると認められる。設定された目標の達成に向けて技術力のある企業、研究機関からなるチームを構成し、全体をプロジェクトリーダーが統括する研究開発体制も妥当である。社会情勢の変化にも対応して、計画・目標の見直しがなされ、中間評価の指摘に対しても概ね良い対応がなされている。

一方で、目標設定が、総合システムとしての実用化シナリオを明確にした内容でなく、個々の革新的な技術開発の可能性評価に留まる内容である。実用化を視野に入れた設定があっても良かった。中間評価の指摘を受けて技術連携 WG を設置したとはいえ、各テーマ間の連携、実施者間の連携が十分ではなく、「燃焼チーム」と「後処理チーム」が別個に開発を行っている感が否めない。企業間の知財権等の問題はあがあるが、計画の初期段階から連携をより密にし、事業を効率的に推進すれば、さらに充実した成果が得られたと想定できる。限られた期間と費用の下で、各要素や分野等の開発に対する重点化および優先付け等の戦略性がもっと考慮されても良かった。

3) 研究開発成果について

成果は概ね目標値を達成していると共に、中間評価での指摘事項も含め、目的と目標に照らして全体的に妥当かつレベルの高いものと言える。論文や多くの学会発表を通じて成果の公表にも積極的に努めているほか、相当数の特許出願もなされていることは評価できる。本プロジェクトの燃費・排気エミッションの成果は、今後ディーゼルエンジンが市場に受け入れられて行くための環境

適合技術として重要なものである。

一方で、成果の詳細についての情報が不十分であり、従来システムや他の競合技術と比較しての特徴や競合優位性を提示することが望まれる。今後の課題についても、技術的な具体的ブレークダウンがやや不足している。連携あるいは相乗効果に対しては、更に広範な究明とそれに基づいた統括の遂行が期待される。成果の普及に関して、環境改善の早期達成に向けた各自動車メーカーへの公開が望まれる。また、一般に対する情報発信が不足しており、工夫が必要である。

4) 実用化、事業化の見通しについて

クリーンディーゼル車の開発は自動車メーカー各社が近い将来の実用化、事業化を目指して取り組んでいる課題であり、各テーマとも、実用化へのある程度の道筋を計画しており評価できる。人材育成に関しても一定の効果を上げている。

一方で、多くのテーマが、研究試作レベルでの性能評価にとどまり、実用化への具体的なシナリオが明確ではない。競合技術との比較も含めて、課題とその解決の方針・見通しを明らかにする必要がある。事業化までの最大の課題は耐久性の確認であり、安全性保証の観点から十分な検討が必要である。今後、技術の更なる進展に対して何らかの形で **NEDO** の協力や支援が望まれる。ポスト新長期規制やその次の規制への対応に向けて、実用可能な技術については、できる限り早期に公開することを検討すべきである。

研究評価委員会におけるコメント

第24回研究評価委員会（平成22年2月5日開催）に諮り、了承された。
研究評価委員会からのコメントは特になし。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所 属、役 職
委員長	西村 吉雄	学校法人早稲田大学大学院 政治学研究科 (科学技術ジャーナリスト養成プログラム) 客員教授
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	オリンパス株式会社 新規中核事業企画本部 ヘルスケア事業開発部 企画グループ コーディネーター
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
	大西 優	株式会社カネカ 顧問
	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 取締役社長
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授
	小柳 光正	国立大学法人東北大学大学院 工学研究科 バイオロボティクス専攻 教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学 精密機械工学専攻 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	富田 房男	放送大学 北海道学習センター 所長
	架谷 昌信	愛知工業大学 工学機械学科 教授・総合技術研究所所長
宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授	

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「●」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価

1. 1 総論

1) 総合評価

本プロジェクトは、国家シナリオに基づく自動車排出ガスの超低公害化と言う大気環境保全上の位置づけや必要性から公共性が高く有意義な開発である。クリーンディーゼル車の実現に必要な要素技術として、燃焼・燃料・後処理に関連する事項に加えて大気影響・健康影響の評価まで研究対象とし、それぞれ先進的かつユニークな技術開発を精力的に進めて、目標を達成したことは高く評価できる。情勢の変化や中間評価での指摘に対して、体制・目標・評価対象などを柔軟かつダイナミックに見直して的確に対応しており、評価できる。

一方で、多様な技術が提案されているが、各技術の特徴を明確にして、最適な使用条件、制約条件、限界等を提示し、最大の効果を得るためのシナリオを示すことができたなら成果がより有機的に活用できる。その際、個別の要素技術の中に連携すればさらに発展が望めるようなケースも見受けられた。中間評価の指摘を受けてエンジン・各種後処理法・燃料の間での技術連携を進めてはいるが、有機的な連携あるいは相乗効果についてもっと定量的に検討すべきである。

<肯定的意見>

- 本事業は、国策上の位置づけ、あるいは自動車排出ガスの超低公害化と言う大気環境保全上の位置づけや必要性からも妥当かつ有意義な開発であると共に、開発の目標を達成し、全体として貴重な成果を挙げており評価に値する。今後、出来るだけ多くの成果が実用化・事業化へと展開されることを期待する。
- クリーンディーゼル車の実現に必要な技術要素として、燃焼・燃料・後処理に関連する事項に加えて大気影響・健康影響の評価まで研究対象とし、それぞれ先進的かつユニークな技術開発を精力的に進めて目標の数値を達成したことは高く評価できる。これにより、今後のディーゼル車開発の一つの方向性を示せたものと認められる。
- エネルギーフローの上流～中流～下流（燃料～エンジン本体～後処理）の全方位的な取り組みを企画しており、高く評価できる。
- またこれを推進するに当たり、産・官・学の連携を強く意識した体制を構築しており、その点でも高く評価できる。
- 情勢の変化から目標値の変更を行っていることや、中間評価での指摘に対して的確に対応しており、その時点その時点で取り組み方針を見直している点も評価できる。

- 社会状況、技術の進捗状況等により体制・目標・評価対象などを柔軟かつダイナミックに見直してプロジェクトを進めていった運営面は高く評価できる。また成果報告会が盛況であったことは、社会の関心の高さ、情報発信が如何に効果的であるかということを示している。個別のグループにおける数値目標は達成されており、成功を収めたプロジェクトであると評価できる。
- 日本の基幹産業である自動車産業において、なるべく次世代環境対応車へ適応する技術開発を率先することはよい。
- 国家シナリオに基づいたクリーンディーゼルの燃費・排気規制目標値の設定が合理的であり、総合的に目標値をクリアできている。
- 中間評価時の問題点をよくフォローして、一部の連携研究も開始されており、本プロジェクトの実施形態は合理性のあるものと感じる。
- 自動車に起因する環境問題への対応が急務であるが、今まで自動車排出ガス規制への対応は、自動車メーカーの責任において技術開発がされてきた経緯がある。これに対し、ポスト新長期規制は、世界でも最も厳しい水準を目指すものであり、その対応にメーカーの努力だけでは排出ガスの改善が進まないという視点で、本プロジェクトは推進されている。
- 環境問題の解決には、**Best Available Technology** の適用が必要であるという考え方からすれば、企業の利益を超え、公共財として環境技術を広く普及させ、環境負荷を低減するという本プロジェクトは必要であり、有益である。また、環境対策であることを念頭においてできる限り早く市場導入、普及を目指すことを前提とすることで公共性が高いと評価される。ここに **NEDO** の関与が成り立つと考えられる。
- 開発目標については、ポスト新長期規制値をターゲットに早期に大気環境の改善を図るという点では評価できる。その目標達成に向けて、既に実用化レベルにあるものと、基礎的段階にあるものが混在しているが、目標達成に必要な要素技術はほとんど網羅されていると考えられる。研究開発の進捗状況に応じて、個別技術の開発促進を図っている点は評価できる。開発成果はおおむね最終目標を達成していると考えられる。ほとんどの技術について、実用化の時点を示していることは評価できる。
- また、健康リスクの評価手法開発を同時に進めることにより、新たに開発した技術の評価を同時進行的に実施するという「予防原則」の考え方を導入したことは高く評価できる。

<問題点・改善すべき点>

- 超低エミッション化と低燃費化を目指して、エンジン・各種後処理法・燃料の間での有機的な連携あるいは相乗効果に対しても究明がなされているが、

願わくは、更に広範な究明とそれに基づいた統括の遂行が望まれる。

- 手法の異なる多様な技術開発が同じ目標に対して提案されていて、各技術をどのように組み合わせ、総合することを想定しているかがよく理解できない。各技術を差別化し、それぞれの成果に基づき特徴を明確にして、最適な使用条件、制約条件、限界、等を提示するとともに、最大の効果を得るためのシナリオを示すことが今回のプロジェクトの成果をアピールすることに繋がると思う。
- 目標値、特に燃費率の設定については、CO₂削減などの社会的要求をベースにして定量化すべきと考える。
- 欲を言うのであれば、個別の要素技術の中に連携すればさらに発展が望めるようなケースが幾つか見受けられたため、プロジェクト以降のチーム内での情報公開と連携をより密にすれば当初の計画以上の成果が見込めると期待される。
- 各テーマとしての技術課題が、一部を除き現状アイテムの延長線上（性能向上）という点が残念である。また、他の NEDO プロジェクトとの関連性、分担性を理解しきっていないが、ローカルエミッション低減に特化している点も少しバランスに欠けている。
- 燃焼、燃料、排気処理系の多様・多種の個別研究はそれぞれが高度な技術開発内容であるが、それぞれの技術の連携、体系的整理をもっと定量的に解析すべきと感じる。
- 実用化研究のため、コスト算定がもっと研究内容に盛り込まれるべき。また燃料系については、Well to Tank の解析により、コスト的・CO₂的に最適燃料の探査を今後重点的に行う必要があると感じる。
- エンジンでの種々の可変技術のより積極的な展開やパワートレイン系の内容ももっと充実すべきでは？
- 本プロジェクトは八次答申を開発目標として国費を投じて開発を行うものである。この点から、①開発技術の相互間での活用、②最終目標値をポスト新長期とするだけでなく、最終的にはガソリン車並みを最終目標として設定すべきと考える。必要な事業であることは否定できないが、最終目標が中環審告示と一致していることは、必ずしも「革新的」と言えるのかどうか疑問な点である。
- 「革新的次世代低公害車」とは、現状のディーゼル車に対して本プロジェクトにより開発された時点でのディーゼル車を意味していると考えられるが、全ての自動車を対象に考えれば、現状で最先端を行っているガソリン車より上を目指すものとするのが大気環境側からの見方になる。
- 2010 年までにポスト新長期規制に適合することが要求されているが、

NEDO プロジェクトの終了時期が 2008 年であり、ほとんどのテーマの実用時期は 2012 年以降となっている。環境改善を早期に達成するために、実用可能な技術については、できる限り早期に公開するべきである。

<その他の意見>

- 本事業における実り多い成果とそのため何らかの形で関わった多くの方々に敬意を表す。
- 対象とした手法の中には、既に実用化に近い技術がある反面、これからの開発が楽しみな夢のある技術も含まれており、今後の様々な状況にフレキシブルに対応するためのシーズが提供されたとも考えられる。
- 今後のエネルギー問題についても、オーバービューが欲しい。(新燃料検討の位置づけを明確にすべき。)
- このプロジェクトには実用に近いレベルまで検証されているグループと、未来志向の革新的技術を開発したグループが共存している。これらはそれぞれ別の評価軸で評価されるべきであろう。燃焼技術を中心とした前者は、数値目標の達成で評価できる。ただし、後者の後処理技術を中心とした技術は、今後エンジンの技術動向や社会的な要請等により価値判断が大きく左右される。このプロジェクトでは、国際的にも先進的な技術が 4 件確立されており、様々な要請に対して全方位的に対応できるバリエーションが整えられている。この点は、数値目標とは別次元での大きな価値があると感じる。
- 各課題を評価する際に、専門知識を必要とする局面が多く、私のような専門家ではない評価委員には理解が及ばない内容も含む。目標、結果のまとめ方と評価委員との適合性に工夫が必要。

実用化を前提にしているので、燃焼改善部分にいまひとつ、新規性に乏しさを感じた。一方、排気触媒系に関してはそれぞれが革新的技術内容であり、やはり今後の厳しい排気規制のため、後処理に比重が過大にかかっている。

2) 今後の提言

本プロジェクトでは各技術とも目標達成のポテンシャルが示された。今後は、その成果を踏まえて耐久性、小型化、低コスト化に取り組むことにより、想定される次期規制に間に合うよう実用化を急ぐ必要がある。提案された種々の新規燃焼システムと革新的後処理システムについて、それぞれのメリット・デメリットを明らかとして、様々な技術を有機的に融合することも含めて量産を想定した幾つかのケーススタディを行い、その適応性を検討する必要がある。10年間以上の信頼性と耐久性を要求される自動車において、十分な検証も必要であり、基礎的・共通的な基盤技術開発の範囲で後継プロジェクト等での支援も考える必要があるのではないかと。

<今後に対する提言>

- 幾つかの分野や要素技術、また基礎的研究と応用的研究など、広範な要素開発と研究分野で構成される本事業では、その開始当初あるいは進行過程で、各要素や分野等の開発に対する重点化および優先付け等の戦略性が何らかの形で検討されたと思うが、今後、この種の事業では、限られた期間と費用の下でプロジェクトの目標達成や成果取得をより一層効率的に遂行するために、この種の戦略性をもっと強く押し出しても良いのではないかと。
- 今回のプロジェクトでは各技術とも目標達成のポテンシャルが示された。今後は、その成果を踏まえて耐久性、小型化、低コスト化に取り組むことにより、実用化を目指すことになろう。一定レベルの低公害性を前提とした上でトータルのエネルギー効率を評価し、その向上を最重要課題として取り組んでいただきたい。
- 各研究において成果が出され、将来の低公害車実現の技術的選択肢は確保できたが、これらの収束（実現）に向けた取り組みも計画すべきと考える。「今後の各企業の取り組み次第」では、実現が困難な内容もある。また、ほとんどのテーマの実用化スケジュールが5年先以降であり、社会情勢の変化なども考えられ、各企業任せではなく NEDO の先導するアクションが必要と考えられる。
- 10年間以上の信頼性と耐久性を要求される自動車において、今後は実用化のための検証を充分実施する必要がある。このため後継プロジェクト等での支援が重要と思われる。
- 同一の目標へ向けて各課題の達成可能性を検討したのが、同プロジェクトであれば、それぞれのメリット・デメリットを明らかにして、量産を想定した幾つかのケーススタディを行い、その適応性を検討する必要性を感じる。
- 本プロジェクトで提案された種々の新規の革新的後処理システムと、今後の

新規燃焼システムとの広範囲の作動条件における性能保証が必要。

- 現場開発サイドにおいて健康影響を評価するために、簡易的な評価手法の開発を目指して欲しい。簡易システムが実用化されれば、開発実施者が研究途上で総合的な健康影響を評価できることになり、環境負荷の低減という本来の研究開発の方向に導くことが可能になると考えられる。
- 新たに環境基準が設定された PM2.5 は、全国的に基準超過の状況であり、道路沿道濃度が高くなっている。自動車寄与は依然として大きいものと考えられることから、本プロジェクトで開発された新規技術の早期の市場化を強く望みたい。また、わが国だけでなく、東南アジア等の新興国の環境改善のためにも、開発技術の普及を進めることが必要である。

<その他の意見>

- 自動車のエネルギー・環境関連の問題は、比較的動きが早く、また関連の国際情勢等も急変する分野である。この種の分野における開発事業では、その背後で開発や実用化等を急ぎたい、またはそれを急がせたいとする潜在的意図が働く場合も少なくないため、基本的に1事業期間の5年は長い様に思える。
- 実施期間内の成果より、次ステップの研究開発の方向性を明確にする事に努めてほしい。そのためには、さらに相互の連携を深め、様々な技術を有機的に融合することも必要となろう。
- 特に新燃料については国策が必須であり、是非 NEDO が国策化への主導的役割を果たしていただきたい。

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

本プロジェクトは、新・国家エネルギー戦略に則ったもので、ディーゼルエンジンとその搭載車両の排気超クリーン化技術開発を柱とし、CO₂削減を図るとともに、国際競争力を高めるなどの国策上からも重要なものであり、エネルギーイノベーションプログラムの目標達成に大きく貢献している。世界でも最も厳しい水準を目指すポスト新長期規制及びその次の規制への対応はメーカーの努力だけでは困難な面があり、その遂行には広範な研究開発分野や産官学の連携を必要とすることから、事業の目的等と併せて NEDO または国の関与は妥当である。

一方で、内外で開発されている技術に対して、本プロジェクトで対象とした技術の特徴と優位性を一般にもっと分かり易い形で、特に、海外技術に対する優位性を示すことが望まれる。また、NEDO が行なうに相応しい研究開発のスキームとし、その成果を各企業で利用し易くすることが望ましかった。本プロジェクトのみの支出費用を、市場の効果に対して比較する費用対効果の評価には疑問があり、不十分であると感じられる。

<肯定的意見>

- 本事業は、ディーゼルエンジンとその搭載車両の排気超クリーン化技術開発を柱とし、日本の運輸部門における環境・地球温暖化対応、省エネルギー化、新エネルギー導入促進などの国策上からも重要なものであり、またその遂行には広範な研究開発分野や産官学の組織を必要とすることから、事業の目的等と併せて NEDO または国の関与は妥当である。
- 本事業は、新・国家エネルギー戦略に則ったもので、クリーン化を進めることにより高効率ディーゼルエンジンの特性を活かして CO₂ 削減を図るとともに、国際競争力を高めることも重要な目的と考えられる。NEDO が関与し、産官学が連携して取り組む事業として妥当と認められる。
- 世界環境を維持しながら、現在の社会活動を維持するために必須である次世代低公害車の基礎技術開発を行う点で、本事業は必要であり、位置づけも高いと判断する。
- プロジェクトの当初の目的が達成され、エンジンから触媒をトータルに設計した実用に近いレベルの技術、将来的に必要となるであろう要素技術が用意されたことで、エネルギーイノベーションプログラムの目標達成に大きく貢献する成果である。またプロジェクト課題は元々公共性が高く、産官学の連携により初めて達成された成果もあり、NEDO の関与が必須であったといえる。

- より強化される排ガス規制に対する、測定技術や、その意義を検討するテーマを含み、技術開発を進める方法はよい。
- 国の低炭素化、およびトランスポーテーション分野での低炭素と各種パワーユニットの最適配置（ホロニック・エネルギー・パス）の中で、本プロジェクトは極めて重要なものである。
- 車両用動力源分野での国際競争力維持のために重要な事業である。
- 自動車に起因する環境問題への対応が急務であるが、今まで自動車排出ガス規制への対応は、自動車メーカーの責任において技術開発がされてきた経緯がある。これに対し、ポスト新長期規制は、世界でも最も厳しい水準を目指すものであり、その対応にメーカーの努力だけでは排出ガスの改善が進まないという視点で、本プロジェクトは推進されている。
- 環境問題の解決には、**Best Available Technology** の適用が必要であるという考え方からすれば、企業の利益を超え、公共財として環境技術を広く普及させ、環境負荷を低減するという本プロジェクトは必要であり、有益である。また、環境対策であることを念頭においてできる限り早く市場導入、普及を目指すことを前提とすることで公共性が高いと評価される。ここに **NEDO** の関与が成り立つと考えられる。

<問題点・改善すべき点>

- 内外で開発されている技術に対して、本プロジェクトで対象とした技術の特徴と優位性について必ずしも明らかとは言えない。ここで取り上げた技術を選定した理由と併せて、取り上げなかった技術についても言及する必要がある。また、海外の国家プロジェクトと比較して、目的、予算規模、開発技術の内容、レベル、等の観点から、本プロジェクトの狙いを明示すべきであろう。
- やや投資対効果の定量化が不十分であると感じる。（特に温暖化対策に対する定量的貢献度が若干不明確。）
- 10年間以上の信頼性と耐久性を要求される自動車において実用化を要求するには、5年間という研究期間は短く感じる。
- 海外技術に対する圧倒的な優位性があまり感じられない。**NEDO** が行なう新技術開発プロジェクトとしては新規性、独自性が少ない。
- 本プロジェクト内容は、1企業のみでの研究開発でなく、**NEDO** 等の国支援プログラムとして、日本版基盤技術のグランドデザインを示し、その基盤技術を各社が得意な分野を補強して、各社各様のバラエティ技術として展開すべきと考える。
- その意味で、より汎用性のある画期的な革新技术のシーズを生み出す研究開

発スキームとすべきと考える。たとえば、EU 諸国のように、EU 支援で EU 統合の汎用解析スキームや汎用燃焼解析ツールを基盤開発して、その成果を各企業体にオープンにして、各社がそれを基盤にしてさらなる高度化ツールを生み出すスキームが今後、日本で必要ではないか？

- 現場開発サイドにおいて健康影響を評価するために、簡易的な評価手法の開発を目指して欲しい。簡易システムが実用化されれば、開発実施者が研究途上で総合的な健康影響を評価できることになり、環境負荷の低減という本来の研究開発の方向に導くことが可能になると考えられる。

<その他の意見>

- 費用対効果について、本プロジェクトで支出した費用と、これから開発を進めて実用化・商品化・事業化された後の市場の効果を比較することで評価することに疑問を感じる。
- 最近になり一般的な世論がハイブリッド車、電気自動車に移っていることは事実であるが、大型のバスやトラックには非現実的な選択肢であり、輸送の主力としてのディーゼル車の需要は依然として継続している。日本の技術力の底力を維持し、今後の CO₂ 排出量大幅な削減目標に対しても必須の事業である。
- 新たに環境基準が設定された PM2.5 は、全国的に基準超過の状況であり、道路沿道濃度が高くなっている。自動車寄与は依然として大きいものと考えられることから、本プロジェクトで開発された新規技術の早期の市場化を強く望みたい。また、わが国だけでなく、東南アジア等の新興国の環境改善のためにも、開発技術の普及を進めることが必要である。

2) 研究開発マネジメントについて

ポスト新長期規制の 1/3 レベルを NO_x の目標にする等、排出ガスおよび燃費に対して戦略的な目標を設定し、目標達成根拠も明確である。テーマ毎にスケジュール、予算が適切に計画され、また目標達成に必要な要素技術をほとんど網羅していると認められる。設定された目標の達成に向けて技術力のある企業、研究機関からなるチームを構成し、全体をプロジェクトリーダーが統括する研究開発体制も妥当である。社会情勢の変化にも対応して、計画・目標の見直しが行なわれ、中間評価の指摘に対しては概ね良い対応が行なわれている。

一方で、目標設定が、総合システムとしての実用化シナリオを明確にした内容でなく、個々の革新的な技術開発の可能性評価に留まる内容である。実用化を視野に入れた設定があっても良かった。中間評価の指摘を受けて技術連携 WG を設置したとはいえ、各テーマ間の連携、実施者間の連携が十分ではなく、「燃焼チーム」と「後処理チーム」が別個に開発を行っている感が否めない。企業間の知財権等の問題はあるが、計画の初期段階から連携をより密にし、事業を効率的に推進すれば、さらに充実した成果が得られたと想定できる。限られた期間と費用の下で、各要素や分野等の開発に対する重点化および優先付け等の戦略性がもっと考慮されても良かった。

<肯定的意見>

- ポスト新長期の 1/3 レベルを NO_x の目標にする等、排出ガスおよび燃費に対する目標水準も、また産官学から構成される研究開発体制もそれぞれ妥当である。中間評価に対しては概ね良い対応が行なわれている。
- 各開発技術とも、戦略的に設定された目標の達成に向けて適切なチームを構成し、テーマ毎に妥当なスケジュールリングおよび予算の管理が行なわれており、動きの激しい最近の社会情勢の変化にも対応して、計画・目標の見直しが行なわれた。さらに、中間評価の指摘にも真摯に取り組む、実施体制の一部変更やテーマの追加によって改善に努めたと認められる。
- 前述の通り、開発計画、体制、中間評価を交えた計画の見直し等、良好にマネジメントされていると判断する。
- プロジェクト立ち上げ時に具体的かつ定量的な目標を設定した点、また規制値の動向を踏まえてプロジェクト進行中に目標値をアップデートした点は大きいと評価できる。スケジュール、予算は適切に計画され、また目標達成に必要な要素技術を予算内でできる範囲で最大限取り上げている。また、メンバーに入った企業は実施者として適切である。
- 具体的な数値目標が与えられていて、目標達成判断が明確でよい。各テーマに対して、専門性を有する企業、研究機関が選定されている。

- ポスト新長期規制をベースにした本事業の目標値設定は合理的である。
- 研究開発計画もパワートレイン系を除いては、網羅的・体系的である。
- また中間評価時の指摘に対しての対応も適切で、所定の成果を得ている。さらに一部の連携研究が期中から開始された点も評価できる。
- 開発目標については、ポスト新長期規制値をターゲットに早期に大気環境の改善を図るという点では評価できる。その目標達成に向けて、国内の最新の技術を網羅して開発が促進されている。既に実用化レベルにあるものと、基礎的段階にあるものが混在しているが、目標達成に必要な要素技術はほとんど網羅されていると考えられる。また、研究開発の進捗状況に応じて、個別技術の開発促進を図っている点は評価できる。
- 健康リスクの評価手法開発を同時に進めることにより、新たに開発した技術の評価を同時進行的に実施するという「予防原則」の考え方を導入したことは高く評価できる。NO_x等の規制物質が低減されていく一方で、未規制物質は後処理装置の装着により排出量が相対的に増加する可能性が否定できない。新開発技術の普及が、逆に環境負荷の増大になるか否かを事前に評価することが可能になる。
- 規制項目だけでなく、未規制物質を含めた排出特性を調査し、細胞曝露システムによる健康影響評価手法を確立したことは特に重要である。
- 全体をプロジェクトリーダーにより統括され、技術力のある実施者が選任されている。
- 開発目標の評価について、JE05、JC08だけでなく、オフサイクル対策という観点から、開発時点から多様の試験モードで確認をすべきであるという中間評価での指摘に対応した点は高く評価できる。

<問題点・改善すべき点>

- 目標水準は、開発対象や予算等にも依ろうが、基本的に開発当初の努力目標であるため、達成可能と思われる水準よりも高めの水準設定を是とする場合があって良いと思う。
- 種々の技術開発を並行して進める計画であり、各テーマ間の関連・連携が明示されていなかった。そのため、総合システムとしての実用化シナリオが明確でなかった。
- ただし、目標設定については前述の通り、社会要求や投資効果を基にした定量化がやや不十分である。
- また、企業間の知財権等の問題はあるが、事業の効率的推進のための各実施者間の連携のあり方について、もう少し見直して欲しい。
- 今回、個別グループ内での連携が充分に行われた結果として各グループの目

標は概ね達成されているが、各グループ間の連携をプロジェクト期間内でより密にすれば、さらに充実した成果が得られたかもしれない。また、5年という研究期間は革新的な技術の開発に必要な最低限の期間であり、信頼性・耐久性を検証してユーザーへの安全な技術として提供するレベルに至るまでにはあまりに短すぎる。

- 目標設定が、実用化、事業化を視野にいった設定内容になっていない。新技術の可能性評価という視点での評価に留まる設定値である。
- 各メーカーが独自に行なう場合に対して、コスト、進捗効率、知財の帰属という観点で、NEDOが行なう場合の優位性が不明。
- 実施体制も申し分なく、各社の強みを生かした総合戦略的であるが、未だ、研究開発内容が並列的・独立的な感が否めない。
- 中環審答申は今まで企業努力による低減技術開発が可能であるということ为前提に規制目標値が設定されてきた経緯がある。これに対し、本プロジェクトは八次答申を開発目標として国費を投じて開発を行うものである。

本プロジェクトにおいて、必ずしも実施者間の連携が十分とはいえない状況が見受けられた。特に「燃料チーム」と「後処理チーム」が別個に開発を行っている場合もあり、車両トータルとしての評価はシミュレーションによっているとのことであったが、実際のチューニングによる確認が必要ではないかと思われる。さらに、本プロジェクトで2008年時点で実用化に至らなかった技術についても、定常試験や法定モードだけでなく、現時点からオフサイクルを認識して開発を進めて行くことが肝要である。以上を踏まえて、

- ① 開発技術の相互間での活用を図ること
- ② 目標値をポスト新長期とするだけでなく、最終的にはガソリン車並みを最終目標として設定すべきであることを望みたい。

<その他の意見>

- 広範な要素開発と研究分野で構成されるこの種の事業では、限られた期間と費用の下でプロジェクトの目標達成等をより一層効率的に遂行するために、各要素や分野等の開発に対する重点化および優先付け等の戦略性を何らかの形でもっと強く打ち出しても良いと思う。
- 技術委員会の果たすべき役割はある程度理解できるが、それがプロジェクト推進の中で各年度毎にどのように機能してきたのかが明確でない。
- 「実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して関与を求める」のはこの次の段階のプロジェクトに求められる課題であろう。

3) 研究開発成果について

成果は概ね目標値を達成していると共に、中間評価での指摘事項も含め、目的と目標に照らして全体的に妥当かつレベルの高いものと言える。論文や多くの学会発表を通じて成果の公表にも積極的に努めているほか、相当数の特許出願もなされていることは評価できる。本プロジェクトの燃費・排気エミッションの成果は、今後ディーゼルエンジンが市場に受け入れられて行くための環境適合技術として重要なものである。

一方で、成果の詳細についての情報が不十分であり、従来システムや他の競合技術と比較しての特徴や競合優位性を提示することが望まれる。今後の課題についても、技術的な具体的ブレークダウンがやや不足している。連携あるいは相乗効果に対しては、更に広範な究明とそれに基づいた統括の遂行が期待される。成果の普及に関して、環境改善の早期達成に向けた各自動車メーカーへの公開が望まれる。また、一般に対する情報発信が不足しており、工夫が必要である。

<肯定的意見>

- 本事業での成果は、目標を達成していると共に、中間評価での指摘事項も含め、目的と目標に照らして全体的に妥当かつレベルの高いものと言える。また、成果は然るべき数が国内外で論文また特許として広く情報発信されている。
- 全てのテーマで目標値を達成し、概ね計画に沿ったスケジュールで世界最高水準の成果が得られたと思われる。論文や多くの学会発表を通じて成果の公表にも積極的に努めているほか、相当する数の特許出願もなされていると認められる。
- 各研究とも最高水準の目標を達成しており、評価できる。
- 知財権の取得も多数、適切に行われており、評価できる。
- 成果の普及についても、適切に社会へ情報発信しており、評価できる。
- 成果は概ね目標値をクリアしている。全体としては 90%以上の目標達成率であると評価できる。また、知的財産権等の取扱、論文発表、学会発表に関しては、研究内容を踏まえ適切に行われている。
- 目標そのものの妥当性は別項でコメントしたが、本プロジェクトでの目標に対する達成度は高く、評価できる。
- 目標の達成度については、一部推定値などがあるものの、概ねクリアできており、成果としては十分と感じる。
- 本プロジェクトの燃費・排気エミッションの成果は、今後のディーゼルエンジンの死命を制する上で重要なものである。

- 開発成果は概ね最終目標を達成していると考えられる。

<問題点・改善すべき点>

- エンジン・各種後処理法・燃料の間での有機的な連携あるいは相乗効果に対して究明がなされているが、願わくは、更に広範な究明とそれに基づいた統括の遂行が望まれる。
- 目標値が達成された際の条件が必ずしも横並びに示されておらず、各テーマの成果をイーブンに比較・評価し辛い。例えば、燃焼改善の技術に対してはシステム全体の大きさ・重さ、等について、後処理技術に対しては種々の運転条件における空間速度や触媒量、等について、従来システムとの比較を含めた情報を出来る範囲で提示することが望まれる。
- 今後の課題について、技術的な具体的ブレークダウンがやや不足していると感じる。(このため、実用化へのスケジュールとストラテジーの説得力がやや欠けていると感じる。)
「相乗効果」についての成果は、やや不十分。
- 成果の発表が、学術論文等の専門分野における範囲でしかされていなく、一般に対する情報発信が不足している。高い専門性によるためその困難さは想像に易いが、納税者である一般国民が理解できる表現方法、発信形態への工夫が必要。
- 今後の燃料の多様化、燃料生成コストなどを勘案した場合、本プロジェクトでは燃料面のアプローチが弱い感がある。

<その他の意見>

- 開発研究では、未踏分野への挑戦と言う面があるため、時に失敗やトラブル更に目標不達成等も起こり得る。もしその様な事態が多少でも生じたとすれば、失敗時のデータや目標不達成に至った事由等は貴重なデータであるため、破棄することなく後の参考資料として何らかの形で残すことが望まれる。
- 本成果を踏まえ、ここで提案された技術が他の競合技術と比較してどのような特徴および優位性を持つかについての言及が少なかったように感じる。
- 技術的には世界トップの目覚ましい成果が得られたものの、ここで得られた成果による市場の拡大・創造は、世論の動向、政府による規制等の政治的な因子により大きく左右される。特に自動車市場は消費者や社会の"ムード"に左右されるため、技術の卓越性のみでは市場規模の予想が難しい。
- 工学的技術開発である本プロジェクトにおいては、その原理的発明を重視するよりも、量産性や競合優位性を重視すべきではないだろうか。後者の観点では成果はあまり得られていないと感じる。
- 成果の普及に関して、本プロジェクトの開発技術内容をより一般化・普遍化

して、各自動車メーカーにオープン化して、各社の強みを生かしたさらなる高度化技術の醸成が必要と感じる。

- 環境改善を早期に達成するために、実用可能な技術については、プロジェクトの終了を待たずに公開するべきである。

4) 実用化、事業化の見通しについて

クリーンディーゼル車の開発は自動車メーカー各社が近い将来の実用化、事業化を目指して取り組んでいる課題であり、各テーマとも、実用化へのある程度の道筋を計画しており評価できる。人材育成に関しても一定の効果を上げている。

一方で、多くのテーマが、研究試作レベルでの性能評価にとどまり、実用化への具体的なシナリオが明確ではない。競合技術との比較も含めて、課題とその解決の方針・見通しを明らかにする必要がある。事業化までの最大の課題は耐久性の確認であり、安全性保証の観点から十分な検討が必要である。今後、技術の更なる進展に対して何らかの形で NEDO の協力や支援が望まれる。ポスト新長期規制やその次の規制への対応に向けて、実用可能な技術については、できる限り早期に公開することを検討すべきである。

<肯定的意見>

- 成果の実用化や事業化への見通しについては、課題も含めて概ね妥当な検討がなされており、今後の展開によって実用化等が期待できるものが多いと思う。
- 付带的また間接的な成果として、開発に直接関わった組織や企業等を中心に、技術力の強化と関連技術者の育成が促進されたことに加え、この事業の存在それ自体が、広く他の関連組織や企業等におけるこの種の研究開発に少なからぬ刺激、つまりある種の波及効果を付与したことが挙げられる。
- クリーンディーゼル車の開発は自動車メーカー各社が近い将来の実用化・事業化を目指して取り組んでいる課題であり、本プロジェクトはその指針となる技術シーズを提供するものとして評価できる。さらに、ここで提案され、研究開発された個々の成果は、いずれもエネルギー資源の有効利用や CO₂ 低減など今後の社会的要求と深く関連するものであり、当該分野の発展に対して大きな波及効果が期待できる。
- 各テーマとも、実用化へのある程度の道筋を計画しており、その点は評価できる。
- 元々実用的な側面の強いプロジェクトであり、排ガス規制値を念頭に設定された目標値をクリアしたことで、成果の産業技術としての適用可能性が明確に示されている。また、波及効果については最終報告会でも話題に出たが、本プロジェクトで開発された新技術は一部関連分野への技術の転用も期待できるものがある。さらに最終報告会での若手研究者の発言も多く、人材育成に関しても一定の効果を上げていると判断される。
- 一部のテーマでは、実用化を前提にした場合の課題の明確化が行なわれている。

- 燃焼改善研究面での冒険が少なかった分、実用化の見通しは大である。
- 後処理系の技術開発に高い新規性が認められる内容があり、これらの早期の実用化に期待したい。
- ほとんどの技術について、実用化の時点を示していることは評価できる。

<問題点・改善すべき点>

- 個々の技術自体についてプロジェクト終了後の研究開発の進め方や、実用化への具体的なシナリオが明確に示されているとは言えず、競合技術との比較も含めて、課題とその解決の方針・見通しを明らかにする必要がある。
- ただし前述の通り、技術的な課題のブレークダウンがやや不十分であり、それを基にした実用化シナリオとなっていないため、今後の計画の説得力に欠ける感触がある。
- 事業化に繋げる NEDO の取り組みが欲しい。
- 事業化までの最大の課題は耐久性の確認であり、安全性保証の観点から十分な検討が必要と思われる。元々耐久性を確認には 5 年のプロジェクト期間は短すぎる。このため後継プロジェクト等で今後の研究をどのように進めるかについて、もう少し具体的な提案があると良いと思った。
- 多くのテーマが、研究試作レベルでの性能評価にとどまり、実用化へ向けた可能性や試算についての検討が不十分で、課題がある場合にも、その明確化について具体性を欠いている。
- 研究体制がそれぞれ個別的な面があり、エンジンシステム全体的な実用化の面ではまだ多少の時間がかかると認識する。
- 2010 年までにポスト新長期規制に適合することが要求されているが、NEDO プロジェクトの終了時期が 2008 年であり、ほとんどのテーマの実用時期は 2012 年以降となっている。環境改善を早期に達成するために、実用可能な技術については、できる限り早期に公開すべきである。

<その他の意見>

- 本事業の成果には、引き続き開発を進めてみたい技術、あるいは実用化等の先行きが必ずしも鮮明ではないが新規制に富んだ興味深い技術等が存在する。今後、場合によっては、このような技術の更なる進展に対して何らかの形で NEDO の協力や支援が望まれる。
- 本プロジェクトでは多種多様な要素技術が含まれているので、それら全てについて実用化への道筋を一律に示す必要はないと思われるが、少なくとも個々の特徴を踏まえて実用化のための条件を明確にすることが望まれる。

- 本プロジェクトを起点として、今後、より体系的・一般的な開発技術の公開を行って、大きな波及効果を生む仕組み作りが必要であろう。

2. 個別テーマに関する評価

2. 1 新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化及びバイオマス燃料利用に関する動向及び技術課題の調査

1) 研究開発成果について

高過給・多量 EGR システム、高圧噴射・燃焼システム、後処理システムにそれぞれ独自の重要な要素技術を開発し、それをエンジンシステムに適用・装着して、乗用車および大型車の双方において超低エミッションと高い燃費改善目標を達成しており、現時点で世界最高水準の成果が得られたと評価できる。特許出願や論文発表を通じてそれらの成果の普及にも努めている。バイオマス燃料については、現状の燃料性状と利用に関する動向が体系的に整理されている。

一方で、新燃焼システムの基礎研究の成果がエンジンシステムの開発にどの様に反映されたのか明確には示されていない。バイオマス燃料利用調査については、エンジン性能との定量的相関など、ポテンシャルを把握し課題を抽出するまでには至っていない。

<肯定的意見>

- 幾つかの重要な要素技術を開発し、それをエンジンに適用・装着して排ガスと燃費の目標を達成する等の成果を挙げている。その成果は幾つかが学術論文や特許等として然るべく情報公開されている。この場合の要素技術は、他のエンジンに対しても適用や応用が可能である。
- 乗用車および大型車の双方において超低エミッションの実現に加え、高い燃費改善目標を達成しており、現時点で世界最高水準の成果が得られたと評価できる。特に、高過給・多量 EGR システム、高圧噴射・燃焼システム、後処理システムにそれぞれ独自の技術を開発し、特許出願や論文発表を通じてそれらの成果の普及にも努めている。また、中間評価の提言を受けてバイオマス燃料利用の調査を実施している。
- 各エンジンシステム及び後処理については、それぞれ極めてアグレッシブなシステムにチャレンジし、相応の成果を挙げた点は高く評価できる。
- バイオ燃料についても、問題点の整理がなされており、一定の評価ができる。
- いすゞによるエンジン開発は機能的かつ計画的に進められた研究の上立った堅実な成果である。産業総合研究所の廃熱回収型コンバータは創意工夫にあふれたユニークな技術であると感じた。またマツダを中心とするグループの成果はエンジンと触媒のマッチングが非常に優れていた好例。ナノレベルの材料開発が耐久性を要求される自動車触媒に生かされており、学問的にも価値が高い。

- 燃焼技術と後処理を統合的に開発し、一定の成果を出している点。後処理においても動作温度環境、耐久要件まで評価し、性能維持の目処がついている点。バイオマス燃料利用に関する動向および技術課題の調査についても、よくまとまっていて、参考になる。
- いすゞ-AIST ; システムティックな研究で、PCI 燃焼と触媒系を主体とした全体システム系コンバインド研究として効率・排気面での成果が充実。使用燃料に対する排気特性結果も合理的。
- バイオマス燃料 ; 現状の燃料性状の体系的な整理はなされている。
- マツダ ; ITIC-PCI 燃焼に新規性あり。シングルサイズ NO_x 触媒に大きな新規性が認められる。
- 超高度燃焼制御エンジンシステムの研究開発/省エネ型 NO_x コンバータの研究開発において、CO を還元剤とする新型 NO_x 触媒、省エネ型コンバータの開発など新規性のある開発がされている。また、実験室レベルでの最終目標はほぼ達成されていると評価できる。
- 超低エミッション高効率乗用ディーゼルエンジンの研究開発及びナノテクノロジーを応用した高性能排ガス浄化用触媒の研究開発において、最終目標はほぼ達成されていると評価できる。

<問題点・改善すべき点>

- 要素等の技術開発では、高性能化を志向するほど、要素やシステムが複雑かつ高価になりがちであって、それが後の実用化等への障害になることが懸念される。欲を言えば、当初の開発企画段階から、関連要素を出来るだけシンプルかつ低コストにするための検討と対応を更に遂行することが望まれる。
- エンジンシステムの開発に際し、新燃焼システムの基礎研究の成果がどの様に反映されたのか、あるいは今後どのように役立てるのが示されておらず、各成果を連携することの必要性が不明確である。バイオマス燃料利用調査については、バイオディーゼル利用の動向を教科書的にまとめた内容に留まっており、ポテンシャルを把握し課題を抽出したとは言えない。
- やや「技術偏重」の感がある。その結果はそれで良いが、もう少し商品性を意識したシステム評価があっても良いのではないか。
- いすゞ+産業総合研究所チームの触媒技術に今回開発した新技術が生かされていれば良かった。
- いすゞ-AIST ; 燃料が1種のみで、燃料多様性での確認が必要。3段 T/C の費用対効果は？
- バイオマス燃料 ; 期中からの開始のため、性状調査が主で、エンジン性能との定量的相関が不明確。

- マツダ；新規燃焼方式と EGR 系とのマッチングにおいて性能の変動幅がどのようなかの検証が必要と感じる。新規触媒系のメカニズム検証が不十分で、実用化にかなりの時間が必要と感じる。
- 超高度燃焼制御エンジンシステムの研究開発/省エネ型 NO_x コンバータの研究開発において、実験室レベルでの目標値達成としており、商品開発は 2014 年以降というスケジュールは再検討が必要である。また、オフサイクルの観点から他のモード、特に渋滞走行モードにおいても確認すべきである。
- バイオマス燃料利用に関する動向及び技術課題の調査において、バイオマス燃料の車両適用例の調査について、種々のトラブルやその対応策の調査が不十分である。トラブル等の経験をフィードバックしていくことが技術課題の解決に繋がっていく。

2) 実用化、事業化の見通しについて

エンジン開発の目標達成のために採用された技術は、いずれも実用化を意識したものであり、各エンジンシステムと後処理について、技術的な課題整理と方針検討がなされている。今回の成果は、実用化への道筋が見込まれるものも多く、全てではないまでも実用化等への期待が持てる。

一方で、本事業での開発エンジンは、低エミッション・高性能化のための優れた開発要素が幾つか組み込まれているが、採用した技術を組み合わせる必要性の議論が不足しており、新技術の優位性は必ずしも明らかでない。コスト面等でエンジンの実用化や事業化が容易ではないことが予想され、コストや信頼性の面でのより定量的な具体的課題の整理と取り組み計画の検討を行い、コスト低減に向けた努力も必要である。

<肯定的意見>

- 実用化や事業化について、その際の課題も含めて妥当な検討がなされている。今回の成果は、実用化への道筋が見込まれるものも多く、全てではないまでも実用化等への期待が持てる。
- エンジン開発の目標達成のために採用された技術は、いずれも実用化を意識したものであり、事業化までの過程は明確と言える。研究開発を加速し、各要素技術を早期に市場投入することが期待される。
- 各エンジンシステムと後処理については、ある程度の技術的な課題整理と方針検討がなされている。
- 産業総合研究所といすゞを中心としたチーム、マツダを中心としたチームともに、エンジン開発と触媒開発のコラボレーションがうまく生かされたプロジェクトであり、実用化への道筋が見える優秀な成果を上げている。
- 実用化への課題とスケジュールに具体性がある点。
- いすゞ-AIST；熱回収コンバータ部分以外の実用化見通しは大

<問題点・改善すべき点>

- 本事業での開発エンジンは、低エミッション・高性能化のための優れた開発要素が幾つか組み込まれており、コスト面等でエンジンの実用化や事業化が必ずしも容易とは思えない。実用化等に向けて、特にコスト低減への努力が求められる。
- クリーンディーゼルエンジンの次世代技術として期待される多くの技術要素を盛り込んだ意欲的な研究開発を実施したと評価できるが、採用した技術を組み合わせる必要性の議論が不足している。特に、群噴孔ノズルやLP-EGR および予混合燃焼の採用、三段過給やカムレスシステムなど、本エ

ンジン開発に採用した新技術の優位性は必ずしも明らかでない。他の競合技術と信頼性・耐久性を含む実用化を加味して比較・検討した結果を示すことが、本開発システムのさらなる進展に繋がると考える。

- コストや信頼性の面での実用化（商品化）のための定量的な具体的課題の整理と取り組み計画の検討が不十分である。
- バイオ燃料については、より具体的なエンジンシステムへの要求、燃料に対する要求についての整理が欲しい。
- 今後の実用化において、廃熱回収型コンバータにおける圧力損失の低減が課題となるであろう。
- 暫定でもコスト試算があればより明確。
- マツダ：新規燃焼方式の稼働条件全域での性能確認と、新規触媒系の排気低減メカニズムの確認が必要で、実用化になお時間を要する。
- 超高度燃焼制御エンジンシステムの研究開発/省エネ型 NO_x コンバータの研究開発において、実験室レベルでの目標値達成としており、商品開発は 2014 年以降というスケジュールは再検討が必要である。
- 超低エミッション高効率乗用ディーゼルエンジンの研究開発及びナノテクノロジーを応用した高性能排ガス浄化用触媒の研究開発において、商品開発の予定が 2012 年からとなっており、前倒しを検討すべきである。

3) 今後に対する提言

超低エミッション・高効率なエンジンの実用化等に向けた技術開発が更に進展し、実エンジンの最適な設計・運転制御方法が提案されることを期待する。バイオ燃料については、より具体的なエンジンシステムへの要求、燃料に対する要求についての整理が必要であり、Well to Tank 解析を考量した最適な燃料の組み合わせやエンジン設計へのアプローチの提案を期待する。実用化検討、事業化検討の前倒しに向けた取り組みが望まれる。

<今後に対する提言>

- 本事業での成果を基盤にして、超低エミッション・高効率なエンジンの実用化等に向けた技術開発が何らかの形で更に進展することを期待する。
- 提案した要素技術の実用化を進めるとともに、その際に基礎研究の成果に基づいて効果をモデル化するなどして一般化し、実エンジンの最適な設計・運転制御の検討に活用することが望まれる。
- 実用化への取り組みについても、NEDO が先導して欲しい。
- 産業総合研究所により開発された CO-SCR 触媒は今回開発のエンジンとの相性が良くなかなかただけで他のエンジンとのマッチングにより高性能を発揮する可能性もある。今後の検討に期待したい。
- 他の革新的後処理装置に対する優位性や位置づけを明確にして欲しい。
- いすゞ-AIST ; より革新的な燃焼方式の組み込みが期待される。
- バイオマス燃料 : Well to Tank 解析を考量した広範囲な最適な燃料の組み合わせの提案を期待したい。また燃料主体のエンジン設計へのアプローチが今後必要。

2. 2 GTL を用いたエンジン技術の開発

1) 研究開発成果について

各種エンジンでの性能調査、GTL 混合率による性能調査、GTL の特質を生かしたエンジン諸元の最適化、材料適合性、未規制物質の評価など、網羅的・体系的な研究で信頼性のある成果が得られている。費用対効果にも優れており、低エミッション・高効率の目標値を達成したことは高く評価できる。

一方で、エンジン試験結果の燃料製造へのフィードバックによる更なる性能改善の検討、ならびに、BTL (Biomass to Liquid) などへの展開など、より広範囲な燃料での検証が望まれると同時に、他の実施者 (エンジン開発、後処理開発) との連携企画が推進者・事務局として早い段階でスタートできれば良かった。

<肯定的意見>

- エンジンの出力性能や排気に対する GTL 使用の影響は定性的に新しい知見とは言えないが、本事業の成果としてその影響が各種のエンジンで定量的に確認され、更に耐久試験、材料適合性、未規制物質などへの影響も検討されたことは有意義であって、今後の実用化に向けた資料として貴重である。
- 小型～大型 (2～8L) の 3 種類のエンジンに、蒸留性状とセタン価の異なる 3 種類の GTL 燃料を適用して性能および排ガス試験を実施することにより、GTL 運転の基本特性が示されたと認められる。さらに、高セタン価、低アロマの燃料特性を活用したエンジン諸元の最適化コンセプトを提示するとともに、低エミッション・高効率の目標値を達成したことは高く評価できる。
- GTL 燃焼利用による Smoke 低減を実証し、エンジン最適化の方向性を明確に示した点で高く評価できる。
- 開発費を考慮すると、費用対効果としては優れている。現行車両に使用する場合の影響が明確になり、参考になる。
- 各種エンジンでの性能調査、GTL 混合率による性能調査、GTL 特質を生かしたエンジン諸元の最適化、材料適合性評価など、網羅的・体系的な研究で信頼性のある成果が得られている。
- 最終目標はほぼ達成されていると評価できる。
- 未規制物質の計測を行ったことは評価できる。

<問題点・改善すべき点>

- 3 年間の取り組みの成果としては、不十分。“やってみただけ”の印象がある。3 年間の取り組みであれば、「調査」だけではなく、より具体的な結果 (エンジンへの要求、燃料への要求) が欲しい。元々の目標設定に問題ありか?

- エンジン試験結果を燃料製造にフィードバックして、更なる性能改善が得られることを確認試験しておらず、最適化の方策が必ずしも実証できたとは言えない。
- より広範囲な燃料での検証、とくに BTL (Biomass to Liquid) などへの展開研究が欲しいと感じる。
- 他の実施者 (エンジン開発、後処理開発) との連携が不十分であるように思われる。感度解析的な調査である。

2) 実用化、事業化の見通しについて

エンジン技術に加えて、材料適合性の調査から現有の燃料インフラ利用の可能性を示し、GTL を用いた場合のエンジン最適化検討もされ、技術的なレベルとしては十分な成果が得られている。その利用形態によっては実用化、事業化の可能性は高い。

一方で、燃料供給に関する実用化・事業化は、原料価格、税金措置、等の社会的・経済的な因子に強く影響されるので、GTL とエンジンの適合性とは別に、GTL の性状、資源性、コスト等の燃料要件に対する将来動向にも配慮した事業化の推進を期待する。

<肯定的意見>

- GTL は、供給インフラも含めてエンジン利用が比較的容易なだけに、その利用形態によっては実用化そして事業化の可能性は高い。
- エンジン技術に加えて、材料適合性の調査から現有の燃料インフラ利用の可能性を示し、実用化・事業化への見通しを明確にしている。
- 燃料供給に関する実用化・事業化は、原料価格、税金措置、等の社会的・経済的な因子に強く影響されるが、技術的なレベルとしては十分な成果が得られている。
- GTL を用いた場合のエンジン最適化検討もされていて、今後の実用化およびその際の性能予測が可能となる。
- 実用化に関しては、使用した GTL については極めて高い実用化可能性がある。

<問題点・改善すべき点>

- GTL とエンジンの適合性とは別に、GTL の性状、資源性、コスト等の燃料要件に対する将来動向にも配慮・検討が必要である。
- GTL 燃料の設計について、製造時の炭化水素組成・構造の自由度やそれらに要するエネルギー量の変化や課題などを公開できる範囲で明示し、燃料性状の最適化の可能性を明らかにされることが望まれる。
- 計画段階での目標設定、取り組み内容の検討が不十分であったのでは？

3) 今後に対する提言

GTL 燃料のサルファーフリーの特性を活用し、後処理技術と組み合わせでどこまで高効率化が達成できるかを追及して欲しい。BTL なども含めた Well to Tank 解析を考慮した広範囲な最適な燃料の組み合わせの提案を期待する。事業化には、技術的要素よりも、エネルギーの安全保障政策に関わる面が大きい。海外の動向も随時ウオッチングすることが望ましい。

<今後に対する提言>

- 今後、バイオマス由来の BTL についても関連の検討が進められることを期待したい。
- GTL 燃料のサルファーフリーの特性を活用し、後処理技術と組み合わせでどこまで高効率化が達成できるかを追及して欲しい。
- 実用化への取り組みについても、NEDO が先導して欲しい。(特に国策の面など)
- せっかくの良い成果であるので、さらに外部への発表を積極的に行っていたきたい。
- 海外の動向も随時ウオッチングしておきたい。
- Well to Tank 解析を考慮した広範囲な最適な燃料の組み合わせの提案を期待したい。また燃料主体のエンジン設計へのアプローチが今後必要と感じる。
- 事業化には、技術的要素よりも、エネルギーの安全保障政策に関わる面が大きい。都市環境対策として、一部都市に燃料として供給するメリットは現時点では疑問がある。

2. 3 革新的後処理システムの研究開発

1) 研究開発成果について

クリーンディーゼルエンジンの実現に不可欠な後処理システムの開発に関して、現有システムの高度化および新規な技術に挑戦し、目標とした排ガス低減性能を達成しており、高く評価できる。低温プラズマシステムは特に新規性の高い革新的かつ秀逸な技術であり、他の ECR システム、プラズマアシスト SCR システム、SCR/DPF システムも先進的な技術である。いずれも、現実的な選択肢として評価できる。

一方で、本プロジェクトで開発した各後処理システムの性能を比較できるデータが示されておらず、それぞれの特徴が解りにくい。また、各システムについて、所定の機能を発揮するために必要な構成要素の詳細を提示することが望まれる。

<肯定的意見>

- 後処理に関わる開発では、新規性の比較的高い幾つかの技術に挑戦し、全体として優位性に富んだ成果をあげたと思う。プラズマ利用による PM 酸化や SCR 脱硝の促進、また SCR 機能添加 DPF での NO_x・PM 同時処理などについて、技術的に優れた成果を挙げており評価できる。特にプラズマ利用 PM 酸化では貴金属触媒を使用せずに PM の低温酸化が促進される点が興味深い。
- NO_x・PM 同時分解については、新たな電気化学手法によっても、少ない燃費犠牲の下で後処理が可能であることが検証されており、同様に評価したい。
- クリーンディーゼルエンジンの実現に不可欠な後処理システムの開発に関して、現有システムの高度化および新規な手法の提案を行い、いずれも革新的な技術を取り入れることにより、目標とした排ガス低減性能を達成したと認められる。
- ダイハツ工業のプラズマ DPF については、少ない貴金属使用量で低温時を含む PM 酸化除去を狙っており、電圧を効果的に変化させて省電力化を図るとともに、静電捕集およびプラズマ触媒活性によって目標とする浄化性能が得られている。
- 立命館大学の電気化学反応による NO_x・PM 除去手法の提案は斬新であり、3 相界面を形成する電極・電解質の構造解析により微細構造セルを開発し、目標を達成している。
- 日産ディーゼルの尿素 SCR の高度活用による NO_x・PM 同時低減システムを新たに提案し、浄化率の目標を達成している。
- 日野自動車については、プラズマアシストにより SCR システム低温浄化性能を高めるとともに、基材改善を施した DPF と組み合わせて NO_x・PM 排

出量の目標値を達成している。

- マツダ自動車では、NO_x 吸蔵還元触媒において粒子をナノサイズ化して活性を高め、さらに中空 3 次元構造により耐久後も浄化性能を維持して目標とする浄化率を達成しており、乗用車用 DeNO_x 触媒の可能性を示したものとして評価できる。
- いずれの取り組みも、現状とは異なる新しい着眼点のシステムにチャレンジし、かつ相応の技術的成果を出した点は高く評価する。
- 実用化に近いシステムも併せて取り組んでいることも評価できる。
- “革新的”との研究テーマに沿った成果が得られている。ダイハツが開発した低温プラズマ反応器は革新的かつ秀逸な技術であり、その完成度も含めて高く評価できる。排気ガス温度に左右される従来の触媒コンバータとは異なりエンジンの ON-OFF にうまく適合できる技術であるので、ディーゼルハイブリッド車への応用を期待したい。先進性では立命館大学・堀場の電気化学的 ECR システムも興味深い技術である。日野自動車および日産ディーゼルの技術は実用化の目処が立ち、現実的な選択肢として評価できる。
- 低温プラズマシステムについては、新規性もあり、その実現可能性が明らかとなった点。
- ダイハツ；高い新規性技術で PM の大幅低減で得られ、今後の発展が期待できる。
- 立命館；これも新規性の高い技術開発で、平板セルで大きな低減実績が評価できる。
- 日野自動車；プラズマアシスト SCR で PM、NO_x の低減成果は目標通り得られている。
- 日産ディーゼル；SCR/DPF システムは従来技術の組み合わせ改良的なものではあるが、排気低減成果が認められ、実用化可能な重要な研究と認識する。早稲田大学の解析部分で、簡易モデルによる触媒系の最適配置研究の成果が貴重である。
- 最終目標はほぼ達成されていると評価できる。

<問題点・改善すべき点>

- 本プロジェクトにおいて開発した各後処理システムの性能を比較できるデータが示されていない。所定の機能を発揮するために必要な構成要素（センサーや制御方法を含む）、反応器の寸法（もしくは SV 値）の他、出来れば触媒の種類や量、等の情報を、各システムについて提示することが望まれる。
- いずれのテーマも論文発表により成果の公表に努めているが、立命館大学のテーマについては電気化学分野で論文を発表し、評価を得る必要があろう。

- 新システムであり、まずは技術開発という点は理解するが、コスト、信頼性等の商品性についても意識しておくべきと考える。
- 低温プラズマシステム以外の後処理システムは、既存アイテムの延長線上であり、耐久評価においては課題が残る点が残念。各システムの相対比較（それぞれの特徴）が解りにくい。
- ダイハツ；排気成分低減メカニズム、NO_x 増加懸念などの問題が残る。
- 立命館；ハニカムモジュールでの PM、NO_x 低減量の推定に若干の不安あり。
- 日野自動車；プラズマアシスト SCR における各調査項目の排気低減寄与度が不明確。またプラズマ効果の温度依存性の定量的検証が必要と感じる。また NO_x 吸蔵型については新めて本プロジェクトで実施検証の必要性を感じない。
- 日産ディーゼル；SCR/DPF システムで、触媒表面で PM が酸化する機構は触媒劣化に繋がらないか？また、15 枚目スライドの NO_x 浄化率向上の燃焼改善による 4.4%の燃費改善の定量的な検証は？早稲田大学の解析部分で、種々のサブモデルのさらなる高精度化を今後期待したい。
- 革新的後処理システムの研究開発（低温プラズマシステム）において、JC08 を評価モードとしているが、transient mode をエンジンマップではなく、実走行による評価が必要となる。
- 電気化学的手法による革新的後処理システムの開発において、最終目標はほぼ達成されているが、ハニカム型モジュールでの評価では達成予定にとどまっている。

2) 実用化、事業化の見通しについて

各システムとも実用化への課題を検討・提示しており、今後の展開によって実用化が期待できる。特に、DPF+尿素 SCR については、比較的近い将来の実用化の可能性があり、他のシステムについてもそれぞれポテンシャルがある。

一方で、技術の進展や社会的環境の変化に対する現時点での見通しを踏まえて、実用化・事業化に必要なエンジン排ガスやコストに係る条件などの技術的課題のブレークダウンとそれに基づくシナリオを明確にすることが必要である。特に、比較的新規性の高い技術を基盤とする後処理法の開発では、実用化への具体的な可能性が見え難い。

<肯定的意見>

- 開発された後処理技術の幾つかは、今後の展開によって実用化が期待できるものと思われる。
- 各システムとも実用化への課題を検討・提示している。特に、日産ディーゼルの NO_x・PM 同時低減システムについては、メカニズムの解明、設計への応用および耐久性を含め、事業化に近い検討がなされていると認められる。
- いずれの技術もプラズマや電気化学反応の利用、あるいはそれらのアシストを利用したものであり、従来よりも広範かつフレキシビリティの高い利用が可能な技術が出揃ったと感じている。
- プラズマシステムは、新しい分野での産業が期待される。
- ダイハツ；最適な Wavy-mesh 構造が確定すれば、従来の排気触媒系への適用は比較的容易かもしれない。
- 立命館；PM、NO_x の同時低減のポテンシャルがあり、早期実用化が期待できる。
- 日野自動車；NO_x 吸蔵還元型に関してはすでに実用化段階である。
- 日産ディーゼル；従来技術の最適な組み合わせ技術のため、実用化見通しは大と感じる。
- 革新的後処理システムの研究開発（日野自工、豊橋技術科学大学）において、DPF+尿素 SCR については、近い将来の実用化の可能性が高い。

<問題点・改善すべき点>

- 新規性の比較的高い技術を基盤とする後処理法の開発では、実用化への具体的な可能性が見え難い様に思われる。
- 技術の進展や社会的環境の変化に対する現時点での見通しを踏まえて、実用化・事業化に必要なエンジン排ガスやコストに係る条件について明確にすることが必要と考える。

- ダイハツ工業のプラズマ DPF については、リアルワールドの運転条件で生じる多様な性状の PM についても除去・処理を確実にを行うことを保証するとともに、耐久性・信頼性を高める必要がある。
- 立命館大学の NO_x・PM 除去手法については、銀電極の長期安定性、セル構造の最適化、電極の表面形成など、実用化への課題は多い。
- 日産ディーゼルの NO_x・PM 同時低減システムについては、事業化に近いとは言えるものの、耐久後および多様な温度条件下での安定した性能を確保する必要があり、現象解析・シミュレーションによる知見を活用して更なる技術開発を進める必要がある。
- 日野自動車において新たに開発したプラズマアシスト SCR については、原理・構造は比較的わかりやすく見通しが良いものの、実用化には触媒量の低減の他、触媒器の材料・形状・担持方法を含む総合的な検討が必要である。
- マツダ自動車のナノサイズ NO_x 吸蔵還元触媒については、所定の浄化性能を発揮するための条件を明確にする必要があり、実用化にはそれに適合する触媒を安定して製造する技術の開発・確立が必須と考えられる。
- いずれも新技術という側面があることは理解するが、実用化、事業化のための技術的課題のブレークダウンと、それに基づいたシナリオの検討が不十分。
- 今後は耐久性および燃費を含めた検証が必要であろう。また、コンバータデザインへの工夫により後処理能力の向上にはまだ”伸びしろ”があるように感じる。
- いずれのシステムも、量産レベルと時期を前提としたコスト試算がなく、実用化への評価が難しい。
- ダイハツ； Wavy-mesh 構造の最適化などにさらなる調査研究が必要か？
- 立命館；新規な触媒系のため、エンジンー排気系全体システムでの体系的評価研究がさらに必要と感じる。さらに実績のある平板構造を生かした新規排気流動系が設計できないか？
- 日野自動車；本プロジェクトの主題のプラズマアシスト SCR に関しては、実験装置的にまだ実用化の域に達していないようである。今後、より広範囲の条件での実用化研究が必要。
- 日産ディーゼル；SCR/DPF システムでの吸着可能なアンモニア量などの定量的な調査が必要では？
- 革新的後処理システムの研究開発（低温プラズマシステム）において、2011年頃に商品化判断としているが、NEDO プロジェクト終了後に速やかに実用化を図ることが望ましい。
- 電気化学的手法による革新的後処理システムの開発において、今後数年掛けて製品化を目指すとしており、実用化への見通しが明確でない。

- 革新的後処理システムの研究開発（日野自工、豊橋技術科学大学）において、**DPF+プラズマアシスト SCR** については、将来の可能性が高いとしているが、都市の平均速度では低温域での活性が高い低減技術が必要なので、実用化を急いで欲しい技術である。
- 革新的後処理システムの研究開発（日産ディーゼル、早稲田大）において、研究目標はほぼ達成しているが、実用化についての見通しが立っていないのは残念である。他の実施者との連携により、早い段階での事業化、実用化研究が必要である。

3) 今後に対する提言

本プロジェクトでは、応用技術または新規技術をそれぞれ基盤とする幾つかの後処理法の開発を並列に進め、いずれの技術も基礎的な知見を得ているが、実用化に向けてはなお解決すべき課題も多い。各技術開発に対する効果を見定めた上で、重点化また分割化など、効率的な要素開発を推進することが望まれる。世界中のディーゼル燃料の性状も加味して、各後処理システムの適・不適合性を明確にして、コスト試算を含め、実用化、事業化の可能性を検討することも期待される。

<今後に対する提言>

- 本事業では、応用技術または新規技術をそれぞれ基盤とする幾つかの後処理法の開発が並列に進められたが、基盤が大幅に異なる技術開発では互いのベクトルや速度が異なりがちになることも多く、単にプロジェクトの目標達成や成果の実用化をより効率的に指向することだけを考えると、各技術開発に対する見極めと重点化また分割化など、何らかの差別化や戦略性が更に必要なのではないか。
- いずれの技術も基礎的な知見を得ているが、実用化に向けてはなお解決すべき課題も多い。効果を見定めた上で、効率的な要素開発を推進することが望まれる。
- 立命館大学の NO_x・PM 除去手法については、最近飛躍的に性能向上している SOFC 開発において得られた有用な知見を積極的に取り入れて、実用性の向上を図って欲しい。
- 実用化への取り組みについても、NEDO が先導して欲しい。
- ダイハツが開発した低温プラズマ反応器はエンジンの ON-OFF にうまく適合できる技術であるので、ディーゼルハイブリッド車、フォークリフト、アイドリングストップ機能付き車両への応用を期待したい。電気化学的 ECR システムはコンバータの設計如何によっては大幅な性能向上が期待できるであろう。
- 世界中のディーゼル燃料の性状も加味して、各後処理システムの適・不適合性を明確にして、コスト試算を含め、実用化、事業化の可能性を検討してほしい。
- ダイハツ；新規技術で今後の大きな発展・展開が期待できる。PM 低減で SOF よりも dry soot 低減率大の結果に興味を覚える。
- 立命館；平板構造を生かした新規排気流動系の設計的検討を行う価値があると感じている。
- 日野自動車；プラズマ効果の温度依存性の定量的検証が必要と感じる。

- 日産ディーゼル；早稲田大学の解析部分の各サブモデルの信頼性評価と、今後の詳細モデル化への展開を期待したい。
- 革新的後処理システムの研究開発（低温プラズマシステム）において、船舶用エンジンへの適用が期待される。
- 革新的後処理システムの研究開発（日産ディーゼル、早稲田大）において、研究目標はほぼ達成しているが、実用化についての見通しが立っていないのは残念である。他の実施者との連携により、早い段階での事業化、実用化研究が必要である。

2. 4 次世代自動車の総合評価技術開発

1) 研究開発成果について

ディーゼルエンジンや車両から排出されるナノ粒子および未規制物質について、世界的トップレベルで計測・評価技術を開発し、それを用いて NEDO エンジンの低排出ガス特性を様々な観点から立証でき、ほぼ目標を達成したと評価できる。エンジン排気の影響評価手法を確立したことは重要であり、次世代低公害車導入による大気環境の改善効果を予測したことも意義がある。これらの成果は、学会や特許で数多く公表されており、一般での利用と併せて政策面での利用も期待できる。

<肯定的意見>

- ディーゼルエンジンや車両から排出される幾つかのガス成分特性についてその評価手法を確立し、併せて低公害車導入による大気環境の改善効果についても大気拡散モデルによって推定予測しており、目標の達成と共に貴重な成果を挙げている。その成果は、然るべき数が学会や特許で公表されており、一般利用と併せて政策面での利用も期待できる。
- PM および未規制物質の計測・評価技術を新たに開発し、それを用いて NEDO エンジンの低排出ガス特性を様々な観点から立証でき、ほぼ目標を達成したと評価できる。特に、尿素 SCR エンジン排気の影響評価、PM 個数濃度連続測定、過渡 PM の成分計測、などに有用な知見を提示している。さらに、広域及び沿道大気質の推計結果は、本プロジェクトの効果をより明確にする他、これらの成果の普及・公表にも努めていると認められる。
- 今後問題となると予想されるナノ粒子および未規制物質の計測技術開発に取り組み、技術的見通しを得られたこと、さらにはシステム評価と効果の推定まで行ったことは高く評価できる。
- PM 連続測定技術、成分計測技術、校正技術といった社会的な必要性が高い技術を、世界的トップの技術レベルで十分な実用性をもって開発している。また、細胞試験により生体への影響をきちんと検証した点は高く評価できる。
- 新技術開発とその跳ね返りを確認できる測定法、基準の検討を同時に進めるのは、非常に有意義。
- テーマ 1～4 とともに所期の成果が得られている。特にこれらのすべてのテーマは JARI においてのみしか体系的に行えないので、重要な総合評価研究である。
- 最終目標はほぼ達成されていると評価できる。
- 健康リスクの評価手法開発を同時に進めることにより、新たに開発した技術の評価を同時進行的に実施するという「予防原則」の考え方を導入したこと

は高く評価できる。

- 規制項目だけでなく、未規制物質を含めた排出特性を調査し、細胞曝露システムによる健康影響評価手法を確立したことは特に重要である。新開発技術の普及が、逆に環境負荷の増大になるか否かを事前に評価することが可能になる。
- ナノ粒子計測について、希釈トンネルによる計測が有効であることを確認するための技術指針を示した点は意義が大きい。
- NEDO エンジンの市場導入により、大都市沿道の大気環境が改善されることを予測したことも意義があるものである。

<問題点・改善すべき点>

- PM 個数計測の校正技術に関して、国内一次標準や簡易型粒子数標準エアロゾル発生器の開発に一定の成果はあるものの、目標とした国際プログラムへの対応に実績が認められず、少なくとも今後の見通しを示すべきであろう。また、NEDO エンジンの排気曝露試験における運転条件が不明であり、排気性状と曝露影響の相関についての解析・議論が不足していると思える。
- 計測技術については、計測器メーカーも体制に入れて開発を行ったほうが良かったのではないかと考える。
- 大気質改善効果予測テーマが一部限定的な内容になっている感じがする。この内容は今後もより積極的に展開していく必要があると感じる。

2) 実用化の見通しについて

本プロジェクトで確立したディーゼル排ガスの計測・評価手法は、ポスト新長期規制実施に当たり必要な技術であり、実用化に向けての具体的技術課題ならびにシナリオが詳細に整理され、個数濃度測定 of 校正・試験技術については、既に一般利用サービスを開始しており、実用化の見通しは十分に得られていると判断できる。論文発表や学会発表等成果の公表・普及も適切であり、国内および国際的な標準化への寄与も期待できる。健康影響も含めたトータルな総合評価手法として活用が望まれる。

一方で、PM 個数濃度測定 of 校正については、より実用性を高める観点から、簡易型発生器による粒径及び濃度制御を可能とするシステムの開発に取り組んで欲しい。また、予算額から考慮すると十分な結果であるが、海外の規制動向との比較調査などがあればなお良かった。

<肯定的意見>

- 本事業で確立したディーゼル排ガス特性の計測手法は貴重と思われ、PM の個数濃度計測法については国内および国際的な標準化への寄与が期待されると共に、将来的に研究者や技術者の多くがその機器を容易に使用できるような普及の進展も望まれる。
- 開発した計測・評価技術は、既にエンジン排気評価に適用され、粒子数濃度校正システムについても一般利用サービスを開始しており、実用化の見通しは十分に得られていると判断できる。また、本事業の研究成果については数多くの学問分野が関連しており、そのため様々な学協会学会へ論文を発表し、成果の公表・普及に努めている。
- 実用化に向けての具体的技術課題ならびにシナリオが詳細に整理されている。
- 校正技術は既に世界に先駆けてサービスが始まっている点で高く評価できる。他の技術も十分に実用レベルにある。
- 人体への影響という他分野との連携により、科学的かつ客観的評価基準を目指している点。
- 総合評価研究のため、個別技術開発におけるような実用化に関するコメントは特にないが、この4テーマの研究は今後も継続的に JARI で実施すべきである。
- 排出量、燃費及び健康影響という観点で総合評価を行う技術に実用化の見通しを付けている。
- PM 計測の技術指針の提案、PM 高精度計測・校正技術は、ポスト新長期規制実施に当たり必要な技術であり、実用化の目処を示した意義は大きい。

- NO_x等の規制物質が低減されていく一方で、未規制物質は後処理装置の装着により排出量が相対的に増加する可能性が否定できない。個別の成分別排出量は微量である可能性が高いが、トータルとして健康影響へのリスクが増大するか否かを評価すべきであり、総合評価手法として、活用が期待される。

<問題点・改善すべき点>

- PM 個数濃度測定の校正については、より実用性を高める観点から粒径及び濃度制御を可能とするシステムの開発に取り組んで欲しい。また、国際標準への対応をより積極的に進めることが必要と考える。
- 予算額から考慮すると十分な結果であるが、海外の規制動向との比較調査などがあればなお良かった。

3) 今後に対する提言

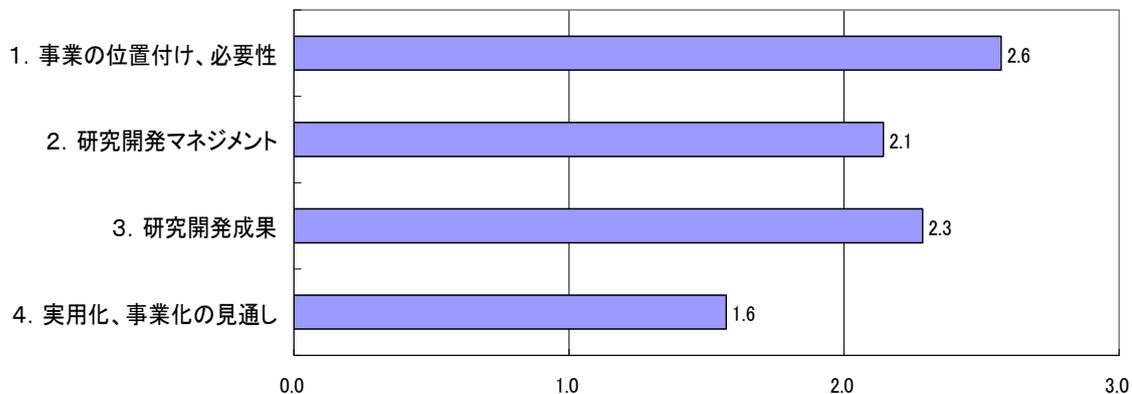
本テーマの対象とした技術は、いずれも公共性が高く、特に、PM および未規制物質の計測・評価技術については、より多くのエンジン排気評価へ適用し、クリーンディーゼルエンジン開発の進展に寄与することが望まれる。大気質予測についても、モデル改良に継続的に取り組んで精度向上に努めるとともに、汎用性を高め、その成果を公開して欲しい。現場開発サイドで利用できる簡易的な評価手法の開発も期待する。国際標準化に向けた活動においてもリーダーシップを発揮できる検討を進めて欲しい。これらによって、NEDO 事業としての価値が明確となり、国内の環境行政に資することが出来ると考える。

<今後に対する提言>

- 本テーマの対象とした技術は、いずれも公共性が高く、特に、PM および未規制物質の計測・評価技術については、より多くのエンジン排気評価へ適用し、クリーンディーゼルエンジン開発の進展に寄与して欲しい。また、大気質予測についても、モデル改良に継続的に取り組んで精度向上に努めるとともに、汎用性を高め、その成果を公開していただきたい。それによって、NEDO 事業としての価値が明確となり、国内の環境行政に資することが出来ると考える。
- 実用化への取り組みについても、NEDO が先導して欲しい。
- これから自動車が普及する地域をも考慮して、基準の国際化が進む中で、リーダーシップを発揮できる検討を進めて欲しい。
- 今回最終時点で開発した技術により、個別研究開発の評価を行った結果は、直ちに各実施者に提供し、改良に結びつけることが望まれる。
- 現場開発サイドにおいて健康影響を評価するために、簡易的な評価手法の開発を目指して欲しい。簡易システムが実用化されれば、開発実施者が研究途上で総合的な健康影響を評価できることになり、環境負荷の低減という本来の研究開発の方向に導くことが可能になると考えられる。

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)							
		A	B	A	A	C	A	A	
1. 事業の位置付け、必要性	2.6	A	B	A	A	C	A	A	
2. 研究開発マネジメント	2.1	B	B	B	A	C	B	A	
3. 研究開発成果	2.3	A	B	B	B	C	A	A	
4. 実用化、事業化の見通し	1.6	B	B	C	B	D	B	B	

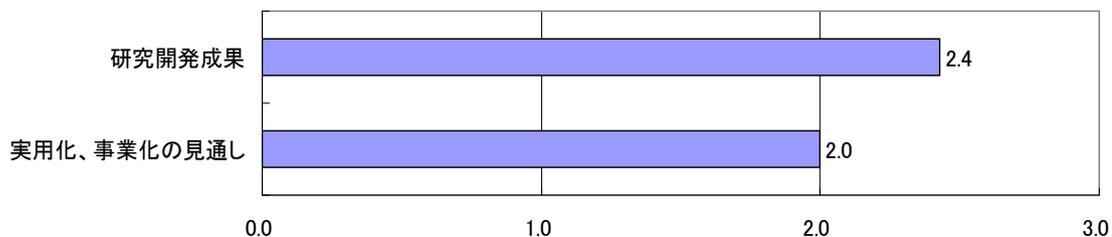
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

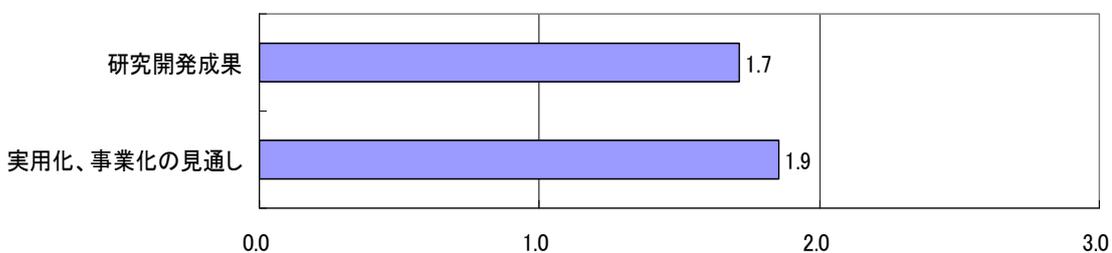
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化、事業化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

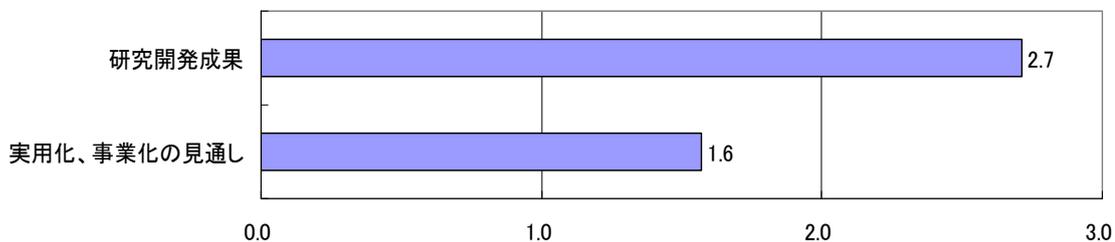
3. 2. 1 新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化及びバイオマス燃料利用に関する動向及び技術課題の調査



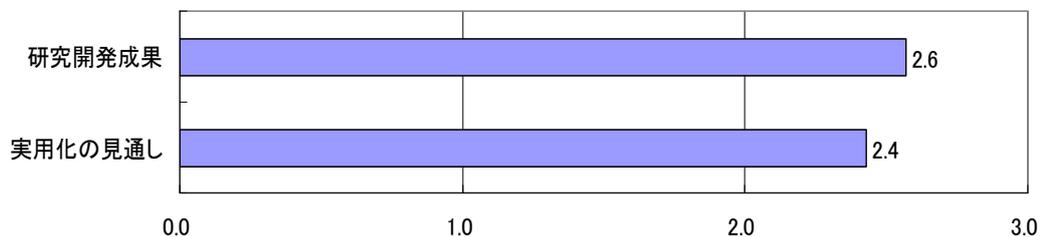
3. 2. 2 GTL を用いたエンジン技術の開発



3. 2. 3 革新的後処理システムの研究開発



3. 2. 4 次世代自動車の総合評価技術開発



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点 (注)							
(1) 新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化及びバイオマス燃料利用に関する動向及び技術課題の調査									
1. 研究開発成果	2.4	A	B	B	A	C	A	A	
2. 実用化、事業化の見通し	2.0	B	A	C	A	C	B	B	

(2) GTL を用いたエンジン技術の開発								
1. 研究開発成果	1.7	B	B	D	B	B	B	B
2. 実用化、事業化の見通し	1.9	A	B	D	B	B	A	C
(3) 革新的後処理システムの研究開発								
1. 研究開発成果	2.7	A	A	A	A	C	A	A
2. 実用化、事業化の見通し	1.6	B	B	C	B	D	B	B
(4) 次世代自動車の総合評価技術開発								
1. 研究開発成果	2.6	B	B	A	B	A	A	A
2. 実用化の見通し	2.4	A	B	B	B	A	B	A

(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化、事業化の見通しについて

- A ・明確
- B ・妥当
- C ・概ね妥当であるが、課題あり
- D ・見通しが不明

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

「革新的次世代低公害車総合技術開発」
(事後評価) 分科会 資料 5-1

「革新的次世代低公害車総合技術開発プロジェクト」

事業原簿(公開)

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 省エネルギー技術開発部
-----	--

—目次—

概 要

【用語説明】

I. 事業の位置付け・必要性について	P I-1
1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性	P I-1
1.1. NEDOが関与することの意義	P I-1
1.2. 実施の効果（費用対効果）	P I-1
2. 事業の背景・目的・位置づけ	P I-3
2.1. 事業の背景	P I-3
2.2. 事業の目的及び意義	P I-4
2.3. 事業の位置付け	P I-4
II. 研究開発マネジメントについて	P II-1
1. 事業の目標	P II-1
2. 事業の計画内容	P II-2
2.1. 研究開発テーマの採択経緯	P II-2
2.2. 研究開発の内容	P II-3
2.3. 研究開発の実施体制	P II-7
2.4. 研究開発の予算	P II-8
2.5. 研究の運営管理	P II-8
3. 情勢変化への対応	P II-10
4. 中間評価結果への対応	P II-10
5. 評価に関する事項	P II-14
III. 研究開発成果について	P III. 1-1
1. 成果の概要	P III. 1-1
2. 研究開発項目④	P III. 2-1
2.1. 研究開発の背景、目的、位置付け	P III. 2-1
2.2. 研究開発マネジメント	P III. 2-1
2.3. 研究開発成果	P III. 2-387
2.4. 実用化、事業化の見通し	P III. 2-388
2.5. まとめ	P III. 2-389
IV. 実用化・事業化の見通しについて	P IV-1

(添付資料)

- ・エネルギーイノベーションプログラム基本計画
- ・プロジェクト基本計画
- ・技術戦略マップ（分野別技術ロードマップ）
- ・事前評価関連資料（事前評価書、パブリックコメント募集の結果）
- ・特許論文リスト

概要

最終更新日 平成 21 年 9 月 24 日

プログラム（又は施策）名	次世代低公害車技術開発プログラム 平成 18 年度より省エネルギー技術開発プログラムに変更 平成 20 年度よりイノベーションプログラムに変更						
プロジェクト名	革新的次世代低公害車総合技術開発	プロジェクト番号	P04013				
担当推進部/担当者	省エネルギー技術開発部/土川 俊三（平成 19 年 4 月～） 省エネルギー技術開発部/伊藤 淳（平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月）						
0. 事業の概要	ディーゼルエンジンを中心とした開発として①新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化、②天然ガスベースの合成液体燃料（GTL）を用いたエンジン技術の開発、③革新的後処理システムの研究開発、④次世代自動車の総合技術開発を進め、ディーゼルエンジンの高い熱効率を維持した上で、ポスト新長期規制にも充分適合でき、画期的に排ガスをクリーン化する技術を開発する。						
I. 事業の位置付け・必要性について	地球温暖化問題や大気汚染問題等の環境問題に対する関心が高まりつつあり、自動車に起因する環境問題への対応が急務である中、これまで以上に低公害車の開発・普及の必要性が高まっている。特に大型トラック・バスについては、その技術的困難さから排ガス対策の技術開発が必要となっている。2010 年頃までには、世界で最も厳しいポスト新長期規制に適合することが要求されており、緊急の課題となっている。また、2008 年以降に本格的となるCO ₂ 削減技術についても、本プロジェクトで確立していくことも要求されている。これらの技術開発は、国内自動車産業の国際競争力の向上につながるため、国家的な課題として位置づけられる。						
II. 研究開発マネジメントについて							
事業の目標	【当初の目標】 ①ディーゼル排出ガス：大型車 NOx 0.2g/kWh、PM 0.013g/kWh、乗用車 NOx 0.05g/km、PM 0.007g/km ②燃費：大型車 10%向上、乗用車ガソリントップランナーに比べ 30%向上。 【変更した目標（H17/10 月）】（変更内容のみ記述） ①ディーゼル排出ガス：大型車 PM 0.010g/kWh、乗用車 PM 0.005g/km。平成 17 年 4 月の中央環境審議会第 8 次答申で示された数値を達成目標値とした。 【変更した目標（H19/10 月）】（変更内容のみ記述） ②燃費：乗用車 2015 トップランナーに比べ 20%向上。平成 19 年 7 月交付された 2015 乗用車等の新燃費基準対応						
事業の計画内容	主な実施事項	H16fy	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	
	要素技術研究開発						
	プロトタイプ開発			←→			
	プロトタイプ評価実用化				←→	→	
	成果とりまとめ			←→		↔	
開発予算 (会計・勘定別に事業費の実績額を記載) (単位：百万円)	会計・勘定	H16fy	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	総額
	一般会計						
	特別会計 (電多・高度化・石油の別)	516	1,243	1,030	767	516	4,072
	総予算額	516	1,243	1,030	767	516	4,072
開発体制	経産省担当原課	製造産業局自動車課					
	プロジェクトリーダー	早稲田大学理工学術院教授 大聖 泰弘					
	委託先	(株)いすゞ中央研究所、(独)産総研、マツダ(株)、広島大、トヨタ自動車(株)、日野自動車(株)、昭和シェル石油(株)、ダイハツ工業(株)、(財)地球環境産業技術研究機構(RITE)、旭化成(株)、戸田工業(株)、大分大、立命館大、(株)堀場製作所、日産ディーゼル工業(株)、早稲田大、(財)日本自動車研究所(JARI)					

情勢変化への対応	<ul style="list-style-type: none"> ・排出ガス目標値の変更 平成17年4月の中央環境審議会第8次答申をうけ、第2回技術委員会（H17年10月6日開催）において本プロジェクトの目標値の変更を審議し、承認され基本計画の改訂を行った。 ・燃費目標値の変更 平成19年7月交付された2015乗用車等の新燃費基準をうけ、第6回技術委員会（H19年10月31日開催）において本プロジェクトの目標値の変更を審議し、承認され基本計画の改訂を行った。
中間評価結果への対応	<p>平成18年度の間評評価により、「概ね現行通り実施して良い」との評価を受け、主な指摘事項と対応状況は、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 燃焼・燃料・後処理分野の技術連携強化の推進すること (対応) 技術連携・統合WGを発足、推進。数値シミュレーションを用いて、相乗効果が期待され、目標値を到達可能な見通しが得られた。 2. 多様な試験モードでの排出ガス評価を推進すること。 (対応) オフサイクル評価の設定と評価の推進。・排ガス温度の低い都市内渋滞時を想定したJARI平均車速15Km/hモードにて評価を実施し、都市内渋滞時の排出量として、既存の排出係数から当初予測された悪化はないことが確認できた。 3. GTL以外にBDFなどの影響なども視野に入れること。 (対応) バイオマス燃料（BDF）利用に関する動向及び技術過大の調査を追加して推進した。 4. 当初に設定した分野にこだわらず、要素技術開発と総合化の視点から扱いを見直すことも必要 (対応) 体制見直しを実施した。 マツダチームの燃焼と後処理のチームを統合するとともに、委託先の見直しを行い、6実施者を4実施者へ変更した。（'07/4～）
評価に関する事項	事前評価 平成15年度実施 担当部 省エネルギー技術開発部
	中間評価 平成18年度 中間評価実施
	事後評価 平成21年度 事後評価実施
Ⅲ. 研究開発成果について	<p>プロジェクト全体の成果を総括すると、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・燃費、排出ガスの最終目標を達成した。 ・オフサイクル・未規制物質など各評価項目とも特に問題なことを確認した。 ・本プロジェクトで開発した車両を将来導入できれば、課題となっている沿道の大気汚染濃度の改善に対する効果があることを大気拡散シミュレーションによって確認した。 <p>本プロジェクトは国プロとして産学官の協同により取り組み、それぞれが得意とする基礎研究の分野から開発研究までを有機的に連携して、世界をリードする目標値が達成できた。さらに健康影響評価で問題のないこと、大気拡散シミュレーションにて環境改善効果があることを示すことができ、クリーンディーゼルの導入意義を確認することができた。</p> <p>①-1 「超高度燃焼制御エンジンシステムの研究開発」 実施先：いすゞ中央研究所／産業技術総合研究所 予混合圧縮着火（PCI）燃焼を主とした新燃焼方式を含め、ディーゼルエンジンのクリーン化、高度化を実現する新燃焼方式の開発及び燃料品質の最適化を行い、3段過給システムによる高過給、高EGR率、噴射系改善による最適燃焼により研究開発目標を達成し得る技術が見出された。新燃料（セタン価42-43、芳香族分フリー）によりNOx、PMのトレードオフが改善できた。</p> <p>①-2 「超低エミッション高効率乗用ディーゼルエンジンの研究開発」 実施先：マツダ／広島大／戸田工業／大分大 革新的燃焼技術<ITIC-PCI(Intake Temperature and Injection Controlled Premixed Compression Ignition) 予混合燃焼、群噴孔ノズルインジェクタ。LP（低圧）/HP（高圧）併用EGRシステムなどの開発により、燃焼技術開発目標（NOx、燃費）を達成した。低温度域（～200℃）と耐熱性に優れる中空3次元構造シングルナノサイズNOx触媒を開発した。開発した燃焼技術・触媒技術と既存DPF技術の組合せにより、プロジェクトの開発目標を達成した。NOx:0.05g/km, PM:0.005g/km, 燃費:2015年GE車比20%改善(JC08モード、1479kgランク)</p>

<p>III. 研究開発成果について</p>	<p>②「GTLを用いたエンジン技術の開発」 実施先：トヨタ／日野自動車／昭和シェル石油 GTLの燃焼の特徴として、スモークやHCが低減することを示した。GTL燃料を用いた際の実用性を多角的に評価し、軽油と比べ何れも問題ないか、軽微な対策で対応可能であることを確認した。GTL燃料の高いエミッション低減ポテンシャルをエンジン緒言の最適化により確認し、プロジェクトの目標値を達成することが出来た。(DPNR触媒付・JE05モードでの評価)。これまでの排気後処理を含めたエンジン改良に関する研究例は極めて少なく、GTL燃料普及に関して意義のある成果が得られたと考える。</p> <p>③-1「低温プラズマシステムの研究開発」 実施先：ダイハツ工業／(財)地球環境産業技術研究機構 プラズマ中に生成した活性種によるPMの炭素結合の変化でPMが燃焼する酸化除去機構を開明し、高性能プラズマ反応器を開発した。その結果、PM₁₀ 0.002g/kmを達成してポスト新長期規制をクリアした。また放電電力100W、モード中の最大圧損を2kPaにするなどの実用上の課題を克服した。さらにPM酸化に対し、プラズマ放電場において有効に機能する金属酸化物触媒を開発した。</p> <p>③-2「固体電解質を用いたPM・NO_x同時低減システムの研究開発」 実施先：立命館大学／堀場製作所 多孔質固体電解質を用いた電気化学的手法による窒素酸化物と微粒子の同時低減を可能とする革新的排ガス処理システムを開発した。YSZ(Yttria Stabilized Zirconia)固体電解質を用い400℃の模擬排ガスでNO_xおよびPM低減率90%を達成した。低温作動型GDC(Gadolinia-doped Ceria)固体電解質セルを開発し、280℃からの稼動を可能にした。GDCセルの稼動温度以下ではPMおよびNO_xをそれぞれ堆積、吸蔵し、稼動温度以上で通電によりこれらを分解する実用化システムの提案を行った。30x30x50mmのハニカムモジュールを試作し、分流希釈トンネルを用いたJC08排ガス試験を実施し、NO_xの低減率74%、PM低減率98%を達成した。平板セルでの実験結果ではNO_x低減率91%を達成し、NO_x排出レベル0.033g/kmを実現可能であることが示唆された。</p> <p>③-3「プラズマアシストSCRシステムによるNO_x低減の研究」 実施先：日野自動車 低温時のNO_x低減性能を改善させる要素技術としてプラズマアシストSCR(プラズマによるNO_x還元反応の促進技術)を開発し、プラズマ反応器入口温度110℃でNO_x低減率80%を得ることができた。その技術と触媒付きDPFを組み合わせてプロジェクトの目標を達成した。</p> <p>③-4「NO_x・PMを同時低減する新排出ガス浄化システムの研究開発」 実施先：日産ディーゼル工業／早稲田大学 DPFと尿素SCRを組み合わせてNO_xとPMの同時低減処理システムの研究開発に取り組み、低温活性の向上およびアンモニアスリップの削減を狙ったSCR触媒を開発した。また、CR-DPFの基礎解析、ススの酸化速度予測、SCR触媒反応解析、最適尿素噴射ロジック、モデルを構築し、触媒仕様の最適化に関して研究開発の効率化を推進し、実験的研究と理論解析的研究と連携してプロジェクトの目標を達成した。</p> <p>④「次世代自動車の総合評価技術」 実施先：(財)日本自動車研究所／産業技術総合研究所 ナノ領域を含むPM粒径と個数濃度分布の計測、排出ガスの健康影響評価及び新燃焼方式から発生する未規制物質の排出挙動を把握し、微量有害物質やナノ粒子の排出量が低減されること及び健康影響の観点からも悪化がないことを確認した。また、大気質改善効果を予測するシミュレーションを実施し、2020年に当該プロジェクトでの開発車両を全て導入すれば、自動車からのNO_xの排出量はBAUに比較して62%低減するとの結果が得られた。ただし、NO_x排出の原因は自動車以外の固定発生源も含まれており、特に自動車の寄与度が大きい沿道(東京都大田区松原自排局を想定)濃度ではNO_xが19~29%、NO₂が11~16%低減するとの予測結果が得られ、本プロジェクトの開発成果が都市環境改善に有効であることが示された。</p>				
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="467 1814 742 1848">投稿論文、外部発表等</td> <td data-bbox="742 1814 1441 1848">「査読付き論文」67件、「その他」157件</td> </tr> <tr> <td data-bbox="467 1848 742 1892">特許</td> <td data-bbox="742 1848 1441 1892">「出願済」98件、</td> </tr> </table>	投稿論文、外部発表等	「査読付き論文」67件、「その他」157件	特許	「出願済」98件、
	投稿論文、外部発表等	「査読付き論文」67件、「その他」157件			
特許	「出願済」98件、				
<p>IV. 実用化、事業化の見通しについて</p>	<p>①「新燃焼方式の研究開発」 新燃焼方式と後処理技術によって次期規制とみなされるポスト新長期規制の挑戦的目標値と燃費の向上を達成することができた。信頼性、耐久性、コストなどを両立させる商品化開発に移行し、商品化を効率的に進める。</p>				

	<p>②「新燃料を用いたエンジン技術の最適化」 G T Lに限らないパラフィン系燃料、水素化処理植物油燃料、BTL などの評価および規格化の提案を行うとともに、市場導入パイロット・プロジェクトへ協力する。</p> <p>③革新的後処理システムの研究開発」 ・後処理システムの耐久性向上、システムの小型化（車両搭載性考慮）などの課題を解決し、エンジン適合、実車適合を図り実用化に結びつける。 ・学を中心とするチームでは製造技術、評価技術、実証試験に関し、協力企業と連携して実用化開発を進める。</p> <p>④「次世代自動車の総合評価技術開発」 ・個数濃度測定器に関する国内一次標準の確立と供給、PMP への対応や国際標準化を進める。 ・培養細胞を用いた健康響評価の簡便手法と大気質の予測モデルによって、開発されたエンジンシステムは健康および大気質環境保全に貢献し、実用化を進めることは有意義であることを明らかにした。</p>	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成16年3月 作成
	変更履歴	<ul style="list-style-type: none"> ・平成17年3月 委託先決定に伴い、研究開発計画を改訂 ・平成17年10月 新排出ガス規制案の提示により、研究開発目標値を改訂 ・平成18年2月 省エネルギー技術開発プログラムに位置付けられたことによる表題の変更 ・平成19年10月 新燃費規制の交付により、研究開発目標値を改訂 ・平成20年7月 イノベーションプログラムに位置付けられたことによる表題の変更

【用語説明】

(1) エンジン関係

- E G R** Exhaust Gas Re-circulation (排ガス再循環：窒素酸化物の発生を抑制するために吸気に排ガスの一部を混合すること。燃焼温度が下がるためにNO_x抑制効果が現れる。)
- H C C I** Homogeneous Charge Combustion Ignition (均一予混合気圧縮着火：燃焼室での着火前に空気と燃料の均一予混合気を生成しておき、圧縮着火させる燃焼方式。均一予混合気を生成するため、通常のディーゼルエンジンと異なり圧縮上死点よりかなり早い時期に燃料を噴射する。低負荷条件で、PMとNO_xの同時低減が可能であることが知られている。)
- P C I** Pre-mixed Combustion Ignition (予混合圧縮着火：燃焼室での着火前に行われる空気と燃料の予混合気形成を従来のディーゼル燃焼よりも積極的に促進しておき、圧縮着火させる燃焼方式。低～中負荷条件で、PMとNO_xの同時低減が可能であることが知られている。H C C Iに関する研究の進展に伴い、PMとNO_xの同時低減には、予混合気の均一性は必ずしも必要でないことが判明してきたため、予混合気の均一性をねらう意味を持つ用語であるH C C Iと区別してP C Iの用語が用いられるようになった。)
- 圧縮比** エンジンのシリンダ内で、混合気がどれだけ圧縮されるかを示す割合で、下死点における燃焼室容積の、上死点における燃焼室容積との比で定義される。
- 過給** 圧縮機（ターボチャージャなど）を用いて、周囲の大気圧以上に加圧した吸気をエンジンに供給すること。
- 過渡状態** エンジン回転数や負荷が一定でなく変化している状態、加速・減速の状態
- カムレス
気筒** 給排気バルブをカムによる機械式ではなく、電磁気や油圧で駆動させること。
シリンダ
- 希薄燃焼（リーンバーン）** 理論上完全燃焼するのに必要な燃料と空気の比率よりも、空気の比率が多い混合気で燃焼させること
- 混合気** 燃料と空気の混合物
- コモンレール** 狭義は高圧化した燃料の蓄圧室の意味であるが、しばしば、コモンレールを備えたディーゼル噴射装置と専用の電子制御インジェクターを組み合わせた燃料噴射方式そのものをさす。旧来の列型噴射ポンプや分配型ポンプとスプリングによる自動弁方式の機械式インジェクターの組み合わせに比較して、新しい噴射方式であり、噴射圧力がエンジン回転速度に依存せず高い値を実現できるなどの特徴を持ち、また、電子制御により1回の燃焼行程で複数回の噴射が行えるなどの利点がある。
- 多段噴射** 燃料噴射を複数回に分けて実施すること
- ディーゼルノック** ディーゼル機関において、燃料が噴射されてから自己着火するまでの遅れ時間が長いために蓄積された燃料が短時間で一挙に燃焼するなどの理由で燃焼速度がとくに高い場合に振動や騒音を発生する現象であって、とくに、その程度が著しく、エンジンの寿命や周囲環境に悪影響を及ぼすもの
- 噴射時期** 燃料を噴射するタイミングで、通常はピストンがあがりきった上死点（TDC）付近

(2) 燃料関係

- G T L** Gas to Liquid (ガス状の炭化水素原料から燃料などの液体炭化水素を合成する技術またはその技術により合成された燃料。軽油を生産する場合は、原料として、天然ガスや石炭から生成されるガスが用いられる。現在の供給量は少ないが、将来の燃料として、液体であるために DME などの気体燃料に比較して可搬性に優れていること、通常の軽油に比較して高いセタン価を持つこと、硫黄分と芳香族分が少ないといった特長と、石油依存からの脱却の可能性の面で期待されている。)
- 蒸留性状** 液体を蒸留したときの温度と留出量の関係。軽油などの液体燃料は多成分系であるため、水やエタノールのように明確な沸点を持たないので、蒸発に関する特性を示す際に用いられる。
- セタン価** ディーゼルエンジンにおいて燃料の着火性を示す指標でありセタン価が高いほど着火性が良い。セタン価測定用の試験エンジンで測定する。ノルマルセタンとヘプタメチルノナンの混合燃料との比較で定義されており、着火性の良いノルマルセタン 100%と同等の着火性を示す燃料のセタン価が 100 と定義されている。燃料中の直鎖飽和炭化水素の含有量が多く、また、その分子内の炭素数が多いものほどセタン価が高い。

(3) 排ガス関係

- C O** Carbon Monoxide (一酸化炭素)
- D P** Diesel Particulate (ディーゼル排気中に含まれる粒子状物質の総称)
- D P N R** Diesel Particulate-NOx Reduction System (トヨタ自動車(株)が開発した PM と NOx を同時に連続浄化する触媒システム。)
- H C** Hydrocarbon (炭化水素)
- NMHC** Non-Methane Hydro Carbon (メタンを除いた炭化水素)
- N O x** Nitrogen Oxides (排出ガス中に含まれる窒素酸化物 (主として NO と NO₂) の総称、光化学スモッグの原因物質のひとつ)
- P M** Particulate Matter (粒子状物質：排出ガスに含有され、未燃焼の炭素粒子の周りに、炭化水素系のさまざまな化合物が付着したもの。一般には黒煙とも言われる。)
- T H C** Total Hydrocarbon (全炭化水素 メタンを含む全ての炭化水素)
- 温室効果ガス** 京都議定書では、排出の抑制及び削減に関する数量化された約束の対象となる温室効果ガスを二酸化炭素 (C O₂)、メタン (C H₄)、一酸化二窒素 (N₂O)、ハイドロフルオロカーボン (H F C)、パーフルオロカーボン (P F C)、六ふっ化硫黄 (S F₆) としており、日本は、温室効果ガスの総排出量を 2 0 0 8 年から 2 0 1 2 年の第 1 約束期間に基準年から 6 %削減することとなっている。
- スモーク** 黒煙。自動車の排気を規定量吸引したろ紙の光反射率の測定による。PM中の固体炭素質粒子 (soot) の濃度に対応するといわれている。
- 未規制物質** 自動車の排ガス規制の中で、現在対象となっていないが、有害大気汚染物質として環境省等がリストアップしている物質の内、自動車の排出物質に含まれている物質。自動車から排出される炭化水素の排出量を管理することでこれらの物質も低い値に

保たれるため現在は個別成分の規制対象とされていない。その他、地球温暖化物質なども未規制物質に含む場合がある。

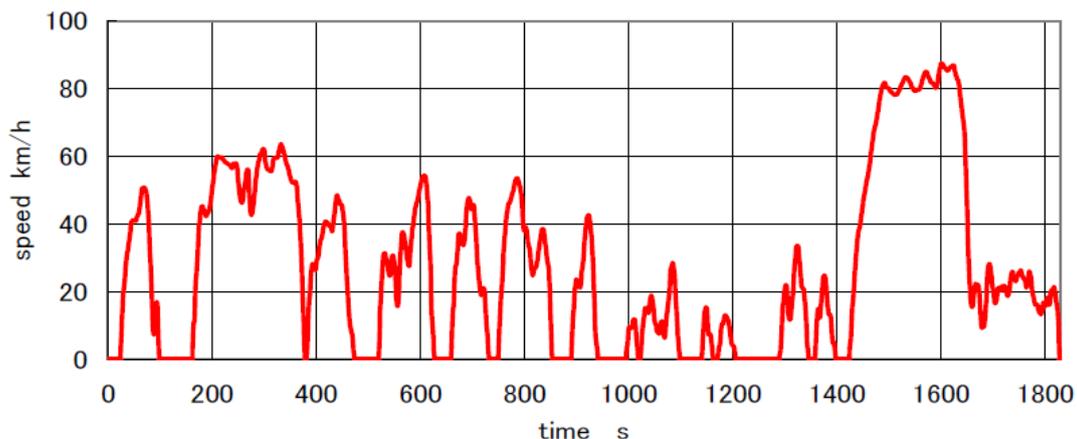
(4) 後処理関係

- C D P F** Catalyzed Diesel Particulate Filter (触媒を担持したD P F : 排出ガスに含有されるPMをフィルター作用で捕集するD P Fに触媒が担持され、CO や未燃炭化水素、オイル、粒子状物質中の SOF (有機溶媒可溶成分) などが酸化除去されるとともに、捕集されたPMの再生が行われる。)
- D O C** Diesel Oxidation Catalyst (ディーゼルエンジンの排出ガス後処理装置として用いられる酸化触媒。排出ガス中に含まれるCO や未燃炭化水素、オイル、粒子状物質中のSOF (有機溶媒可溶成分) などが酸化除去される。)
- D P F** Diesel Particulate Filter (ディーゼル微粒子除去装置 : 排出ガスに含有されるPMをフィルター作用で除去する装置。一定期間ごとに除去したPMを燃焼させるなどの再生(Regeneration)が必要になる。)
- N S R** NO_x Storage Reduction (NO_x 吸蔵還元触媒 : 通常の運転時はNO_x を触媒上に吸蔵し、定期的に燃料の濃い空燃比 (リッチ条件) に調整してNO_x を還元する機能のある触媒)
- S C R** Selective Catalytic Reduction (選択還元触媒 : 排ガス中のNO_x を選択的に還元する触媒。還元剤として炭化水素、アンモニアが代表である。)
- B a s e E m i s s i o n** 後処理なしのエンジン排出ガス
- アンモニアスリップ** S C Rで使用されるアンモニアが触媒で反応されずに排出されること。アンモニアは、劇物であり、安全環境衛生上規制されている。
- 固体電解質** 固体電解質は金属の酸化物で、その内部を酸化物イオン (O²⁻など) が自由に動ける物質を指す。固体酸化物型の燃料電池 (S O F C) ほか、自動車の排ガス中の酸素を検出する酸素センサ等で利用されている。
- 三元触媒** 排ガスに含まれる3大有害物質 (CO、HC、NO_x) を同時に酸化もしくは還元して除去する。ガソリンエンジンでは広く利用されている。
- シングルナノ** 1~9ナノメートル (1ミクロンの千分の1) サイズのこと
- 低温プラズマ** プラズマを構成する粒子すべての温度が高い状態を高温プラズマ、電子温度のみが高い状態を低温プラズマという。
- D e N o x 触媒** 窒素酸化物を還元して窒素と酸素分子に戻す働きをする触媒。
- 尿素S C R** S C Rのうち、添加した尿素によって生成されたアンモニアを還元剤として、NO_x をN₂に還元する触媒システム。石油精製、工業炉等の固定式の燃焼装置でNO_x 除去を目的として一般的に使用されている。自動車等の移動式燃焼ガスへの応用は、2004年から大型トラック用に実用化された。
- メソポーラス** ミクロ孔とマクロ孔の間であるメソ孔のこと。国際純正応用化学連合 (I U P A C) では、2~50ナノメートルの細孔径を、メソポーラスとして分類する。

(5) その他

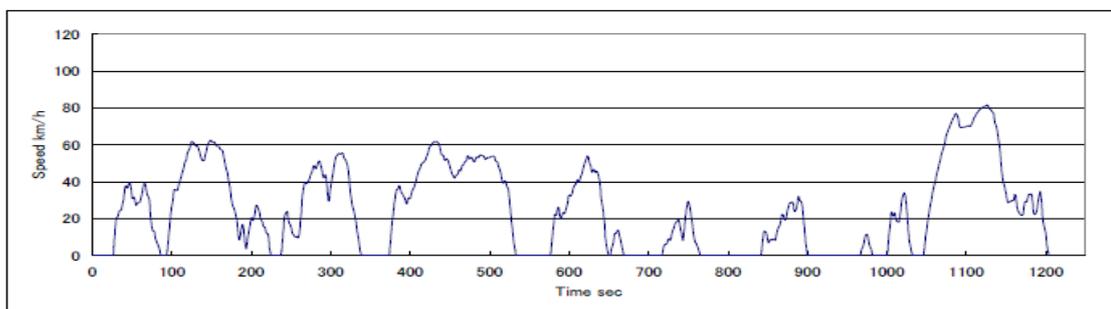
JE05モード 新長期規制（05年～）に併せて導入されたエンジンベースの排出ガス試験方法（対象：車両総重量 3500kg 超過）

◎JE05 モード



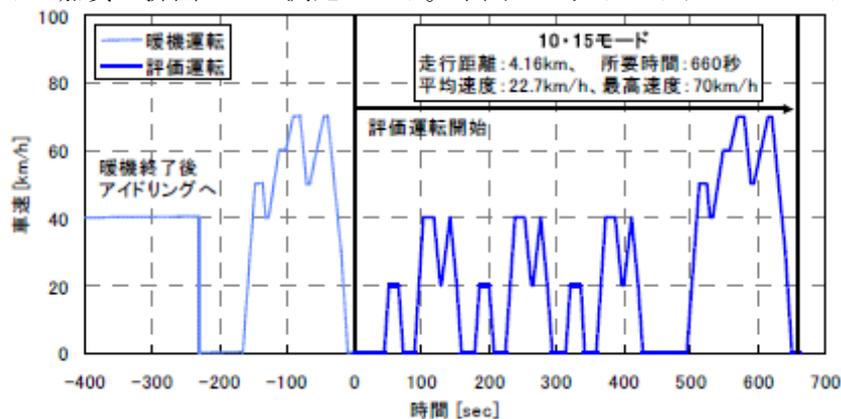
JC08モード 2008年から導入を予定されている排ガス試験方法（対象：車両総重量 3500kg 以下）

新たな試験モード(JC08モード)



想定走行距離	8.171km	所要時間	1204秒
平均速度	24.4km/h	平均速度(アイドリング時を除く)	34.8km/h
最高速度	81.6km/h	アイドリング比率	29.7%

10・15モード 燃費・排出ガスの測定モード。下図のホット・トランジェント測定手法



P R T R 物質	化学物質排出移動量届出制度の対象となる物質
P A H s	Poly Aromatic Hydrocarbons (多環芳香族炭化水素：ベンゼン環を 2 以上持つ炭化水素。健康影響の面から関心がもたれている。)
T O F / M S	Time of Flight Mass Spectrometer 飛行時間型質量分析計
エイムズテスト	健康影響を調査するためのスクリーニング試験法のひとつで、細菌を用いて物質の変異原性を調べる試験方法
希釈トンネル	ディーゼル自動車から排出される PM およびガス状物質の質量排出率を測定するための排ガス希釈装置。自動車の運転状態に応じて排ガス流量が変化しても、希釈空気と排出ガスの合計流量が常に一定に保たれる構造となっているため、希釈トンネル内の物質濃度は排ガス流量と排出物質濃度の積を反映した値となる。この性質を利用して、排出物質の質量排出率を算出することが容易にできるため、各国でディーゼル自動車の認証試験における排出物質の測定方法に広く採用されている。とくに PM 重量の測定に際して希釈ガスの温度が測定結果に影響を及ぼすことと、粒子状物質の個数濃度を測定する際には温度と希釈率の双方が影響するため、希釈率とトンネル内のガス温度は重要なパラメータである。
ナノ粒子 (PM)	PM のうちナノメートル (1 ミクロンの千分の 1) サイズのもの。一般的には PM 中のとくに 50nm 程度以下の大きさの粒子をナノ粒子と呼び、近年、排出質量が少なくてもナノ粒子の個数濃度が多い場合がありえることと、呼吸器系の深奥部まで到達して体内の各所に移送される懸念があることから、健康影響の面で関心がもたれており、PM 規制の方法として従来の質量排出率の規制だけでなく個数濃度の規制の必要性が欧州等で議論されている。

(参考資料) 「今後の自動車排出ガス低減対策のあり方について (第八次報告) / H17.2 中央環境審議会大気環境部会」用語解説、いすゞ自動車(株)ホームページ掲載「自動車用語辞典」ほか

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性

1.1. NEDOが関与することの意義

「低炭素社会づくり行動計画」（平成 20 年 7 月）では、排出量のうち約 2 割を占める運輸部門からの二酸化炭素削減を行うため、次世代自動車（ハイブリッド自動車、電気自動車、プラグインハイブリッド自動車、燃料電池自動車、クリーンディーゼル車など）について、2020年までに新車販売のうち半分の割合で導入するという目標を掲げている。

「経済成長戦略大綱」（平成 18 年 7 月）の自動車関連の、「次世代自動車・燃料イニシアティブ」では、「クリーンディーゼル」を 5 つの戦略の一つとして、重要戦略として位置づけられている。

経済産業省は、全ての研究開発プロジェクトを 7 つの「イノベーションプログラム」の下で体系的に推進している。そのうちのひとつ「エネルギーイノベーションプログラム」に、「革新的次世代低公害車総合技術開発」は含まれている。

「エネルギーイノベーションプログラム」は 5 つの柱、Ⅰ. 総合エネルギー効率の向上、Ⅱ. 運輸部門の燃料多様化、Ⅲ. 新エネルギー等の開発・導入推進、Ⅳ. 原子力等利用の推進とその大前提となる安全の確保、Ⅴ. 化石燃料の安全供給確保と有効かつクリーンな利用、から構成されている。本プロジェクトは、総合エネルギー効率の向上の先進交通社会確立技術として位置づけられているとともに、運輸部門の燃料多様化、新エネルギー等の開発・導入推進、化石燃料の安全供給確保と有効かつクリーンな利用にも寄与する研究開発施策としても位置付けられている。

また、本プロジェクト発足時の社会を取り巻く環境としては、地球温暖化問題や大気汚染問題等の環境問題に対する関心が高まりつつあり、自動車に起因する環境問題への対応が急務である中、これまで以上に低公害車の開発・普及の必要性が高まっていた。特に、大型トラック・バスについては、その技術的困難さから排ガス対策の技術開発が遅れている。

経済産業省で自動車を巡る環境・エネルギー問題に対応すべく、自動車燃料・技術に関する長期的な見通しの検討を行うため、「次世代低公害車の燃料及び技術の方向性に関する検討会」が設置され、平成 15 年 8 月にとりまとめが行われた。この報告によると、自動車を巡る問題の中では、第一に新長期規制（2005年に実施）後に予想される規制強化に向けて2010年までの早い段階で都市環境問題の懸念を払拭すべき大気環境問題が最も重視すべき課題との結論であった。

このような背景の中、環境負荷の高い従来のディーゼルエンジンにかわる高効率でクリーンなエンジン、大気汚染物質の低減に役立つ燃料などを開発することによって、国として、ディーゼル車の環境面における懸念を払拭する見通しを示す必要がある。

また、我が国の自動車産業は、欧米各国と環境対策技術の激しい開発競争を繰り広げており、その優劣がすなわち競争力につながっていく状況であることから、国が主導的かつ早期に環境対策技術を開発し、公共財として提供することにより、各自動車メーカーにおいて、限られた経営資源を投入できる環境を整備する必要がある。

さらに、先の報告書における第二の課題である地球温暖化及び資源制約対策への取り組みも必要

である。

以上の理由から本事業を「次世代低公害車技術開発プログラム」の一環として実施する。

本プロジェクトでは、2005年の新長期規制後に予想されるさらなる排出ガス規制強化に備え、現在、物流の主流を占める、貨物自動車用大型及び小型のディーゼルエンジンなどでの開発を狙っているが、一方、乗用車についてもクリーンなディーゼルエンジンが開発できれば、燃費向上及びCO₂削減の点からその効果は大きいので、開発項目の中に加える。

1.2. 実施の効果（費用対効果）

本プロジェクトでは、特に、大型トラック・バスの排ガス対策に関する技術開発を目的とし、2009年実施予定のポスト新長期規制値の1/3の挑戦目標値を目標として開発を進める。中国や東南アジアなどの市場は、日本自動車メーカーの市場拡大が予想される。また、ディーゼル乗用車については、現在そのシェアはほとんどないので、本プロジェクトの成果によりガソリン車からの代替が進めば、新しい市場が形成されることとなる。

本プロジェクトの費用は、総額約40億円である。

市場規模の見通しと省エネルギー効果の試算結果を以下に記す。

【市場規模】

(1) トラック・バス

2020年の年間登録台数を2008年と同等の44万台とし、大型車9万台、小一中型車35万台と想定する。

1台あたりの価格を250万円と想定し、前記台数をかけると1兆1000億円の市場となる。このうちの30%が本プロジェクトの成果を実用化したと想定すると、3300億円の市場となる。

(2) 乗用車

2020年の年間登録台数を2008年と同等の280万台とし、そのうちの10%がディーゼル車に置き換わると想定する。

1台あたりの価格を150万円と想定し、前記台数をかけると4200億円の市場となる。トラック・バス及び乗用車をあわせて約7500億円の市場規模が想定される。

【省エネルギー効果】

(1) トラック・バス

大型トラックの燃費を3km/l、年間走行距離を40,000kmと想定する。

同様に小一中型トラックの燃費を6km/l、走行距離を10,000kmと想定する。

燃費の向上率は大型、小一中型ともに10%とする。

1台あたりの年間の燃料の使用量の差を計算すると

大型； $40,000/3-40,000/(3 \times 1.1)$ 小一中型； $10,000/6-10,000/(6 \times 1.1)$

市場規模の項目で想定した台数をかけると

$(40,000/3-40,000/(3 \times 1.1)) \times 90,000 \times 0.3 + (10,000/6-10,000/(6 \times 1.1)) \times 350,000 \times 0.3 = 48,300 \text{kl}$

省エネルギー量として約4.8万kLとなる。

(2) 乗用車

乗用車の燃費は 12km/l、走行距離 6,000km と想定する。

燃費の向上率は、ガソリン車に対して 20% と想定する。

1 台あたりの年間の燃料の使用量の差を計算すると

$$6,000/12 - 6,000/(12 \times 1.2)$$

市場規模の項目で想定した台数をかけると

$$(6,000/12 - 6,000/(12 \times 1.2)) \times 2,800,000 \times 0.1 = 23,200 \text{kl}$$

省エネルギー量として約 2.3 万 kL となる。

トラック・バス及び乗用車をあわせて約 7.1 万 kL の省エネルギー量が想定される。

トラック・バス及び乗用車の年間登録台数は、「自動車統計月報」を出典とした。バスの登録台数は 1.5 万台/年なので大型トラックの数字に含めた。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

2.1. 事業の背景

本プロジェクトは、「次世代低公害車技術開発プログラム」の中のひとつとして実施され、①環境負荷の小さい自動車社会の構築と②我が国自動車メーカーの国際競争力の強化を目標としている。

ディーゼルエンジンは、ガソリンエンジンに比べ、20%程度高い熱効率が得られ、特に、最近ヨーロッパなどで普及しているように運輸部門における省エネルギーのキー技術であるといえる。しかしながら、排ガス中のPM（微粒子状物質）及びNO_xの点で環境側からの要請に十分応えておらず、ディーゼルエンジンの環境特性を改善することは、省エネルギーを推進する上で極めて重要である。

特に、物流の主流を占める大型のトラック・バスに関する排ガス対策技術の開発を行うことが重要であり、本技術の確立により、ディーゼルエンジンに関する都市大気環境問題への懸念を払拭し、運輸部門におけるCO₂削減を図り、地球温暖化対策に資するものである。

図 2.1-1 は、大型車についての排ガス規制値の変化を示したものである。また、図 2.1-2 は、二酸化窒素の環境基準達成率の推移を示したもので、年々改善されているが、自排局では、まだ10%程度の未達成局がある。

【大型車】

NEDO 目標は、将来の規制強化を踏まえ、
ポスト新長期規制の挑戦的目標値
NO_x 0.2g/kWh（ポスト新長期の約 1/3）に設定

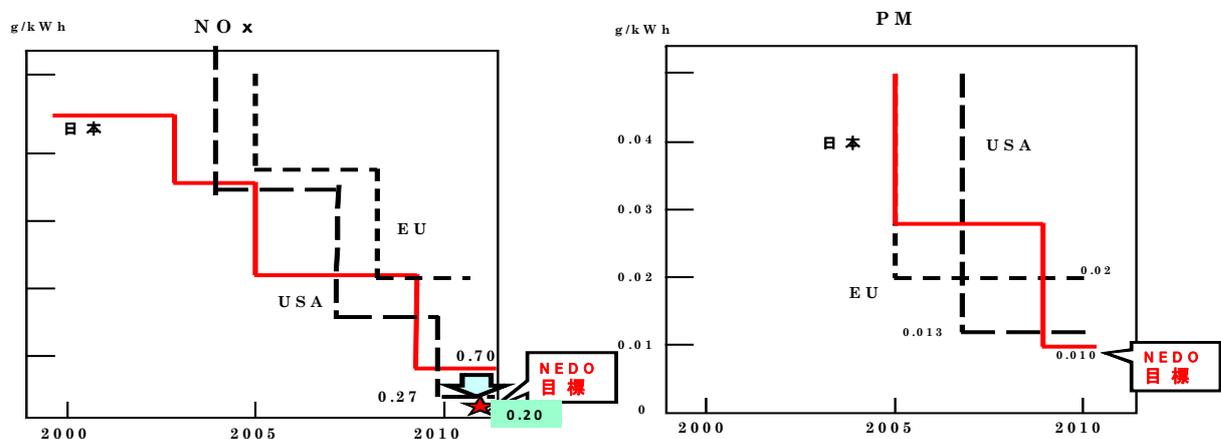
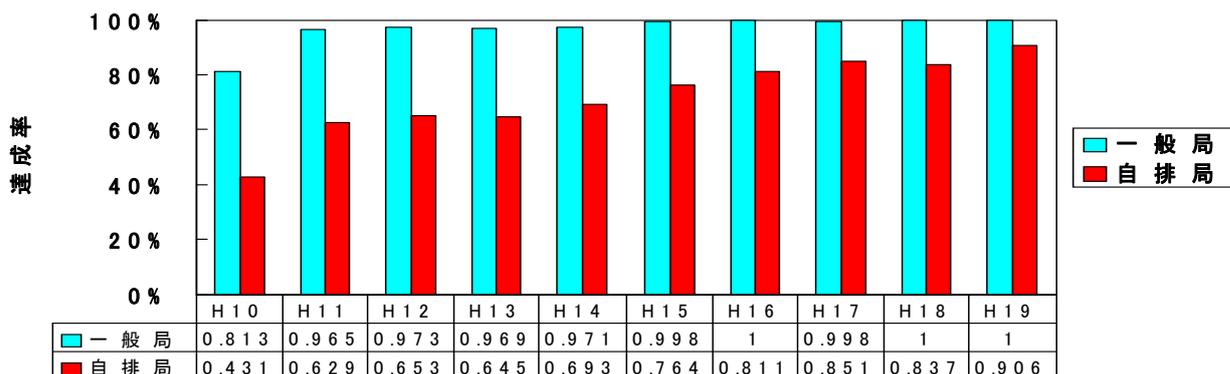


図 2.1-1 大型車の排気ガス規制値の推移

二酸化窒素の環境基準達成率(自動車NOx・PM法の対象地域)



注) ・一般局(一般環境大気測定局)
 一般環境大気汚染状況を常時監視する測定局
 ・自排局(自動車排出ガス測定局)
 自動車走行による排出物質に起因する大気汚染の考えられる交差点、道路端付近の大気を対象にした汚染状況を常時監視する測定局

図 2.1-2 二酸化窒素の環境基準達成率

2.2. 事業の目的及び意義

自動車を巡る環境・エネルギー問題としては都市大気環境問題への対応、エネルギーセキュリティの確保及び地球温暖化問題への対応がある。これらの中で、エネルギーセキュリティに関しては、将来の水素社会への対応を含めて中長期的課題として位置付けられている。一方、大気環境問題としては、寄与度が大きい大型トラック・バスについても排ガス対策の技術開発が進められてきたが、ポスト新長期規制後に予想されるさらなる規制強化に向けて、2015年頃までには解決することが求められており、緊急の課題として認識されている。また、地球温暖化問題に関しては、CO₂排出削減が要求されており、その対応はますます厳しくなっていくものと予測される。

これまで、自動車を巡る環境・エネルギー問題については、大気環境問題、地球温暖化問題及びエネルギー問題を個別の政策課題とし、それぞれに必要な選択・措置が講じられてきたが、将来的にはこれらの課題が密接に関連するため、今後はこれらを総合的に踏まえて技術開発を進めることが最も効果的である。具体的には、開発のハードルが高く実用化は困難とされてきた自動車技術についても、例えば、自動車技術と燃料とのマッチングを踏まえて同時に開発を進めることで、大気環境問題とCO₂問題への対応を考慮した実用化技術の可能性が見えてくる。

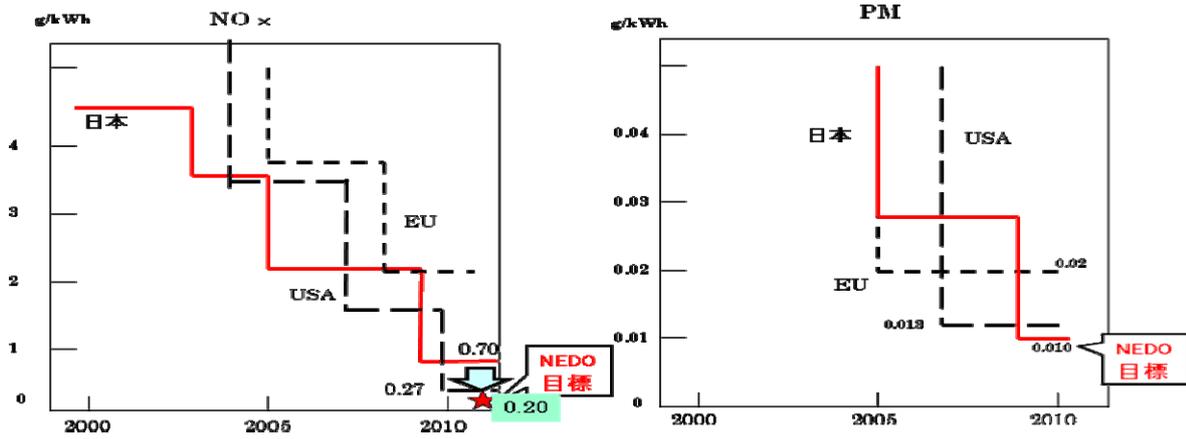
そこで、ディーゼルエンジンに特化した排出ガス後処理、燃料利用技術を中心に開発を進め、ディーゼルエンジンの高い熱効率を維持した上で、画期的に排ガスをクリーン化する技術を開発する。

本技術の確立は、ディーゼルエンジンに起因した都市大気環境問題への懸念を払拭するとともに、運輸部門における地球温暖化対策に資するものとなる。

2.3. 事業の位置付け

2005年の新長期規制は、図 2.3-1にあるようにNO_xは世界で最も厳しいが、PMは欧州の規制値のほうが厳しくなっている。その後、2009年頃に予定されているポスト新長期規制では、NO_x、PMともに世界で最も厳しい値となる。この状況は、大型車及び乗用車ともに同じであり、新しい規制値に対応する環境技術開発が必要になってくる。

【大型車排出ガス】



【乗用車排出ガス】

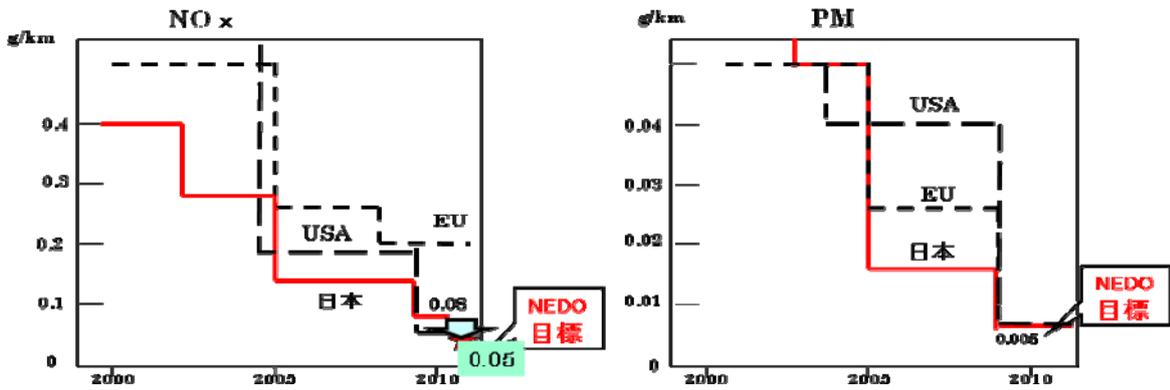


図 2.3-1 日・米・欧のディーゼル排出ガス規制

ディーゼルエンジンは、熱効率が高いことや多様な燃料に適應できることから世界の自動車メーカーを中心とした技術開発が積極的に実施され、欧州では、ディーゼル乗用車の販売シェアが50%を越える国も現れている。いずれも地球温暖化対策としてのCO₂削減に向けてのキー技術としてディーゼルエンジンの開発は、日米欧とも、国家プロジェクトとして、進められている。



図 2.3-2 日米欧のクリーンディーゼル国家プロジェクト

世界で最も厳しい規制値に適合する技術を確立することは、国際的な技術の優位性を向上させることができ、わが国自動車メーカーの競争力強化につながるものである。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

①ディーゼル排出ガスの低減

【当初の目標】

大型貨物車に関しては、NO_xは2005年実施の重量車新長期規制値の1/10を、PMについては、同じ規制値の1/2を、各々達成目標とする（中量車などの貨物車についても、新長期規制値に対して、同様な削減比率で目標値を設定する）。

乗用車に関しては、NO_xは2005年実施のガソリン車の新長期規制値として、ガソリン車と同等レベルの達成を目標とする。PMは、ディーゼル乗用車の新長期規制値の1/2を目標とする。

なお、その他の規制物質については新長期規制で定められた値を目標値とする。

表II. 1-1 排出ガスの達成目標値（平均基準値）

	NO _x	PM	走行モード
大型貨物車 (g/kwh)	0.2	0.013	JE05
乗用車 (g/km)	0.05	0.007	JC08

【変更後の目標】

大型貨物車に関しては、平成17年4月の中央環境審議会第8次答申で示されたNO_x及びPMの数値を達成目標とする（中量車などの貨物車についても、同様に答申案の数値を目標値として設定する。）。乗用車に関しても前記と同様の数値を達成目標とする。

なお、その他の規制物質については、新長期規制で定められた値を目標値とする。

（平成17年10月6日の第2回技術委員会で承認され、基本計画を改訂した。）

表II. 1-2 変更後の排出ガス達成目標値（平均基準値）

	NO _x	PM	走行モード
大型貨物車 (g/kwh)	0.2	0.010	JE05
乗用車 (g/km)	0.05	0.005	JC08

② 燃費の改善

【当初の目標】

2005年の新長期規制や、その後予想されるさらなる排出ガス規制強化は、燃費にとっては、かなりの悪化要因となる。しかし、ディーゼルエンジンにとっては、都市環境改善から要求される、排出ガス規制強化への対応は必須である。そういう状況の中で、この「革新的次世代低公害車総合技術開発」では、プロジェクトの燃費改善目標値について、今後策定される燃費基準値からさらなる燃費改善を、エンジン開発の面でどれだけ上積みできるかについては、必ずしも技術的な見通しが立っていない状態ではあるが、新燃焼方式などの開発による燃費改善を見込み、燃費向上の目標値としては、現行基準値に対して10%とする。

なおディーゼル乗用車については、ガソリンエンジンからディーゼルエンジンへの転換に加え、さらに新燃焼技術などの開発を見込んで、2010年のガソリントップランナーの燃費基準から30%の燃費向上を目標値とする。

表II. 1-2 燃費目標値

	燃費向上率 (現行基準比)	走行モード
貨物車	10%	JE05
乗用車	30% (ガソリン比)	JC08

【変更後の目標】

ディーゼル乗用車については、当初の2010燃費基準の30%向上から、2007年2月

に発表された2015年トップランナーの乗用車等の新燃費基準（トップランナー基準）から20%の燃費向上を目標値とする。

（平成19年10月31日の第6回技術委員会で承認され、基本計画を改訂した。）

表Ⅱ. 1-4 燃費目標値

	燃費向上率 (現行基準比)	走行モード
貨物車	10%	JE05
乗用車	20% (2015新燃費基準)	JC08

2. 事業の計画内容

経済産業省で平成15年8月にとりまとめられた「次世代低公害車の燃料及び技術の方向性に関する検討会」の報告に基づき、本プロジェクトである「革新的次世代低公害車総合技術開発」を実施する。

特に、環境負荷の高いディーゼルエンジンのクリーン化を実現し、かつ、高い熱効率を維持したままで、CO₂排出量の低減も狙うものであり、具体的には、燃料技術・自動車技術の両面から研究開発を実施する。

研究開発テーマは下記4分野にわたり、9チームが担当する。

- ① 新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化
- ② 新燃料（GTL）を用いたエンジン技術の開発
- ③ 革新的後処理システムの研究開発
- ④ 次世代自動車の総合評価技術開発

早稲田大学理工学術院 大聖泰弘教授をプロジェクトリーダーとし、平成16年から平成20年の期間（5年間）にわたって、上記項目の研究開発を実施する。

2.1. 研究開発テーマの採択経緯

2.1.1 テーマの公募まで

平成14年10月から、経済産業省において「次世代低公害車の燃料及び技術の方向性に関する検討会」を開催し、国内・海外の関連企業、有識者等、自動車燃料・技術に係る幅広い有識者からの報告とこれを踏まえた議論、検討を行うとともに、大気環境問題の対応に向けたディーゼルトラック・バス等の燃料・技術選択に関して、学識経験者で構成されるワーキンググループを開催し、有識者等からヒアリングを実施し検討を行い、報告書を取りまとめた。

この報告書に基づき、平成16年2月24日に「革新的次世代低公害車総合技術開発」事業の事前評価書をまとめた。引き続き、平成16年2月25日～平成16年3月19日の期間にNEDO POST2を開設し、パブリックコメントを募集した。2件のコメントがあり、その内容を基本計画に反映した後、委託先の公募に至った。

2.1.2 公募から採択まで

(1) 委託先を公募

平成16年6月1日（火）公募開始（経済産業省及びNEDOホームページに掲載）

平成16年6月3日（木）公募説明会開催 20社 約30名の出席があった。

(2) 公募締め切り

平成16年7月12日（月）提案書提出締め切る。提案件数：12件

(3) 採択委員会

平成16年7月13日（火）～7月16日（金）NEDO書面審査を実施。

提案書内容を査読し、様式や内容の不備を提案者と調整した。

平成16年7月20日（月）～7月30日（金）外部専門家による書面審査を実施。

提案内容の技術面・政策面における審査・採点を実施した。

平成16年8月6日（金）外部専門家による採択審査委員会を実施した。

書面審査結果をもとに順位付けを行い、8件を採択候補とした。

平成16年8月24日（火）契約・助成委員会を開催し、候補8件の採択を決定した。

平成16年8月26日（木）委託先決定の通知（プレス発表）を行った。

研究開発項目④の次世代自動車の総合評価技術開発については、

平成16年9月17日（金）公募開始

平成16年10月22日（金）提案書提出締め切り 提案件数：1件

平成16年10月25日（月）～11月12日（金）NEDO書面審査を実施

平成16年11月5日（金）～11月15日（月）外部専門家による書面審査を実施

平成16年11月30日（火）契約・助成委員会を開催し、候補1件の採択を決定した。

上記経緯により、全9テーマの採択を決定した。

2.2. 研究開発の内容

研究開発の内容を以下に記す。

研究開発項目①「新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化」

エンジンの燃焼を改良してディーゼル排出ガス低減を図ることは重要な技術であるが、NO_xとPMはトレードオフの関係にあるため、同時に大幅に低減するのは難しいことである。最近、燃料を早期に噴射して空気との混合を均一化し、希薄燃焼させる新しい燃焼方式（HCCI、PCCI等）によってNO_x・PMの排出抑制の可能なことがわかってきた。ただし、負荷範囲の広い実用エンジンに適用することは時期尚早といえるものである。

そこで、本プロジェクトでは、この新燃焼方式を含め、ディーゼルエンジンのクリーン化、高効率化を実現する新燃焼方式の開発及び燃料噴射や燃料品質の最適化を行う。

具体的には、以下の開発項目（1）から（3）について研究開発を行う。

(1) 新燃焼方式の開発

i 混合圧縮着火燃焼方式 対象：大型及び小型エンジン

ii その他新しい燃焼方式の開発

(2) 新燃焼方式に対応した燃料噴射の最適化

例えば、高圧噴射、噴射回数・量など

(3) 燃焼方式に対応した燃料品質の最適化及び様々な燃料を提供

例えば、セタン価、蒸留性状、硫黄分、芳香族成分など

研究開発項目②「GTLを用いたエンジン技術の開発」

今後エネルギーの中長期的な資源制約を考えると新燃料が不可欠となる。

本プロジェクトでは、新燃料としてGTLに着目し、軽油にGTLを混合して現行車に適用す

る場合と専用車の開発を必要とするGTL100%燃料（ニート燃料）について、それらの最適な使用法の開発を行う。

GTLについては、製造法によって燃料性状が異なるので、各種GTLについてその性状の確認、軽油との混合割合とエンジン性能の関係及び実用性等について検討する必要がある。

具体的には、以下の研究開発を行う。

- (1) GTL混合軽油に適したエンジン技術の開発
- (2) GTL100%燃料に適したエンジン技術の最適化

GTLに適したエンジンの開発は、従来のエンジン開発手法が適用できることから、研究期間を3年とする。

研究開発項目③「革新的後処理システムの研究開発」

ディーゼルエンジン排出ガス中のNO_xは、これまで排出規制の強化がなされてきたが、燃費とNO_xの間にはトレードオフの関係が存在するため、結果として燃費改善が充分には達成できず、一部燃費悪化の要因ともなっていた。しかも、今後NO_x規制強化が予想されるため、燃費改善への対応がさらに遅れることが懸念される。

ディーゼルエンジンのNO_xを低減できる有効な後処理技術が開発されれば、燃費を最適化した後、NO_xを低減できるので環境対策と燃費改善が同時に可能となる。

以上の背景から、NO_x低減を主とした研究開発を進め、耐久性、信頼性の確立を目指して研究開発を行う。

具体的には、以下の研究開発を行う。

- (1) 尿素SCRシステム

尿素を還元剤とするSCRシステムであり、特に、排気温度の低い過渡運転時のNO_x浄化率を向上するため、低温活性の高い触媒、尿素水供給制御システムとこれを機能させるための各種センサー等の開発を行う。SCR触媒中の重金属成分、尿素の熱分解成分及びアンモニアの排出のないことを確認する。

また、本システムは平成18年度までに完成させ、その後、さらなる規制強化に対応した技術として利活用する。

- (2) NO_x吸蔵還元システム

本システムは、燃料中の硫黄分によって触媒が被毒されるため、触媒を再生する必要があり、燃費の悪化を伴う。したがって、硫黄被毒の少ない高効率の吸蔵還元触媒材料とその使用システムを開発する。

- (3) DPFシステム

PMについては新長期規制対応システムとして触媒付きフィルター（CDPF）が市販されると予想されるが、NO_x吸蔵触媒と同様に硫黄分の影響を受ける。そのため、従来の触媒を使用しないプラズマ方式あるいは電気集塵方式などのDPFを開発する。さらに、過渡運転時のように、排気温度の低い状態においても除去率を向上できる排熱有効利用技術の開発を行う。

- (4) その他新しいコンセプト（例えば、電気化学的な方法）の排出ガス処理技術

なお、上記開発は単なる実験室的開発には止まらず、実エンジンとの組合せにより実規模ベースで開発を進めることを前提とする。

研究開発項目④「次世代自動車の総合評価技術開発」

本プロジェクトで開発された技術は、GTL燃料などの新燃料とともに、中間的に、あるいは、最終的にエンジンや車両による性能確認や同一基準での比較評価が必要であり、さらに、燃費、排出ガス両面からの総合的な評価が必要である。

また、本プロジェクトで開発された次世代低公害車の導入により、関東圏を中心とした大気環境の改善効果をシミュレーションにより予測することも必要である。

具体的には、本プロジェクトで開発した低公害自動車に関して、以下の研究開発を行う。

(1) 性能確認、性能評価

排出ガス、燃費、エンジン性能等を評価する。

必要に応じ、車両でも評価する。

GTL等新燃料も含め、総合的に評価する。

(2) PM計測・評価

ナノ粒径域までを含むPMの計測システムの校正技術及びPMの希釈・サンプリングに伴う誤差影響を考慮した試験・評価法の開発を行い、PMを総合的に評価する。

(3) 排出ガス中の未規制物質評価

未規制排出物質の個別測定を行う。

エイムズテストなどによる未規制排出物質の健康影響評価を実施する。

(4) 次世代低公害車導入による大気改善効果の予測

関東圏を対象としたPMやNO_x等の数値シミュレーションを行い、次世代低公害車導入普及による大気環境の改善を予測する。また、交差点周辺部などの局所的な改善効果についても予測を行う。

次世代低公害車のエミッションマップデータを取得し、数値シミュレーションに用いる。

(5) その他有用な評価項目

① から④の研究開発項目について、開発技術の詳細を表Ⅱ. 2-1に示す。

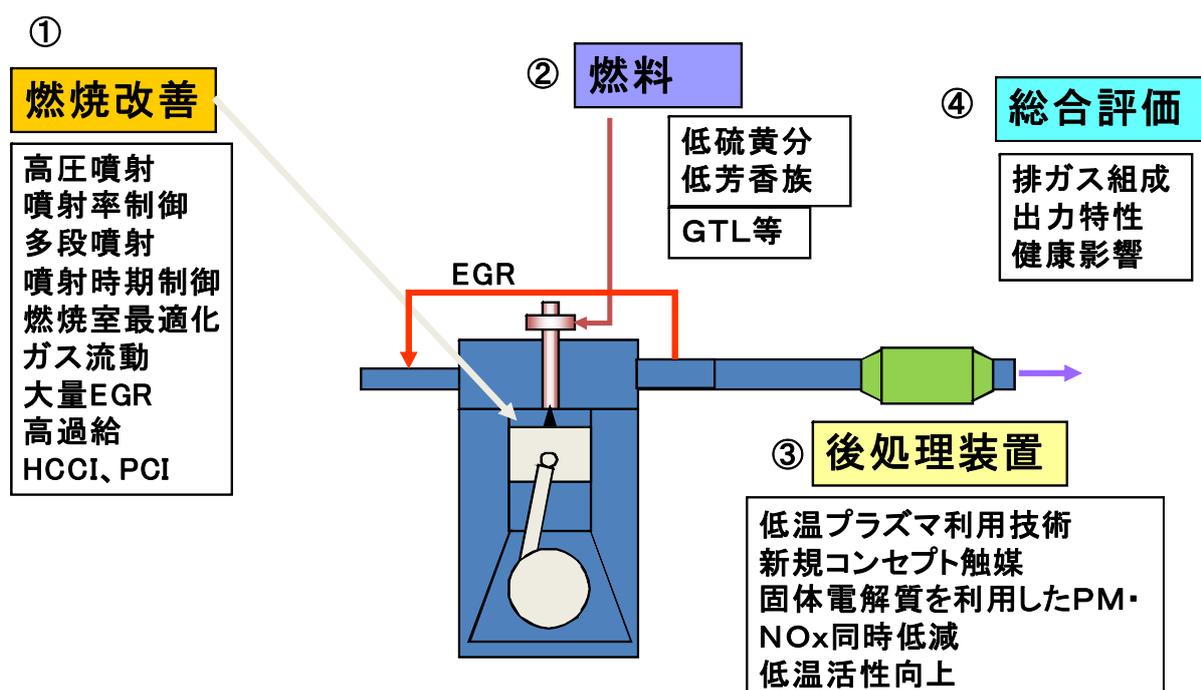


図 Ⅱ. 2-1 プロジェクトの構成

表 II. 2-1 プロジェクトの構成

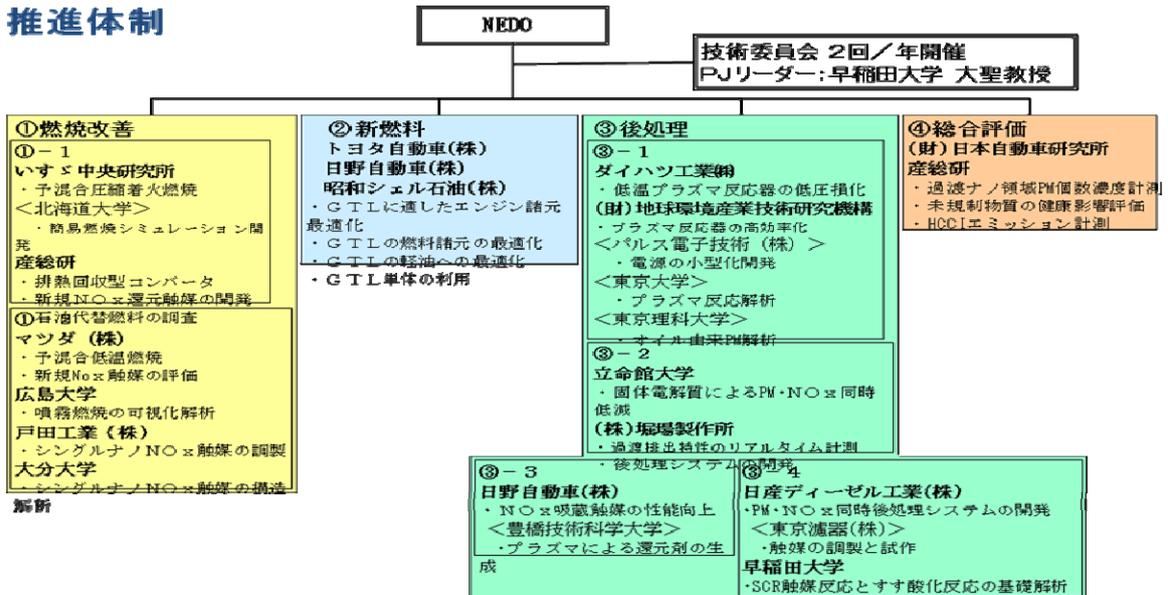
開発分野	実施者	開発技術内容(実施計画書より)
①燃焼改善 (エンジン)	(株)いすゞ中央研究所 (独)産業技術総合研究所	予混合圧縮着火燃焼 排熱回収型コンバータ、新規NOx還元触媒
	マツダ(株) 広島大学	燃焼と後処理 のチーム統合 (2007~)
	マツダ(株) (株)戸田工業 大分大学 (旭化成(株):'04~'06 終了)	
②新燃料 (合成軽油)	トヨタ自動車(株) 日野自動車(株) 昭和シェル石油(株)	GTL利用に適したエンジン諸元の最適化 GTL燃料諸元の最適化
③後処理装置 (排気ガス後処理)	ダイハツ工業(株) (財)地球環境産業技術研究機構	プラズマ反応器の低圧損化(小型車への適応) プラズマ反応器の高効率化
	立命館大学 (株)堀場製作所	固体電解質の低温作動化 NOx、PMの同時低減手法 過渡排出特性のリアルタイム計測
	日野自動車(株) <豊橋技術科学大学>	NOx吸蔵触媒の性能向上、プラズマ活用尿素SCR触媒 PMの低温燃焼技術
	日産ディーゼル工業(株) <東京濾器(株)> 早稲田大学	NOx・PM同時低減後処理システムの開発 SCR触媒反応の基礎解析 すす酸化反応の基礎解析
④総合評価	(財)日本自動車研究所 (独)産業技術総合研究所	過渡ナノ領域PM個数濃度計測 HCCIエミッション計測 未規制物質の健康影響評価

2.3. 研究開発の実施体制

本プロジェクトは公募により委託先を採択し、平成16年～平成20年までの5年間の計画で実施する。実施にあたり、研究開発項目①～④を9チームが担当する。各チームに研究開発責任者を置き、各チームが担当するテーマの運営・管理に責任を持つ体制とした。

また、プロジェクト全体は、早稲田大学理工学術院 大聖泰弘教授をプロジェクトリーダーとし、効率的な研究開発の推進を図るようにした。プロジェクトの推進体制を以下に記す。

推進体制

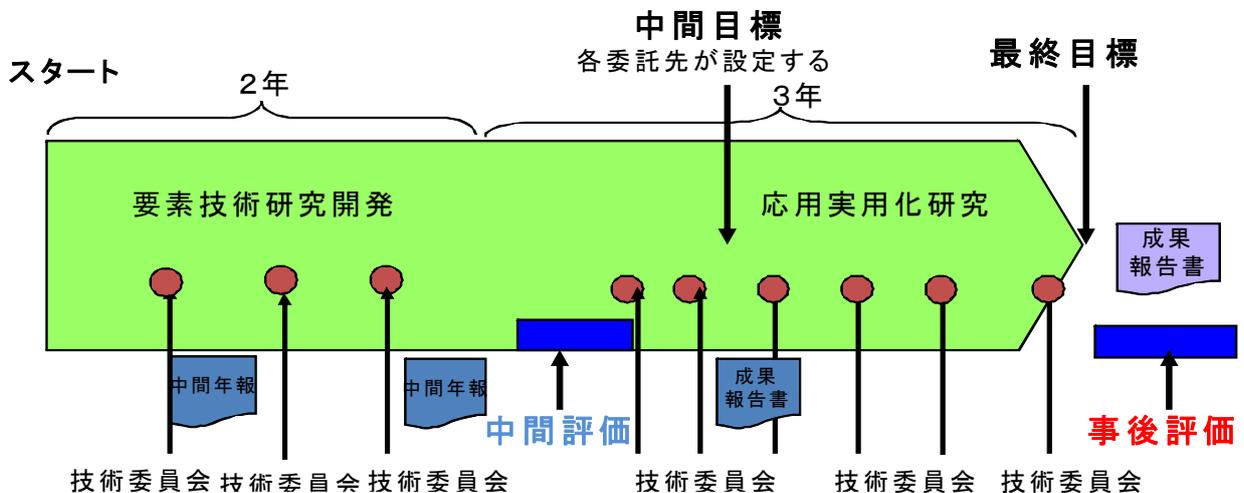


図Ⅱ. 2-2 推進体制(平成20年4月現在)

2.4. 研究開発の全体スケジュールと予算

【全体スケジュール】

図Ⅱ. 2-3に全体のスケジュールを示す。研究開発項目②「GTLを用いたエンジン技術の開発」のみ3年計画である。平成18年度に中間評価を実施する。



図Ⅱ. 2-3 全体スケジュール

【研究開発の予算】

表Ⅱ． 2－2 に全体及び各分野別の予算を示す。5年間の総額は、約40億円である。

表Ⅱ． 2－2 研究開発テーマの予算

開発分野	研究テーマ	実施者	実績(百万円)					
			H16年度	H17年度	H18年度	H19年度	H20年度	合計
①燃焼改善 (エンジン)	新燃焼方式の開発及び燃料の最適化 (超高度燃焼制御エンジンシステムの研究開発)	(独)産業技術総合研究所 (株)いすゞ中央研究所	124	578	393	307	187	1589
	新燃焼方式の開発及び燃料の最適化 (超低エミッション高効率乗用ディーゼルエンジン)	マツダ(株) 広島大学						
	革新的後処理システムの研究開発 (ナノテクノロジーを応用した 高性能排ガス浄化用触媒)	戸田工業(株) 大分大学						
③後処理装置 (排気ガス 後処理)	革新的後処理システムの研究開発 (低温プラズマシステム)	ダイハツ工業(株) (財)地球環境産業 技術研究機構	346	518	496	370	240	1970
	革新的後処理システムの研究開発	立命館大学 (株)堀場製作所						
	革新的後処理システムの研究開発	日野自動車(株) <豊橋技術科学大学>						
	革新的後処理システムの研究開発	日産ディーゼル工業(株) 早稲田大学						
②新燃料 (合成軽油)	GTLを用いたエンジン技術の開発 GTL: Gas to Liquid 研究開発期間:3年	トヨタ自動車(株) 日野自動車(株) 昭和シェル石油(株)	29	20	52			101
④総合評価	次世代自動車の総合評価技術	(財)日本自動車研究所 (独)産業技術総合研究所	17	127	89	90	89	412
平成19年度からマツダ(燃焼改善)とマツダ(後処理)とを統合して一本化した。			516	1243	1030	767	516	4072

< >内は再委託先及び共同実施者を示す。
(注)研究開発管理費を除く

2.5. 研究の運営管理

【技術委員会】

本プロジェクトは5年計画で、2回/年 表Ⅱ． 2－4 に示すように計9回実施、外部有識者(技術委員)に各テーマの研究開発責任者が進捗状況を報告し、各委員の意見を各テーマの運営に反映する。表Ⅱ． 2－3 に技術委員名簿を示す。

表Ⅱ． 2－3 技術委員名簿 (平成16年～20年)

	名前	所属	委員期間
委員長	大聖 泰弘	早稲田大学理工学術院 教授	H16～H20
委員	梶谷 修一	茨城大学工学部 教授	H16～H20
委員	神本 武征	ものづくり大学 学長	H16～H20
委員	後藤 雄一	(独)交通安全環境研究所 環境研究領域長	H16～H20
委員	花村 克悟	東京工業大学炭素循環エネルギー研究センター 教授	H16～H20
委員	水野 哲孝	東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 教授	H18～H20
委員	斎藤 健一郎	新日本石油(株)研究開発本部 研究開発企画部長	H20
委員	石谷 久	慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科 教授	H16～H18
委員	掛川 俊明	日本自動車工業会排出ガス・燃費部会 副部会長	H16～H18
委員	松村 幾敏	新日本石油(株) 常務取締役	H16～H19
委員	御園生 誠	(独)製品評価技術基盤機構 理事長	H16～H18

また、技術委員会では、経済産業省自動車課の出席があり、本プロジェクトの運営管理にご意見をいただいた。

表Ⅱ. 2-4 技術委員会の開催状況

	内容
第1回技術委員会 (H17. 2. 8)	<ul style="list-style-type: none"> 報告内容は研究計画が主体で中間目標値と最終目標値の具体化を実施 実施体制として企業単独のところは、国のプロジェクトとして好ましくないのではとの意見があり、第2回の委員会までに改善するようにした。結果として2つの国立大学を再委託先として実施体制に組み込み、企業単独のチームはなくなった。
第2回技術委員会 (H17. 10. 6)	<ul style="list-style-type: none"> 中央環境審議会第8次答申に対応して、本プロジェクトの排出ガスPM目標値の変更することを承認した。
第3回技術委員会 (H18. 2. 21)	<ul style="list-style-type: none"> 大学・産総研等の要素研究実施者の報告は合同報告とし、企業が同席して実施する全体報告の形態と、互いに競争関係にある企業からの個別報告という形態で実施
第4回技術委員会 (H18. 10. 12)	<ul style="list-style-type: none"> 中間評価の指摘を踏まえ、技術連携強化の推進およびマツダの新燃焼と後処理チームの合体化を推進するようにとのご指摘をいただいた
第5回技術委員会 (H19. 2. 15)	<ul style="list-style-type: none"> 経産省から、次世代自動車燃料イニシアティブの紹介 燃費基準改訂への対応および技術連携、統合化の推進など、本年度の重点推進項目について承認した。
第6回技術委員会 (H19. 10. 31)	<ul style="list-style-type: none"> 2015新燃費基準に対応して、本プロジェクトの乗用車燃費目標を2010基準の30%向上から2015基準の20%向上に変更することを承認した。
第7回技術委員会 (H20. 3. 5)	<ul style="list-style-type: none"> オフサイクル評価など来年度のプロジェクトおよび各チームでの最終評価項目、方法等について承認した。 社会への発信として、本プロジェクト終了のH21年3月に成果報告会を開催することを承認した。
第8回技術委員会 (H20. 10. 7)	<ul style="list-style-type: none"> 最終年度に当たり、目標達成状況の中間報告を行うとともに、最終まとめの方向性を指導した。
第9回技術委員会 (H20. 3. 6)	<ul style="list-style-type: none"> 最終委員会として、目標達成状況を報告した。 最終評価は、全般的に目標を達成した。

さらに、以上の委員会とは別に、各実施者主催の委員会・技術連絡会に出席し、各テーマ推進の方向性について意思疎通を図った。

【プロジェクトリーダー】

早稲田大学理工学術院 大聖泰弘教授をプロジェクトリーダー（PL）にし、各テーマの進捗状況の把握、計画の軌道修正、実施体制の見直し及び予算金額の配分（加速判断等）の項目に関して指示をいただいた。

【加速案件】

NEDO企画調整部が年度ごとにNEDO全体のプロジェクト予算の一部をプールし、一定の基準を満たしたテーマに費用を追加し、より一層の成果を上げるよう加速するしくみで、春と秋の2回／年実施時期がある。

本プロジェクトでも各テーマの進捗状況に合わせて提案を行い、平成17年秋に4案件128百万円の加速を実施し、平成18年春の加速では、3案件37百万円の加速を実施した。

3. 情勢変化への対応

3.1. プロジェクト目標値の見直し

(1) 排出ガス達成目標値の変更

平成17年3月に作成された「基本計画」では、本プロジェクトの最終目標を平成17年10月に実施される「新長期規制」のNO_xは1/10、PMは1/2という数字としていたが、平成17年4月に中央環境審議会第8次答申が出され、「新長期規制」後の規制値が具体化された。本答申の数値は、特にPMの数値が厳しくなっており、本プロジェクト終了後の規制値ということもあったので、第2回技術委員会において目標値の変更をNEDOから提案し、各実施者、技術委員各位及び経済産業省の承認を得て変更し、「基本計画」の改訂を実施した。

(2) 乗用車燃費達成目標値の変更

当初の基本計画では、本プロジェクトの乗用車燃費の最終目標を、2010年ガソリン車燃費基準の30%向上で設定していたが、平成19年7月に交付された2015年新燃費基準に対応するために、2015新燃費基準の20%向上への目標値変更を、第6回技術委員会に提案し、各実施者、技術委員各位及び経済産業省の承認を得て変更し、「基本計画」の改訂を実施した。

4. 中間評価結果への対応

4.1. 中間評価の主な指摘事項と対応

平成18年5月29日に「中間評価第1回分科会」、平成18年7月25日に「第2回分科会」、平成18年9月26日に「第10回 研究評価委員会」が実施された。

本中間評価の結果は、「概ね現行通り実施して良い」との評価を受けた。また、主な指摘事項としては、各分野の技術連携強化など4項目があり、その主な指摘内容と対応状況を表Ⅱ.4-1に示す。

表Ⅱ. 4-1 中間評価での主な指摘事項とその対応

指摘		対応
1	燃焼・燃料・後処理分野の技術連携強化の推進を推進すること	<ul style="list-style-type: none"> ・技術連携・統合WGの発足、推進（'09/05～ 燃焼、後処理、評価分野から7チーム中5チーム参加） ・数値シミュレーションを用いて、相乗効果が期待され、目標値を到達可能な見通しが得られた。
2	多様な試験モードでの排出ガス評価を推進すること	<ul style="list-style-type: none"> ・オフサイクル評価の設定と評価の推進 ・排ガス温度の低い都市内渋滞時を想定したJARI平均車速15Km/hモードにて評価を実施 ・都市内渋滞時の排出量として、既存の排出係数から当初予測された悪化はないことが確認できた
3	・GTL以外にBDFなどの影響なども視野に	・バイオマス燃料(BDF)評価追加
4	当初に設定した分野にこだわらず、要素技術開発と総合化の視点から扱いを見直すことも必要	<ul style="list-style-type: none"> ・体制見直し マツダT(燃焼と後処理のチーム統合と委託先の見直し 6? 4実施者へ '07/4～)

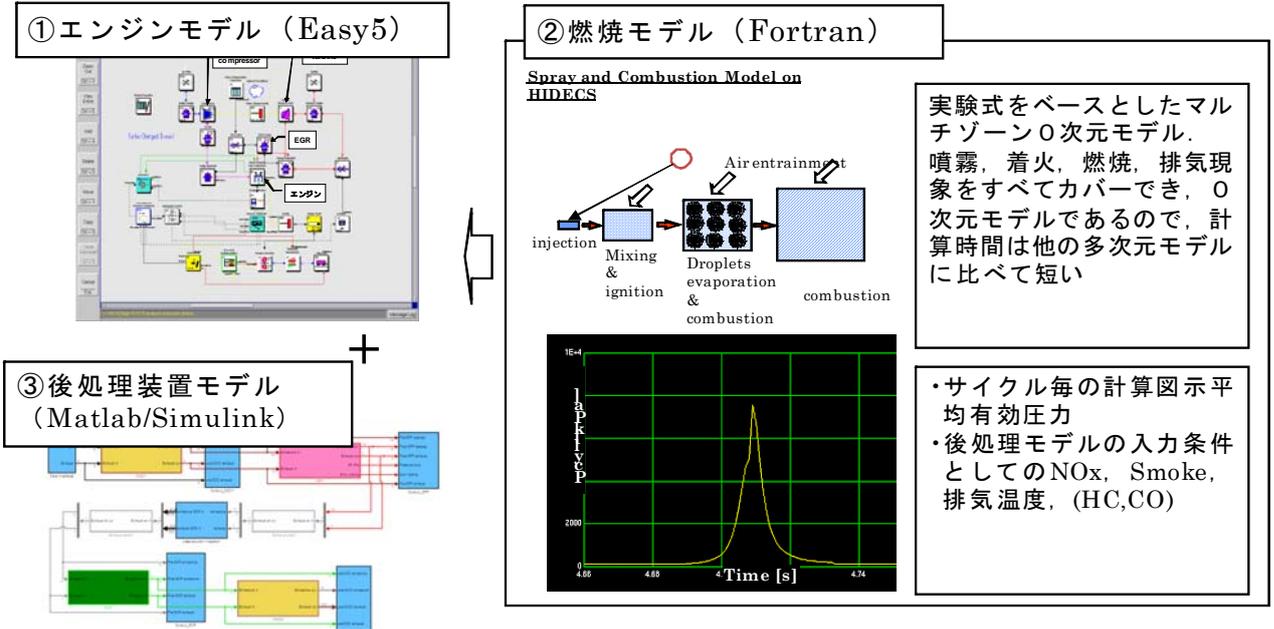
4.2. 技術連携・統合ワーキング

平成18年の中間評価以降に、個別に研究開発に取り組んでいた燃焼と後処理のチームの技術を統合して、より低公害と低燃費の可能性を探る技術連携・統合WGを発足した。当該WGはこの趣旨に賛同したチームのみが参画し、それぞれの性能を持ち寄ってトータルエンジンシミュレーションによって性能向上の可能性を探るものである。そのシミュレーションの概要を図Ⅱ. 4-2に示す、基本的な考え方は目標とする低燃費を満足しつつ、目標とする低排出ガスの性能を満足することである。技術連携・統合WGの活動概要を図Ⅱ. 4-1に示す。検討結果の一例を図Ⅱ. 4-4に示す。いすゞ中研のエンジンを触媒初期温度135℃で運転し、直下型酸化触媒、日野・豊橋技術科学大学のプラズマSCR及びダイハツ、RITEのプラズマDPF、さらに酸化触媒の組合せで目標を達成できる可能性があること、さらにこれが取り組んでいる技術開発の性能限界であることを予測できたことに大きな意義があったものと考えている。本ワーキングの活動のまとめを図Ⅱ. 4-5に示す。

項目	平成19年度				平成20年度			
	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期	第1 四半期	第2 四半期	第3 四半期	第4 四半期
技術連携・統合による総合評価WG	5/22 (JARI) 5/15 (NEDO)	7/31 (NEDO)	9/20,10/3 (NEDO) 10/19 (立命館)	1/31,2/28 (NEDO)	5/7, 5/20 (JARI 東京)	7/23, 9/12 (NEDO)	10/7 技術委 員会	1/8 2/9 (NEDO)
シミュレーションによる統合化検討								
個々の後処理技術の評価								
①理想的なエンジンとの統合	◆	◆	◆◆					
②現実的なエンジンとの統合				◇◇				
後処理技術の組み合わせによる統合						◇◇	◆	◇◇◆
シミュレーションではPM予測が困難なため、実機エンジンでの評価を検討。			◆	◇				

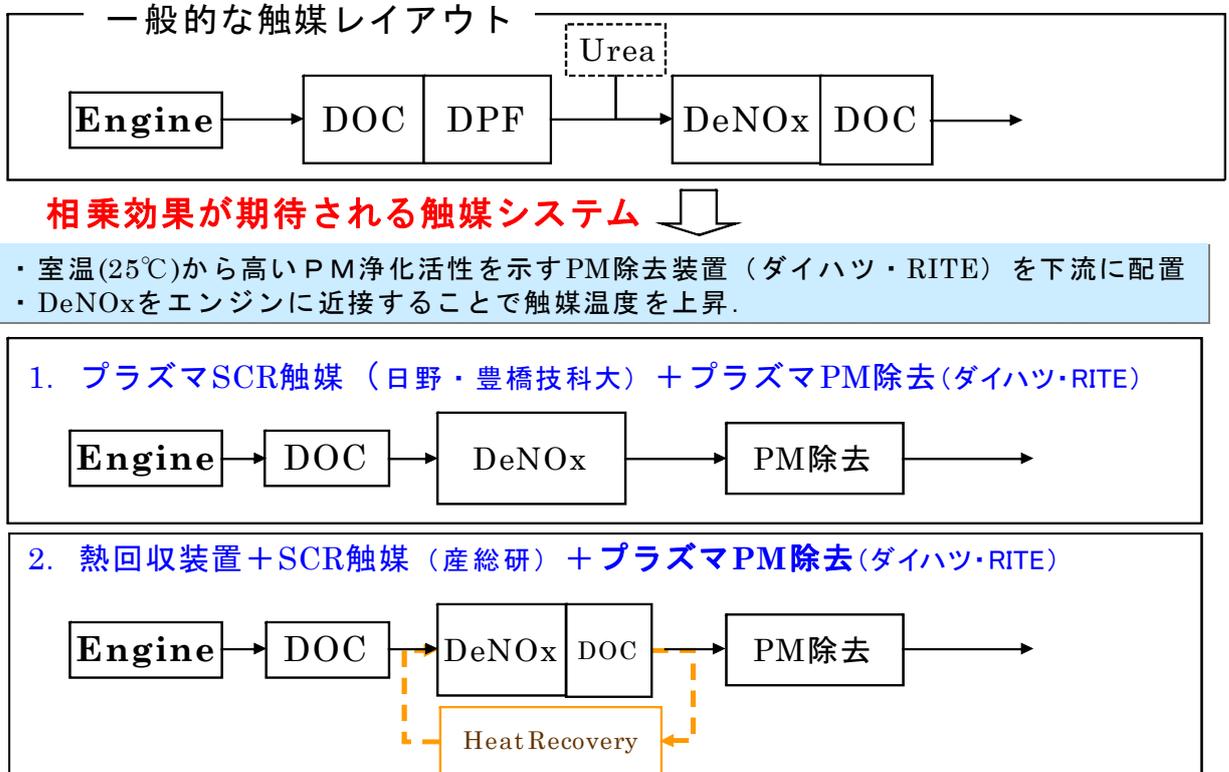
図Ⅱ. 4-1 技術連携・統合WGの活動概要

エンジン(排気温度, 排気流量, NO)と触媒(浄化率, 触媒配置, 容量)について最適化計算を実施するため, 計算速度が速い集中定数系の計算モデルを利用

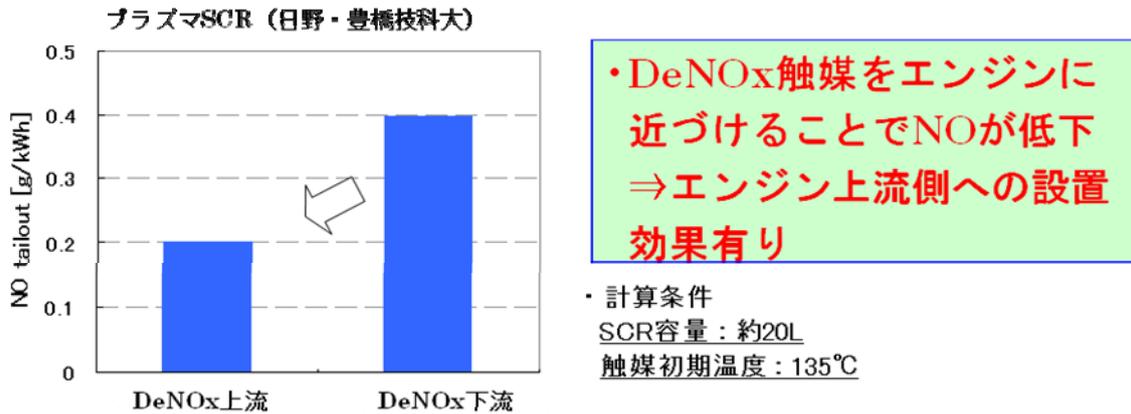
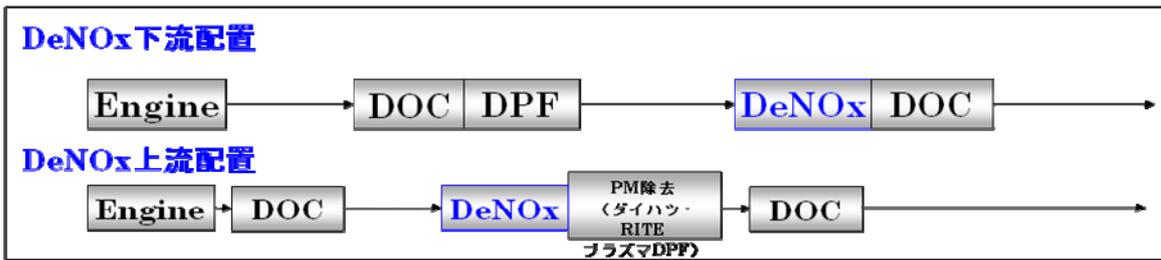


図Ⅱ. 4-2 トータルエンジンシミュレーションシステムの概要

【後処理システムの統合化検討(平成20年度上期)】



図Ⅱ. 4-3 後処理システムの統合化検討(平成 20 年度上期)



図Ⅱ. 4-4 DeNOx 触媒配置の影響

相乗効果が期待されるエンジン・触媒システムに関して、技術連携・統合化WGメンバーで議論し、下記のシステムを見出した。

室温(25℃)から高いPM浄化活性を示すプラズマPM除去装置(ダイハツ・RITE)をエンジン下流側に配置させ、より温度が高い条件で利用できるDeNOx装置をエンジン上流側に配置させることで、相乗効果が期待され、目標値を到達可能な見通しが得られた。

	特徴	期待される効果
プラズマSCR (日野・豊橋技科大)	プラズマにより低温活性を向上。	エンジン近くに配置させるとNO低減効果大。(目標値達成)
熱回収装置+SCR (産総研)	熱交換機能により触媒温度を浄化率の最適な状態に維持する。	触媒開発は低温活性よりも最高浄化率に注力でき、触媒種の実用性が増える。安価な触媒との併用が期待される。
プラズマPM除去装置 (ダイハツ・RITE)	室温(25℃)から高いPM浄化活性を示すため触媒配置の自由度が高まる。	DeNOxをエンジンに近づけることで高い浄化率が期待される。

図Ⅱ. 4-5 技術連携・統合 WG の活動のまとめ

5. 評価に関する事項

NEDOは、国の定める技術評価に関わる指針及び技術評価実施要領に基づき、技術的及び産業技術政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の評価を実施する。スケジュールを以下に記す。

事前評価：平成16年2月24日に実施した。事業概要、事業規模（9億円／年）及び事業期間（平成16年～平成20年 5年間）を決定した。

中間評価：平成18年5月29日 第1回分科会、平成18年7月25日 第2回分科会
平成18年9月26日 第10回 研究評価委員会開催を実施した。

本中間評価の結果は、「概ね現行通り実施して良い」との評価を受けた。また、主なご指摘事項としては、各分野の技術連携強化など4項目があり、その主なご指摘内容と対応状況をPⅡ-8の表Ⅱ. 4-1に示す。

事後評価：平成21年9月24日 第1回分科会

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 成果の概要

(1) 全体概要

2004年度から2008年度まで「革新的次世代低公害車総合技術開発」、略して「クリーンディーゼル」プロジェクトを実施した。

NO_xおよびPMの排出ガス目標値達成状況を重量車について図Ⅲ. 1-1、乗用車について図Ⅲ. 1-2に示す。重量車については全て目標を達成し、乗用車については一部未達があったが、達成の目途が示されている。また、目標値はないが、PMの個数評価を実施した。その結果の一例を、長期規制対応エンジン、新長期規制対応エンジンと比較して図Ⅲ. 1-3に示す。PMの個数濃度は大幅に低減していることが示された。

排出ガスの目標を評価する試験サイクルは、J E O 5モード（重量車、平均車速27 km/h）およびJ C O 8モード（乗用車、平均車速24 km/h）であるが、平均車速が低く触媒温度が低下すると予想される低速域での試験サイクル（J A R I平均車速15 km/hモード）も加えて実施した。図Ⅲ. 1-4に試験サイクルを示すが、J C O 8とJ E O 5は試験サイクルを郊外、市街地、高速と3区分に分けてデータを整理した。図Ⅲ. 1-5に平均車速で排出係数を整理し、ポスト新長期規制対応車と比較した。その結果、当該プロジェクトで開発した全てのエンジンおよび車両は、低速域においても排出ガス浄化性能が確保されていることを確認した。

排出ガスを曝露するラットを使った動物実験と培養細胞を使用する簡便手法によって健康影響評価を実施し、開発されたエンジンシステムは微量有害物質やナノ粒子の排出量が低減されること及び健康影響の観点からも悪化がないことを確認した。

また、大気質改善効果を予測するシミュレーションを実施した。そのケースは図Ⅲ. 1-6に示すように1990年、2000年、2015年、2020年を想定した。特に2020年の予測ではBAU（Business As Usual, 計画以外の新たな規制等を導入しないケース）と乗用車の10%をディーゼル車とし大型車も含めて全てのディーゼル車の排出ガス性能を当該プロジェクトでの開発レベルとする2ケースについて予測を行った。一例として、東京23区内の冬期平日幹線道路走行時のNO_x、PM排出量推計結果を図Ⅲ. 1-7に示す。2020年に当該プロジェクトでの開発車両を全て導入すれば、自動車からのNO_xの排出量はBAUに比較して62%低減するとの結果が得られた。ただし、NO_x排出の原因は自動車以外の固定発生源も含まれており、特に自動車の寄与度が大きい沿道（東京都大田区松原自排局を想定）濃度では、図Ⅲ. 1-8に示す通り、NO_xが27~39%、NO₂が16~22%低減するとの予測結果が得られ、本プロジェクトの開発成果が都市環境改善に有効であることが示された。

最終評価のまとめを表Ⅲ. 1-1に示す。

プロジェクトの成果を総括すると以下のことが言える。

- ・燃費、排出ガスの最終目標を達成した。
- ・オフサイクル・未規制物質など各評価項目とも特に問題なことを確認した。
- ・本プロジェクトで開発した車両を将来導入できれば、課題となっている沿道の大気汚染濃度の改善に対する効果があることを大気拡散シミュレーションによって確認した。

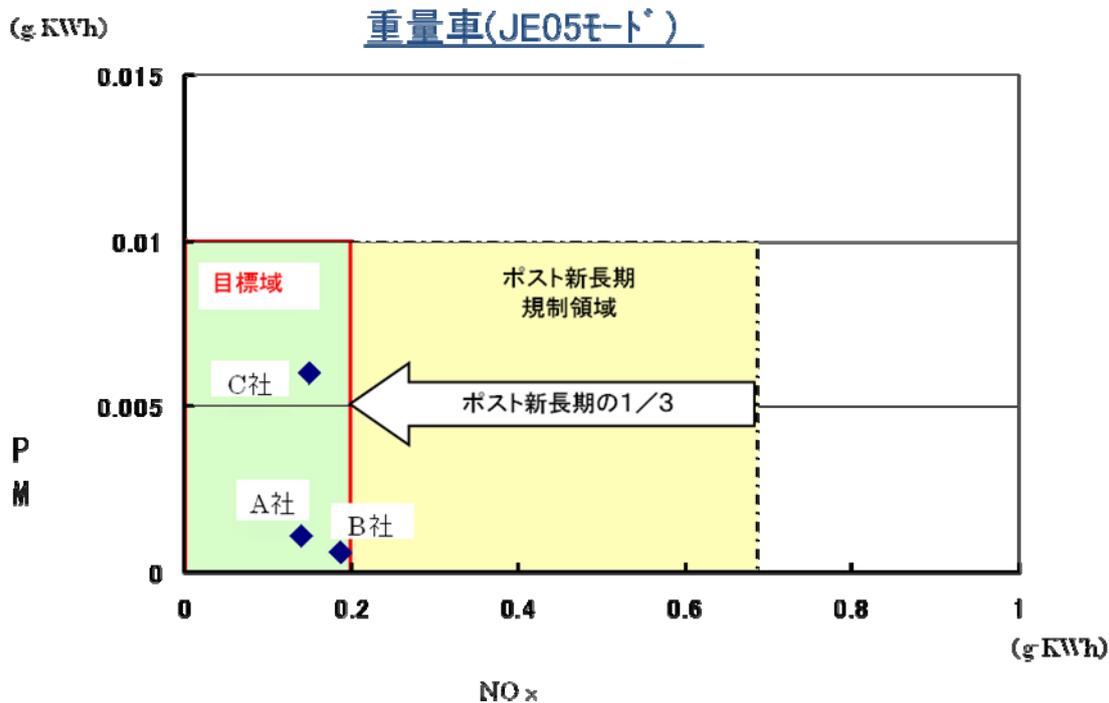
当該プロジェクトは国プロとして産学官の協同により取り組み、それぞれが得意とする基礎研究の分野から開発研究までを有機的に連携して、世界をリードする目標値が達成できた。さらに健康影響評価で問題のないこと、大気拡散シミュレーションにて環境改善効果があることを示すことが

でき、クリーンディーゼルの導入意義を確認することができた。

表Ⅲ. 1-1 最終評価のまとめ

テストモード	評価項目	結果まとめ	
①法定モード 重量車:JE05 乗用車:JC08	(1)燃費	◎ 重量車、乗用車とも目標達成	
	(2)規制物質	NOx	○ 乗用車にて未達チームがあるが、達成の目処もあり、 全体的には、目標達成
		PM	◎ 目標達成
	(3)未規制物質	・対照に対して概ね低減	
	(4)PM個数連続測定	・対照に対して低排出量	
	(5)PAH連続測定	・検出限界以下の低レベル	
(6)in vitro試験	・対照に対して悪化はみられない		
②オフサイクル 車速15km/h JARIモード	規制物質 (NOx、PM)	・都市内渋滞時の排出量として、既存の排出係数から当初予測された悪化はないことが確認できた	
(7)大気質改善効果予測(JARI): クリーンディーゼル車の導入による関東圏のNOx、PM排出量低減効果ならびに大気環境改善効果を見積もる		・次世代低公害車の導入普及により、2020年では非導入時に対して自動車からのNOx排出量が半減する ・沿道大気環境に対しては改善が見込まれ、 広域大気環境に対して、自動車の寄与度は大幅低減する	

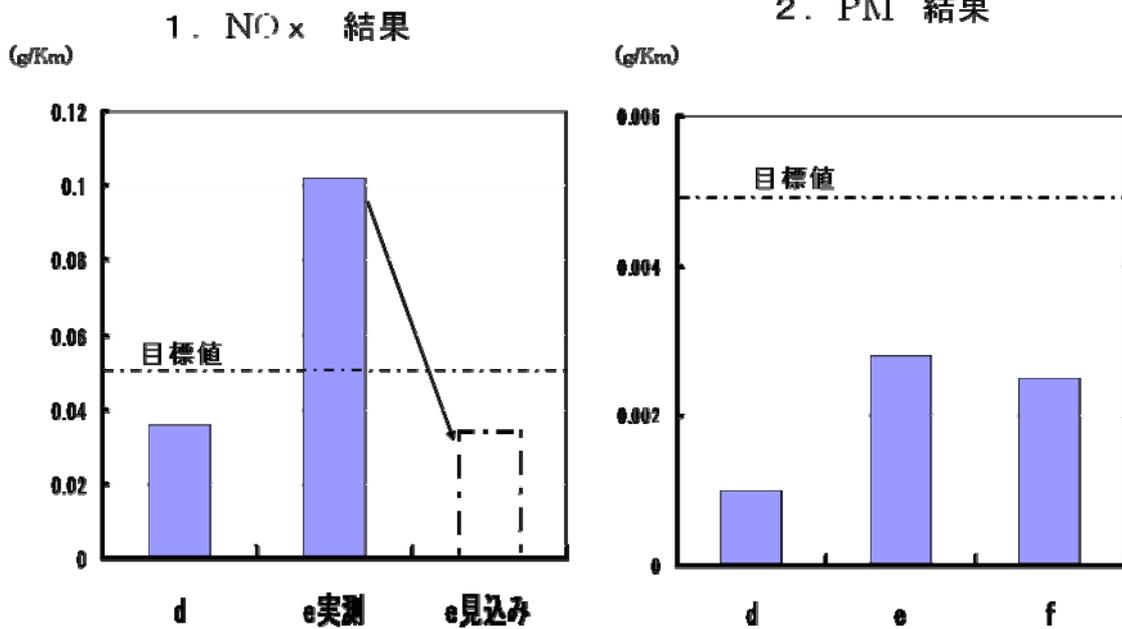
(1) 排出ガス目標達成状況



図Ⅲ. 1-1 排出ガス目標達成状況 重量車

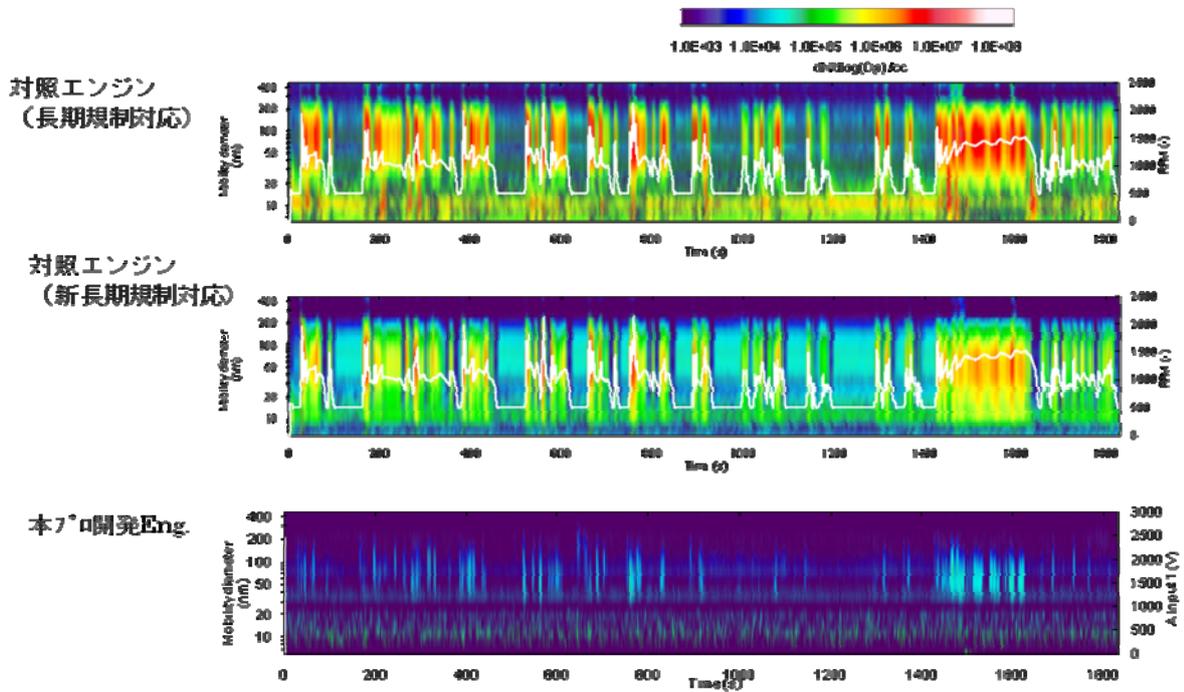
(1) 排出ガス目標達成状況

乗用車(JC08モード)



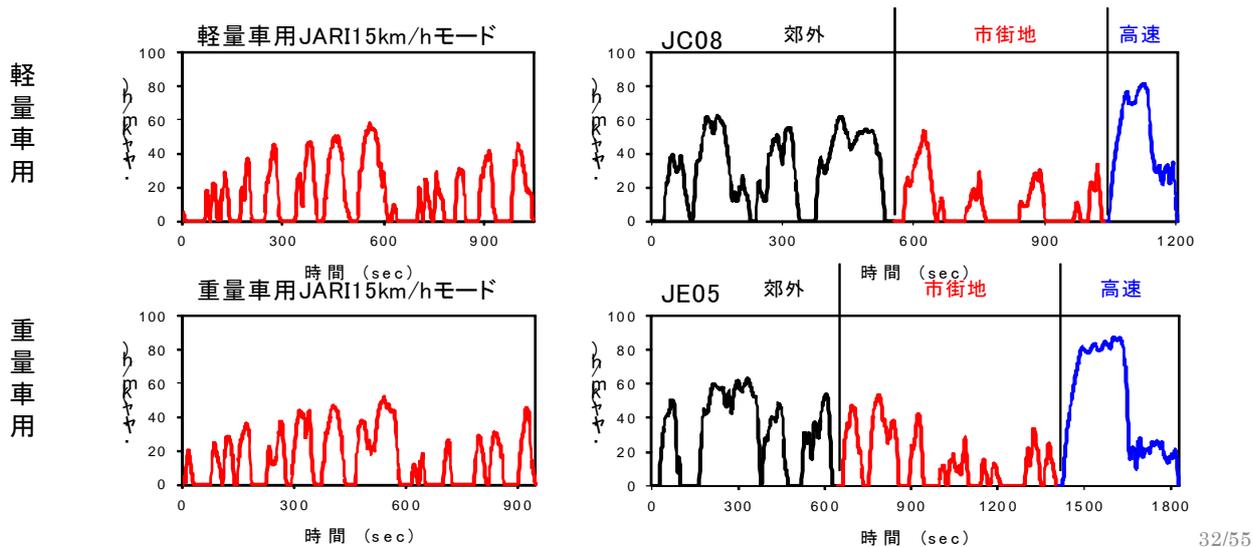
図Ⅲ. 1-2 排出ガス目標達成状況 乗用車

PM個数連続測定結果例 (エンジン: JE05モード)

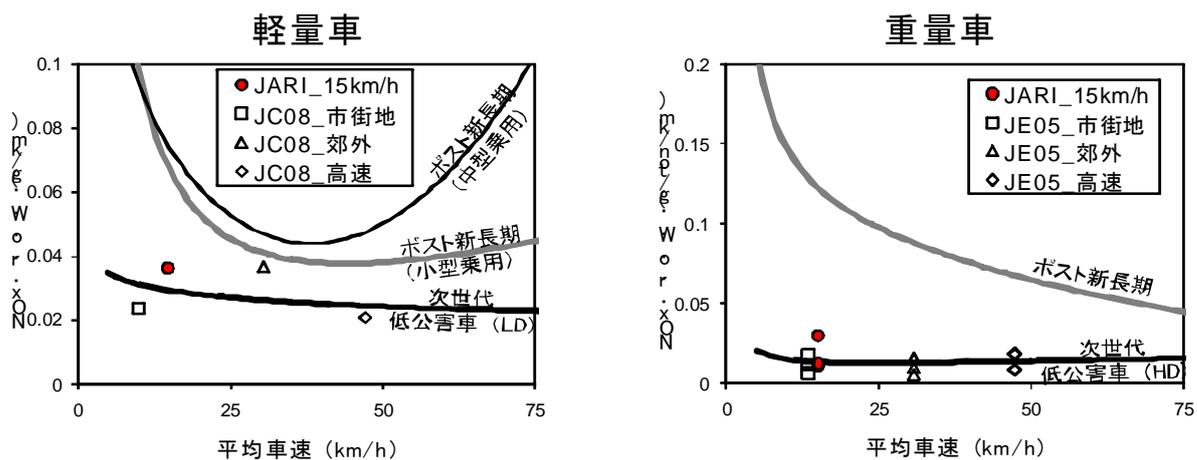


本プロジェクト開発エンジン排出PM個数濃度は極めて低値

図Ⅲ. 1-3 PM個数連続測定結果



図Ⅲ. 1-4 オフサイクル試験モード



平均車速 (km/h)	JC08/JE05			JARI15
	市街	郊外	高速	
軽量車	9.9	30.4	47.1	14.7
重量車	13.5	30.7	47.5	15.1

図Ⅲ. 1-5 オフサイクル試験結果

大気質改善効果予測

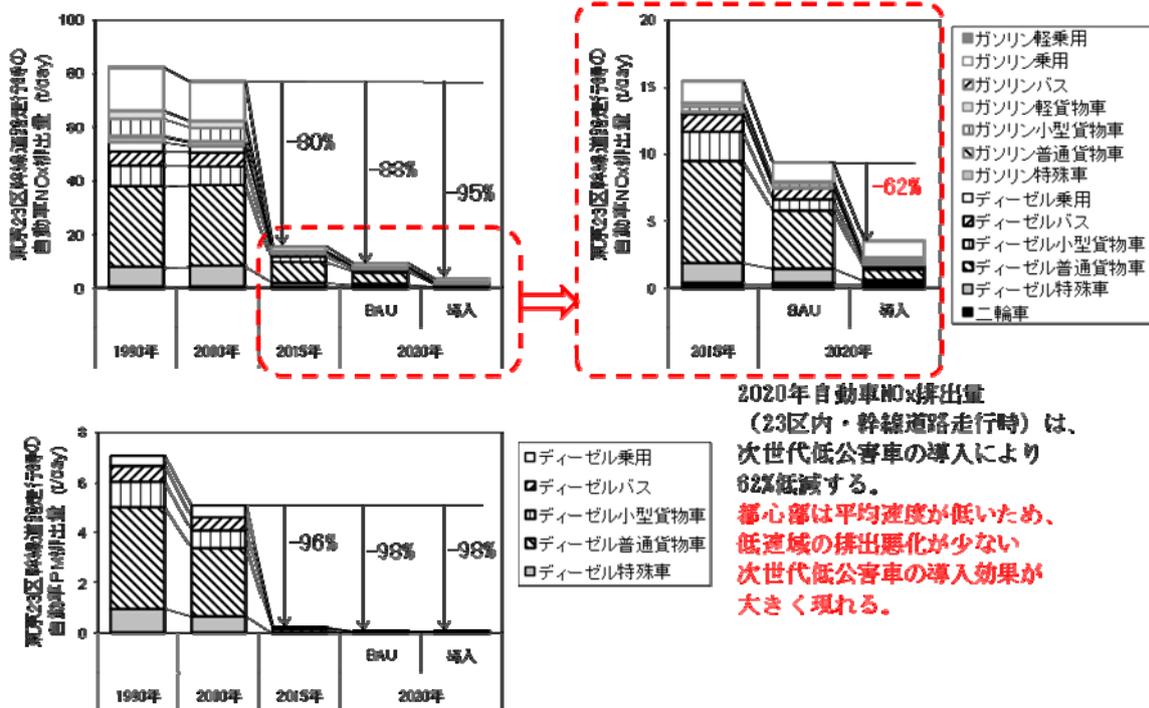
シミュレーションケース

対象年次	ケース	考慮した規制など	ディーゼル車のNO2/NOx比	実施シミュレーション			
				自動車排出量	広域大気質	沿道大気質	
1990年	冬季	過去	14%	○			
2000年	夏季 冬季	現況	14%	○	○	○	
2015年	冬季	BAU	30%	○			
2020年	冬季	BAU	30%	○	○	○	
	夏季						
	冬季	次世代低公害車導入	↑ + ・全てのディーゼル車を次世代低公害車に代替、 ・乗用ガソリン車の1割を次世代低公害車に代替	30%	○	○	○
	夏季						

BAU: Business As Usual, 計画以外の新たな規制等を導入しないケース

図Ⅲ. 1-6 大気質改善効果予測 シミュレーションケース

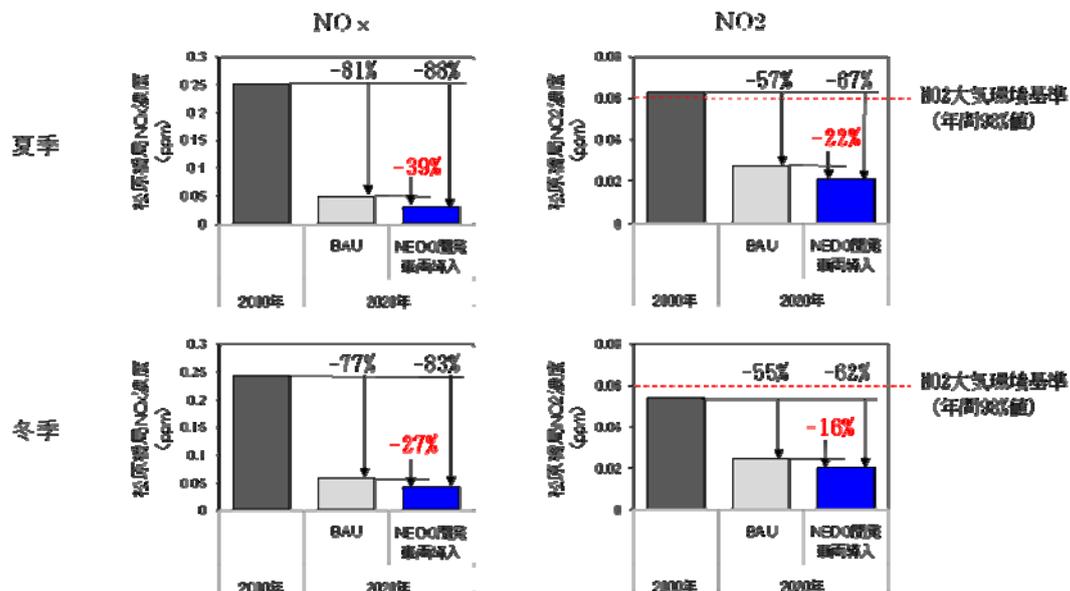
東京23区内の冬季平日幹線道路走行時NOx、PM排出量推計結果を示す。



図Ⅲ. 1-7 冬季平日感染道路走行時 NOx、PM 排出量推計結果

沿道濃度推計結果

NOxおよびNO2濃度推計結果 —松原橋自排局（大田区）—



2020年の松原橋自排局濃度は、次世代低公害車の導入により、NOxは27～39%、NO2は16～22%低減する。

図Ⅲ. 1－8 沿道濃度推計結果 (松原橋自排局)

(2) 研究開発項目毎の成果概要

「研究開発項目① 新燃焼方式の研究開発及び燃料の最適化」

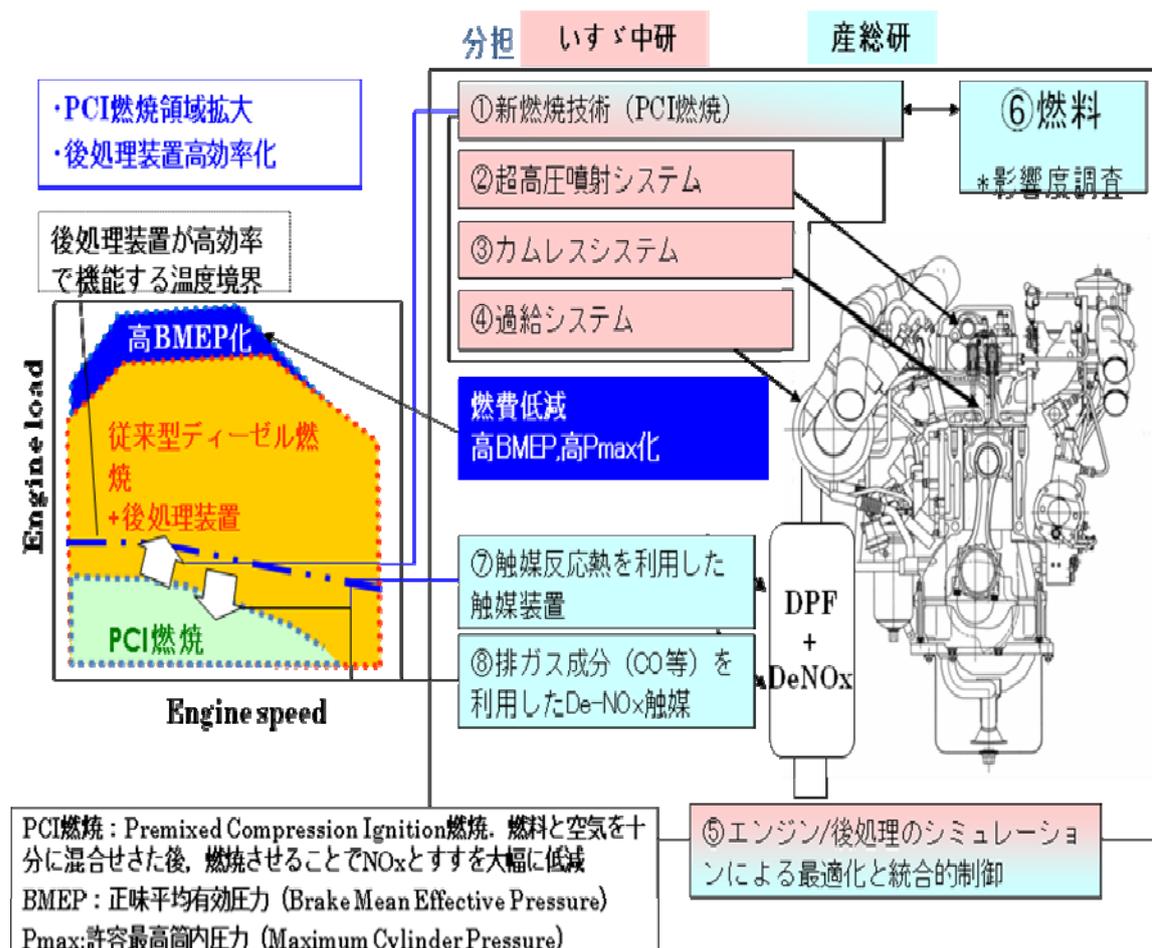
①-1 「超高精度燃焼制御エンジンシステムの研究開発」

実施先：(株) いすゞ中央研究所 (再委託先：北海道大学)

(独) 産業技術総合研究所

開発に取り組んだエンジンシステムの概要を図Ⅲ. 2-1 に示す。

予混合圧縮着火 (PCI) 燃焼を主とした新燃焼方式を含め、ディーゼルエンジンのクリーン化、高度化を実現する新燃焼方式の開発及び燃料品質の最適化を行い、3段過給システムによる高過給、高 EGR 率、噴射系改善による最適燃焼により研究開発目標を達成し得る技術が見出された。新燃料 (セタン価 42-43、芳香族分フリー) により NO_x、PM のトレードオフが改善できた。



図Ⅲ. 2-1 超高度燃焼制御エンジンシステムの研究開発

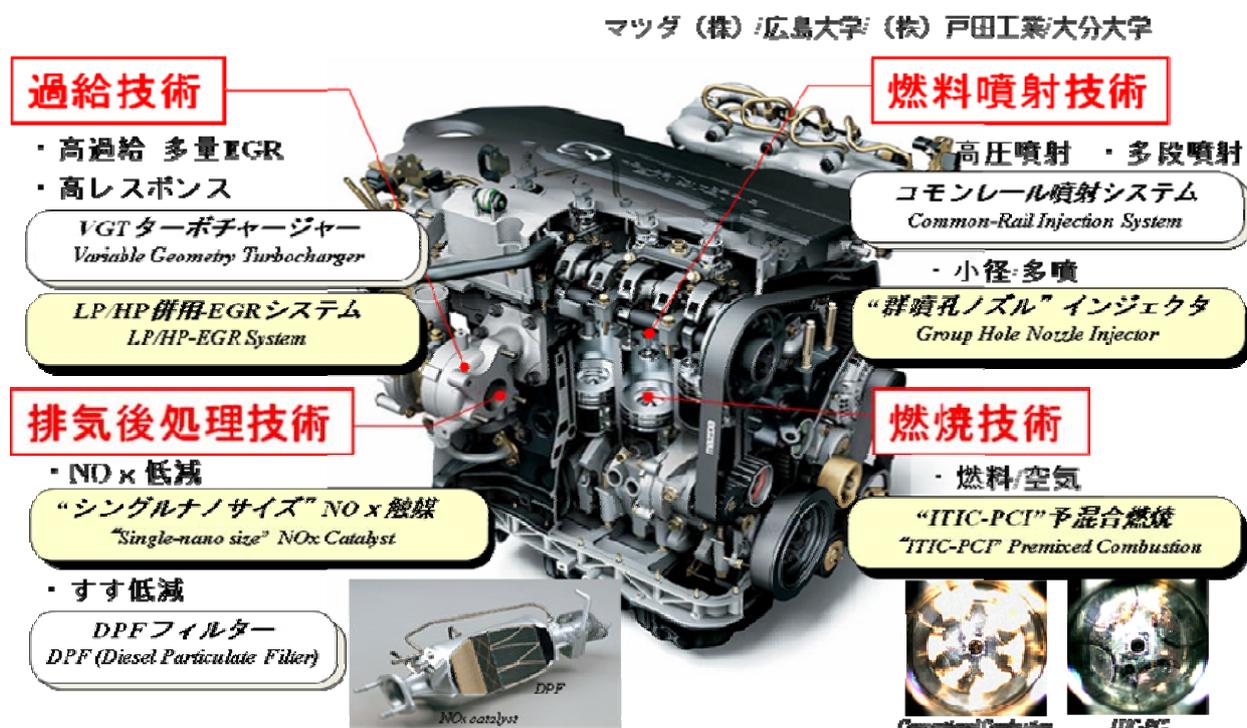
①-2 「超低エミッション高効率乗用ディーゼルエンジンの研究開発」

実施先：マツダ（株）

広島大学

開発に取り組んだエンジンシステムの概要を図Ⅲ. 2-2に示す。

革新的燃焼技術<ITIC-PCI(Intake Temperature and Injection Controlled Premixed Compression Ignition) 予混合燃焼、群噴孔ノズルインジェクタ。LP（低圧）/HP（高圧）併用 EGR システムなどの開発により、燃焼技術開発目標(NO_x, 燃費)を達成した。低温度域（～200℃）と耐熱性に優れる中空3次元構造シングルナノサイズ NO_x 触媒を開発した。開発した燃焼技術・触媒技術と既存 DPF 技術の組合せにより、プロジェクトの開発目標を達成した。
NO_x:0.05g/km, PM:0.005g/km, 燃費:2015年GE車比20%改善(JC08モード、1479kg ランク)



図Ⅲ. 2-2 超低エミッション高効率乗用ディーゼルエンジンの研究開発

及びナノテクノロジーを応用して高性能排出ガス浄化用触媒の研究開発

「研究開発項目② GTLを用いたエンジン技術の開発」(2006年度終了)

実施先：トヨタ自動車(株)

日野自動車(株)

昭和シェル石油(株)

新燃料としてGTLに着目し、新長期規制を目標(2006年度に終了したため、この目標値は当該研究のみ)として最適な利用技術の開発を行った。最適燃料設計の考え方を図Ⅲ.2-3に示す。

GTLの燃焼の特徴として、スモークやHCが低減することを示した。GTL燃料を用いた際の実用性を多角的に評価し、軽油と比べ何れも問題ないか、軽微な対策で対応可能であることを確認した。GTL燃料の高いエミッション低減ポテンシャルをエンジン緒言の最適化により確認し、プロジェクトの目標値を達成することが出来た。(DPNR触媒付・JE05モードでの評価)。これまでの排気後処理を含めたエンジン改良に関する研究例は極めて少なく、GTL燃料普及に関して意義のある成果が得られたと考える。

燃料設計の考え方

- ・ 高セタン価(70以上が目標)
ベースの軽油に比して充分高い特性
 - 燃焼騒音の低減
 - 低温・低圧縮比での燃焼特性維持
- ・ 低T90(90%蒸留温度)
燃料の揮発性を改善
 - シリンダ内混合気の改善
 - 排気管添加燃料の反応性向上

燃料の特徴(セタン価~70は共通)

A : JIS 2号相当の蒸留特性

B : AとCの中間特性

C : 燃焼上の顕著な差が予測されるT90差
~60deg程度(経験値)

- ・ セタン価70程度
- ・ T90を変化させた3種
(A, B, C fuel)



- ・ 排気量2L, 4L, 8L
エンジン評価



- ・ 混合燃料試験用燃料
を選択

図Ⅲ.2-3 GTLを用いたエンジン技術の開発

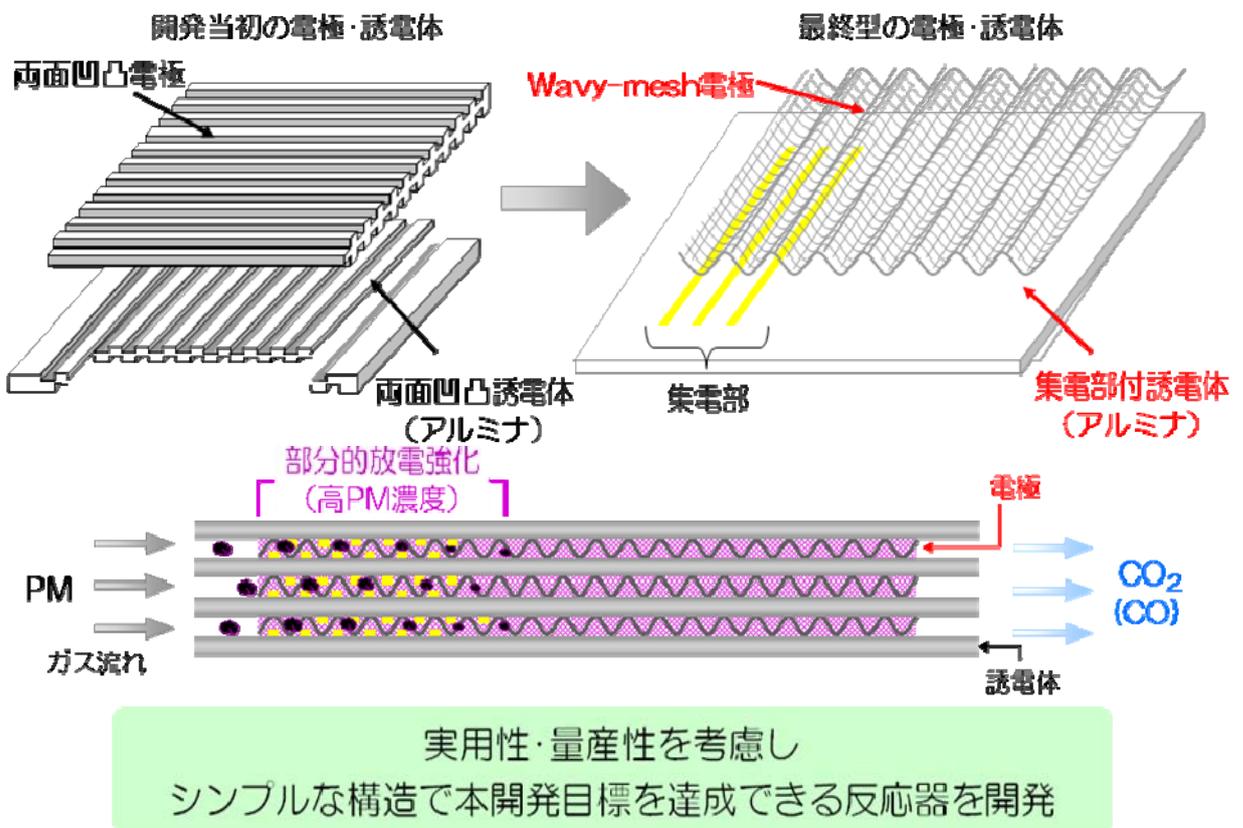
「研究開発項目③ 革新的後処理システムの研究開発」

③-1 「低温プラズマシステムの研究開発」

実施先：ダイハツ工業（株）

（財）地球環境産業技術研究機構（再委託先：パルス電子技術（株））

プラズマ中に生成した活性種による PM の炭素結合の変化で PM が燃焼する酸化除去機構を開明し、図Ⅲ. 2-4 に構造と機能を示す高性能プラズマ反応器を開発した。その結果、PM0.002g/km を達成してポスト新長期規制をクリアした。また放電電力 100W、モード中の最大圧損を 2kPa にするなどの実用上の課題を克服した。さらに PM 酸化に対し、プラズマ放電場において有効に機能する金属酸化物触媒を開発した。



図Ⅲ. 2-4 低温プラズマを用いたディーゼル後処理システム

③-2 「固体電解質を用いたPM・NO_x同時低減システムの研究開発」

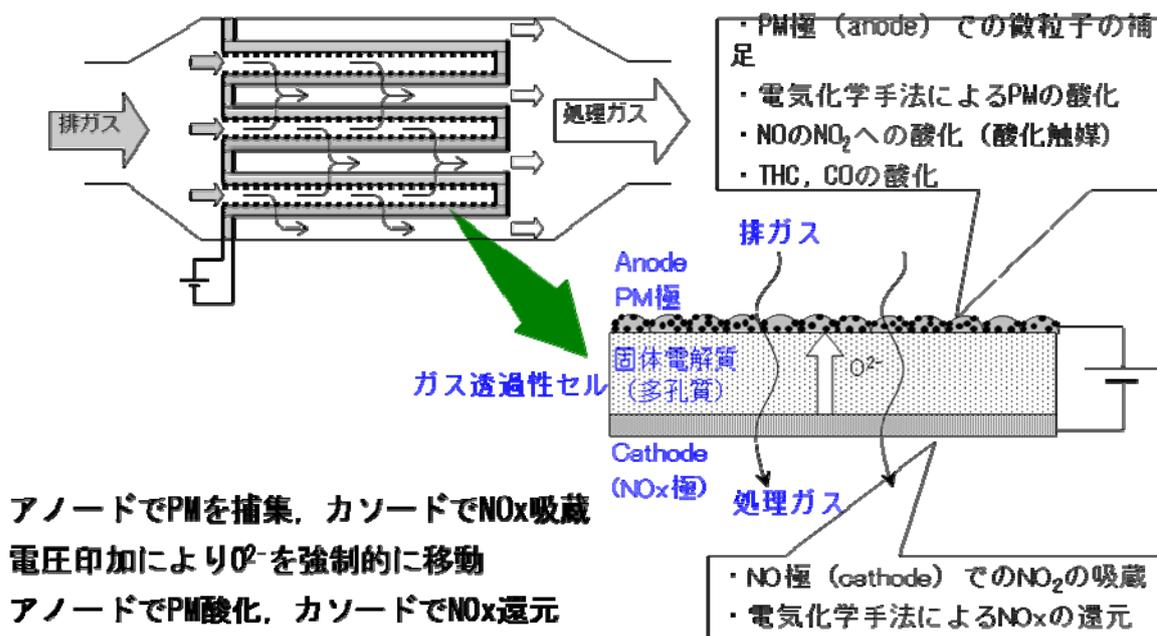
実施先：学校法人 立命館大学

(株) 堀場製作所

Ⅲ. 2-5に概要を示す多孔質固体電解質を用いた電気化学的手法による窒素酸化物と微粒子の同時低減を可能とする革新的排ガス処理システムを開発した。YSZ(Yttria Stabilized Zirconia) 固体電解質を用い400℃の模擬排ガスでNO_x およびPM 低減率90%を達成した。低温作動方GDC(Gadolinia-doped Ceria)固体電解質セルを開発し、280℃からの稼動を可能にした。GDCセルの稼動温度以下ではPM およびNO_x をそれぞれ堆積、吸蔵し、稼動温度以上で通電によりこれらを分解する実用化システムの提案を行った。30x30x50mmのハニカムモジュールを試作し、分流希釈トンネルを用いたJC08排ガス試験を実施し、NO_xの低減率74%、PM低減率98%を達成した。平板セルでの実験結果ではNO_x低減率91%を達成し、NO_x排出レベル0.033g/kmを実現可能であることが示唆された。

多孔質固体電解質を用いた電気化学的手法による窒素酸化物と微粒子の同時低減を可能とする革新的排ガス後処理システム

ECR (electro-chemical reduction) 法

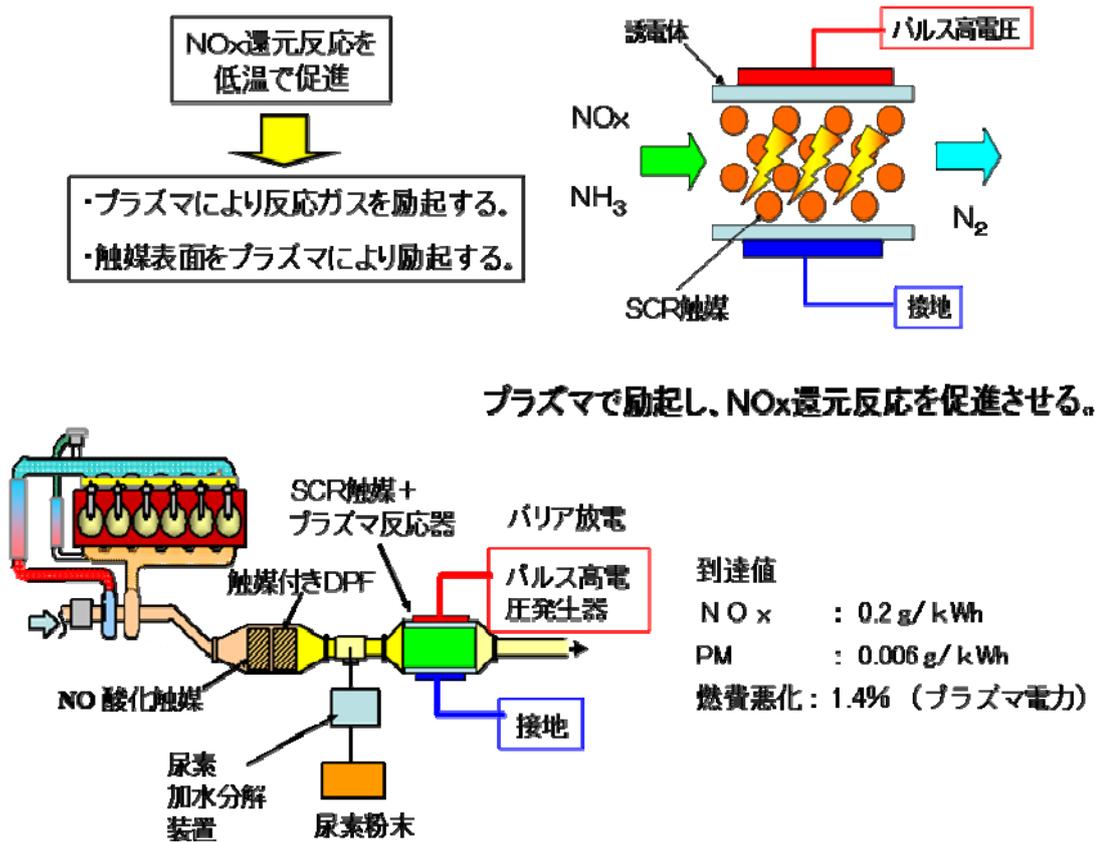


図Ⅲ. 2-5 電気化学手法による革新的後処理システムの開発

3-③ 「低温活性を改善した新NO_x触媒の開発とPM同時低減システムの研究開発」

実施先：日野自動車（株）（再委託先：豊橋技術科学大学）

低温時のNO_x低減性能を改善させる要素技術として、図Ⅲ. 2-6に概念を示すプラズマアシストSCR（プラズマによるNO_x還元反応の促進技術）を開発し、プラズマ反応器入口温度110℃でNO_x低減率80%を得ることができた。その技術と触媒付きDPFを組み合わせることでプロジェクトの目標を達成した。



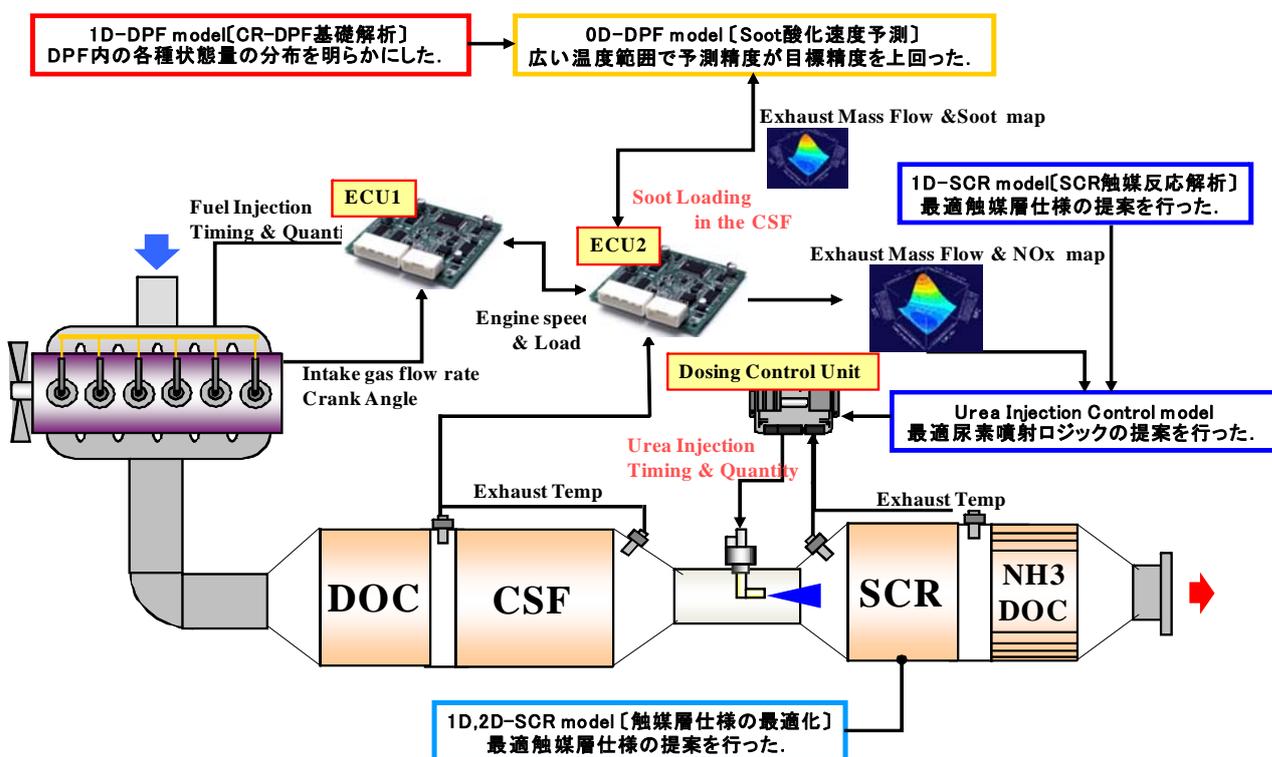
図Ⅲ. 2-6 プラズマアシストSCRシステムによるNO_x低減の研究

③-4 「NO_x・PMを同時低減する新排出ガス浄化システムの研究開発」

実施先：日産ディーゼル工業（株）（再委託先：東京濾器（株））

学校法人 早稲田大学

DPFと尿素SCRを組み合わせてNO_xとPMの同時低減処理システムの研究開発に取り組み、低温活性の向上およびアンモニアスリップの削減を狙ったSCR触媒を開発した。また、図Ⅲ. 2-7に示す、CR-DPFの基礎解析、ススの酸化速度予測、SCR触媒反応解析、最適尿素噴射ロジック、モデルを構築し、触媒仕様の最適化に関して研究開発の効率化を推進し、実験的研究と理論解析的研究と連携してプロジェクトの目標を達成した。



図Ⅲ. 2-7 新コンセプト尿素SCRシステムによる
大型商用車用ディーゼルエンジンのNO_x・PM同時低減

「研究開発項目④ 次世代自動車の総合評価技術開発」

実施先：（財）日本自動車研究所
 （独）産業技術総合研究所

本プロジェクトで開発されたエンジンから排出される微量有害物質として、大気環境基準値もしくは指針値が設定されている物質、PRTR リストのうち自動車が主要な発生源とされる物質、優先取組物質のうち自動車関連 5 物質、US EPA の MSATs21, ACES 研究 Priority の 190 物質の測定、超微小粒子として各種の金属化合物や炭素などのナノ粒子（超微小粒子）の測定およびそれらのヒトの吸入暴露を模擬した細胞暴露試験を実施し、微量有害物質やナノ粒子の排出量が低減されること及び健康影響の観点からも悪化がないことを確認した。

また、大気質改善効果を予測するシミュレーションを実施した。そのケースは図Ⅲ． 2－8 に示すように 1990 年、2000 年、2015 年、2020 年を想定したものであるが、特に 2020 年は BAU（Business As Usual, 計画以外の新たな規制等を導入しないケース）と乗用車の 10%をディーゼル車とし、大型車も含めて全てのディーゼル車の排出ガス性能を当該プロジェクトでの開発レベルとする 2 ケースについて予測を行った。

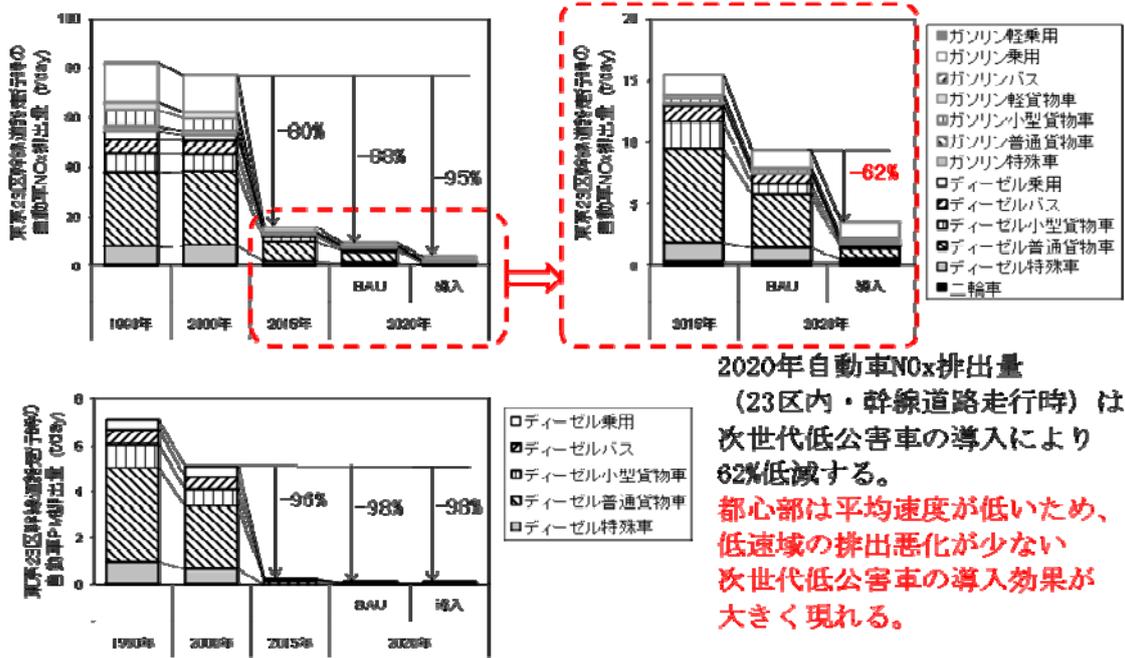
東京 23 区内の冬期平日幹線道路走行時の NOx、PM 排出量推計結果を図Ⅲ． 2－9 に示す。2020 年に当該プロジェクトでの開発車両を全て導入すれば、自動車からの NOx の排出量は BAU に比較して 62%低減するとの結果が得られた。ただし、NOx 排出の原因は自動車以外の固定発生源も含まれており、特に自動車の寄与度が大きい沿道（東京都大田区松原自排局を想定）濃度では NOx が 19～29%、NO2 が 11～16%低減するとの予測結果が得られ、本プロジェクトの開発成果が都市環境改善に有効であることが示された。

対象年次	ケース	考慮した規制など	ディーゼル車の NO2/NOx比	実施シミュレーション			
				自動車排出量	広域大気質	沿道大気質	
1990年	冬季	過去	14%	○			
2000年	夏季	現況	14%	○	○	○	
	冬季						
2015年	冬季	BAU	30%	○			
2020年	冬季	BAU	30%	○	○	○	
	夏季						
	冬季	次世代低公害車導入	↑ + ・全てのディーゼル車を次世代低公害車に代替、 ・乗用ガソリン車の1割を次世代低公害車に代替	30%	○	○	○
	夏季						

BAU: Business As Usual, 計画以外の新たな規制等を導入しないケース

図Ⅲ． 2－8 大気質改善効果予測 シミュレーションケース

東京23区内の冬季平日幹線道路走行時NOx、PM排出量推計結果を示す。



図Ⅲ. 2-9 自動車排出量推計結果

上記研究開発項目①～④の全体で、特許出願件数 97件（うち外国出願 3件含む）、論文9件、講演（口頭発表含む）19件、プレス発表 1件を実施した。表Ⅲ. 1-1に特許出願の9テーマ別の内訳を示す。

表Ⅲ. 1-1 特許出願状況

● 特許出願件数： 98件
● 論文・学会発表等： 224件

(特許出願件数)

実施者名称	いすゞ中研 産総研	マツダ 広島大 戸田工業 大分大 旭化成	トヨタ 日野自動車 昭和シェル	ダイハツ RITE	立命館大学 堀場製作所	日野自動車	日産ディーゼル 早稲田大学	JARI 産総研	合計
①新燃焼方式の研究開発	6	9	-	-	-	-	-	-	15
②GTLを用いた エンジン技術の研究開発	-	-	1	-	-	-	-	-	1
③革新的後処理システムの 研究開発	12	21	-	22	6	10	8	-	79
④次世代低公害車の 総合技術開発	-	-	-	-	-	-	-	3	3

2 研究開発項目④ 次世代自動車の総合評価技術開発

1. 研究開発の背景、目的、位置付け

<背景>

ディーゼルは地球温暖化や耐久性面から優位にあるが、普及には排出ガスに起因する都市大気環境問題への懸念を払拭する必要がある。このために、本プロジェクトで新たに開発された次世代低公害車について、排出ガス、燃費、エンジン性能等を総合的に評価する必要がある。

<目的>

NEDO 次世代低公害車について、新技術の普及にともなう新たな課題の未然防止のために、微量有害物質や健康影響のスクリーニング手法の構築を行い、排出ガスクリーニ化を検証する。

2. 研究開発マネジメント

(1) 開発目標

全体目標(主目標)	達成目標(値)と設定理由	現状レベル(開発開始時)
開発システムの総合評価を行う。そのための計測技術・校正技術開発を行う。	開発された対象システムの総合評価を可能とする。 設定理由：予防原則	総合評価に適用可能な技術は未完。
研究課題目標	達成目標(値)と設定理由	現状レベル(開発開始時)
PM 計測・評価技術の確立	ナノ領域を含む PM 粒径・個数濃度分布、過渡排出特性の計測技術の確立。 PM 個数基準計測・校正技術の確立。	PM 個数計測，校正技術，過渡排出成分計測技術は社会的ニーズにも係わらず確立されていない。
未規制物質調査手法の確立	健康影響のスクリーニング手法（細胞曝露）の確立。動物曝露を含む健康影響評価	試験現場にて有害性がわかるスクリーニング手法は見当たらず。新規使用化学物質排気の曝露影響は見当たらず。
大気質改善効果予測	NEDO 開発システム導入による将来大気質改善効果を予測する。	広域，沿道の大気質への改善効果は未知。

(2) 研究開発の実施計画

表1 研究開発項目と実施スケジュール

項目/年度(平成)	16	17	18	19	20
1. PM計測、評価					
1) 過渡個数濃度計測法		→			
2) 過渡PM成分計測法 未規制成分計測法		→			
3) 個数基準計測法によるPM高精度計測・校正技術の開発		→			
2. 未規制物質評価					
1) 細胞曝露による健康影響評価		→			
3. 尿素SCR排気の動物曝露評価 (未規制物質評価)					
		→			
4. 開発システム総合評価 (規制物質、燃費、未規制物質)					
		→			
5. 大気質改善効果予測					
		→			

(3) 研究開発体制

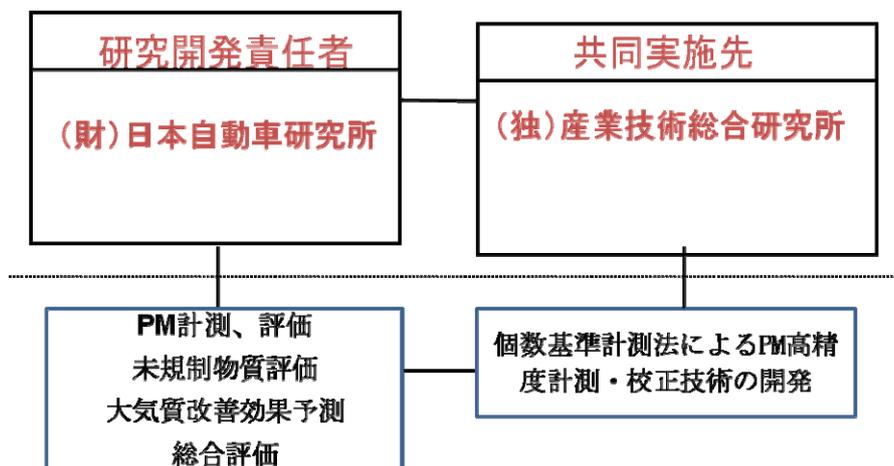


図1 研究開発体制

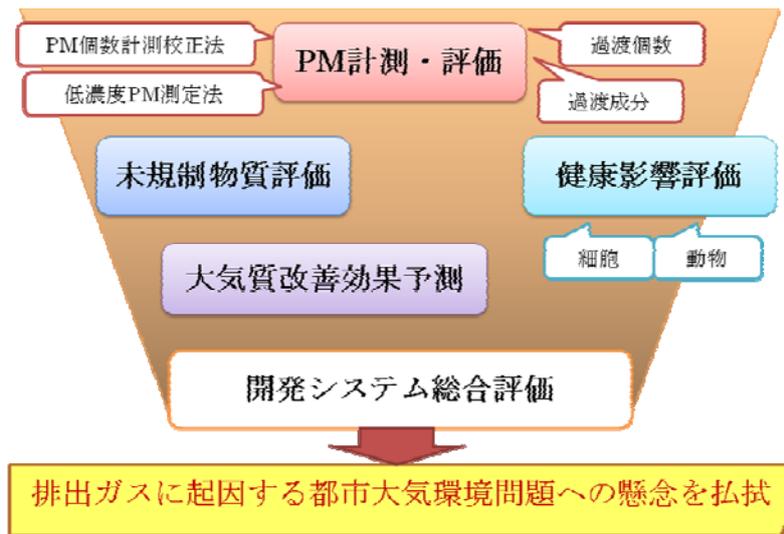


図2 研究開発項目の繋がり

(4) 研究内容

概要

1. PM 計測・評価

新たに開発される次世代低公害車は、粒子（PM）の排出レベルが極めて少ないことを目指しているが、そのための新規技術を用いる際に、自動車から排出されるPMは、その大きさと個数の両方がともに減少するとは限らず、個々のPMの寸法が減少しても、いわゆるナノ粒径域のPM個数はかえって増加してしまう場合があり、健康への影響が懸念されるとの指摘もある。そこで、PMについては、従来から使用されている質量排出率による評価以外に、過渡排出個数濃度、粒径分布や数密度の計測、PM組成分析の計測評価を行うことができるよう、その準備を行った。具体的には、次世代低公害車からのPM排出量（総排出質量）の減少に伴い、従来から用いられてきたフィルター法に代表される質量基準計測法は適用限界に近づくことが予測されているため、今後はこれらの重量測定法に加えPMの個数計測法に基づく総PM数濃度や粒径分布の測定方法を併用することが必須の状況となってきている。しかしながら、そこで用いられるべき個数計測装置等に関しては濃度や粒径分布の測定精度、あるいは異なる原理に基づく装置の整合性等に関して十分に検証されていないなど幾つかの重大な課題が残されている状況にある。このため、次世代低公害車からのPM排出評価に対応する個数基準計測装置に関し、PM計測における不確かさを低減した高精度計測技術の確立を目指すことを目的として、a. 個数濃度測定の校正・試験技術の開発、並びに b. 低PM濃度域におけるフィルター法の妥当性評価の課題について研究を実施した。

また、触媒や排気ガスフィルタ（DPF）等の新規後処理装置を装着したエンジンシステムでは、触媒やDPF表面において炭化水素等の吸着・脱離過程やPMのDPF再生過程に伴って放出される高沸点成分の再凝縮現象が存在するため、自動車の加減速時に従来のディーゼルエンジンとPMの排出挙動が大きく異なることが知られている。そこで、PMの評価を行う上では、自動車の加減速を想定した過渡走行時での排出特性を把握することが有用である。このため、従来の手法による粒径計測・成分分析に加えて、過渡走行時のPM個数濃度や粒径分布の計測手法を準備するとともに、過渡応答特性の優れたレーザ・イオ

ン化/飛行時間型質量分析装置による組成計測方法の開発を行った。これらの計測技術によって、開発システム排出ガスの評価を行った。

2. 未規制物質評価

細胞曝露による健康影響評価

自動車排出ガスを含む化学物質の健康への影響を科学的に明らかにするためには、疫学調査や動物実験などの知見を総合的に評価することが求められるが、これらを全て実施するには膨大な費用と時間が必要となる。そのため、医薬品などの安全性評価を行う場合には、動物実験の前に簡便、かつ鋭敏な *in vitro* 評価（細菌や細胞を用いた評価）を実施し、有害性調査の時間的及び費用的な節減が図られている。

一方、自動車排出ガスが最初にヒトの体内に取り込まれ、障害を与える標的器官は呼吸器系であることから、実際の気道を模した実験系で呼吸器への影響を評価することが重要である。気道を模した実験系として、人工膜上に増殖させたヒトの呼吸器系由来培養細胞表面に希釈排出ガスを接触させる方法が既に考案されており（培養細胞暴露装置）、現状と比べ健康影響面に対する改善効果が期待されることを、あるいは悪化することがないことを確認する目的で、この培養細胞暴露装置による評価を行うための実験条件を検討した。この培養細胞曝露によって開発システム排出ガスの曝露を行い、遺伝子解析によって影響の有無などを推定した。

尿素 SCR 排気の動物曝露評価

開発システムに採用される新規技術の中で、特に尿素 SCR は、過去に自動車に使用された実績がほとんど無い尿素を新たに還元剤として使用するため、大量普及が開始される前に、その健康への問題が無い事を確認することが重要である。過去の NEDO プロジェクトにおいて、プロトタイプエンジンシステムから排出される PM 中の有機溶媒可溶成分についてスクリーニング手法による試験で、発がん性のリスクは小さいことが示されている。そこで、本事業では PM のみでなく、システムから排出される物質すべてに関する影響について評価するため、実験用小動物を用いた吸入暴露試験を実施した。

3. 開発システムの総合評価

本プロジェクトで開発された新燃焼方式エンジン、革新的後処理システムなどを最終的にエンジンや車両に搭載した次世代低公害車の排出ガス、燃費、エンジン性能等の評価を同一基準で実施するとともに、個別の開発者では実施困難な未規制排出物質の評価を行うことで、開発された技術の総合評価を行った。

具体的には、HD エンジンと LD 車両の台上試験を行ない、排出ガス規制走行モードおよび都市内モード走行時の燃費と、排出ガスとして規制成分（NO_x（窒素酸化物）、PM（粒子状物質）、HC（炭化水素）、CO（一酸化炭素）と CO₂（二酸化炭素）と NO₂（二酸化窒素）ならびに PM 個数濃度を、排出ガス規制モードに関しては、PRTR（Pollutant Release and Transfer Register）等でリストアップされた物質のうち自動車が主要な発生源とされる物質および PM 抽出物中の B[a]P（ベンズ[a]ピレン、多環芳香族炭化水素の代表的な一つ）、地球温暖化物質 CH₄、N₂O 等についても計測を行った。

4. 大気質改善効果予測

次世代低公害車導入普及による関東圏を対象としたPMやNOx等の大気環境の改善効果を把握することを目的として、以下に示すシミュレーション計算を実施した。

- ・自動車排出量低減予測

次世代低公害車導入普及時の排出量低減効果を予測する

- ・広域大気環境改善予測

次世代低公害車導入普及時の広域大気環境改善効果を予測する

- ・沿道大気環境改善予測

次世代低公害車導入普及時の沿道大気環境改善効果を予測する

1. PM 計測・評価

1.1 過渡ナノ領域 PM 個数濃度計測の検討

本事業で開発される次世代低公害車は、NO_x とともに粒子状物質（PM）の排出が極めて少ないことを目指している。新規の低減技術によっては、粒径の極めて小さな、いわゆるナノ領域の個数の増加をもたらすとの指摘もあることから、従来手法による質量排出率による評価に加えて、粒径分布や個数濃度の評価が必要である。また、触媒やDPF等の新たな後処理装置を装着したシステムでは、後処理装置上でのPM成分の吸着等にもない加減速時のPM個数の排出挙動が従来とは異なることが知られており、過渡走行時での排出特性を把握することが重要である。しかし、自動車から排出されるPMの個数濃度の計測方法は現時点では確立されておらず、客観的な評価を行うためには、希釈・サンプリングに伴う誤差影響を考慮した試験・評価法の開発が必要である。また、PM排出量の計測方法は、国内外の試験法に示されているが、このPM重量計測にはPMの化学的性状と秤量環境条件が大きく影響する。本事業で開発される革新的低公害車の排出PMは、その重量や成分が従来と異なる可能性があることから、既存試験法による計測値の変動などを把握しておく必要がある。

ナノ領域を含む過渡走行時のPM個数濃度を計測するために、過渡粒径計測装置として、すでに国内外にて計測実績のある自動車排出ガス用に開発された計測器（自動車排ガス用パーティクルサイザー、TSI社製EEPS Model3090）を選定した。計測原理は、計測器のチャージャー部でサンプルPMをプラス荷電し、センサー中央部にプラス電極の高電圧ロッドを設けることにより、荷電したPMはロッドに反発して中央から外側に流れる。PMの持つ移動度にしたがって外側に設置した多段の各エレクトロメーターで捕集、検出する。粒径が小さい程、電気移動度が大であり上段のエレクトロメーターで捕集され、粒径の大きいPMは電気移動度が小さいので下段のエレクトロメーターで捕集される。エレクトロメーターで検出された電流値はPM個数に依存する。エレクトロメーターで検出された電流値をPM個数に換算し、個数濃度分布を求める。本装置によって、高時間分解能でナノ領域のPMの個数濃度分布が計測できる。主な仕様は、粒径範囲：5.6～560nm、分解能：32ch、時間分解能：0.1秒である。各エレクトロメーター間の時間遅れ補正、多重荷電補正、温度圧力補正を行い、粒径分布を経時的に計測可能である。この計測器の基本的特性を調べた。エンジン排ガス計測の概要を図1.1.1に示す。

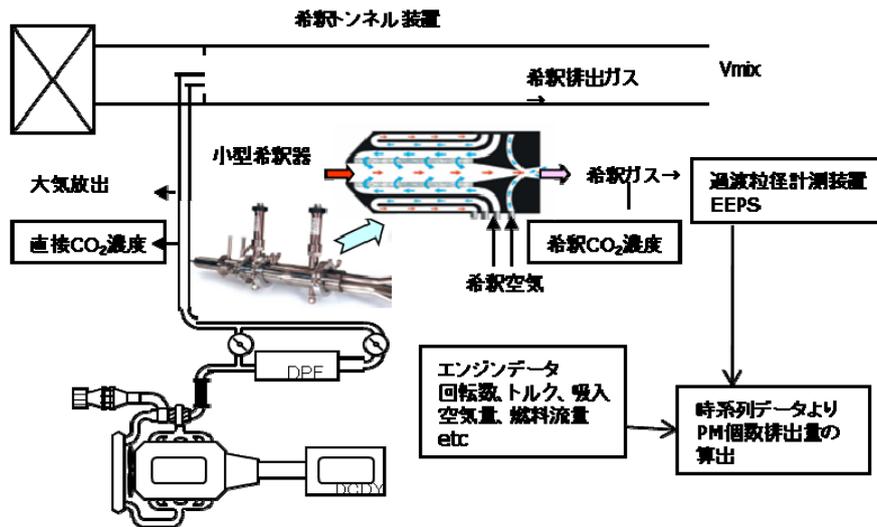


図 1.1.1 希釈トンネル装置と希釈器を用いたエンジン過渡排出 PM 個数濃度測定の流れ

1.1.1 過渡排出 PM 個数濃度計測器の比較試験

PM の発生源として燃焼粒子発生器（CAST、Matter Engineering 社製）および長期規制対応大型ディーゼルエンジンを用いて、計測装置の基本的性能の確認試験を行った。CAST は C_3H_8 の燃焼で PM を生成させる装置であり、20 から 200nm の粒径範囲の PM を $10^4 \sim 10^7$ 個/cm³ の間で濃度を変えることができる。CAST の発生条件とエンジンの運転条件は、ナノ領域の PM 発生の有り無しの条件を設定した。CAST 発生 PM は高濃度であるため、希釈器を用いて計測可能な濃度に調整した。エンジン排出 PM は希釈トンネル装置（DLT-2470W、内径 60cm、CVS 流量 20～70m³/min）を用いて希釈した。

過渡対応のナノ領域の PM 個数計測として EEPS、DMS、ELPI を、過渡対応ではないがナノ領域の計測に現在最も汎用されている SMPS を比較用として選定して比較試験を実施した。ELPI は他の 3 機種とは分級原理が異なり、空気動学的粒径である。CAST の PM 発生は、モード径が 50nm 以下と 100nm 以上を示す条件として、BiM と MP1 を選定した。それぞれの個数濃度分布の測定結果を図 1.1.2 に示す。50nm 以下の核生成モードの分布は各測定器とも概略一致した。50nm 以上の集積モードでは EEPS が他機種よりは粒径が小さく評価される傾向にある。

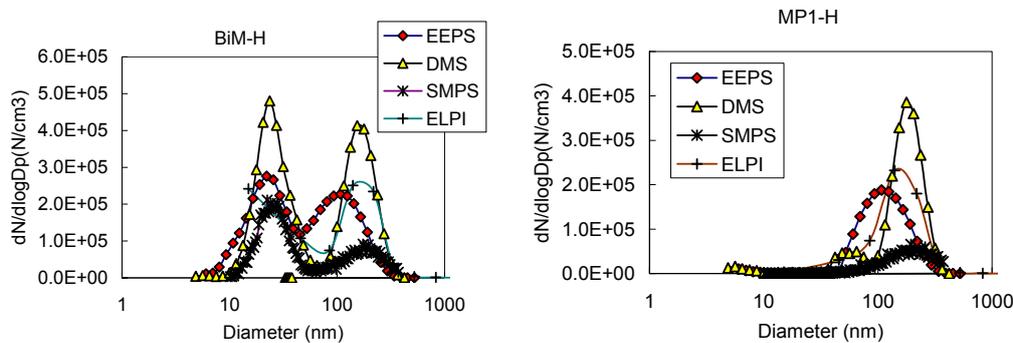


図 1.1.2 CAST 発生 PM の測定結果

50nm 以下にモード径を示すエンジン運転条件を 2 条件を選定して、希釈トンネル装置および希釈器を用いて PM 濃度を変えた条件下にて、上記 3 機種 of 計測値の比較を行った。モード径と総個数濃度を図 1. 1. 3 に示す。いずれの機種ともモード径は 10nm 内で比較的良く一致している。希釈倍率補正後の総個数濃度は CAST の PM と同様に SMPS が低値であるが、これは SMPS は他の計測器とは測定対象の粒径範囲が異なることと、サンプル流量が少ないことによる装置の内部損失の影響が考えられる。

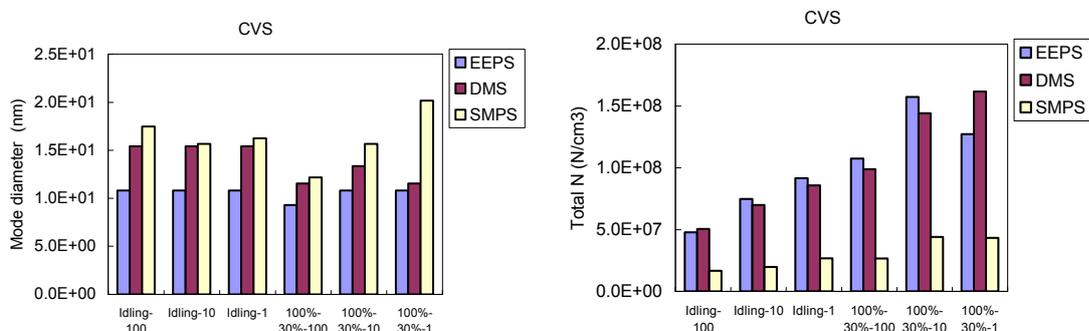


図 1. 1. 3 エンジン排出 PM の測定結果

本試験で過渡ナノ領域の個数濃度の測定に用いる EEPS の計測値は、現状のナノ領域の計測器と比較して、50nm 以下のナノ領域に対して、粒径、個数濃度とも大きくは異ならない値を示したことから、試験に適用でき、50nm 以上に対しても他の測定器結果と定性的な比較も可能と思われる。なお、50nm 以上の粒径では EEPS が小さめの粒径を示したため、粒径計測結果の比較ではこの点を考慮する必要がある。

1.1.2 希釈条件の検討

ナノ領域の PM は多くの研究結果から、希釈過程の影響を受け定量的な評価が難しいことが示されている。ここでは、ナノ PM 個数濃度の計測に PM 重量計測に汎用されている希釈トンネル装置を用いた場合の課題を調べ、低濃度時への適用可否の判断材料を得ることを目的とした。エンジン排出ガスがテールパイプから大気中に放出された状態を基準として捉え、この大気放出状態を実験室内で再現する方法として排出ガスの一部を空气中に放出した。エンジン運転条件は、ナノ PM の排出が見られる条件として、アイドリング、高回転低負荷条件、連続再生式 DPF の再生条件を選定し、排気導入管の希釈トンネルへの入口近くから排出ガスのごく一部を内径約 5mm 長さ約 10cm の SUS 管より大気放出した。大気放出後の測定位置の設定は、希釈トンネル内に各運転条件下の排出ガスの全量を導入した時の希釈倍率に近似する位置とし、この位置を大気放出口からの最近距離として、順次距離を離らして（希釈倍率を大きくして）測定した。各測定点の希釈倍率は CO2 ないし NOx 濃度比から求めた。ここで、大気放出時と希釈トンネルでの計測値が一致すれば、希釈トンネルを用いたナノ領域の PM 個数濃度の評価が可能と言える。

各運転条件の個数濃度分布測定結果を図 1. 1. 4 に示す。アイドリング時には大気放出時のガス濃度に変化が大きいため希釈倍率補正に十分な精度がないが、粒径分布は概ね一致した。100%回転数-30%負荷条件の集積モードの分布は希釈条件によらずほぼ一致してい

るが、核生成モードの分布は異なっている。これは、排気分割による排気導入管内の変化に、放出時のガスからの PM 化や PM 個数濃度の影響と見られる。全量導入よりは 1/10 分割時に一致する傾向にあり、高濃度 (10^7 個レベル以上) では PM 生成や凝集が起これると思われる。

本事業で開発されるエンジンからの排出 PM は相当な低濃度となることが予想されるため、この高濃度試験結果より個数濃度の影響は少なくなる。

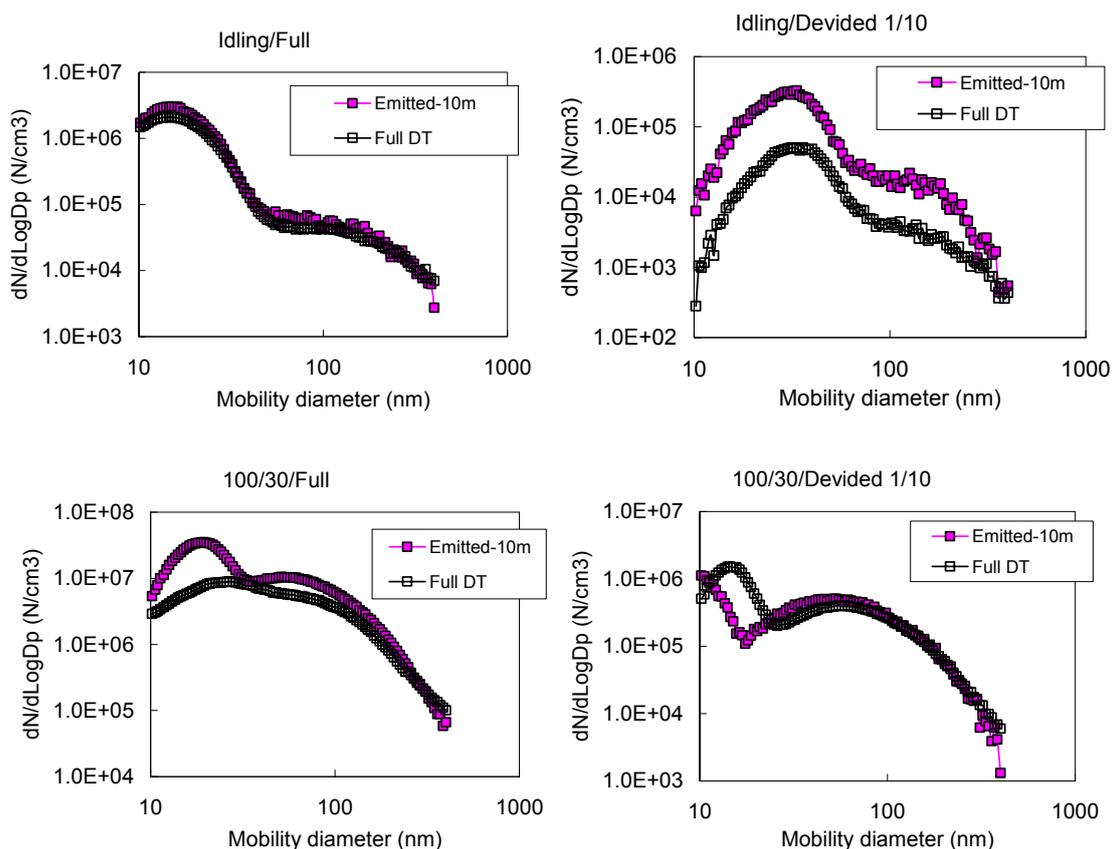


図 1.1.4 希釈トンネル全量導入と大気放出の個数濃度分布の比較

また、大気放出後の測定位置を変えた場合の個数濃度分布を図 1.1.5 に示す。高回転低負荷条件では集積モードの分布は類似しているが、核生成モードでは大きく異なり、ナノ PM の増加は、希釈トンネルと大気放出の希釈倍率が非常に低い条件下である。同様に、DPF 再生条件で他と大きく分布が異なるのは、希釈トンネルと大気放出とも希釈倍率が低い場合（ここでは約 1/5 以下）である。

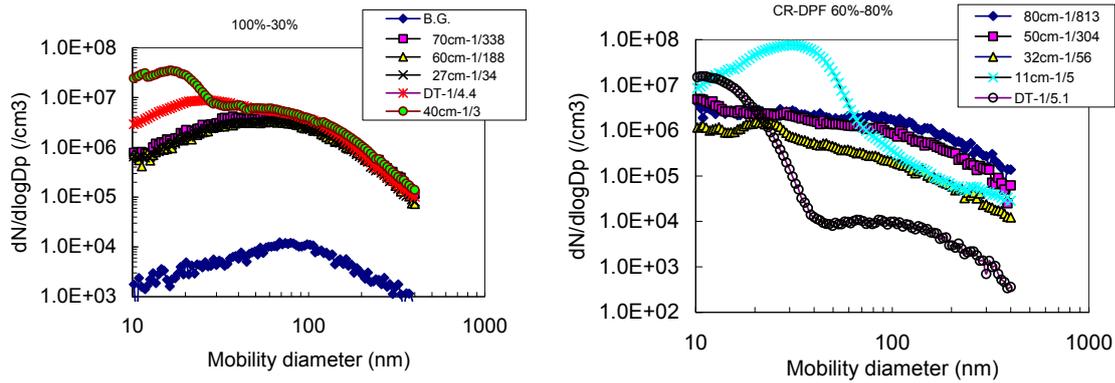


図 1.1.5 希釈トンネル全量導入と大気放出の個数濃度分布の比較

大気放出時の各測定点での希釈倍率と個数濃度測定値，および希釈倍率補正後の個数濃度を，希釈トンネルでの測定値と合わせて図 1.1.6 に示す。放出口から離れるに従い希釈倍率は大きくなり個数濃度は低値となるが，希釈倍率補正した個数濃度は凡そ一定の値を示した。上記のように大気中に放出された後の希釈倍率が低い条件では分布が異なる場合があるが，個数濃度は大きく変化しないと言える。希釈トンネルの個数濃度は，大気放出での同程度の希釈倍率の値と近いことから，希釈トンネルを用いた個数濃度の計測は十分な希釈倍率を設定すれば大きな問題はないと言える。

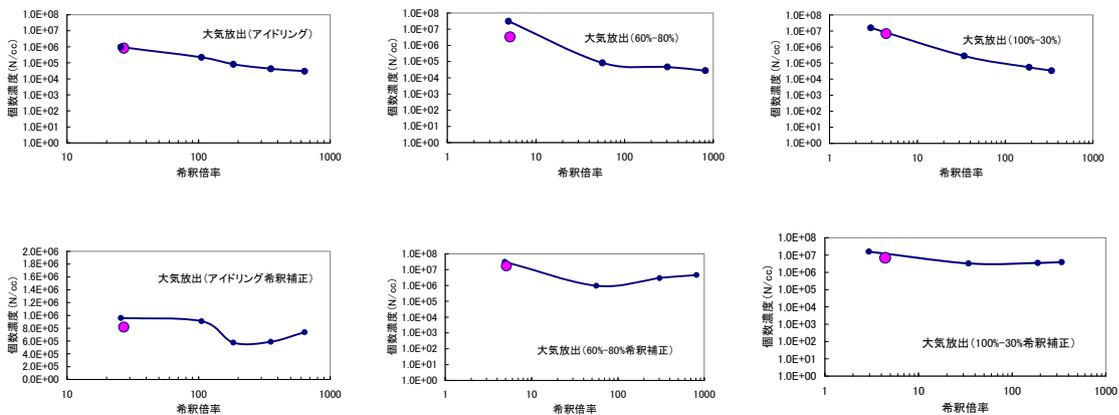


図 1.1.6 大気放出時の希釈倍率と個数濃度

(上段：測定値，下段：希釈倍率補正後の値，○：希釈トンネル，-○-：大気放出)

1.1.3 排気導入管の影響

排気導入管内の PM 濃度は測定系内で最も高値であることから，個数濃度計測時への影響も大きいことが予想される。排気導入管の仕様は，重量車では内径 154mm 以下長さ 10m 以下，中型および小型車は内径 105mm 以下長さ 6.1m 以下のように，排出ガスの測定方法に詳細に決められている。滞留時間は排出ガス量の少ないアイドリング時に最も長くなる。前項までの結果，ナノ PM の顕著な増加がみられるエンジン運転条件では希釈過程で種々の影響をうけることが示され，個々の影響因子の評価は困難である。そこで希釈条件の影

響を受けずに長時間安定に計測されるエンジン運転条件（60%回転数-20%負荷）を選定して、エンジンから希釈トンネルまでの排気導入管内の滞留時間の影響を調べた。排出ガスの分割は希釈トンネル内のPM 個数濃度で設定した。CVS 流量 60m³/分として、全量導入、1/10および1/100分割導入時の個数濃度分布を、全量導入に対する希釈補正を行い図1.1.7に示す。分割1/10（滞留時間 2 秒）までは全量導入（滞留時間 0.2 秒）と大きくは異ならないが、分割1/100（滞留時間 21 秒）では 100nm 以下の粒径での減少が大きい。

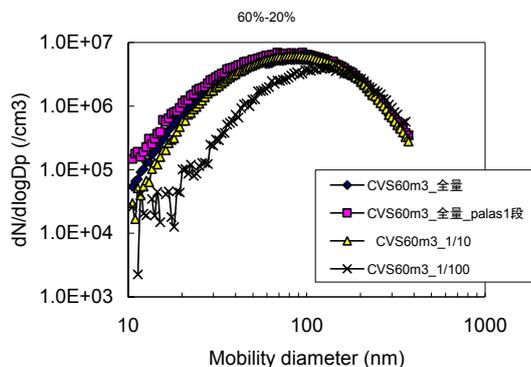


図 1.1.7 排出ガス分割導入時の粒径変化例

排気導入管内の滞留時間とモード径および個数濃度を図 1.1.8 に示す。モード径と個数濃度の数秒以内の変化は少ない。個数濃度は数秒以内であれば変化は少なく約 2 秒で 10% の変化であるが、21 秒では 55% の変化となる。したがって、排気導入管内の滞留時間は 2 秒程度以内が望ましいと言える。

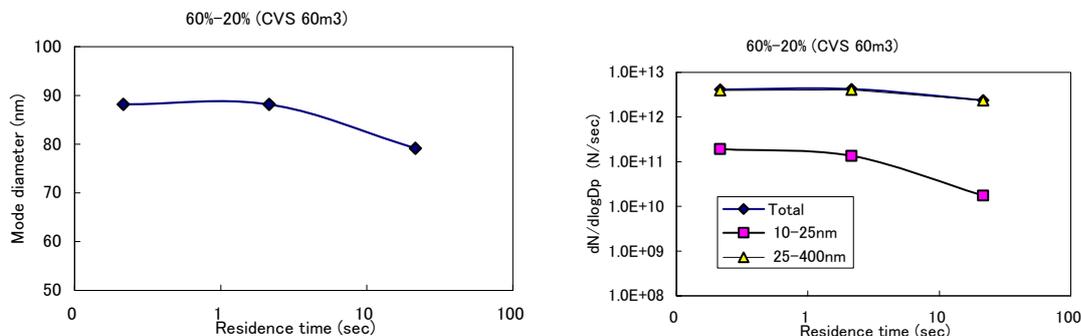


図 1.1.8 滞留時間とモード径および個数濃度

排出ガス流路に DPF を取り付けて排出ガス全体の導入量を変えずに PM を含む排出ガスの導入量を変えた場合の結果を図 1.1.9 に示す。エンジン運転条件は、条件によってナノ PM が観測される高回転低負荷とした。この場合には全量導入の 1/10、1/100 と高希釈とした場合にはナノ PM の増加は見られない。排出ガスの分割導入では排気導入管内の滞留時間が長くなることによってナノ PM の増加が起こると推定される。

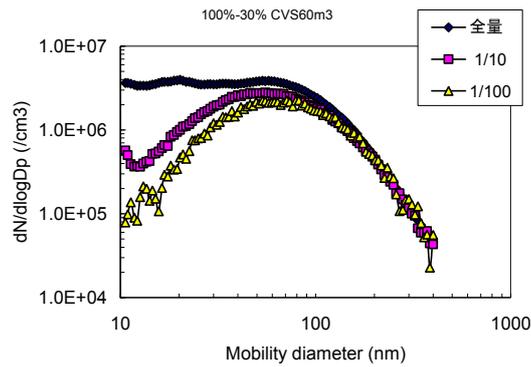


図 1.1.9 希釈トンネル内排出ガス全量導入時の個数分布
(PM 個数濃度のみ変化)

1.1.4 CVS 流量の影響

本試験で用いた希釈トンネル（内径 600mm、長さ 6m）内流量を滞留時間に換算すると、CVS 流量 20、40、60m³/分はそれぞれ 0.64 秒、0.24 秒、0.15 秒となる。排出ガス全量導入によって排気導入管の影響を極力排除した時の、モード径と総個数濃度を図 1.1.10 に示す。滞留時間が 0.15 秒から 0.24 秒に増加した場合、モード径と個数濃度は約 10% 程度の増減である。

したがって、個数濃度計測に対して、通常の試験条件の範囲での CVS 流量の影響は少ないものと考えられる。

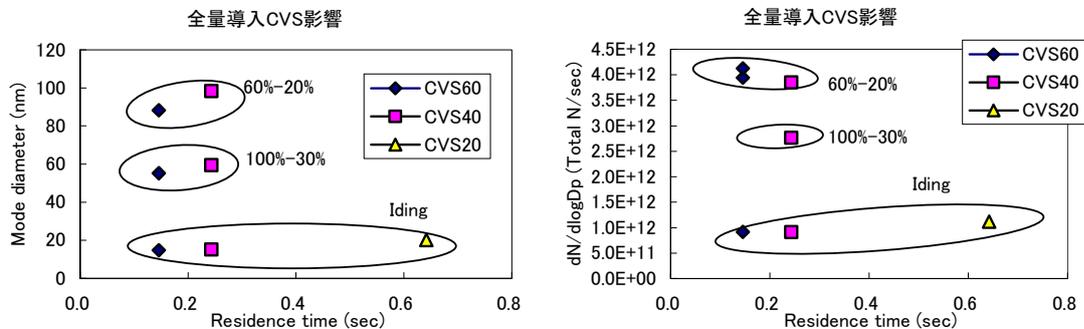


図 1.1.10 希釈トンネル流量（滞留時間）の影響

PM 個数計測では、計測可能な濃度範囲があるため、濃度に応じて何段階かの希釈が必要になる場合がある。そこで、1 段希釈トンネルと 2 段希釈トンネルに加えて、粒径計測に汎用される小型の希釈器を利用した場合の個数濃度分布について比較した。1 段希釈トンネルに全量導入した場合とそこから希釈器で 10 倍、100 倍に希釈した場合と、1 段希釈トンネルから 2 段希釈トンネルで 2 倍、10 倍に希釈した場合とさらに希釈器で 10 倍に希釈した場合について計測した。計測範囲は 10² から 10⁷ 個/cc、同一粒径では 3 ケタの範囲にある。粒径範囲 10nm から 400nm の総個数値に対する各粒径の個数比率の比較を図 1.1.11 に示す。

アイドリングと高回転低負荷はナノ PM の増加が顕著な条件であるが、各希釈条件とも

粒径毎の個数比率に大差はなく、1 段希釈トンネル内の PM は 2 段希釈トンネルやその他の希釈方法によって計測が可能である。

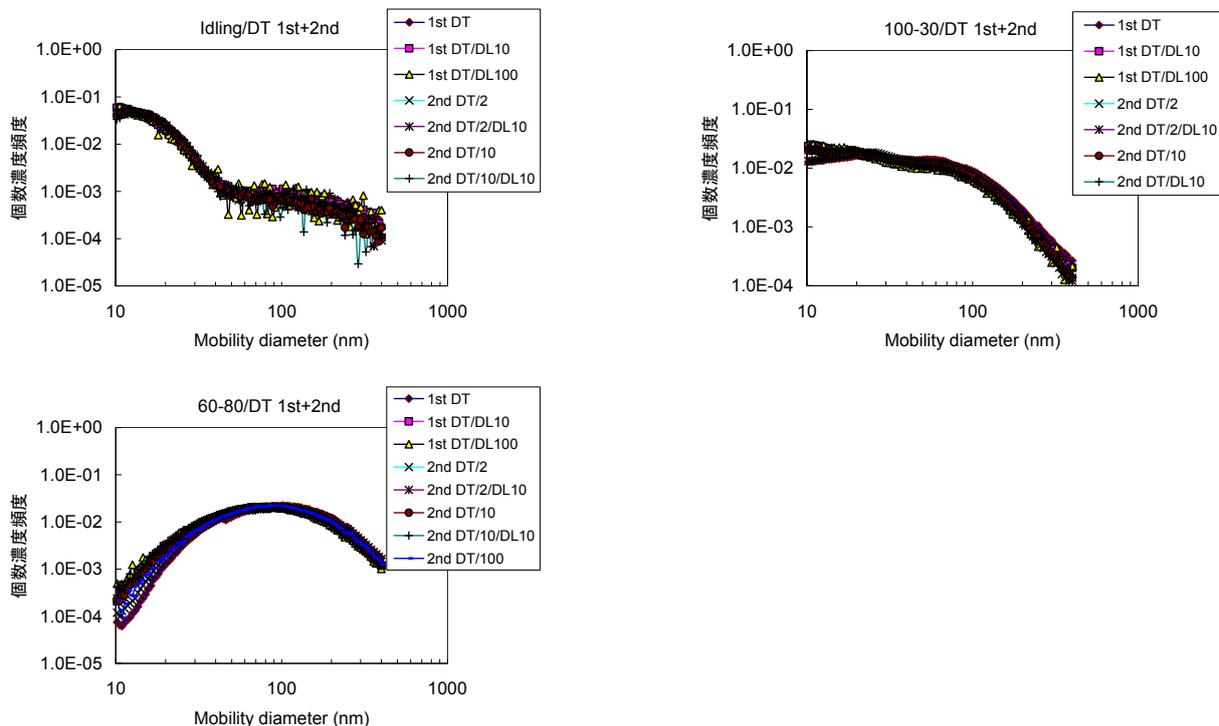


図 1. 1. 11 総個数値に対する各粒径の個数比率の比較

1.1.5 配管壁面の影響

極めて低濃度の PM を計測する場合には、希釈トンネル装置など計測系からうける影響にも留意する必要がある。希釈トンネル装置はその設置状況によっては内壁に付着した PM や PM 生成に係わる物質の除去が困難な場合がある。ここでは、希釈トンネル装置内にアイドリング時の排出ガスを 3 時間ほど導入した後に、DPF によって PM 除去した排出ガスを導入することによって、希釈排出ガス温度を 180°C まで順次上昇して、希釈トンネル壁面からの PM 離脱ないし離脱したガスからの PM 生成の有無を調べた。アイドリング時の個数濃度分布と、その後の離脱確認時の個数濃度分布を図 1. 1. 12 に示す。希釈排出ガス温度が常温近辺での PM 個数はバックグラウンドレベルであるが、温度上昇にともなって僅かであるが個数増加の傾向にあり、壁面からの高沸点成分のガス化と PM 化がごく僅かではあるが起こる可能性を示唆している。1000 個/cc 程度が希釈トンネル装置を用いた場合の計測下限値ともいえる。

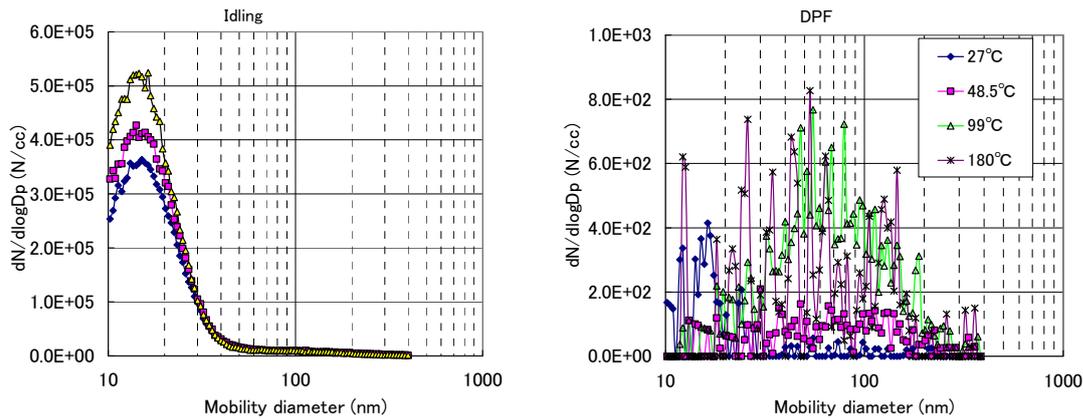


図 1.1.12 希釈トンネル内排出ガス導入時とその後の壁面個数濃度の変化

1.1.6 後処理装置通過 PM

DPF 再生後には、PM の捕捉効率が低下して微小な PM が通過する懸念がある。ここでは、JE05 モード走行時の排出ガスを DPF に通過させた後に、エンジン 100% 負荷として DPF を再生後に、再度 JE05 モード走行して、再生前後の個数濃度分布の相異有無を調べた。再生前、再生直後、ならびに再生後 JE05 モード 5 回目の個数濃度分布を図 1.1.13 に示す。再生前に比して、再生直後の核生成モードでは若干個数濃度の増加が見られ、集積モードの粒径 60nm 近辺で 2 倍程度の増加を示した。この個数増加は経時によって低下する傾向にある。DPF 再生直後には短時間であるが PM の通過が見られたが、この増加分の全体への寄与は再生頻度が大きく関わり、再生システム個々の今後の課題である。

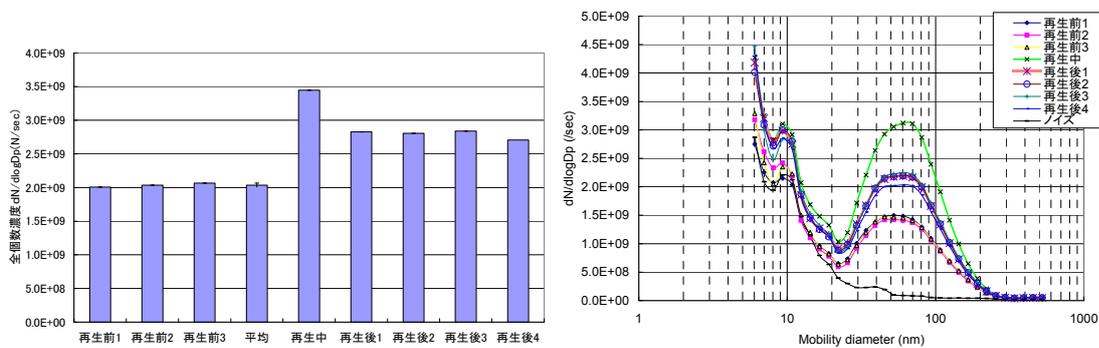


図 1.1.13 DPF 再生前後の PM 個数濃度

1.1.7 PM 低濃度時の計測値の変動

本プロジェクトで開発されるエンジン車両から排出される PM 個数は相当低値になることが予測される。一般的には、低濃度になると計測値のばらつきは大きくなる。そこで、ナノ PM 計測値に関して PM 個数濃度と RSD との関係性を調べた。試験は、後処理装置付きの大型エンジンを種々の条件で台上運転し、後処理装置前後の排出ガスを種々の希釈倍率下で計測した。これにより PM の特性に係わらずに PM 個数濃度と RSD との関係性を得ることが出来る。6.04 nm から 523.3 nm の全個数濃度の計測結果を図 1.1.14 に示す。PM 個数濃度が低値になるにともない RSD は増加を示し、PM 個数濃度が 2 桁減少すると RSD は 2

倍となる傾向を示し、PM 個数濃度が低値の場合の計測値のバラツキは大きいことがわかる。粒径別に見る（図 1.1.15）と、EEPS の計測粒径の最小である中位径 6.04 nm では他の粒径に比して若干 RSD が高値であるが、他の粒径では PM 個数濃度と RSD の関係は概ね同じである。

EEPS のノイズレベル以下の計測値を除外した場合の全 PM 個数濃度と RSD の関係を図 1.1.16 に、粒径別に図 1.1.17 示す。PM 個数濃度計測値のバラツキは大きく改善される。EEPS の計測粒径の最小である中位径 6.04 nm では他の粒径に比して若干 RSD が高値であり、 10^4 個/cm³ で 50% であるが、他の粒径では PM 個数濃度 10^4 個/cm³ で RSD は 10% 以下となる。そこで PM 個数濃度の排出量は、装置に由来する計測バラツキが少ない条件、すなわち EEPS のノイズレベル以下の計測値は除外して算出することにした。

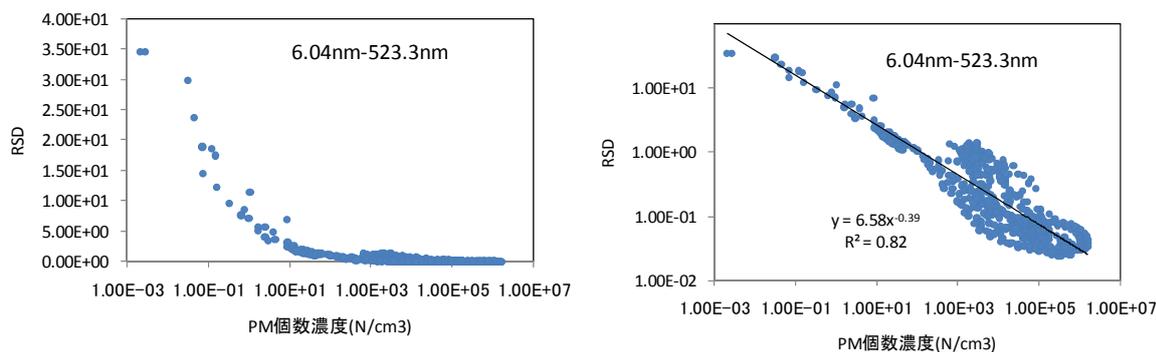


図 1.1.14 PM 個数濃度と RSD の関係（6.04 nm～523.3 nm の全個数）

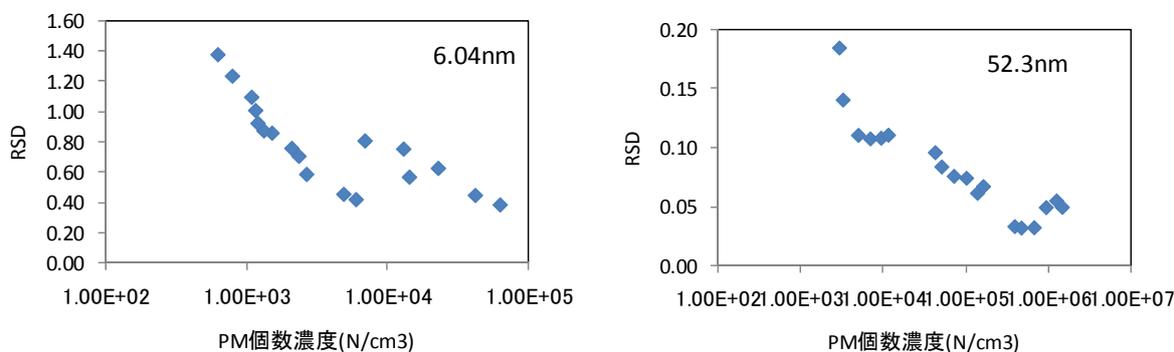


図 1.1.15 PM 個数濃度と RSD の関係（粒径別の全個数）

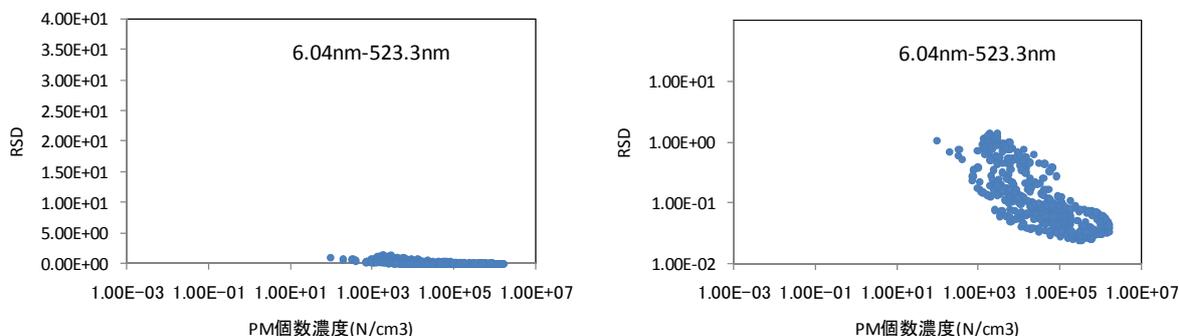


図 1.1.16 PM 個数濃度と RSD の関係
（6.04 nm～523.3 nm の全個数、ノイズレベル以下を除外）

1.1.8 小括

過渡走行時のナノ領域を含む PM 個数濃度計測法を検討した。欧州では排出ガス中の PM 個数規制を検討しており、希釈トンネルと希釈器を基本とした希釈方法を推奨している。希釈過程の影響を受けやすく定量的な評価が難しいナノ領域の PM を計測するために、大気放出を基本として希釈トンネル装置の検討を行った結果、希釈倍率が非常に低い条件下（5 倍以下）ではナノ PM の増加が起こる。よって、ナノ PM の評価には、高希釈倍率下での計測か、ナノ PM 個数が希釈倍率に依存しないことの確認が必要である。PM 個数濃度を計測可能な範囲に調整するために、濃度に応じて何段階かの希釈が必要になる。そこで、1 段希釈トンネルと 2 段希釈トンネルに加えて、さらに粒径計測に汎用される小型の希釈器を利用した場合の個数濃度分布について比較した。ナノ PM の増加が顕著なエンジン運転条件（アイドリングと高回転低負荷）での結果から、1 段希釈トンネル装置内の PM 個数濃度分布は 2 段希釈トンネルやその他の希釈方法によって再現が可能である。JE05 モード時に排出される PM 個数濃度の計測を試行した結果、全量導入、分割導入、2nd トンネルで再希釈、小型希釈器で希釈時の連続計測から求めた総個数濃度はいずれの希釈方法でも大きくは異ならず、排出特性の概要把握は可能であることがわかった。

本プロジェクトで開発されるエンジン車両から排出される PM 個数は相当低値になることが予測される。ナノ PM 計測値に関して PM 個数濃度と RSD との関係を調べた結果、PM 個数濃度が低値になるにともない RSD は増加を示し、PM 個数濃度が 2 桁減少すると RSD は 2 倍となる傾向を示し、PM 個数濃度が低値の場合の計測値のバラツキは大きくなる。EEPS のノイズレベル以下の計測値を除外した場合には、PM 個数濃度計測値のバラツキは大きく改善される。EEPS の計測粒径の最小である中位径 6.04 nm では他の粒径に比して若干 RSD が高値であり、 10^4 個/cm³ で 50% であるが、他の粒径では PM 個数濃度 10^4 個/cm³ で RSD は 10% 以下となる。そこで PM 個数濃度の排出量は、装置に由来する計測バラツキが少ない条件、すなわち EEPS のノイズレベル以下の計測値は除外して算出することが妥当と判断した。

1.1.9 参考文献

- 1) ETH Conference on Combustion Generated Nanoparticles (1st~10th, 1997~2006)
- 2) U.S.Federal Register 40CFR Part 86, HEAVY DUTY ENGINES: GASEOUS AND PARTICULATE EXHAUST TEST PROCEDURES
- 3) Jin-ha Lee, et al, Measurement of the diesel exhaust particle reduction effect and particle size distribution in a transient cycle mode with an installed diesel particulate filter (DPF), SAE Technical paper 2002-01-1005
- 4) Kittelson D.B., Engine and nano particles.A review. J.of Aerosol Sci., vol.29 No.5/6 (1998) 575-588
- 5) David Kittelson, Recent on-road measurements of ultrafine and nanoparticles, Cambridge Particulate Meeting May 2005

1.2 PM 過渡排出成分計測

1.2.1 はじめに

本 NEDO プロジェクトで開発される次世代低公害車では、最新規制値よりも低い PM 排出量を目的としている。トータルとしての PM 排出量が減れば個別の成分も減少するものと考えられるが、新たな技術を用いて開発されたエンジンや後処理技術を用いた場合、特定の走行条件（例えば、急激な加減速時）で、特定の物質が過渡的に多く排出されるような状態の有無を把握することは、更なる排出量の低減に有効である。ところが、PM の排出成分の過渡的な排出を連続的に計測することは、計測装置に従来の汎用機器以上に高感度かつ高精度な性能が必要である。そこで、ここでは、NEDO 開発エンジン車両からの PM の過渡排出成分を把握するために、連続計測が可能で感度や選択性にも優れているレーザをイオン化光源とする飛行時間型質量分析装置による計測手法の検討を行った。

1.2.2 原理

質量分析法は試料分子をイオン化し、電場や磁場によって質量/電荷比ごとに分離して検出する方法である。イオン化の方法は電子イオン化、化学イオン化、高速原子衝突イオン化、エレクトロスプレーイオン化、大気圧化学イオン化など、多種多様なイオン化法が使用されている。その中でも、レーザを試料に照射してイオン化を行う方法は、高効率、高選択な手法として極めて有用である。

レーザを用いる利点として、波長を変えることにより 1 光子当たりのエネルギーを変えることができることが挙げられる。また、パルスレーザを用いる場合、パルス幅を変えることによって、単位時間当たりのレーザ強度も調整可能である。

例えば電子イオン化の場合でもイオン化の効率を高めたいならば、熱電子の量（エネルギー）を多くすればよいが、あまりに過大なエネルギーを試料分子に照射すると試料分子がバラバラのフラグメントとなってしまふ。そこで、電子イオン化では過去に蓄積された多数のデータを考慮し、一般的に 70 eV の熱電子流となっている。

一方で、レーザを用いる場合、レーザ光のエネルギーを大きくすることで電子イオン化と同様にイオン化効率を高めることができる。さらに、フラグメントが生じるようになれば、波長を変えることによって 1 光子当たりのエネルギーでイオン化過程を調整することも可能である。よって、電子イオン化よりも分子イオンを高効率に生成させやすく、高感度な計測が可能となる。

さらに、レーザはコヒーレント性が高い（時間的、空間的な電磁波の位相が揃っている）ため、通常の光では起こらないような非線形光学効果が起こるといった特徴がある。例えば、通常の光を照射したのでは分子は 1 光子の吸収のみが起こるが、レーザ光であれば複数の光子を吸収する多光子イオン化過程が容易に起こる。多光子イオン化過程は非線形光学効果の一つである。よって 1 光子ではその分子のイオン化エネルギーに到達しないような場合でも複数の光子の吸収によってイオン化させることが可能である。

さらに多光子イオン化過程には別なメリットがある。**Fig.1.2.1** に示すように基底電子状態の分子が $h\nu$ の光子を 2 個吸収してイオン化状態に達するとする。このとき、**Fig. 1.2.1 (a)** のように、最初の光子 $h\nu$ が励起状態のエネルギー準位に一致した場合、光子吸収の遷移確率

は共鳴効果によって増大する。すなわち極めて高効率なイオン化が起こる。これを共鳴 2 光子イオン化 (R2PI; Resonance 2-Photons Ionization) と呼ぶ。また、**Fig. 1.2.1 (b)**のような非共鳴の状態でも 2 光子イオン化は起こり得る。これを非共鳴イオン化と呼ぶ。非共鳴イオン化の場合は、高出力のレーザーが必要となる。

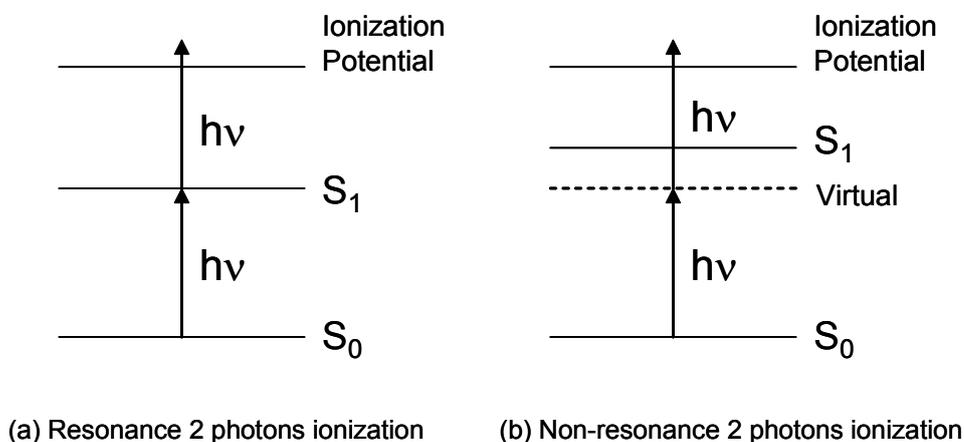


Fig. 1.2.1 2 光子イオン化過程

共鳴イオン化と非共鳴イオン化法には、それぞれメリットとデメリットがある。共鳴イオン化法は、共鳴波長にレーザーの波長が 0.01 nm という極めて高い精度で一致した場合にのみ、光子の吸収効率が 5~6 桁のオーダーで向上する。極めて高効率なイオン化法である。また、分子のエネルギー準位は、その分子の構造に固有であるため、異性体であっても共鳴波長は異なる。すなわち、レーザーの波長を選択することによって異性体も分離して選択的にイオン化することができる。自動車排出ガスのように膨大な数の共存物質が存在している場合、それらを精度良く分離して検出することは非常に難しいが、本法を用いれば高選択的な計測が可能となる。しかしながら、その高選択性が実際の計測ではネックとなる場合も考えられる。1つのレーザー波長で1つの分子（異性体も分離）しかイオン化・検出されないため、複数の分子を同時に計測することができない。複数の分子をモニターしたい場合には、複数のレーザーを用いる必要がある。また、波長可変レーザーは稼働部が多く安定性に問題がある場合が多い。波長可変レーザーとして一般的なものとして、色素レーザーがあり、比較的安定しているが、一つの色素でカバーできる波長の範囲が 20 nm 程度であり、それ以上に波長を変えたい場合は、色素を交換しなければならない。そこで、ボタン一つで紫外から赤外まで波長を変えることができる OPO (Optical Parametric Oscillator: 光パラメトリック発振器) が分光学の分野で多く使われている。しかし、OPO は非常に多くの光学素子を巧妙に配置して波長変換を行っているため、ミクロン単位でも光学素子（結晶やミラーなど）がズレてしまうと発振しなくなってしまう。埃や振動にも弱く、簡易のクリーンブースでレーザーを囲う必要や、レーザーを設置している光学テーブルも特殊なものが必要となる。さらに、室温や湿度にも敏感であり、実験室のみでの検討には使えるが、現場での分析に OPO が用いられた例はほとんどない。

一方で、非共鳴イオン化の場合は、通常 2 光子でイオン化ポテンシャルを超えれば十分

であり、紫外のレーザーを用いれば、ほとんどの芳香族化合物をイオン化できる。しかし、異性体の分離はできない。さらに、それが本当に親分子イオンか、もっと大きな分子が光解離してその重さのイオンになっているのか区別がつかない。しかし、選択性が少ない分、一度の計測で複数の分子を同時にモニターすることができる。厳密に異性体まで分離して計測することは不可能であるが、異性体を合算した形では、その存在量を見積もることができる。この場合、用いるレーザーは上述したように紫外レーザーであればどのようなものでも十分である。YAGレーザーの第四高調波（266 nm）であれば、特殊な調整も不要で、埃や振動にも比較的強いため、本研究分野ではよく使用されている。光学テーブルも特殊なものを使用する必要はなく、普通の実験用の台で十分である。

ところで、共鳴イオン化の場合には、単色なレーザーを用いるだけではシャープなスペクトルを得ることはできない。試料分子は、一般に電子のエネルギーに加え、振動や回転に伴うエネルギーも持っている。つまり、**Fig. 1.2.2 (a)**に示すように、室温では分子が基底状態の多くの振動・回転準位に位置しており、これらの準位から励起状態に遷移が起これば、多数の遷移が重なるため、スペクトルには幅広いバンド構造が観測される。一方で、**Fig. 1.2.2 (b)**のように分子を絶対零度付近に冷却すると、振動や回転をしていない真の基底状態から遷移を起こすことができる。

よって、共鳴効果によって特定の波長で選択的なイオン化を達成するには、試料分子を絶対零度付近にまで冷却する必要がある。そこで、**Fig. 1.2.3**に示すような超音速分子ジェット法を用いることで、過渡的に気体状態のまま絶対零度付近にまで冷却することができる。これは、気化させた試料分子を希ガス（ヘリウム、アルゴンなど）とともにノズルを通じて高真空中に噴出することによって得られる。このとき、ノズル付近で試料分子と希ガス原子の2体衝突が起これば、試料分子のもつ熱エネルギーが希ガス原子の並進エネルギーに変換され試料分子の温度が低下する。ノズルから出た直後には、まだかなりの2体衝突があり温度低下はさらに進む。しかし、ある距離以降では衝突がなくなり一定温度に到達する。衝突を繰り返したあとの分子、希ガス原子はすべて等速度で運動するので、分子間衝突のない極低温（数 K）の気体を得られる。

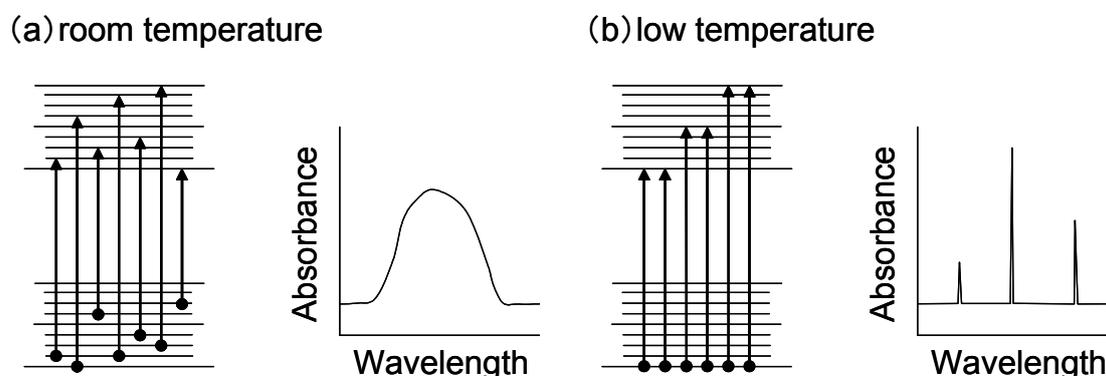


Fig. 1.2.2 分子温度と吸収スペクトルの関係

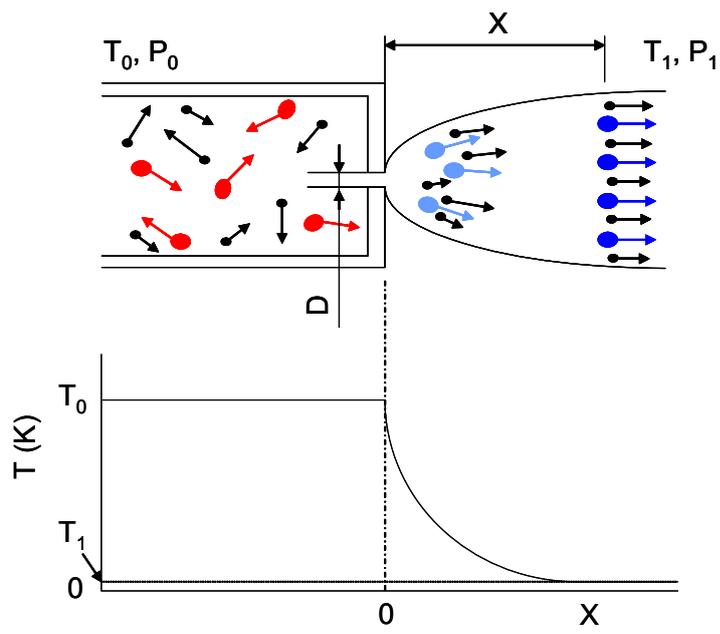


Fig. 1.2.3 超音速分子ジェットによる温度低下

本研究では、共鳴イオン化法の検討ならびに非共鳴イオン化法においても超音速分子ジェットによって試料を導入した。非共鳴イオン化では超音速分子ジェットで試料導入する直接的な利点はないが、分子のエネルギーの初期状態が揃い安定しているため、非共鳴といえども再現性の高いシグナルが得られる。特に試料分子密度を毎回ある程度一定に揃えることができるため、感度の見積もりなども精度の高いものとなる。

超音速分子ジェット法による共鳴イオン化法は、極めて有効な方法であるが、試料分子の噴出のさせ方、ノズルの背圧、オリフィス形状、試料噴出後の電極の配置によるガスの流れの乱れ、試料噴出とレーザーの照射タイミング、オリフィスからレーザー照射点までの位置など、多種多様なパラメータの調整が必要であり、それらによって冷却効果が大きく変わってくる。冷却効果が変われば、吸収スペクトルにおける吸収線の線幅、すなわち共鳴イオン化のイオン化効率、検出感度が大きく変わる。また、前述したように使用するレーザーについてもデリケートであり、精緻な調整が必要となり、現場計測に用いるにはあまり適していない。

そこで、本研究では非共鳴イオン化による連続計測を NEDO 開発エンジン・車両の評価のメインとして位置づけて開発を行い、共鳴イオン化については、方法論として基礎的知見を得るための検討を行った。

1.2.3 装置概要とこれまでの開発経緯

Fig. 1.2.4 に、本研究で用いた質量分析装置 (REMPI-2002; SHIMADZU) の写真を示す。真空排気系として、ターボ分子ポンプとオイルフリー回転ポンプが、イオン化室、フライトチューブに、それぞれ 1 組ずつ設置されている。真空度は、イオン化室、フライトチューブともに 10^{-6} Pa 台を達成し十分な性能を有している。

Fig.1.2.5 に、本装置内部のイオン加速電極・検出系の模式図を示す。パルスバルブよりチャンバー内に噴出された試料分子は、Ion Extraction Electrodes の間に照射されたレーザーによってイオン化する。生成したイオンは、Ion Extraction Electrodes によって、Reflector 方向へ加速される。このとき、円筒状の Einzel Lens に電圧を印加することによって、イオンの発散を抑制し、検出器 (MCP) 上に集束するように調整する。Reflector では、イオンの初期位置・速度分布が補正され、検出器方向へと反射させる。MCP で検出したイオン信号は、増幅器を通した後に、パソコンでデータ処理を行った。



Fig.1.2.4 質量分析装置の写真

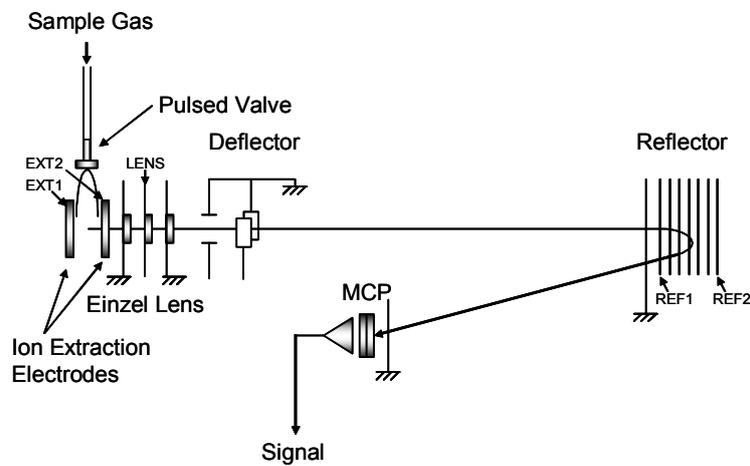


Fig.1.2.5 質量分析装置内部の構造図

本検出手法上で質量分析装置の質量分離機構および検出機構に関しては大きな問題はなく、重要な試料導入部とレーザの照射法に関して検討を行った。種々の手法を検討した結果、試料導入には新規構造のパルスバルブが最良であることがわかった。Fig.1.2.6 にその高温短パルスバルブ（IDX テクノロジー社製）の写真と模式図を示す。本バルブは試料の入口と出口があり常にガスを流した状態にすることができる。試料噴出部には直径 0.7 mm のオリフィスがあり、その上部をヘアピンのような形をした金属板で覆っている。この金属板に電流を流すことによって金属板がたわみ、その空隙から試料ガスがオリフィスを通して真空チャンバ内に導入される仕組みである。

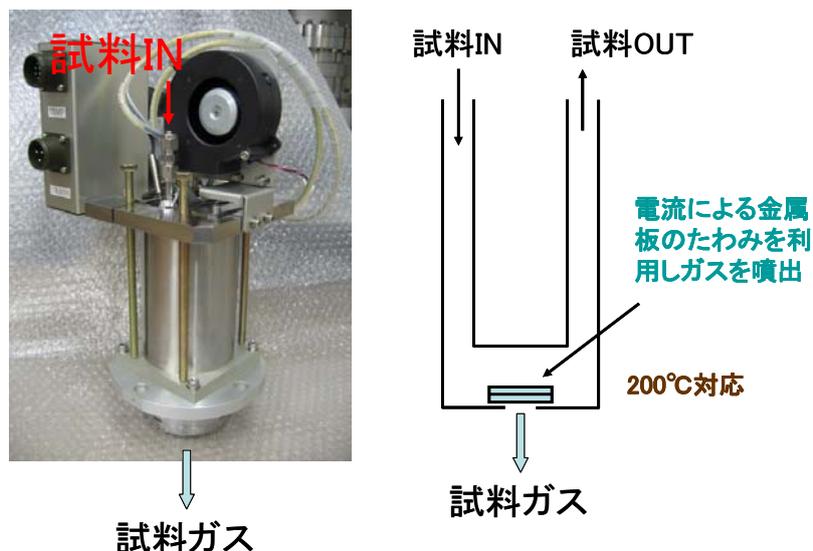


Fig.1.2.6 高温短パルスバルブの写真と内部構造

NEDO 開発エンジン・車両排出ガスの 1 秒毎の過渡変化を計測するために、OPO レーザ励起用の YAG レーザ (スペクトラフィジックス社製、Quanta Ray) の第四高調波 266 nm を光源として用いた。このレーザではエネルギーを 90 mJ まで大きくすることができる。高出力のレーザであれば Fig.1.2.7 に示すように光子密度が大きいため集光することなく約 10 mm のレーザ径のままでイオン化が可能である。しかし、90 mJ のエネルギーでは集光無しでも光子密度が大きすぎ、フラグメントがたくさん生成され、レーザエネルギーを有効に利用できなかった。そこで、Fig.1.2.8 に示すように、シリンドリカルレンズを用いてビームを広げて試料に照射することにより、光子密度をむしろ下げ、レーザと試料分子の相互作用体積をさらに増大させた。その結果、Fig.1.2.9 に示すように、ナフタレン 3 ppb の標準試料を検出することができた。Fig.1.2.9 でのトルエンやスチレンの濃度は 5 ppb であり、S/N 比から 1 ppb 以下の検出限界であることが推察される。また、フェナントレンやピレンの標準物質を用いても検出に成功し、それぞれ 30 ppb、70 ppb の検出限界を得た。

本研究では、試料導入は高温短パルスバルブを用い、レーザは YAG レーザの 90 mJ のビームをシリンドリカルレンズで拡大して照射する方式を用いた。

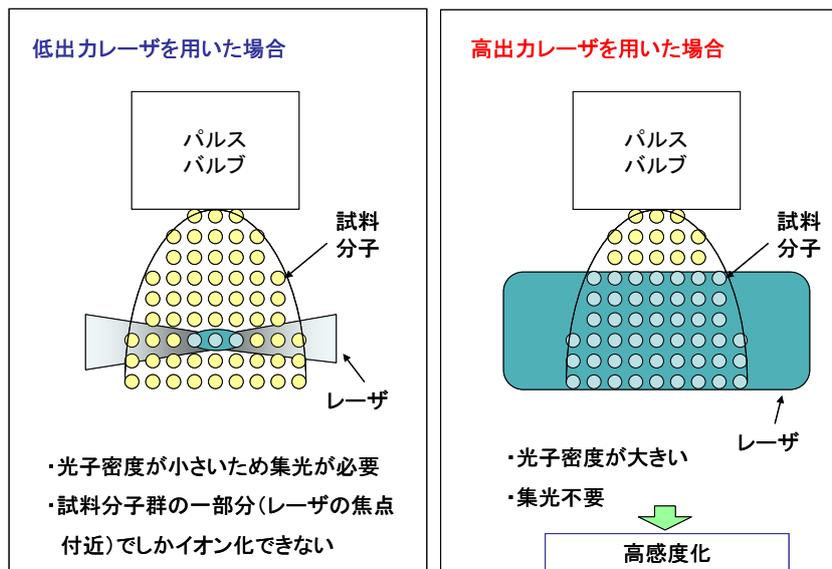


Fig.1.2.7 レーザエネルギーと照射方法

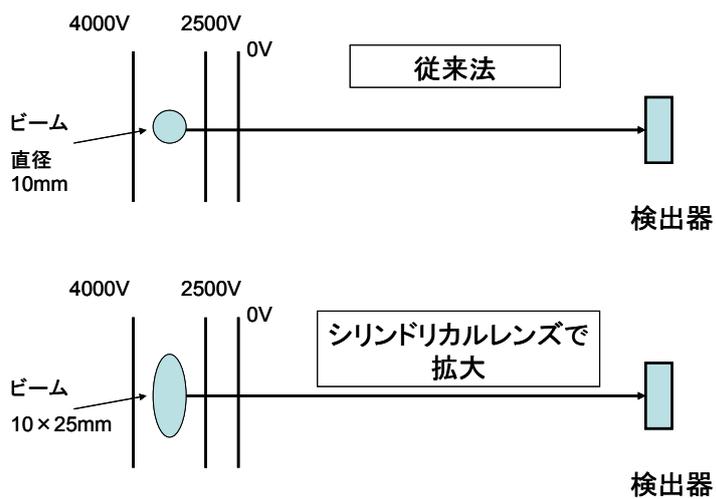


Fig. 1.2.8 シリンダリカルレンズを用いたレーザービームの拡大照射

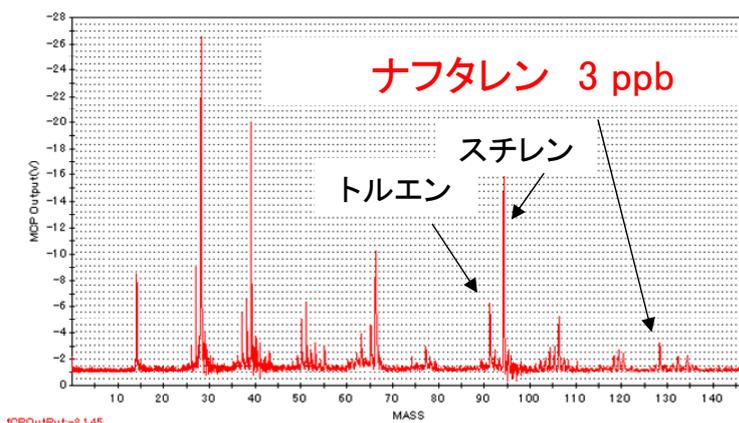


Fig.1.2.9 シリンドリカルレンズを用いたレーザービームの拡大照射による標準試料の質量スペクトル

1.2.4 実排出ガスによる予備検討

排出ガスの引き込み口から質量分析装置までの遅れ時間と信号の応答性について、トルエンおよびキシレン（各 1 ppm）の標準ガスを用いて検討した。**Fig.1.2.11**に標準ガス（トルエン、キシレン）の模擬連続計測の結果を示す。この結果、遅れ時間 3.3 秒で標準ガスのシグナルが立ち上がり、標準ガスから空気に変えた際は、少しテーリングがあるものの 0.5 秒以内に信号がほぼゼロに戻った。1 秒毎の過渡計測には、この程度のテーリングであれば大きな問題はないものと判断できる。

実際のディーゼル車（新短期規制対応、酸化触媒付）を用いて、過渡計測の予備検討を行った。**Fig. 1.2.12**に実験装置図の模式図を示す。レーザーは YAG レーザの第四高調波 266 nm、エネルギーは 90 mJ のものを用いた。**Fig.1.2.13**にディーゼル車の直接排出ガスの連続計測（JE05 モード）の結果を示す。モニターした質量数は、 $m/z=92$ 、106、120、178、202 であり、トルエン、キシレン、ナフタレン、フェナントレン、ピレンなどに該当する。この結果、この車両では、加速時にこれらの芳香族成分が多く排出されることがわかった。また、**Fig. 1.2.14**に示す JE05 モード中の加速、減速、アイドリングのそれぞれのポイントで質量スペクトルを測定した。その代表例として、**Fig. 1.2.15** および **Fig. 1.2.16**に JE05 モード開始 520 秒時と 1490 秒時の質量スペクトルをそれぞれ示す。また、**Fig. 1.2.17** および **Fig. 1.2.18**に、**Fig. 1.2.14**で示した全てのポイントの質量スペクトルを示す。**Fig. 1.2.15**の 520 秒時では、質量数 150 以下の単環および 2 環の芳香族が観測されているが、**Fig. 1.2.16**の 1490 秒時では、3 環や 4 環の芳香族も観測されていることがわかる。また、質量スペクトル全般を示している **Fig. 1.2.17** および **Fig. 1.2.18**を見ても、加速時に質量スペクトルの信号が大きくなっていることがわかる。しかし、全体を通して 3 環や 4 環の芳香族に相当する信号が明確に観測されているのは 1490 秒時であり、全般的な傾向として加速時に信号は大きくなるが、3 環や 4 環の芳香族に関しては最も大きな加速の時のみに観測された。

このように本法を用いることによって、実際の車両からの芳香族化合物を連続的に観測できることが実証でき、評価試験に適用できることがわかった。

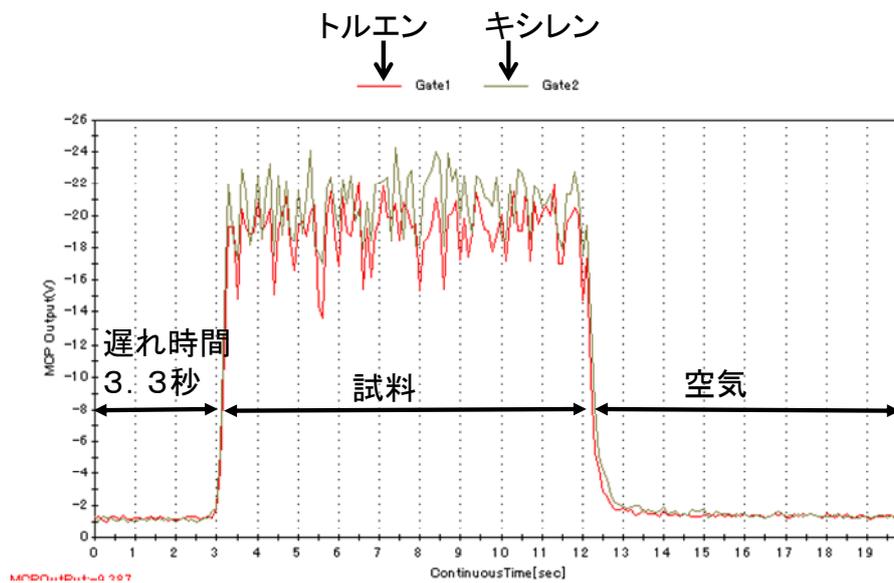


Fig. 1.2.11 模擬過渡計測（ヒートホース 45 m 使用による影響）

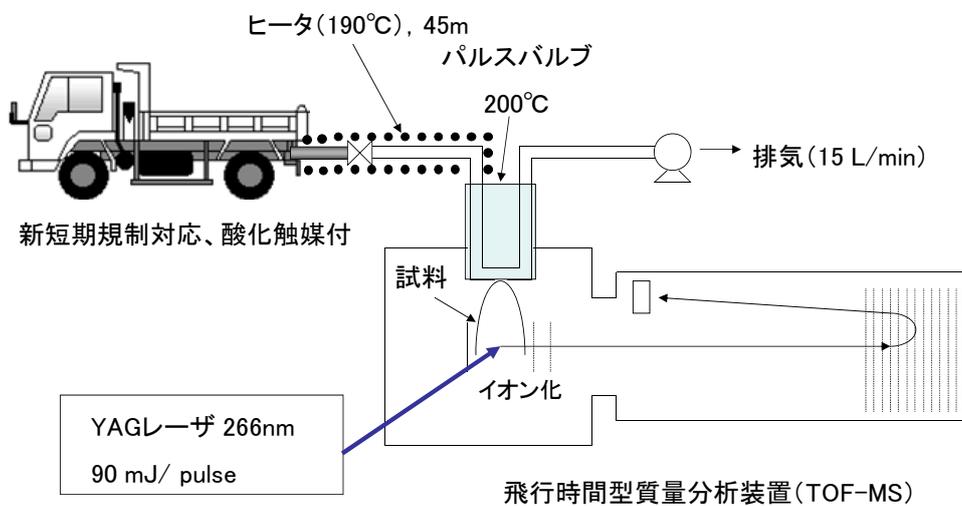


Fig. 1.2.12 実験装置図

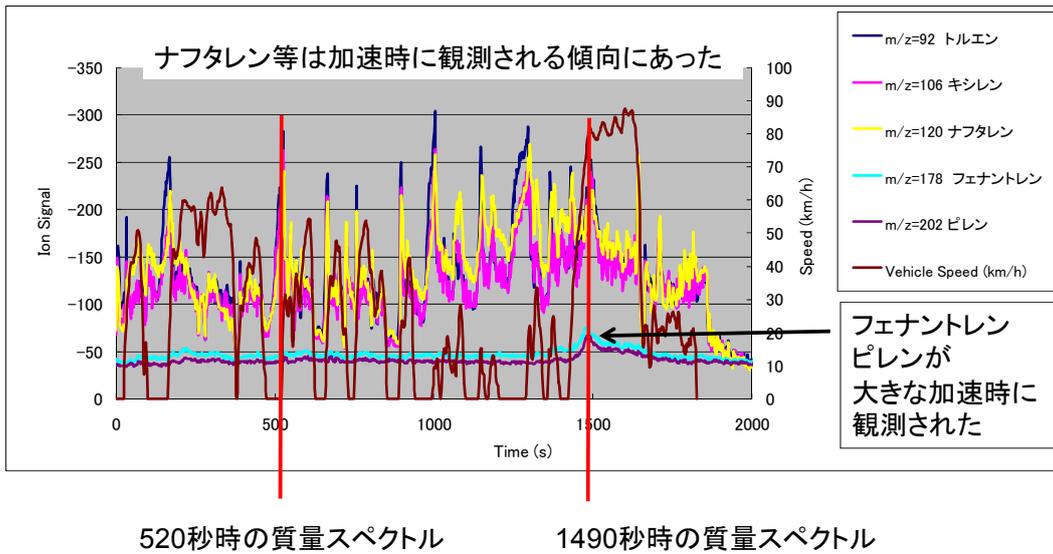


Fig. 1.2.13 ディーゼル車（新短期規制対応、酸化触媒付）排出ガス中芳香族成分の過渡計測

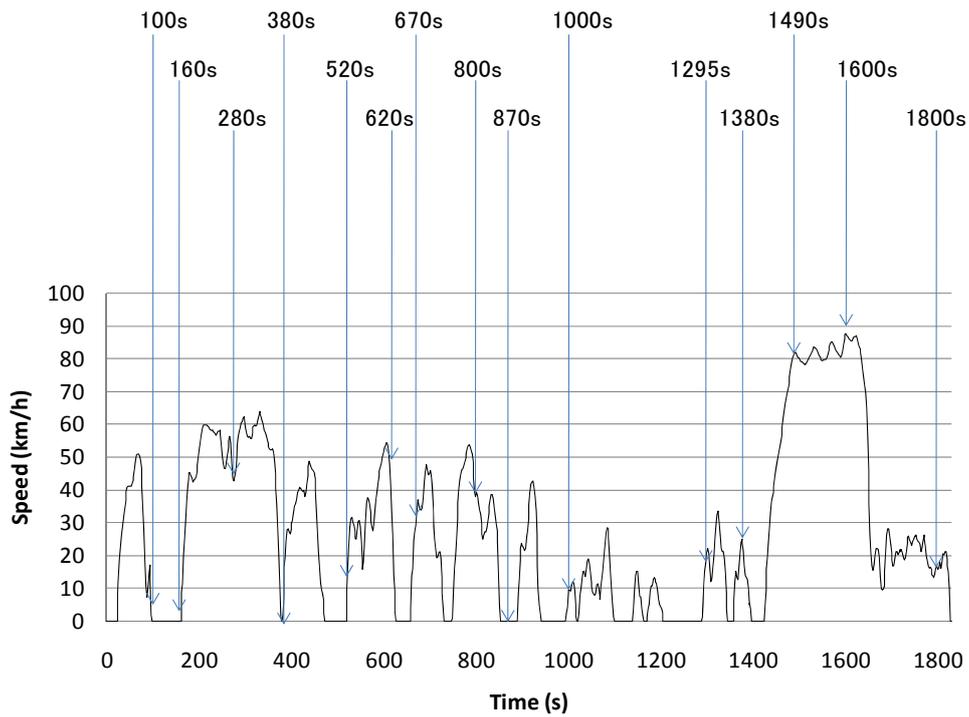


Fig. 1.2.14 JE05 モードと質量スペクトルの測定ポイント

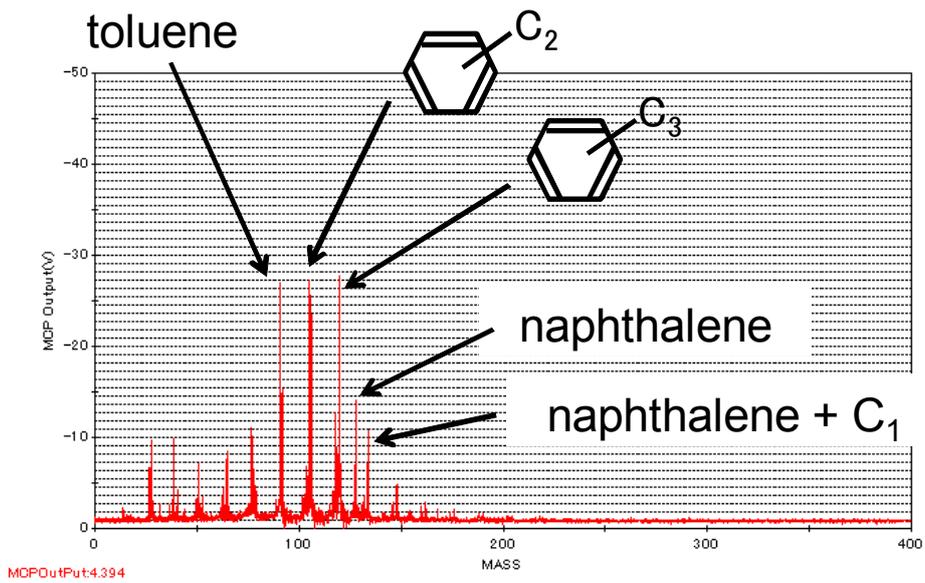


Fig. 1.2.15 JE05 モード開始 520 秒時の質量スペクトル

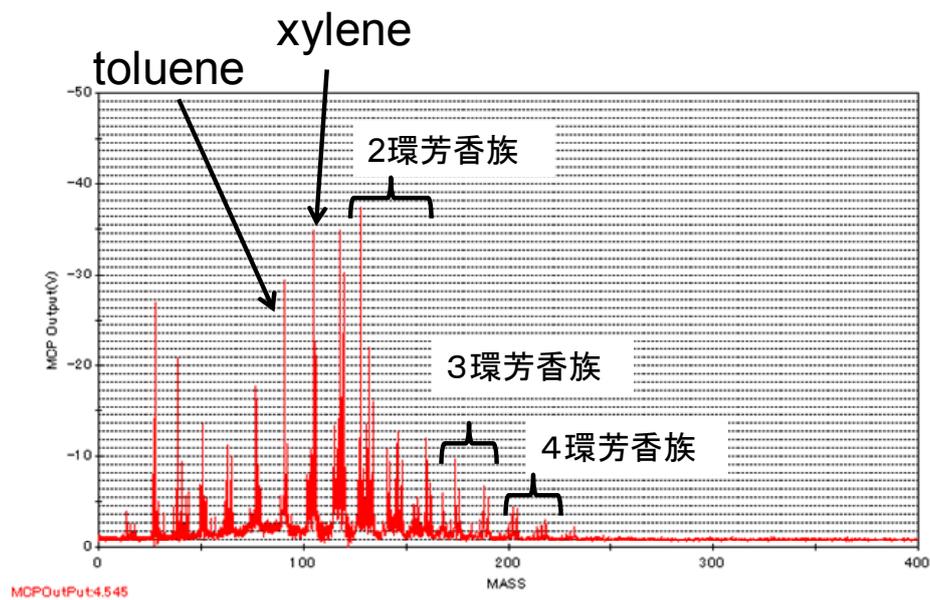


Fig. 1.2.16 JE05 モード開始 1490 秒時の質量スペクトル

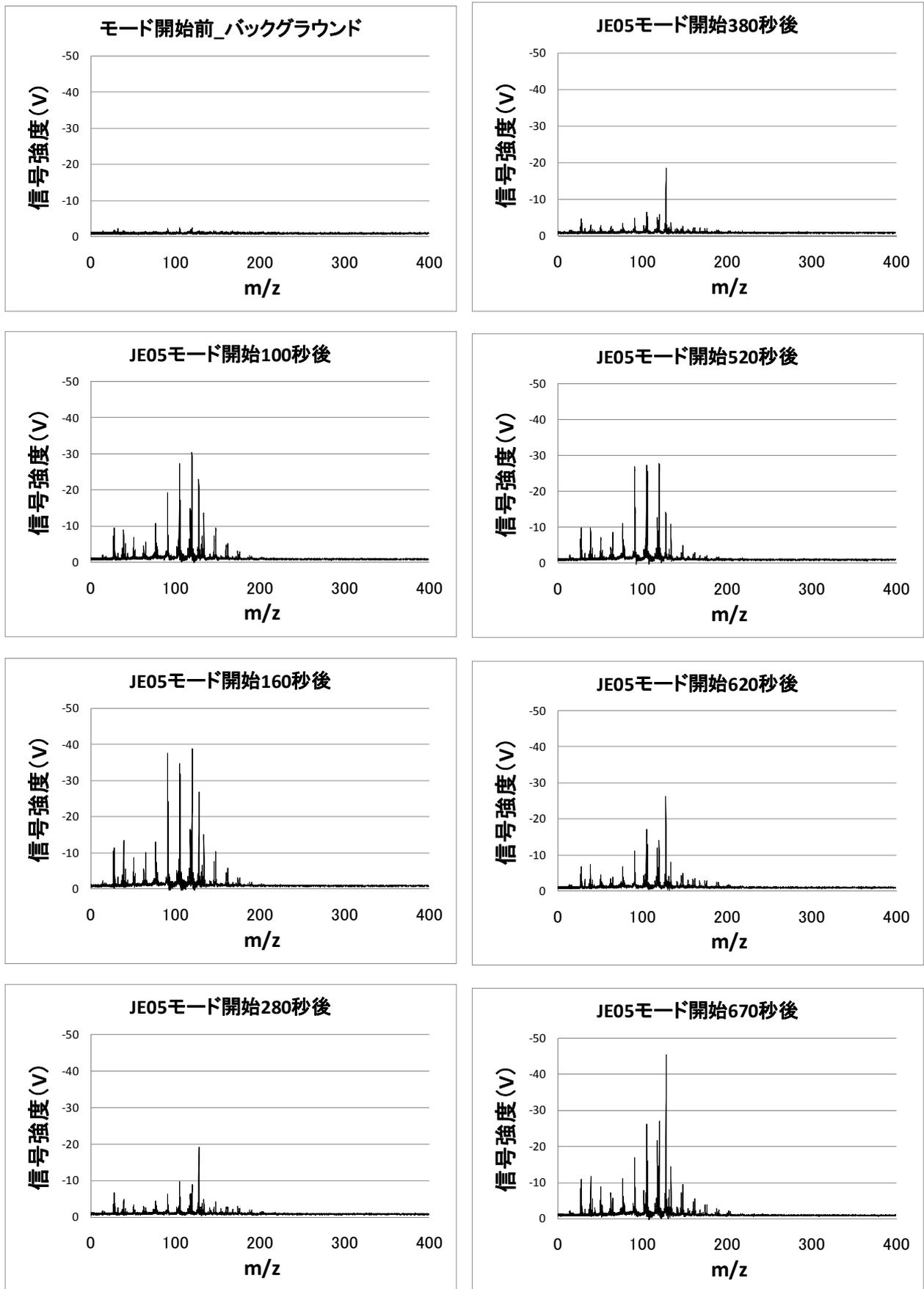


Fig. 1.2.17 予備試験車両（新短期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル

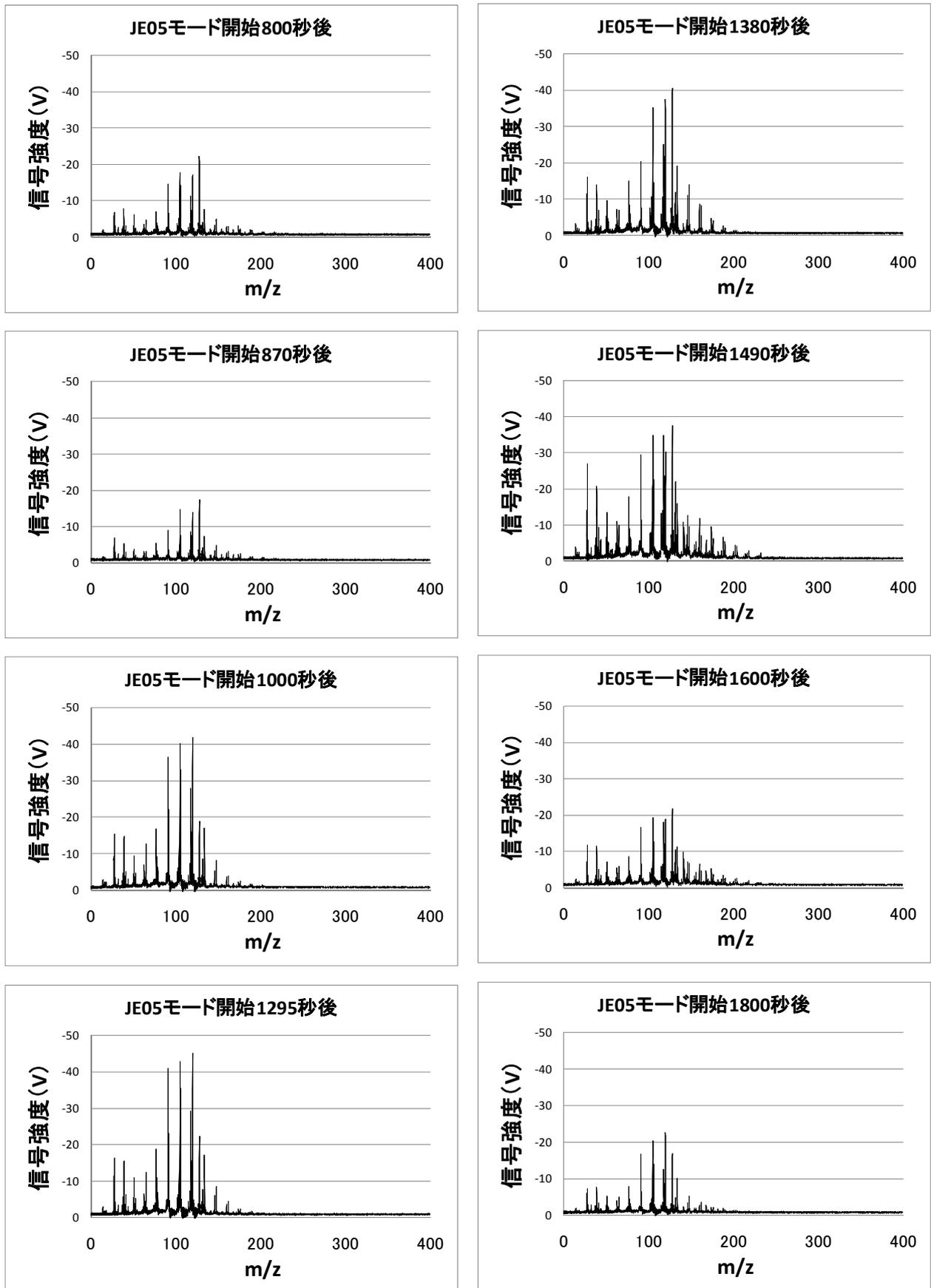


Fig. 1.2.18 予備試験車両（新短期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル

1.2.5 ピレンの共鳴イオン化に関する検討

2)-4 節で示したように非共鳴イオン化法を用いても実際の車両からの芳香族化合物の連続計測が可能であることがわかった。共鳴イオン化法の場合、検出感度が原理上 5~6 桁も向上し、さらに選択性も極めて高くなるという特徴がある。そこで、ここではピレンの共鳴イオン化に関して検討を行った。

共鳴イオン化法は、少なくとも実験室レベルではその有用性が実証されている。しかし、この際に主にターゲットとされてきた分子は単環の芳香族である。単環の芳香族の場合、1 台のレーザーを用いて、最も吸収の大きな共鳴波長にレーザーの波長を合わせることによって、1 光子目で共鳴効果での効率的な遷移が起これ、2 光子目の吸収でイオン化ポテンシャルを超えることができる。本研究では、PM すなわち常温で固体の成分をターゲットとしているため、沸点の高い多環の芳香族を対象としている。ここで問題となるのはこれらの多環芳香族のエネルギー準位である。

Fig. 1.2.19 にピレンのエネルギー準位の模式図を示す。ピレンの最も遷移確率の高い共鳴波長は、340.8 nm であるが、340.8 nm のレーザー 2 光子のエネルギーではピレンのイオン化ポテンシャルを超えない。この場合、イオン化には 3 光子が必要となる。一般に n 光子イオン化過程では、光子数の n 乗でイオン化の効率が悪くなってしまふ。このように多環芳香族ではそのエネルギー準位の関係から、もっとも効率的な 2 光子イオン化が 1 色 (1 台) のレーザー光のみを用いるのでは不可能である。そこで、340.8 nm の光に加えて、266 nm などの短波長の光を同時に照射する方法があるが、それらの 2 つのレーザーの照射タイミングで感度の大幅な増減が起こることや、266 nm のみで非共鳴イオン化が起これ選択性がなくなってしまう問題など、調整すべきパラメータが多い。さらに、レーザーを 2 台用いることから排ガス試験設備近辺で使用するのにあまり適した方法とは言えない。そこで、最も強い吸収線ではないが、より短波長の 321.2 nm の吸収線 (S2 準位) を利用する方法であれば、レーザー 1 台で測定が可能である。共鳴イオン化法の特長上、この場合はピレンのみしか測定できないが、ピレンを高感度・高選択に過渡計測できれば有用な情報となる。

Fig. 1.2.20 にピレン 1 ppm の多光子イオン化スペクトルを示す。ピレンの標準物質を導入し、レーザー波長を走査した。測定に用いたレーザーのエネルギーは 5 mJ であった。共鳴波長は 321.2 nm とわかっているが、レーザーに表示される波長と実際に発振している波長は微妙に異なるため波長の走査が必要である。波長の表示を合わせるためにはキャリブレーションを行えばよいが、レーザーの波長を厳密に求めることは困難で、本測定のような結果を基にキャリブレーションが行われているのが現実であり、波長を走査しながらピークを見つけるのが一番の近道である。しかし、**Fig. 1.2.20** からわかるように、ピレンのピークを観測することができなかった。S2 準位を用いた方法では、共鳴効果が不十分であることが示唆される。これらを解決するには、2 色 2 光子イオン化による共鳴法の適用しかないが、システムやパラメータの調整が複雑になり現実的には実用化には相当な困難を有することが判明した。2)-4 節の結果から非共鳴法で NEDO 開発エンジン・車両の評価が十分に行えることから、共鳴イオン化法の検討は行わなかった。

- (1) 1色3光子イオン化 → 3光子イオン化によるイオン化効率の低下
- (2) 2色2光子イオン化 → レーザ2台使用, タイミング同期, エネルギーの調整
- (3) 1色2光子イオン化 → レーザ1台でOK, 2光子イオン化, S₂準位であるが共鳴

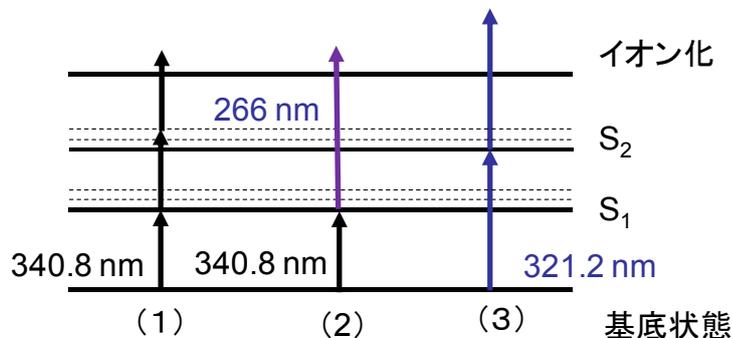


Fig. 1.2.19 ピレンのエネルギー準位

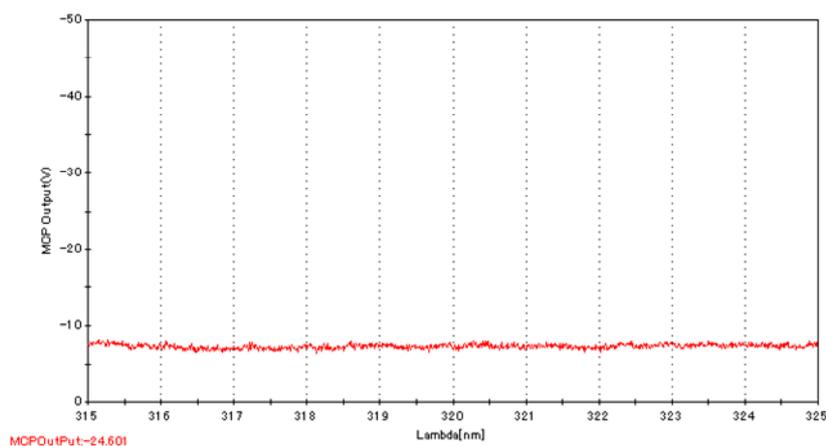


Fig. 1.2.20 ピレンの多光子イオン化スペクトル

1.2.6 小括

レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置を用いて、NEDO 開発エンジンおよび NEDO 開発車両から排出される芳香族成分の過渡排出特性の評価準備を行った。

まず始めに実用計測を行うための予備検討を実際のディーゼル車両（新短期規制対応、酸化触媒付）を用いて行った結果、芳香族化合物を連続的に観測できることが実証でき、評価試験に適用できることがわかった。

1.3 HCCI 排出特性調査

1.3.1 まえがき

ディーゼルエンジンは、高い熱効率を有する反面、NO_x および微粒子 (PM : Particulate Matter) に代表される有害排気成分が問題となっており、その低減が強く求められている。最近では、燃焼改善によりエンジンアウトでの NO_x と PM の大幅同時低減を可能にする HCCI (Homogeneous Charge Compression Ignition) 燃焼や PCI (Premixed Compression Ignition) 燃焼といった新規の燃焼方式が注目されている。

前者の HCCI 燃焼は、燃料噴射を吸気行程や圧縮行程前半に行い、燃料が自着火するまでに十分に燃料と空気を混合させ、希薄・均質混合気バルクの燃焼により NO_x とスモークを同時に低減させる手法である。しかしながら、ディーゼルエンジンにおいて希薄かつ均質の混合気を形成するために圧縮行程早期に筒内へ燃料噴射を行うと、シリンダ壁への燃料付着やオーバーリーンによる HC/CO エミッションの増大、さらには圧縮行程中に着火が生じる過早着火等の問題が発生する。一方、PCI 燃焼は、圧縮行程後半に燃料噴射を行いながらも、EGR により適度な着火遅れ期間を確保することで上死点近傍にて低温部分予混合燃焼を実現し、NO_x とスモークを同時低減させる手法であり、新ディーゼル燃焼方式として有望視されている。

NEDO プロジェクトでは、エンジンアウトでの NO_x と PM の同時低減を可能にする新規燃焼方式エンジンシステムを搭載した次世代低公害ディーゼル車の開発を進めている。しかしながら、HCCI や PCI などの新燃焼方式に関しては、従来型のエンジンと比較して、始動時等にエンジンから排出される HC 等が増加する可能性があり、未規制物質も従来のディーゼルと異なる挙動を示す可能性がある。

そこで本研究では、HCCI または PCI 燃焼の排出挙動予備調査として、新燃焼方式の HC および未規制物質の排出特性を評価し、本プロジェクトで開発されるエンジンシステム(或いは車両システム) の中間評価を行う上での注意点や問題点を明確にすることを目的とした。未規制物質に関しては、PRTR (Pollutant Release and Transfer Register) でリストアップされた物質の内、自動車が必要な発生源とされるアルデヒド類や PAHs について評価を行う。本報では、単気筒ディーゼルエンジンを用いて、新燃焼方式の定常運転において種々の運転パラメータが各種の有機化合物エミッションや粒子状物質の排出挙動に及ぼす影響について調査した。

1.3.2 実験装置および実験方法

1.3.2.1 実施内容

HCCI 燃焼に関する研究は、古くはガソリンの 2 サイクルエンジンの自着火運転に端を発し、既に二輪車用原動機として AR 燃焼⁽¹⁾と称して生産販売されている。ディーゼルについても、90 年代半ばより、低温予混合燃焼方式に関する研究が盛んに行われている。その代表例として、(i)マイクロホールノズルと高圧噴射の組み合わせによる希薄予混合燃焼⁽²⁾⁻⁽⁴⁾、(ii)大量 EGR と噴射タイミングリタードにより着火遅れ期間を確保し、高スワールにより予混合化を促進する MK 燃焼⁽⁵⁾、(iii)高 EGR 化と低圧縮比化により上死点近傍噴射

においても適切な着火遅れ期間を確保する PCI 燃焼^{(6), (7)}等が挙げられる。

本研究では、これらの研究背景を考慮して、コモンレールシステムを搭載した研究用単気筒ディーゼルエンジンを用いて、ノズル仕様（噴孔径および噴孔数）、燃料噴射圧力、燃料噴射時期、EGR 率、圧縮比を変化させることで、下記の 3 種類の低温予混合化ディーゼル燃焼を実現した。そして、各々の低温燃焼方式に対して、排出量の増大が懸念される HC/CO エミッションやアルデヒド、PAHs といった未規制成分のエミッション特性を評価した。また、比較対象として、EGR を行わない通常の高温ディーゼル燃焼のエミッション特性も評価した。

- (1) 真下单噴孔ノズル ($\phi 0.18\text{mm} \times 1$ 穴) により圧縮行程早期に燃料噴射を行い、シリンダ壁への燃料付着を回避した HCCI 燃焼
- (2) マイクロホールノズルを用いた研究⁽²⁾⁻⁽⁴⁾を参考に、高圧燃料噴射と多噴孔微細孔ノズル ($\phi 0.08\text{mm} \times 20$ 穴) の組み合わせにより噴霧の広域分散を図り、さらに低圧縮比かつ適度な EGR により着火遅れ期間を確保した PCI 燃焼 (PCI1)
- (3) 従来の MK 燃焼や PCI 燃焼に関する研究⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾を参考に、低圧縮比かつ大量 EGR により適度な着火遅れ期間を確保し、通常ノズル ($\phi 0.125\text{mm} \times 8$ 穴) での上死点近傍噴射による PCI 燃焼 (PCI2)

1.3.2.2 供試エンジンおよび周辺装置

表 1.3.1 に、供試エンジンの諸元を示す。供試エンジンは 4 ストローク単気筒直接噴射式ディーゼル機関であり、ボア径は 108mm、ストローク長さは 115mm、排気量は 1054cm³ である。圧縮比は燃焼方式によって変更し、HCCI 燃焼時は 17.5、PCI 燃焼時は 16.5 とした。図 1.3.1 に、燃焼室形状を示す。吸気行程早期に燃料噴射を行う HCCI 燃焼では、シリンダ壁への燃料付着を回避するため真下单噴孔ノズルを使用し、燃料噴霧が燃焼室内に留まる様にパンケーキ型の燃焼室とした。一方、多噴孔ノズルを用いて圧縮行程後半や上死点付近に燃料噴射を行う PCI 燃焼では、スワール保存性の良いリエントラント型燃焼室とした。スワール比は 2.2 であり、燃料噴射装置はコモンレール方式を使用した。

図 1.3.2 に、実験装置の概略図を示す。本システムは、研究用単気筒ディーゼルエンジンの他に、空気温湿度制御装置、エンジンダイナモメータ、直接排気ガス分析計、全量希釈トンネル、2 段希釈トンネル、定容量採取装置 (CVS 装置) 等から構成される。本試験では、吸気方式は自然吸気とし、温度 25°C、湿度 60% に温湿度制御された空気をエンジンに供給した。EGR は水冷式のクールド EGR とし、EGR 率は排気絞り弁の開度により調整した。表 2.3.2.2 に、使用した直接排気ガス分析計の諸元を示す。本分析計により、吸気および排出ガス中の HC、CO、NO_x、CO₂ および O₂ の体積濃度を測定した。PM は、二段希釈トンネルで 52°C 以下に温調した希釈排出ガスをテフロンコーティングされたガラス繊維フィルタ ($\phi 70\text{mm}$ TX フィルタ : TX40HI20-WW) に通すことで捕集した。また、酸化触媒によるエミッション低減効果を確認する際は、排気絞り弁の下流側に酸化触媒を設置した。

Table 1.3.1 Engine specifications

Engine type	4-stroke single cylinder DI diesel engine
Bore X Stroke	ϕ 108 mm X 115 mm
Displacement	1.05 liters
Cylinder head	2 inlet and 2 exhaust valves
Geometric compression ratio	17.5 (HCCI), 16.5 (PCI)
IVO	13° BTDC exhaust
IVC	135° BTDC compression
EVO	126° ATDC compression
EVC	8° ATDC exhaust
Connecting rod length	133.5 mm
Connecting rod offset	None
Squish height	0.7 mm
Swirl ratio	2.2
Combustion chamber	Pancake (HCCI), Re-entrant (PCI)
Fuel injection system	Common rail system
EGR	Water-cooled
Intake system	Naturally aspirate

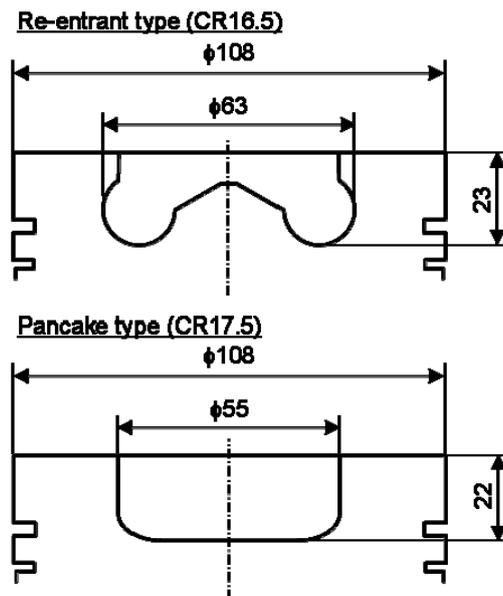


Fig. 1.3.1 Combustion chamber

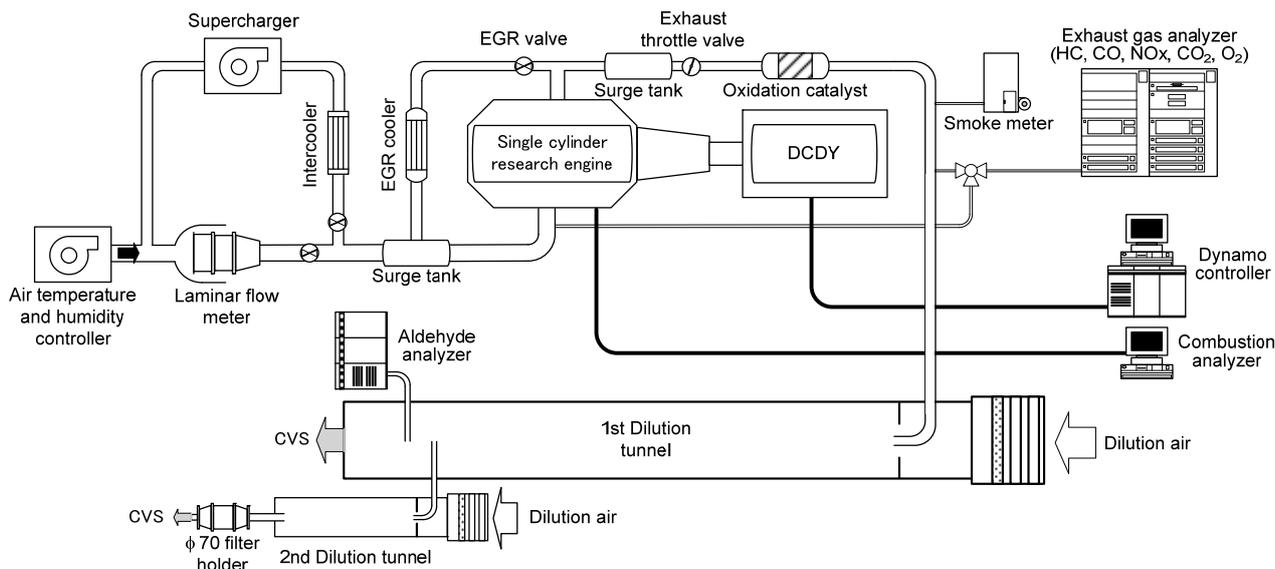


Fig.1.3.2 Schematic diagram of experiment apparatus

1.3.2.3 試験条件

全てのエミッション性能評価は定常運転試験により実施した。表 1.3.2 に、エンジン運転条件を示す。機関速度は 1280rpm 一定とし、運転負荷が無負荷および低負荷条件となるように燃料噴射量は 15 および 20 mm³/st とした。供試燃料は市販 JIS2 号軽油である。

表 1.3.3 に、試験パラメータを示す。本研究では、ノズル形状、燃料噴射圧力、燃料噴射時期、EGR 率、圧縮比を変化させることで、3 種類の低温部分予混合燃焼 (HCCI、PCI1、PCI2) を実現し、各々の燃焼方式に対してエミッション評価を行った。また、比較対象として、通常の高温度ディーゼル燃焼のエミッション特性も評価した。

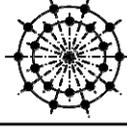
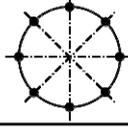
Table1.3.2. Regulated emissions measuring equipment

Equipment.....	MEXA9100D (Horiba)
HC.....	FID
CO.....	NDIR
NOx.....	CLD
CO ₂	NDIR
O ₂	MPD

Table1.3.3 Engine operating conditions

Engine speed.....	1280 rpm
Water temperature.....	80 °C
Oil temperature.....	80 °C
Fuel.....	JIS#2 diesel fuel (CN61)
Injection quantity per cycle.....	15, 20 mm ³ /st

Table1.3.4 Engine operating parameters

	Low temperature combustion methods			Reference
	HCCI	PCI1	PCI2	Ref.
Orifice diameter	φ 0.18 mm	φ 0.08 mm	φ 0.125 mm	←
Number of orifices	1 hole	20 holes	8 holes	←
Total orifice area	0.025 mm ²	0.101 mm ²	0.098 mm ²	←
Included spray angle	None	150 ° & 120 °	152 °	←
Arrangement of orifices				←
Injection pressure	120 MPa	180 MPa	55 MPa	←
SOI timing	-120, -90 ° CA ATDC	-40, -35, -30 ° CA ATDC	-7, -4, -1 ° CA ATDC	-4, -1, 2 ° CA ATDC
Injection quantity	15, 20 mm ³ /st	20 mm ³ /st	←	←
EGR rate	0 %	35 %	56 %	0 %
Intake O ₂	21 %	18 %	15 %	21 %
Compression ratio	17.5	16.5	←	←
Combustion chamber	Pancake	Re-entrant	←	←

- (1) **HCCI** : 希薄均質混合気の形成を狙って、真下单噴孔ノズル (φ0.18mm×1 穴) により圧縮行程早期に燃料噴射 (噴射圧力 120MPa) を行った。圧縮比は 17.5 とし、燃焼室形状はパンケーキ型とした。HCCI 燃焼にて希薄化を進めた場合、燃焼温度が 1500K 以下のオーバーリーン燃焼となり、CO から CO₂ への酸化反応が凍結されるなど大量の燃焼中間生成物が排出されることが懸念される⁽⁸⁾。そこで、燃料噴射量は、低負荷条件の 20mm³/st (燃料噴射時期 : -90° CA ATDC) に加え、無負荷条件となる 15mm³/st (燃料噴射時期 : -120° CA ATDC) の 2 条件とした。これらの圧縮比、噴孔径、噴射圧力、噴射時期の組み合わせは、予備検討結果から NO_x とスモークが同時低減できる条件として決定している。
- (2) **PCI1** : 適度な EGR (EGR 率 35%、吸気酸素濃度 18%) と低圧縮比化により着火遅れ期間を確保した上で、多噴孔微細孔ノズル (φ 0.08mm×20 穴) と高圧燃料噴射 (180MPa) の組み合わせにより積極的に混合促進を図ることで、圧縮行程後半での燃料噴射において低温予混合燃焼を実現した。噴孔配置は、噴射角度が 150° と 120° となる二段構造の千鳥配置とした。圧縮比は 16.5 とし、燃焼室形状はリエントラント型とした。燃料噴射量は、低負荷条件の 20mm³/st (燃料噴射時期 : -40、-35、-30° CA ATDC) とした。
- (3) **PCI2** : 従来の PCI 燃焼研究⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾と同様に、大量 EGR (EGR 率 56%、吸気酸素濃度 15%) と低圧縮比化の組み合わせにより着火遅れ期間の長期化を図ることで、通常ノズル (φ 0.125mm×8 穴) を用いた上死点近傍噴射 (燃料噴射時期 : -7、-4、-1° CA ATDC) での低温予混合燃焼を実現した。圧縮比、燃焼室形状、燃料噴射量は PCI1 と同様とした。
- (4) **Ref.** : 上述の低温予混合燃焼との比較対象として、ノズル形状、燃料噴射圧力、燃

料噴射量、圧縮比、燃焼室形状は PCI2 と同様とし、EGR なしでの高温ディーゼル燃焼とした（燃料噴射時期：-4、-1、2° CA ATDC）。

1.3.3 低温部分予混合燃焼時のエミッション特性

1.3.3.1 基本燃焼特性

(1) 参照データ (Ref.) の燃焼特性

まず、各々の燃焼方式 (Ref.、HCCI、PCI1、PCI2) に関して、熱発生率、規制成分エミッション、熱効率等の基本的な燃焼特性について論ずる。図 1.3.3~1.3.5 に、参照データとして測定した EGR なしでの高温ディーゼル燃焼 (Ref.) の基本燃焼特性 (噴射タイミング 3 条件) を示す。噴射量が $20\text{mm}^3/\text{st}$ と低負荷条件であるため、熱発生率パターンは予混合的燃焼が主体となり、噴射時期をリタードさせた条件では燃料噴射終了後に主燃焼が開始している。排気エミッションは、予測していた通り、噴射時期のリタードに伴い CO、HC、ISOF、SOF が増加し、NOx のみ減少する。しかしながら、EGR なしの高温燃焼のため噴射時期リタード化による NOx 低減効果は低く、噴射開始時期を 2° CA ATDC までリタードさせた条件においても図示 NOx 排出率は $4.9\text{g}/\text{kWh}$ と高い値を示す。一方、図示熱効率 (ITE) と燃焼効率 (CE) も噴射リタード条件では若干悪化するが、それでも $\text{ITE}>45\%$ 、 $\text{CE}>97.9\%$ と高いレベルを維持しており、図示平均有効圧力 (IMEP) は 317kPa 以上を示す。

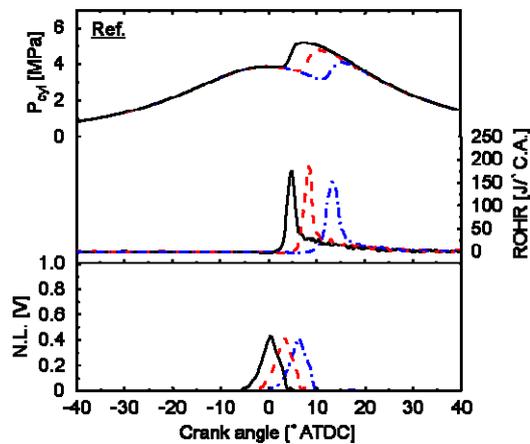


Fig.1.3.3 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (Ref., $\lambda = 4.6$)

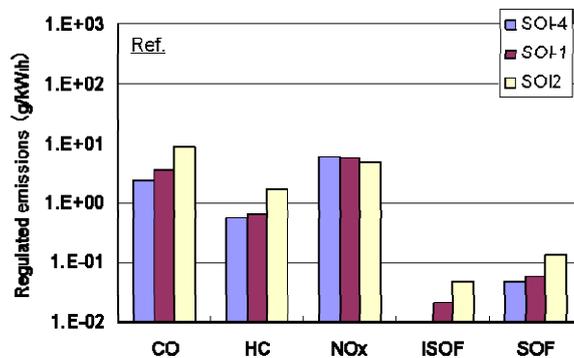


Fig.1.3.4 Effect of SOI timing on engine emissions (Ref., $\lambda = 4.6$)

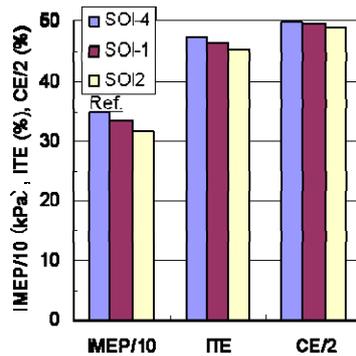


Fig.1.3.5 Effect of SOI timing on engine performance (Ref., $\lambda = 4.6$)

(2) HCCI の燃焼特性

図 1.3.6~1.3.8 に、HCCI の基本燃焼特性を示す（負荷 2 条件）。HCCI では燃料噴射を圧縮行程早期に行っており、燃料噴射終了後、十分な予混合時間を経た後に燃焼による圧力上昇が発生する。熱発生率は、低温酸化反応を経た後に熱炎（高温酸化反応）に移行する HCCI 特有の二段燃焼パターンを示す。排気エミッションを見ると、NO_x 排出率は 0.5g/kWh 程度と比較的低いレベルを達成しているが、CO、HC、SOF が参照データ（Ref.）と比較して 2 桁以上も多く、また ISOF も予測に反して増加する結果となる。さらに、このエミッション傾向は無負荷条件でより大となる。燃焼効率は低負荷条件 (20mm³/st、 $\lambda=4.6$) で 70.9%、無負荷条件 (15mm³/st、 $\lambda=5.8$) では 52.8%と極めて悪く、それに伴い図示熱効率がそれぞれ 24.7%、11%と非常に低い値となる。供試燃料の JIS2 号軽油は 90%留出温度 T₉₀ が 344℃ と高く（ガソリンの T₉₀ は 160℃程度）、真下单噴孔ノズルを用いて圧縮行程早期の低温・低密度雰囲気中に噴射しても、大半が非蒸発のままピストンキャビティに衝突し、一部はそのままキャビティ表面に液膜として残留するものと予測される。よって、燃料噴射終了から燃焼開始までに十分な予混合時間を与えても、キャビティ表面近くの消炎領域に燃料過濃領域が残存し、その多くが未燃のまま排出されたものと考えられる。圧縮行程早期での燃料噴射によってエミッション改善を果たすには、例えばガソリンの様に蒸発性の良い燃料を使うことが一つの解決方策になるとと思われる。

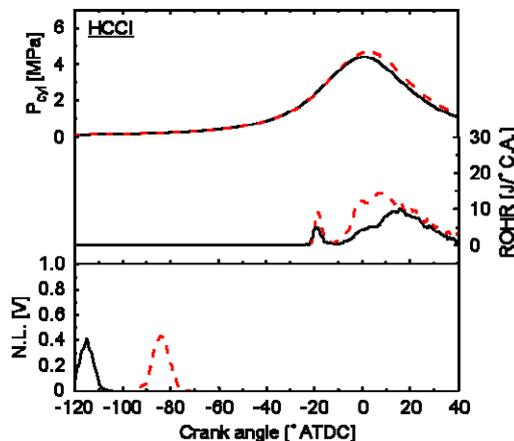


Fig.1.3.6 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (HCCI, $\lambda = 4.6, 5.8$)

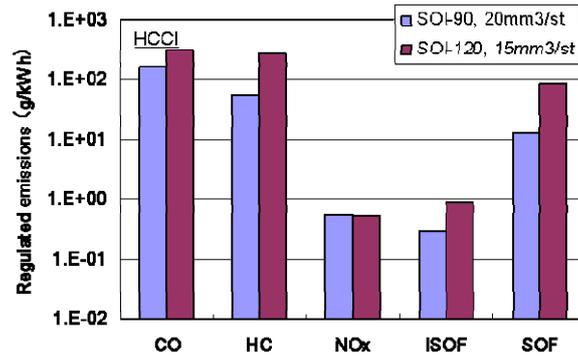


Fig.1.3.7 Effect of SOI timing on engine emissions (HCCI, $\lambda = 4.6, 5.8$)

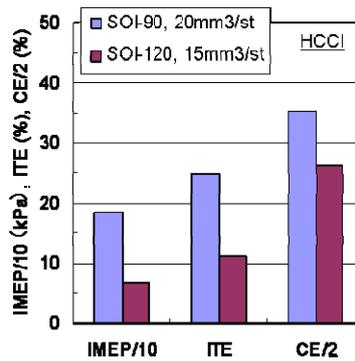


Fig.1.3.8 Effect of SOI timing on engine performance (HCCI, $\lambda = 4.6, 5.8$)

(3) PCI1 の燃焼特性

図 1.3.9～1.3.11 に、PCI1 の基本燃焼特性（噴射タイミング 3 条件）を示す。PCI1 では、微細孔ノズルと高圧噴射の組み合わせにより乱流混合速度を高めた上で、低圧縮比化と適度な EGR により燃焼反応速度を低減し、圧縮行程後半での燃料噴射において低温予混合燃焼を実現した燃焼方式である。燃料噴射タイミングを進角させるに従って、熱炎発生時の急激な圧力上昇を抑えた緩慢な燃焼へと遷移する様子が分かる。その時、図示 NO_x 排出率は 0.1g/kW_{ih} 程度（SOI-35）もしくはそれ以下（SOI-40）のレベルを達成するが、低 NO_x 化とともに CO、HC、SOF エミッションは増加し、燃焼効率および図示熱効率は悪化する。ただし、上述の HCCI 燃焼ほどエミッションおよび運転性能は悪化せず、燃焼効率、図示熱効率は、図示平均有効圧力は、低 NO_x 燃焼を実現する SOI-35 においてそれぞれ 91.2%、40.4%、291kPa となる。

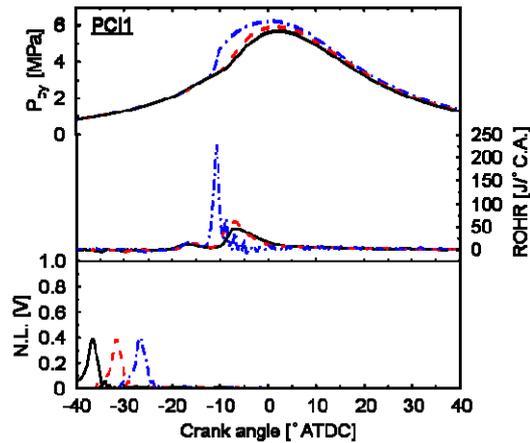


Fig.1.3.9 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (PCI1, $\lambda = 2.8$)

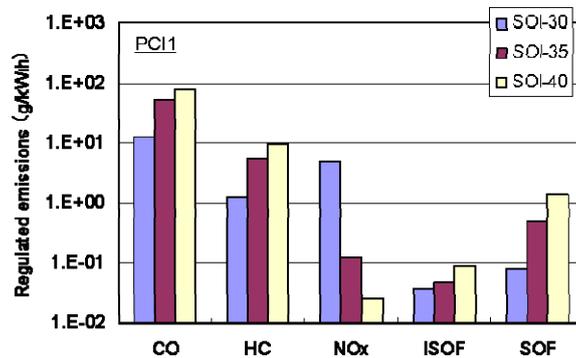


Fig.1.3.10 Effect of SOI timing on engine emissions (PCI1, $\lambda = 2.8$)

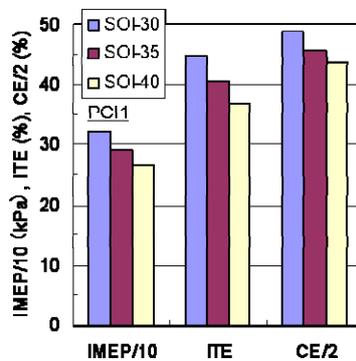


Fig.1.3.11 Effect of SOI timing on engine performance (PCI1, $\lambda = 2.8$)

(4) PCI2 の燃焼特性

図 1.3.12~1.3.14 に、PCI2 の基本燃焼特性（噴射タイミング 3 条件）を示す。PCI2 では、通常ノズルを用いた上死点付近での燃料噴射であるにも拘らず、大量 EGR により適切な着火遅れ期間を確保し、噴射終了後に主燃焼が開始する低温予混合燃焼を実現している。大量 EGR により吸気酸素濃度を 15%（量論混合比、定圧燃焼での断熱火炎温度は 2276K）にまで希釈しているため、燃料噴射タイミングに拘らず低 NO_x 燃焼（0.1g/kWh 程度またはそれ以下）が実現される。PCI1 と比較すると、HC 排出量は概ね同レベルとなり、CO 排出量は PCI1 の時程増大しない。ただし、EGR なしの高温ディーゼル燃焼（Ref.）と比較すると、CO および HC 排出量は一桁高く、噴射時期のリタード化はさらなる CO、HC、SOF エミッションの悪化をもたらす。しかしながら、今回検討した 3 種類の低温予混合燃焼方

式の中では、低 NO_x 化と高効率を両立する唯一の燃焼方式であり、SOI-7 にて ISNO_x=0.13g/kWh、ITE=46.3%となる。このように、低 NO_x・高効率ディーゼル燃焼を実現するには、大量 EGR により低火炎温度化と燃焼反応速度の低減を図った上死点近傍噴射での等容度高い PCI 燃焼が望まれる。

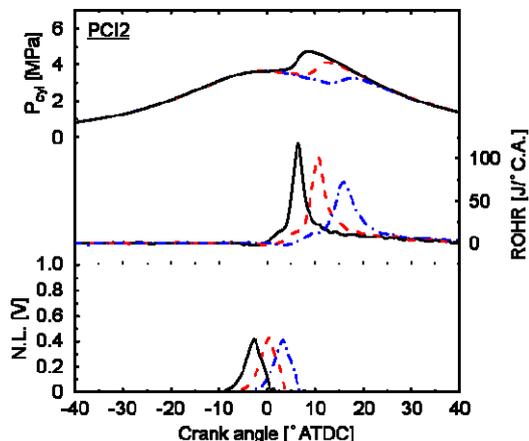


Fig.1.3.12 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (PCI2, $\lambda = 1.9$)

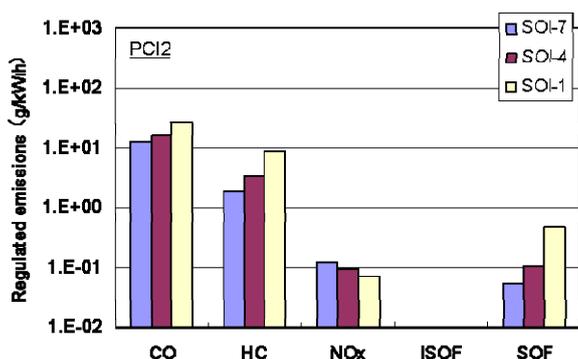


Fig.1.3.13 Effect of SOI timing on engine emissions (PCI2, $\lambda = 1.9$)

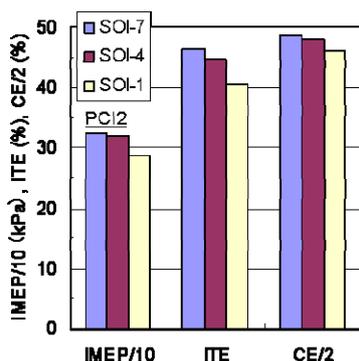


Fig.1.3.14 Effect of SOI timing on engine performance (PCI2, $\lambda = 1.9$)

1.3.3.2 アルデヒド排出特性

次に、各々の燃焼方式 (Ref.、HCCI、PCI1、PCI2) の未規制成分エミッションとして、アルデヒド類の排出特性について論ずる。評価対象としたアルデヒド類は、PRTR で自動車排出ガスの測定が必要とされるホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アクロレイン、

ベンズアルデヒドを含む 13 成分である。図 1.3.15~1.3.17 に、各燃焼方式でのアルデヒドエミッション結果を示す。明らかに、燃焼効率が著しく悪化する HCCI 燃焼時に最も多くアルデヒドが排出されており、参照データ (Ref.) と比較すると 2 桁以上も多い結果となる。また、HC 排出量が概ね同レベルとなる 2 種類の PCI 燃焼間ではアルデヒドエミッションに大きな差異は見られず、HC 排出率が高くなる低 NO_x 燃焼条件でアルデヒド排出量が増加する傾向がある。さらに、高温ディーゼル燃焼 (Ref.) 時においても、HC エミッションが増加する噴射時期リタード条件でより多くのアルデヒドエミッションが認められる。この様に、アルデヒド排出量は HC 排出量と高い相関を持つ可能性が示唆される。図 1.3.18~1.3.21 に、各低温予混合燃焼方式 (HCCI、PCI1、PCI2) において、最もアルデヒドが排出された低 NO_x 燃焼条件でのアルデヒドエミッションの成分構成を示す。アルデヒドの主要成分は、燃焼方式に拘わらず、ホルムアルデヒド (約 50%)、アセトアルデヒド (約 20%) およびアクロレイン (約 10%) から構成される。

これまでの結果から、アルデヒドエミッションは燃焼効率が悪化する低 NO_x 燃焼条件で大量に排出され、特に HC 排出率と高い相関を持つ可能性が示唆されている。その裏付けとして、図 1.3.22~1.3.23 に、アルデヒドエミッションの主要成分であるホルムアルデヒドと HC/CO エミッションとの排出相関を示す。予想していた様に、ホルムアルデヒド排出量は、HC/CO エミッションと相関があり、特に HC エミッションと高い相関 ($R^2=0.997$) を持つことが分かる。このことから、新規燃焼方式エンジンシステムを搭載した次世代低公害ディーゼル車の中間評価を行う際の注意点として、エンジン始動時や排気温度が低い低負荷運転時など酸化触媒での排気浄化が期待できない運転条件で HC 排出量が多い場合には、アルデヒドの排出にも留意する必要がある。

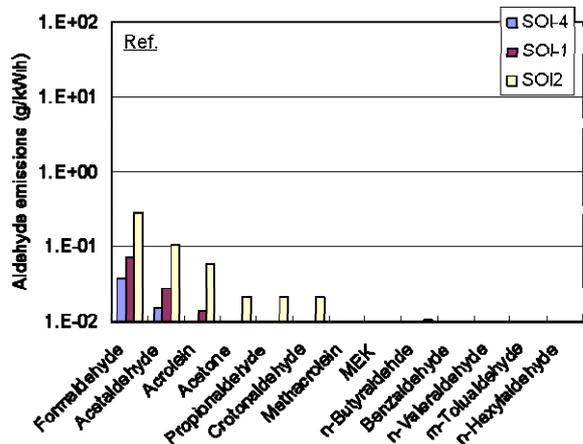


Fig.1.3.15 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (Ref.)

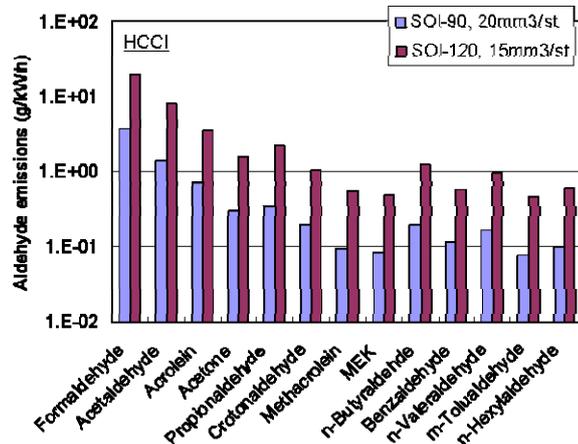


Fig.1.3.16 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (HCCI)

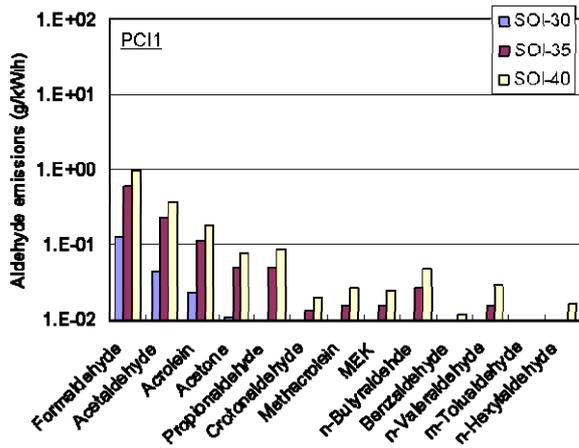


Fig.1.3.17 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (PCI1)

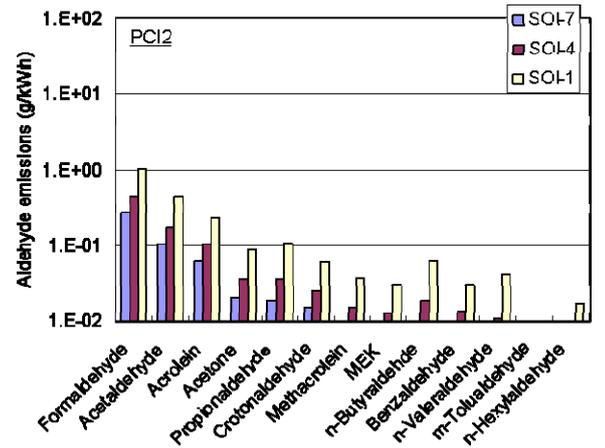


Fig.1.3.18 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (PCI2)

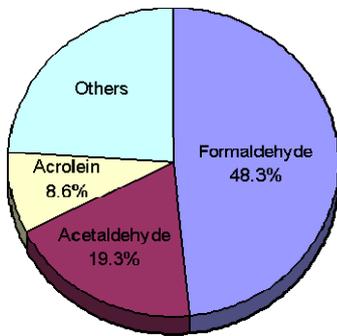


Fig.1.3.19 Main aldehyde emissions (HCCI, SOI-120)

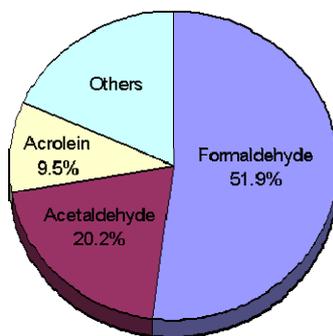


Fig.1.3.20 Main aldehyde emissions (PCI1, SOI-40)

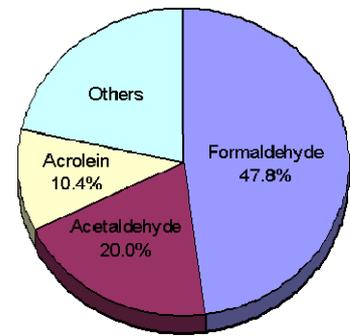


Fig.1.3.21 Main aldehyde emissions (PCI2, SOI-1)

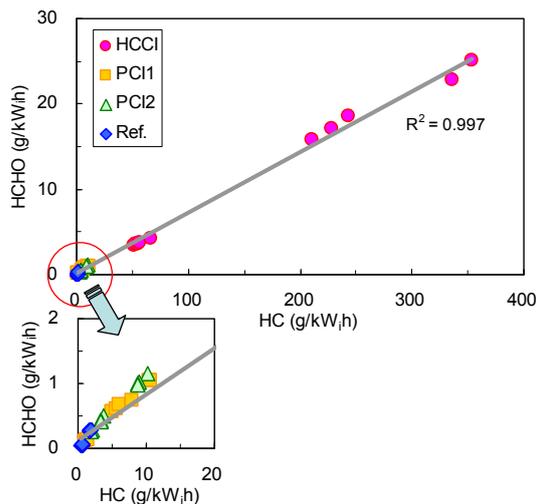


Fig.1.3.21 Effect of HC emissions on formaldehyde emissions

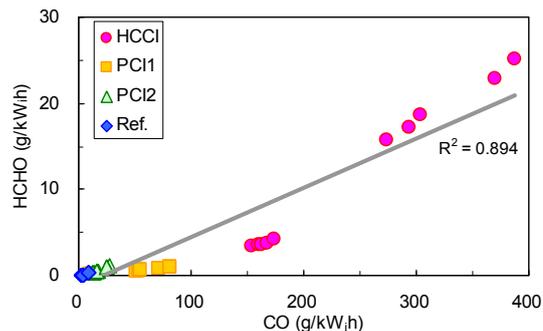


Fig.1.3.22 Effect of CO emissions on formaldehyde emissions

1.3.3.3 PAHs 排出特性

ここでは、各々の低温予混合燃焼方式（HCCI、PCI1、PCI2）での PAHs 排出特性について論ずる。評価対象とした PAHs は、MSATs として選択されている 7 種の POM を含む 2 環から 6 環までの 17 成分とした。図 1.3.23~1.3.25 に、各低温燃焼方式での PAHs エミッション結果を示す。参照データである高温ディーゼル燃焼（Ref.）では、PAHs の排出が殆ど確認されなかったため省略している。アルデヒドエミッションと同様に、PAHs エミッションも HCCI 燃焼時に最も多く排出されており、PCI 燃焼と比較しても 2 桁程度も多い結果となる。また、2 種類の PCI 燃焼間では PAHs エミッションに燃程大きな差異は見られないが、上死点付近で燃料噴射を行う PCI2（SOI=-7~-1° CA ATDC）よりも圧縮行程後半に燃料噴射を行う PCI1（SOI=-40~-30° CA ATDC）の方が PAHs 排出量が多い。これは、上死点近傍噴射に比べ低温・低密度雰囲気中に燃料噴射を行う PCI1 では、HCCI と同様に、燃料噴射終了から着火に到るまでに十分な予混合時間があるにも拘わらず、軽油の蒸発性に起因して燃料過濃領域の残留割合が高くなり、局所的な低温リッチ燃焼が生じやすいものと推測される。

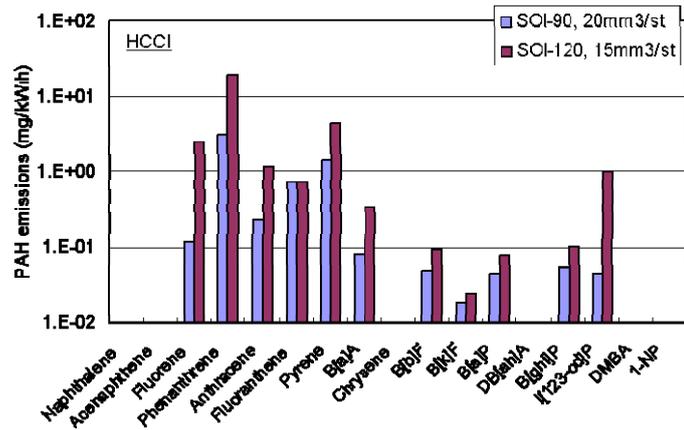


Fig.1.3.23 Effect of SOI timing on PAHs emissions (HCCI)

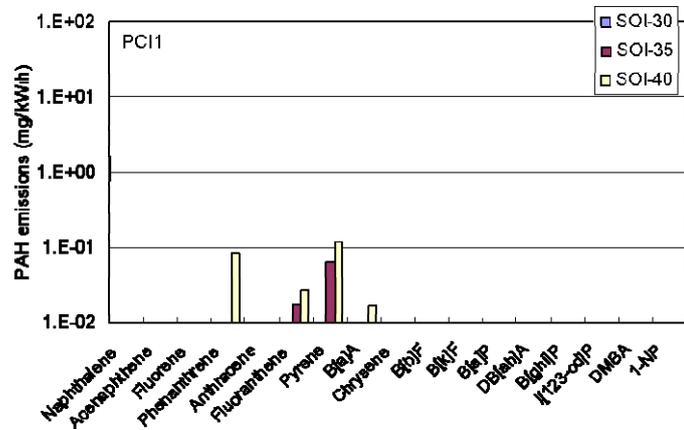


Fig.1.3.24 Effect of SOI timing on PAHs emissions (PCI1)

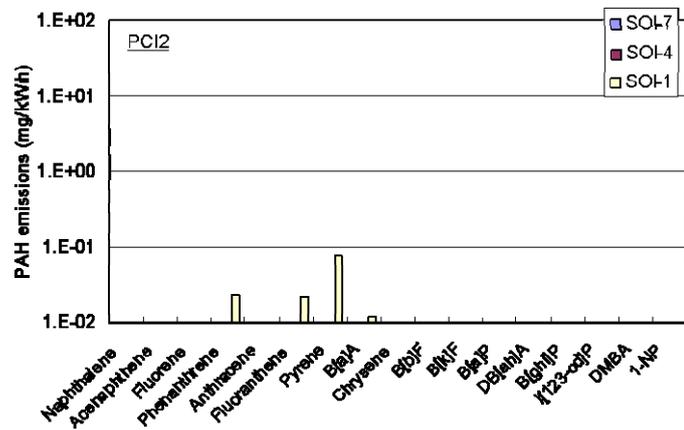


Fig.1.3.25 Effect of SOI timing on PAHs emissions (PCI2)

図 1.3.26~1.3.28 に、各低温予混合燃焼方式 (HCCI、PCI1、PCI2) において、最も PAHs が排出された燃料噴射条件での PAHs エミッションの成分構成を示す。アルデヒドエミッションの主要成分は燃焼形態に依らず同一であったのに対し、PAHs 主要成分は燃焼形態によって変化している。PCI 燃焼での PAHs 主要成分は、ピレン (45~55%)、フェナントレン (17~3.2%) およびフルオランテン (10~16%) であるのに対し、HCCI ではフェナントレンが 66%と大半を占め、残りがピレン (16%) とフルオレン (9%) から構成される。これは、燃焼効率が極端に悪化する低温 HCCI 燃焼では、局所リッチ燃焼領域での分子成長

反応が早い段階で凍結するため、PAHs 排出成分はより環数の少ないものが支配的になったと考えられる。

以上の結果から、PAHs エミッションは、アルデヒドエミッションと同様に、圧縮行程中に燃料噴射を行うなど燃焼効率の悪化を招く低 NOx 燃焼方式で排出傾向が高いことが分かった。図 1.3.29~1.3.30 に、PAHs エミッションの主要成分であるピレンと HC/CO エミッションとの排出相関を示す。ピレン排出量は、HC とホルムアルデヒドエミッションで得られた排出相関程ではないが、HC および CO エミッションと比較的高い相関を示す。しかし、ピレン排出量が小となる (<0.2g/kWh) 条件に着目すると、燃焼形態によってピレン排出傾向が異なることが分かる。

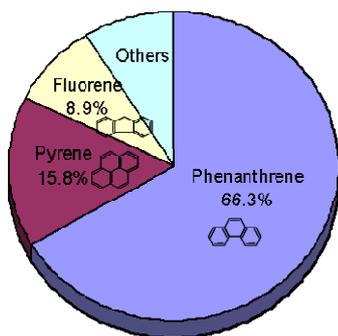


Fig.1.3.26 Main PAHs emissions (HCCI, SOI-120)

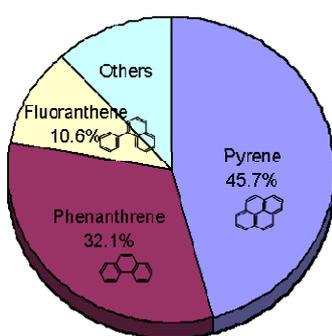


Fig.1.3.27 Main PAHs emissions (PCI1, SOI-40)

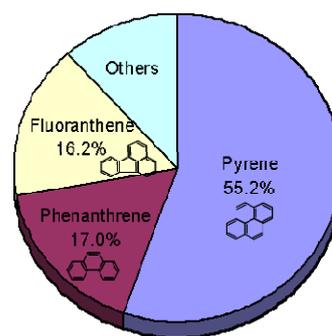


Fig.1.3.28 Main PAHs emissions (PCI2, SOI-1)

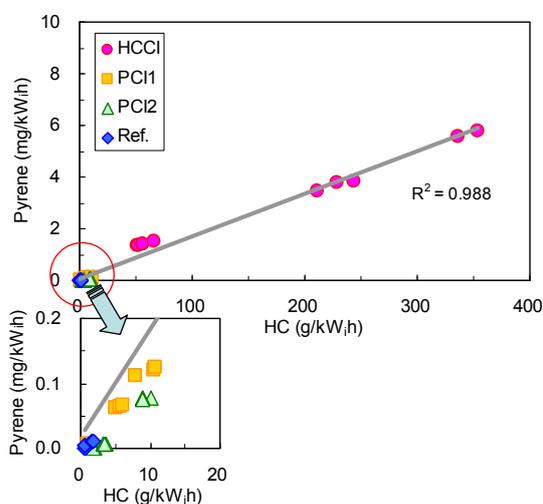


Fig.1.3.29 Effect of HC emissions on pyrene emissions

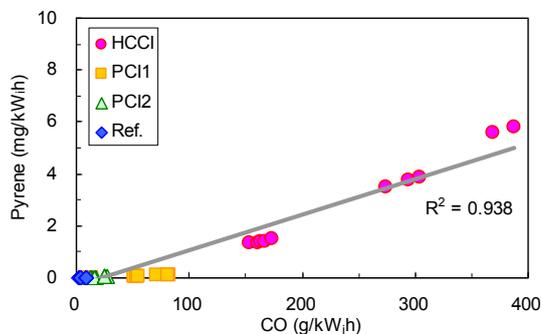


Fig.1.3.20 Effect of CO emissions on pyrene emissions

1.3.3.4 酸化触媒による未規制成分低減効果

最後に、酸化触媒（白金 Pt 担持）を設置した場合の低温予混合燃焼時に排出されるアルデヒドおよび PAHs エミッションについて報告する。ここでは、排気温度の低い低温予混合燃焼時においても触媒の排気浄化効率を出来る限り維持するため、酸化触媒に電気ヒーター

タを取り付け、その表面温度を 300°Cに保持した状態で試験を行った。酸化触媒付きの HCCI および PCI1 での未規制成分エミッション結果を、図 1.3.31~1.3.34 に示す。上述のエンジンアウトエミッション結果と比較すると、酸化触媒の設置により低温予混合燃焼時に排出されるアルデヒドおよび PAHs エミッションは低減されており、PCI1 ではアルデヒドおよび PAHs とともにゼロレベルにまで低減可能となる。

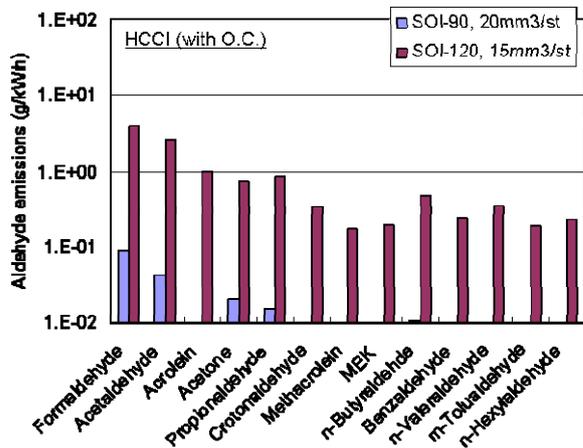


Fig.1.3.31 Aldehyde emissions with oxidation catalyst (HCCI)

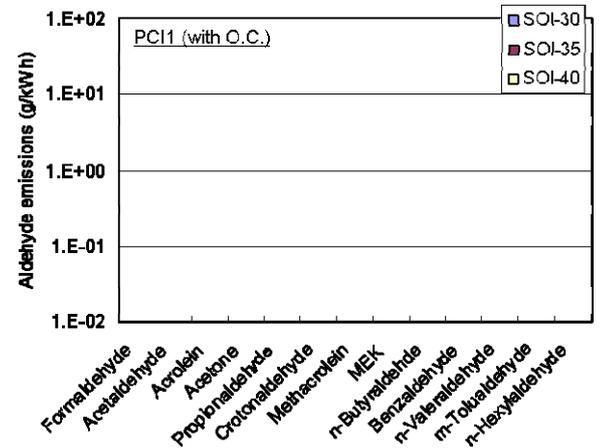


Fig.1.3.32 Aldehyde emissions with oxidation catalyst (PCI1)

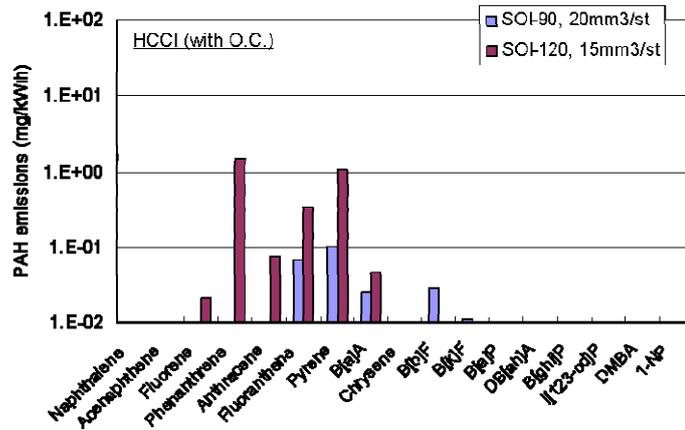


Fig.1.3.33 PAHs emissions with oxidation catalyst (HCCI)

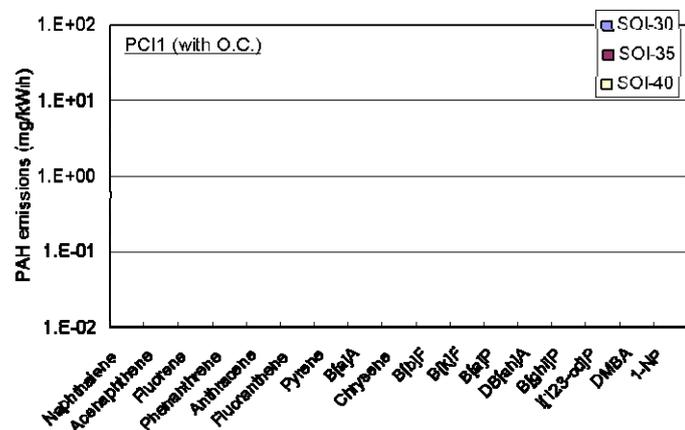


Fig.1.3.34 PAHs emissions with oxidation catalyst (PCI1)

図 1.3.35 に、HCCI および PCI1 に関して、酸化触媒による未規制成分の浄化効率を触媒入口での排気ガス温度でまとめた結果を示す。図中に示す様に、HCCI よりも PCI1 の方が排気温度が高く、排気成分に依らず高い浄化効率を実現できる。ただし、PCI1 の噴射時期 -30° CA ATDC の条件では、酸化触媒を設置しなくても図示ピレン排出率が 0.006mg/kW_{ih} と検出限界近くの低濃度となるため、触媒での低減効率は 75%程度と低く示されている。このように、酸化触媒を設置し、かつ、その温度を適切に保持できれば、低温予混合燃焼時に排出される未規制成分を大幅に低減可能であることが分かる。

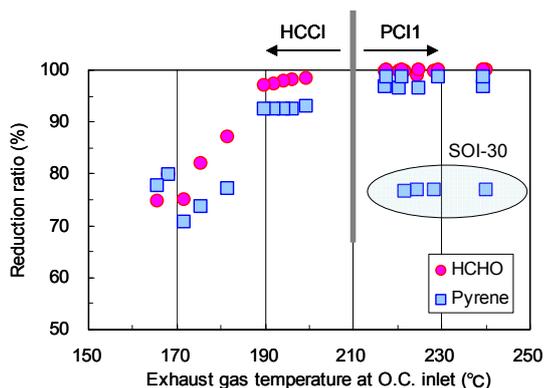


Fig.1.3.35 Effect of exhaust gas temperature on aldehyde and PAHs emissions with oxidation catalyst

1.3.3.5 小括

本研究で得られた低温予混合化ディーゼル燃焼のエミッション特性を以下に要約する。

- (1) エンジンアウトでの NO_x エミッションの大幅低減を可能にする低温部分予混合燃焼では、従来の高温ディーゼル燃焼と比較して HC/CO エミッションが増大し、さらにアルデヒドや PAHs といった未規制成分の排出量も増大する。これらの主要成分として、アルデヒドではホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アクロレインが、PAHs ではピレン、フェナントレン、フルオランテン等が同定された。
- (2) アルデヒド排出量は、燃焼方式に拘わらず、HC 排出量と非常に高い相関 ($R^2=0.997$) がある。
- (3) PAHs 排出量も、HC 排出量と比較的高い相関 ($R^2=0.988$) が見られるが、燃焼形態によって排出傾向は異なる。
- (4) 圧縮行程早期の低温・低密度雰囲気中に燃料噴射を行う HCCI 燃焼では、極端に燃焼効率が悪化し、大量のアルデヒドおよび PAHs が排出された。一方、圧縮行程後半や上死点付近に燃料噴射を行う PCI 燃焼では、HCCI 燃焼ほどアルデヒドや PAHs エミッションは悪化しない。低 NO_x・高効率ディーゼル燃焼を実現するには、大量 EGR により低火炎温度化と燃焼反応速度の低減を図った上死点近傍噴射での等容度高い PCI 燃焼が望まれる。
- (5) 酸化触媒を設置し、かつ、その温度を適切に保持できれば、低温部分予混合燃焼時に排出されるアルデヒドおよび PAHs エミッションを低減することが可能である。

新規燃焼方式エンジンシステムを搭載した次世代低公害ディーゼル車の中間評価を行う際の注意点として、エンジン始動時や排気温度が低い低負荷運転時など酸化触媒での排気浄化が期待できない運転条件で HC 排出量が多い場合には、アルデヒドの排出にも留意する必要がある。

1.3.3.6 参考文献

- 1) Ishibashi, Y. and Asai, M.,: A low-pressure pneumatic direct-injection, two-stroke engine by activated radical combustion concept, SAE Paper 980757
- 2) 小堀繁治、ほか 2 名: マイクロホールノズルを用いた直噴式ディーゼル機関の着火、燃焼および排気特性, 日本機械学会論文集 (B 編), Vol.62, No.594, pp.404-409, 1996
- 3) 村田峰啓、ほか 2 名: マイクロホールノズルを用いた直接噴射式ディーゼル機関の燃焼改善, 日本機械学会論文集 (B 編), Vol.66, No.647, pp.298-304, 2000
- 4) 港明彦、ほか 2 名: 超高压噴射を用いた希薄予混合燃焼の試み, 自動車技術会論文集, Vol.36, No.1, pp.87-92, 2005
- 5) Kimura, S., et. al.,: Ultra-Clean Combustion Technology Combining a Low-Temperature and Premixed Combustion Concept for Meeting Future Emissions Standards, SAE Paper 2001-01-0200
- 6) 島崎直基、西村輝一: 上死点近傍燃料噴射による予混合ディーゼル燃焼コンセプト, 自動車技術会論文集, Vol.36, No.3, pp.31-36, 2005
- 7) 港明彦、西村輝一: 吸排気弁動作の可変化による予混合燃焼における反応制御, JSAE paper 20055099
- 8) 山崎由大、飯田訓正: 圧縮自己着火機関における n-Butane 空気予混合気の素反応数値計算, 自動車技術会論文集, Vol.33, No.4, pp.69-75, 2002

1.4 個数基準計測法による PM 高精度計測・校正技術の開発

次世代低公害車からの PM 排出量（総排出質量）の減少に伴い、従来から用いられてきたフィルター法に代表される質量基準計測法は適用限界に近づくことが予測されている。このため、今後はこれらの重量測定法に加え粒子の個数計測法に基づく総粒子数濃度や粒径分布の測定方法を併用することが必須の状況となってきた。しかしながら、そこで用いられるべき個数計測装置等に関しては濃度や粒径分布の測定精度、あるいは異なる原理に基づく装置の整合性等に関して十分に検証されていないなど幾つかの重大な課題が残されている状況にある。

このため、本研究では次世代低公害車からの PM 排出評価に対応する個数基準計測装置に関し、PM 計測における不確かさを低減した高精度計測技術の確立を目指すことを目的として、a. 個数濃度測定 of 校正・試験技術の開発、並びに b. 低 PM 濃度域におけるフィルター法の妥当性評価の課題について研究を実施した。

a. 個数濃度測定 of 校正・試験技術の開発

次世代低公害車からの PM 測定に用いられる計測装置 of 校正・試験においては、現在最も一般的な個数濃度計測装置である凝縮式粒子計数装置（Condensation Particle Counter; CPC）に対し SI 単位系標準にトレーサブルな校正技術を確立することが目的とされている。このため、本研究においては個数濃度測定器に関する国内一次標準の開発と UNECE WP29/GRPE-PMP（国連欧州経済委員会傘下で進められている微粒子計測法プログラム）への対応を目標に、個数濃度測定装置 of 試験・校正技術開発及びエアロゾル・エレクトロメータ法による校正用標準器の製作と評価を行った。

ここで、個数濃度測定器に関する国内一次標準の開発においては、当該プロジェクト of PM 排出目標基準値（ポスト新長期規制）をクリアした車両 of PM 個数濃度を正確に計測できることを目標とした。具体的には、本項目における校正システムの最終的な拡張不確かさ（95%信頼区間 $k=2$ ）が 10%以下であることが要求されることに鑑み、標準装置における濃度測定値 of 拡張不確かさを 10^3 個/cm³ において約 3%以下とすることを目標とした。

(i) 気中粒子 of 個数濃度標準

気中粒子数濃度 of オンライン測定器には、主に凝縮核計数器（CNC、あるいは CPC: Condensation Particle Counter）、光散乱式粒子計数器（OPC: Optical Particle Counter）、ファラデーカップ・エアロゾル・エレクトロメータ（FCAE: Faraday-Cup Aerosol Electrometer、以下 AE と略）の 3 種類が一般的に使用されている。本研究では、開発に先立ってこれら装置 of 校正を行うための参照標準について、本課題に最適な利用形態を検討した。

図 1-4-1-3-1 に示すように、利用可能な技術としては標準物質型、発生器型、計測器型 of 3 通りが考えられ、第一 of 標準物質型はガス分析機器 of 校正における標準ガスに相当するもので、高い利便性が期待されるが気中に浮遊する粒子は不安定なため標準として実現できない。第二 of 発生器型は標準物質型に次いで高い利便性が

期待される。可能性のある発生器としては振動オリフィス式エアロゾル発生器（VOAG, TSI 社, 米国）や CAST（Matter Engineering 社, スイス）などが挙げられる。しかし、前者はオリフィスの振動数と空気流量から粒子数濃度を推定できるものの粒径範囲に制約がある。また、後者は正確な計測器で濃度や粒径分布が値付けされたエアロゾルを再現性良く発生できる装置であるが、極めて高価な装置になるという欠点がある。第三の計測器型に関しては、参照標準となる計測器を用意して比較測定による校正を行うものであり、参照標準はあらかじめ上位の標準に対して校正されている必要がある。比較校正は2つの計測器、すなわち被校正器と参照器に同じ濃度の粒子を同時に測定させて行うので、校正者はそのための粒子発生器を保有する必要がある。以上の検討の結果から、発生器型と計測器型が参照標準として利用可能と考えられ、かつどちらがより良い参照標準であるかについては、校正に要求される不確かさの大きさや費用などの要素を考慮した上で判断されるべきであることなどが分かった。従って、ここではSIトレーサブルな国内一次標準の開発をも意図して、上記計測器型の標準を採用することとし参照標準となる計測器の開発を行った。さらに、発生器型参照標準についても従来の高価であるという欠点を克服するため、かつ現場ニーズに応えるための簡易型装置（現場校正用粒子発生装置開発）の開発を試みるとともに、その実用可能性の評価を行った。

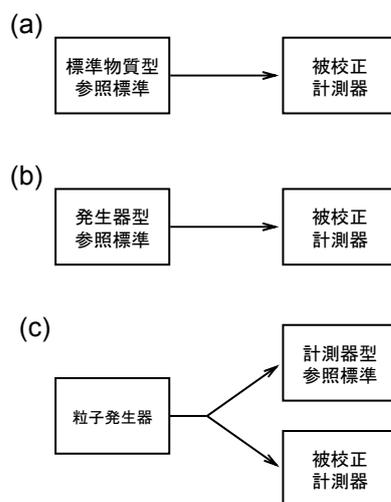


図 1-4-1-3-1 気中粒子数濃度測定器用標準の3つの形態

(ii) 計測器型一次標準の開発

本研究で開発を行った一次標準は、上述の通り測定が正確な計測器に基づく計測器型の標準である。個数濃度計測器には現在、前述のCPC、OPC、AEの3通りの方式が一般に使用されているが、一次標準としての適正を検討した結果、CPCは装置内部の構造がOPCやAEに比べ複雑で長期安定性と堅牢性の点で劣ると考えられる他、CPCの構造の複雑さは粒子損失の見積もりが難しく装置の検出効率の推定にお

いて大きな不確かさの要因となること等から CPC よりも OPC または AE が一次標準として相応しいと判断した。そこで、本課題においては自動車排ガス測定における濃度範囲（約 $10^3 \sim 10^4 \text{ cm}^{-3}$ ）に適用できることを優先して AE を採用することとした。図 1-4-1-3-2 に AE ファラデーカップ部の概略を示す。なお、将来的にはこの一次標準 AE で校正した OPC や CPC を標準として用いることで、粒径と濃度の適用範囲を拡張することを予定する。AE は図に示すように、気体流れ（流量 Q ）中の電荷をもった粒子をファラデーカップ内のフィルターで捕集し、それによって捉えられる電荷の流入（電流 I ）をエレクトロメータによって測定するものである。個数濃度 C_N は、粒子が全て一方の極性に荷電しかつ価数 z が既知である場合

$$C_N = \frac{I}{zeQ\eta_{FC}} \quad (1)$$

と算出できる。ここで e は電気素量である。また、 η_{FC} はファラデーカップの入口から流入した粒子がフィルターに捕集される確率を示す。理想的なファラデーカップであればこの値は 1 であるが、主としてフィルターの捕集効率が 100% でないこととファラデーカップ内の配管内での沈着損失を理由として実際には 1 より小さくなる。本研究では新たに一次標準用に設計・製作したファラデーカップを用いることとした。即ち、粒子が吸入口に入った後検出電極に到達する前にブラウン運動により流路壁面に衝突して電流として検出されずに失われる可能性がありこれが効率 η_{FC} の低下をもたらすが、この損失の確率を極力下げるため粒子導入部流路をできる限り短くしている。また、効率 η_{FC} のもう一つの影響因子である粒子フィルターの捕集効率については、効率 99.9999% 以上のフィルターを使用することで検出効率低下への影響を無視できるようにしている。これによりファラデーカップ効率をできる限り 1 に近づけることが可能となった。エレクトロメータと体積流量計には市販の装置を用い、それぞれ SI 単位系にトレーサブルな校正を行っている。

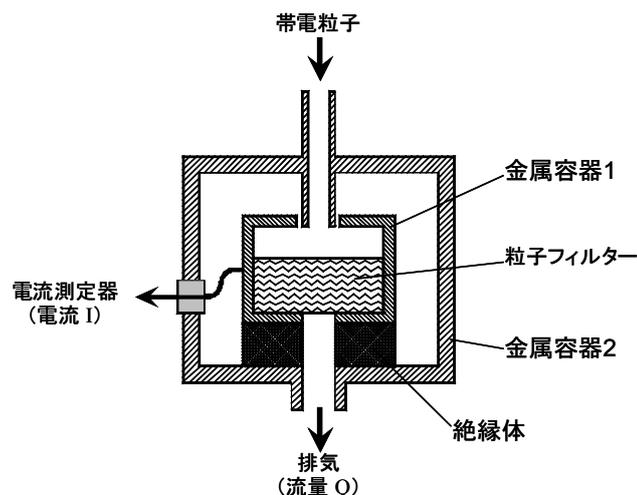


図 1-4-1-3-2 AE ファラデーカップ部の概略

次に、これら計測器型標準の校正に用いる際に必要な粒子発生技術についても本研究において開発を行った。AE が一次標準の中核をなすことから、前述の「全て

一方の極性に荷電し、かつ価数が既知」である粒子の発生技術が必要となる。検討の結果、ここではエレクトロスプレー法とDMA法を組み合わせた発生装置を用いることとした。DMAを用いることで電気移動度の揃った粒子を取り出すことが可能であるが、多分散粒子発生器を用いる従来のネブライザー等による方法では、DMA下流に多価荷電粒子が多量に混在する問題があった。これに対し、エレクトロスプレー法を用いれば分布幅の狭い粒子を発生可能なため、多価荷電粒子の影響を大幅に低減することが可能となる。本研究では、計測器の校正を目的として球形の理想粒子を発生する技術の開発を行い、低揮発性油滴粒子（7～100 nm）とPSL標準粒子（30 nm）に対して高濃度（DMA下流において $10^3 \sim 10^4$ 個/cm³）で長時間安定的に発生する技術を確立した。これらの粒子発生技術は計測器型参照標準を用いた校正全般で広く利用可能なものである。なお、校正の条件は主として粒径、濃度、粒子組成で特定され、複数の条件で検出効率の校正を行うことで、被校正装置の性能特性を定量的に求めることができる。上記技術を組み合わせて開発した、国内一次標準でもある産総研の気中粒子個数濃度標準については、2008年に産総研が世界に先駆け開発を完了させ校正サービスを開始させた。そこでは、粒径一定で濃度を変化させた校正を数条件、さらに濃度一定で粒径を変化させた校正を数条件、合わせて5～10点程度の校正点セットを推奨している。図1-4-1-3-3に装置外観を、図1-4-1-3-4に校正システムの概略構成を示した。また、開発した校正システムの不確かさを図1-4-1-3-5に示した。

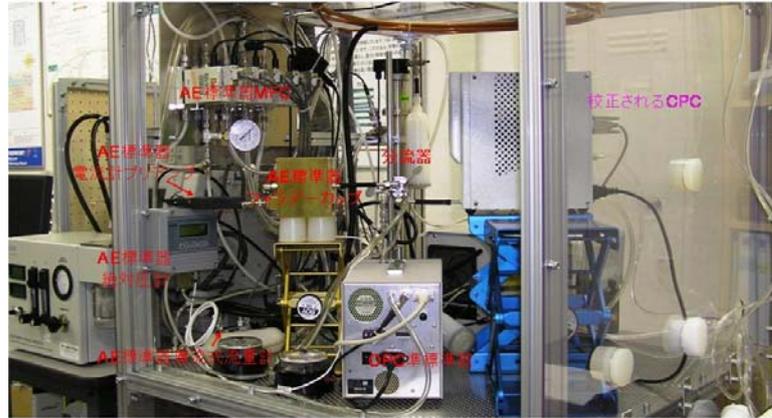


図 1-4-1-3-3 校正システム外観

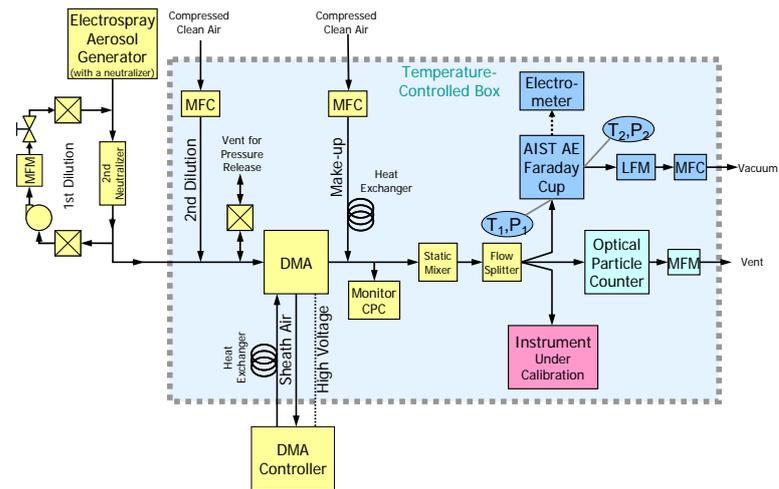


図 1-4-1-3-4 校正システム概略構成

これまで、上位の参照標準が存在せず厳密な不確かさ評価ができなかったため、参照標準の形態や異なる校正方法に対しての定量的な比較検討がなされてこなかったが、本研究において個数濃度の SI トレサブルな国内一次標準が開発されたことにより、異なる参照標準についての不確かさの比較検討が可能になるとともに計測器の校正トレーサビリティも確保できるようになってきた。なお、気中粒子数濃度の国家計量標準は最近まで全く存在しなかったが、2003 年頃から世界的にその必要性が指摘され日本をはじめいくつかの国で開発が始まり、本研究において産総研が世界に先駆けてこれに取り組み開発を完了した。その後、イギリス・国立物理学研究所 (National Physical Laboratory; NPL) 及びスイス・連邦計量研究所 (Federal Office of Metrology; METAS) でも開発を開始し、いずれも現在までにその開発を完了するとともに各々国家計量標準の同等性を保証すべく上記 3 カ国の NMI が参加した気中粒子数濃度標準の比較が開始されている。また、現在 ISO/TC 24/SC 4/WG 12 において DMA の粒径測定や CPC の粒子数濃度測定に対する校正方法の国際標準化が行われているが、これは粒径や個数濃度の測定に対してトレーサビリティを整備するにあたり、校正方法の規格化が望まれることに対応するもので、校正方法も含めた DMA に関する規格は ISO 15900 として間もなく発行する見込みである。CPC 校正に関する規格 (27891) の作成は始まったばかりであり、迅速な規格発行を目指し CPC 製造メーカーや NMI による活発な議論が行われている。これらの規格作成作業においても産総研は中心的な役割を果たしており、今後ともその役割は拡大していくものと期待されている。

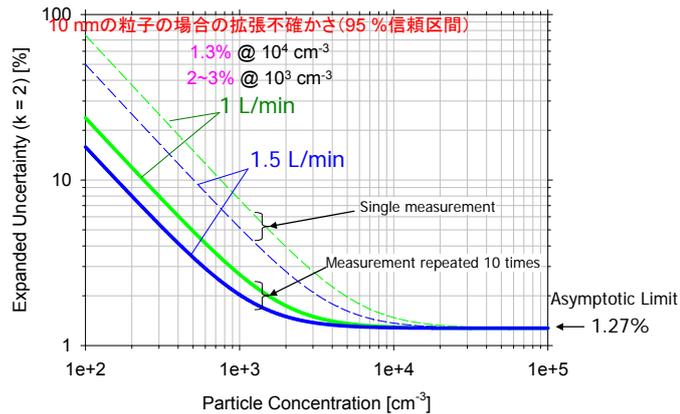


図 1-4-1-3-5 開発システムの不確かさ

(iii) 現場校正用粒子発生装置開発

ディーゼルエンジン排ガスに含まれる粒子数濃度の測定には、凝縮型粒子計数器（以下、Condensation Particle Counter:CPC）が広く使われている。一方、CPC を使った粒子数濃度測定法が規制の一部として採用されるためには、CPC が国家計量機関において校正され、国家一次標準へとトレーサブルになることが不可欠である。このような国家一次標準を用いたトレーサビリティ体制では、現場で使用される CPC に対する多くとも年 1 – 2 回の頻度での校正が想定されており、これ以上の頻度の校正は経済的、技術的等の理由で不可能である。一方、現場の CPC ユーザーからは、このような低頻度で高精度な校正に加えて、低精度であっても測定現場で日常的に測定器の正常動作を確認することの可能な校正を望む声が上げられている。当該研究ではこのようなニーズに応えるため、現場常駐型で気中粒子計数器の日常校正に利用可能な、発生器型の粒子数濃度標準が実現可能であるかどうかについて検討を行った。

インクジェット技術は本研究目的に対し下記の利点を持っている。

- ・発生される粒子数濃度 C_N がインクジェットノズルのピエゾ振動周波数 f と CPC のサンプル流量 Q より $C_N = f/Q$ で算出できるため、この値を CPC に表示された濃度と比較できる。
- ・ノズルから吐出される液滴の粒径分布は単分散性が高いため、液滴蒸発後の残渣である不揮発性溶質による固体粒子の粒径分布の単分散性もまた高い。従って、CPC の正常動作確認に適した粒径域に、発生した全ての粒子を容易に収めることができる。

インクジェット式エアロゾル発生器の概要図を図 1-4-1-3-6 に示す。この装置では、インクジェットノズルより一定頻度で清浄気流中に吐出された液滴が蒸発し、不揮発性溶質による固体のエアロゾル粒子が生成される。発生器ユーザーは、CCD カメラとストロボを使った液滴吐出の動画を観察しながら、サテライトと呼ばれる余剰液滴が生成しない液滴吐出条件を設定できる。吐出直後の液滴の粒径は 50 μm ,

そして吐出時の飛翔速度は約 1.5 m/s であり、空気の摩擦抗力により液滴は吐出後約 10 ms 以内に終端速度である清浄気流の速度へと減速する。ここで、液滴の吐出頻度が高すぎると、後から吐出された液滴が先に吐出された液滴に追いついて衝突し、一つの液滴になってしまうので、結果として発生器出口での粒子数濃度が低下する。そこで、吐出後の液滴の挙動を数値流体力学を併用し解析した結果、清浄空気の流量が 1 L/min の場合、管の内径が 1.6 cm そして液滴吐出頻度が 1000 Hz 以下であれば、減速後の液滴間の衝突は起こらないと結論した。

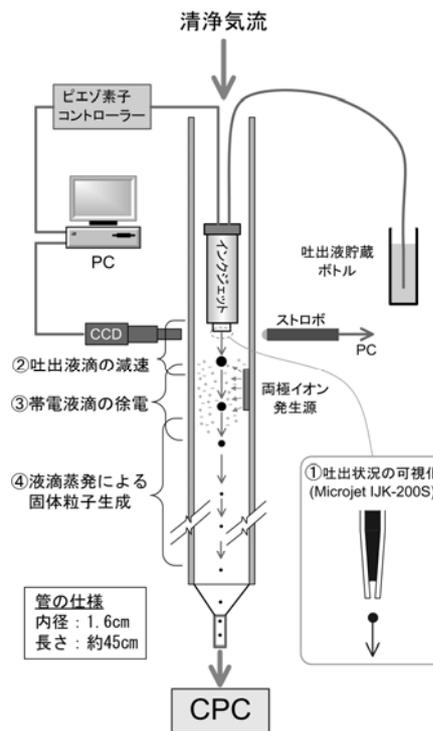


図 1-4-1-3-6 インクジェット式エアロゾル発生器の概要図

また、液滴が過度に帯電している場合、静電気沈着による粒子数濃度の低下や、Rayleigh explosion と呼ばれる液滴表面からの微小液滴の発散による粒子数濃度の増加が起こる。従って、液滴が過度に帯電している場合に備えアメリカシウム(^{241}Am)放射線源より発生させた両極イオンによって液滴を除電する構造を取り入れた。両極イオン-エアロゾル粒子間の荷電と再結合の速度理論を使った解析の結果、イオン生成速度が予想される値よりも一桁以下であっても、両極イオンによる十分な液滴を除電が行えると結論した。

試作装置の清浄空気の流量設定は 0.5~1.0 L/min であり、この設定における管中央での滞在時間は約 1~2 秒である。この滞在時間内に吐出された液滴の溶剤が蒸発し、不揮発性溶質による固体粒子が生成される設計とした。溶剤を水とした場合の吐出液滴の蒸発による粒径の変化の計算結果を図 1-4-1-3-7 に示す。清浄気流の温度は 22° C とし、想定される液滴吐出頻度範囲は 50-1000Hz とした。解析の結果、吐出液滴は発生器出口(40cm)に達するまでには固体粒子へと変換されると予測された。

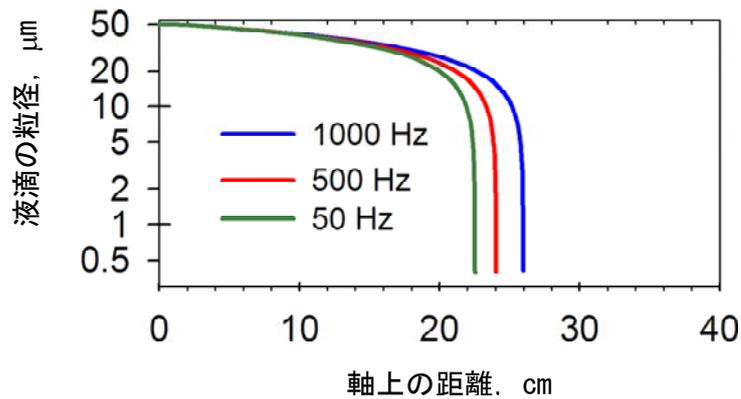


図 1-4-1-3-7 インクジェットノズルより吐出された液滴の蒸発による粒径の変化
(清浄気流温度 22° C)

実験では、インクジェット式エアロゾル発生器の試作装置の液滴発生頻度と、発生されたエアロゾル粒子を装置出口にてサンプルする気中粒子計数器の粒子検出頻度とを比較した。粒径約 300 nm と 3.5 μm の二種のテスト粒子を試作装置により発生させた。約 300 nm の粒子は超純水を吐出液とした場合の蒸発残渣であり、これらの粒子は超純水中に微量に含まれる不揮発性不純物による固体粒子である。Differential mobility analyzer (DMA: 微分型移動度分級器) による解析の結果、これらの粒子は単分散性が高く(相対標準偏差<1.2%)、また、粒径は不純物の濃度に依存し 200-400nm であった。一方、3.5μm の粒子は図 1-4-1-3-8 の例が示す様な既知濃度の食塩水を吐出液とした場合の蒸発残渣による固体粒子である。

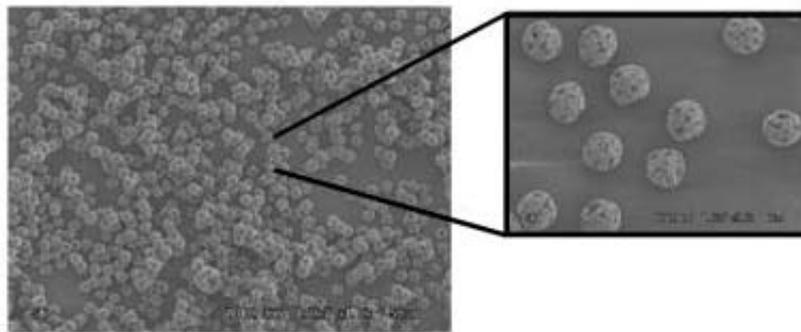


図 1-4-1-3-8 インクジェット式エアロゾル発生器で発生させた NaCl 粒子

約 300 nm の粒子の検出にはサンプル流量 1 L/min の CPC (TSI 社 3010 型) を使い、3.5 μm の粒子検出にはサンプル流量 0.5 L/min の光散乱式気中粒子計数器 (RION 社 KC-01D 型 Optical Particle Counter, これより OPC と略) を使った。試作装置の液滴発生頻度に対する CPC もしくは OPC の粒子検出頻度を図 1-4-1-3-9 (a) と (b) にそれぞれ示す。あるサンプル流量において吐出された液滴を装置滞在時間内に固体粒子へと蒸発させるためには、液滴発生頻度をある値以下に設定する必要がある。

流量 1 L/min の CPC に対しては 500 Hz 以下 (30 個/cm³ 以下に相当) の範囲において、そして流量 0.5 L/min の OPC に対しては 300 Hz 以下 (36 個/cm³ 以下) の範囲において、液滴発生頻度は粒子検出頻度と一致している。これらの結果は、インクジェットの液滴吐出数が試作装置出口におけるエアロゾル粒子発生数として保存されていることを強く示唆している。そしてまた、インクジェット式エアロゾル発生器が現場での CPC の正常動作確認のためだけでなく OPC の校正技術としても応用可能であることを示している。

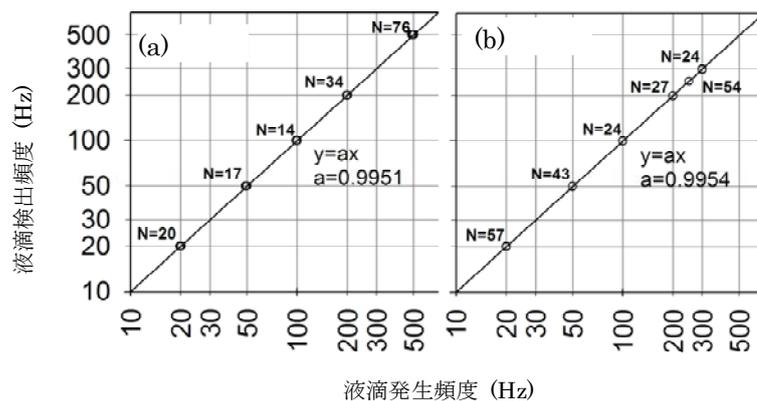


図 1-4-1-3-9 インクジェット式エアロゾル発生器の液滴発生

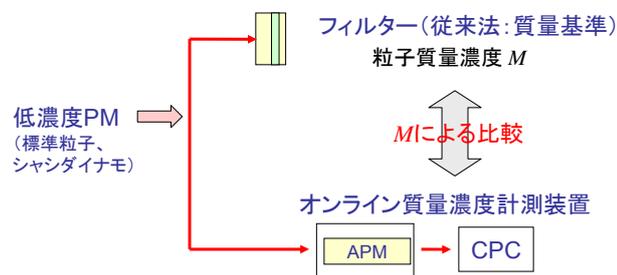
以上、ディーゼル排ガス中の粒子数濃度をモニタリングする目的で使用される CPC の正常動作を、現場にて日常的に行うための発生器型の粒子数濃度標準が実現可能であることを実験により実証するとともにインクジェットより吐出された個々の液滴が、発生器出口にて単分散性の高いエアロゾル粒子として生成されるインクジェット式エアロゾル発生器を開発した。以上の成果を基に、今後は実用器の開発と気中粒子数濃度の国家一次標準器への測定トレーサビリティの確立を目指す。

b. 低 PM 濃度域におけるフィルター法の妥当性評価

フィルター法の下限濃度の見極めに関する研究においては、次世代低公害車の排気として想定される極希薄な PM 濃度域にも適応可能な高感度質量濃度計測システムを構築し、本システムを用いることにより従来のフィルター法の妥当性や下限濃度の見極め等の評価を行うことを目的とした。高感度質量濃度計測システム（オンライン質量濃度計測装置）は、微分型微粒子分級装置 DMA（Differential Mobility Analyzer）と、粒子質量計測装置 APM（Aerosol Particle Mass Analyzer）で構成される PM 質量分級装置と個数濃度測定装置である CPC との組み合わせにより粒径毎の

質量と個数濃度を求め、それぞれの積を積分することでトータルの粒子質量濃度を求めるための装置であり、従来から用いられているフィルター法によって計測されるPM総質量との相関を評価することが可能である。

このオンライン質量濃度計測装置（以下オンライン法）を用いることにより、本事業プロジェクトで開発されたエンジンシステムや車両からのPM排出実態を高精度に把握することができるようになるとともに、フィルター法の検出下限や定量限界などを把握することが可能となる筈である。以下、上記目的のために本研究で構成したオンライン質量濃度計測装置を用いて、粒径毎の粒子質量（または粒径毎の有効密度値）とSMPSで測定した粒径分布からトータルの質量濃度を求め、従来フィルター法との比較を行うことでその評価を行った。図1-4-1-3-10に本妥当性評価研究の概念を示す。



$$\sum_{d_p} [(粒子質量 m) \times (粒子個数濃度 \Delta N)] = 粒子質量濃度 M$$

図1-4-1-3-10 質量濃度比較によるフィルター法の妥当性評価法

(i) 予備実験

実験に使用したエアロゾル粒子質量分析器（APM）及びそれを利用し構成した粒子質量濃度計測システム（DMA-APM法）の概略を図1-4-1-3-11、図1-4-1-3-12に示す。荷電された試料粒子はDMAで特定の大きさの粒子に分級されAPM装置内の内側、外側回転電極筒の間隙部に導入される。APM内では導入された粒子に働く静電気力と遠心力のバランスにより、特定の質量/電荷比を持った粒子のみがAPMを通過し下流側に達する。下流側に配置された粒子計数器（CPC）で通過粒子の個数を測定すれば粒径毎の質量濃度分布を求めることができる。APMは荷電粒子に作用する静電気力と遠心力の釣り合い式から粒子質量を直接測定する装置であり、DMAとの組み合わせで粒径毎の有効密度も計測できるシステムとなる。

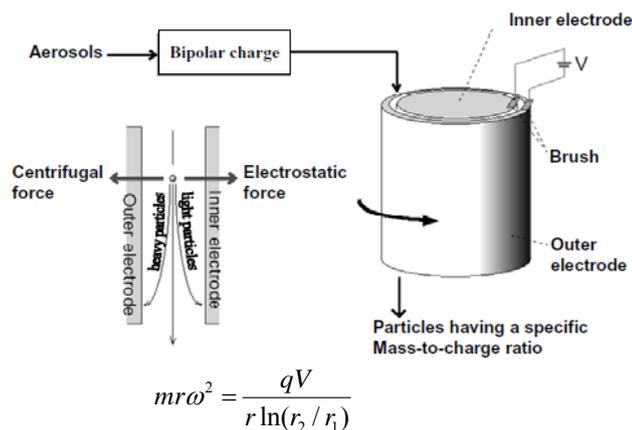


図 1-4-1-3-11 APM の概略構成

オンライン質量濃度計測システムは、DMA-APM の下流側に CPC を配置して粒子質量濃度の計測を行うもので、粒径毎の粒子質量または粒子の有効密度を求めることができる。別途 SMPS で測定した粒径分布の結果と併せればトータルの質量濃度を求めることができる。比較的高感度のオンライン質量濃度計測システムと従来のフィルター法で求めた質量濃度との比較を行うことで、フィルター秤量法の測定限界(下限)の決定や妥当性の評価等を行うことを目的としたものである。ここで、ディーゼル PM のような非球形粒子に対する粒径は常に何らかの有効径であるので、ここで求められる粒子密度もこれに対応した有効密度 (ρ_{eff}) とした。

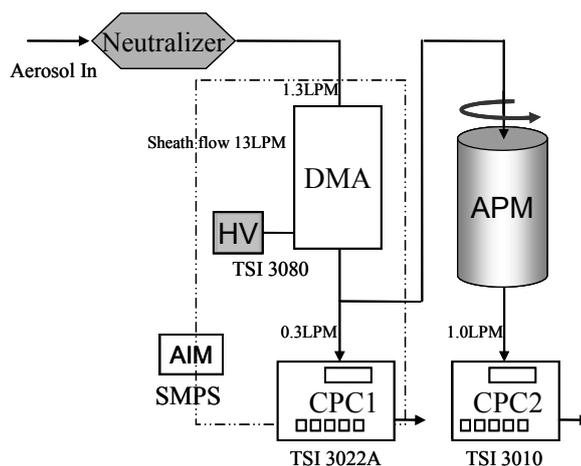


図 1-4-1-3-12 DMA-APM 法のシステム構成

なお、本研究プロジェクトに使用するエアロゾル粒子質量分析装置は、直接的で

単純な測定原理に基づいた測定装置であり、高精度な粒子質量測定が可能であると予測されているが、その実験的な実証は十分に行われていない。そのため、エアロゾル粒子質量分析装置で測定された粒子質量は、現時点ではその精度が不明確である。そこで、粒子質量が正確に値付けされている標準粒子を用い、それらの粒子の質量をエアロゾル粒子質量分析装置で測定することで、エアロゾル粒子質量分析装置の測定精度の検証や、誤差がある場合の補正を行う試験・校正法の開発を行った。

ここで、標準粒子として粒径範囲 30 nm から 800 nm にある 10 種のポリスチレン粒径標準粒子を選定し実験を行った。水に分散された状態で供給されるポリスチレン粒子を気中に噴霧するにあたり、粒径に応じて 2 種類の噴霧技術を用いた。一つはエレクトロスプレー式発生器で、粒径 30~70 nm の粒子を噴霧するのに用い、もう一つはネブライザーで粒径 100~800 nm の粒子を噴霧するのに用いた。

なお、エアロゾル粒子質量分析装置の測定精度を検証するに先だって、装置の運転パラメータである分級室回転数と分級印加電圧の校正を行った。回転数については、エアロゾル粒子質量分析装置に組み込まれた回転数計に顕著な誤差は見られず、補正は必要ないことを確認した。一方、印加電圧については、コンピュータから送られる印加電圧の制御信号に対し、実際の印加電圧がずれていることが見られた。そのため、印加電圧の誤差を補正するためのデータを取得し、後のデータ解析に組み込むための校正式を決定した。結果を図 1-4-1-3-13 に示した。

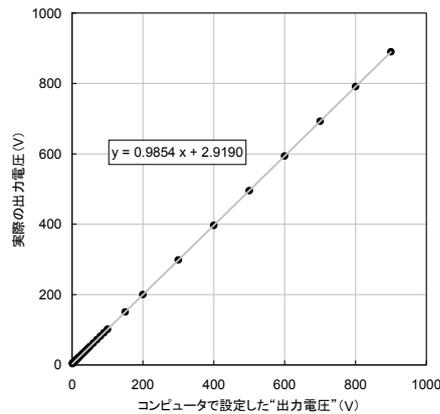


図 1-4-1-3-13 電圧補正式導出のための電圧校正と回帰分析の結果

次に、上記 10 種のポリスチレン粒子に対しエアロゾル粒子質量分析装置による測定を行った。測定においては、印加電圧を段階的に変化させながらスペクトルを得る“通常法”と、電圧を連続的に上昇（または下降）させながらスペクトルを得る“高速法”の両方を用い、精度の比較を行った。その結果、装置の高精度な校正には高速法では十分な精度が得られず、通常法を用いるのが妥当であることがわかった。通常法により得られた実験データは、我々が開発したフィッティング用コンピュータ・プログラムを用いて解析を行い、平均質量の算出に用いた。

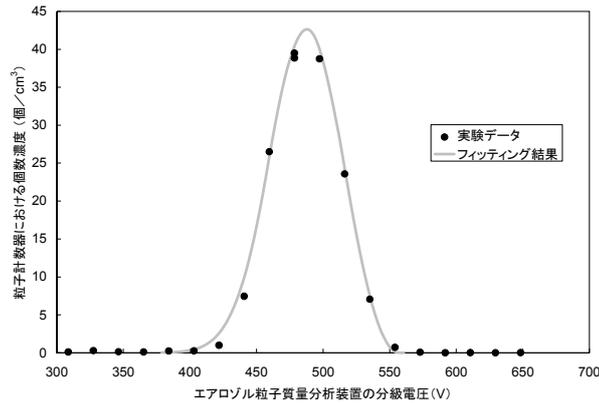


図 1-4-1-3-14 粒径 500 nm のポリスチレン標準粒子の場合での、実験で得られたスペクトルとフィッティング計算により得られたスペクトル曲線の比較

図 1-4-1-3-14 には、粒径約 500 nm のポリスチレン粒子を測定した際の実験データ（黒丸）とフィッティング計算から得られた曲線を示す。フィッティング曲線と実験データがよく一致しており、このことから良好なフィッティング計算ができたことがわかる。

ここで、ポリスチレン粒子の質量は粒径が既知であり、また密度は約 1.06 g/cm^3 であることから算出することができる。こうして得られた質量と、エアロゾル粒子質量分析装置によって測定された質量を比較すると、粒径 200 nm 以下の領域において、エアロゾル粒子質量分析装置の測定値が計算値を下回り、粒径が小さいほどその傾向が顕著であることが見られた。計算値を測定値で除した値を粒径ごとにプロットしたグラフを図 1-4-1-3-15 に示す。測定値と計算値がなぜ食い違うか、その理由は不明である。しかしながら、以上の研究によりエアロゾル粒子質量分析装置により測定された質量の値に対し、この図に示す補正係数を乗ずることによりポリスチレン粒子の質量の計算値を算出することが可能となった。以後、本プロジェクトで用いるエアロゾル粒子質量分析装置に対し、その測定精度を向上させるための補正パラメータとしてここで得られた計数を用いることとした。

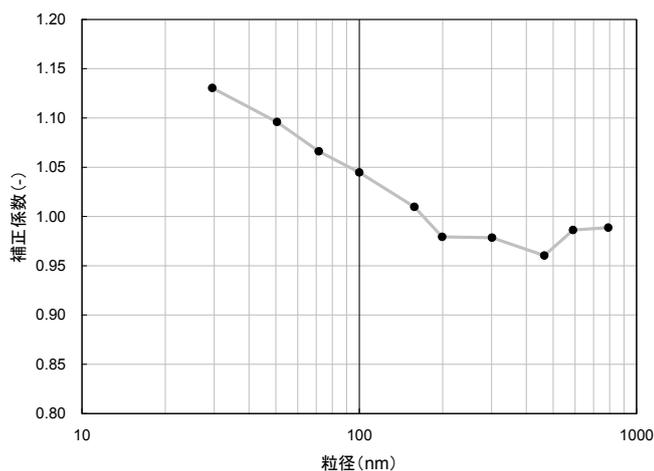


図 1-4-1-3-15 本プロジェクトで用いるエアロゾル粒子質量分析装置の粒径ごとの補正係数

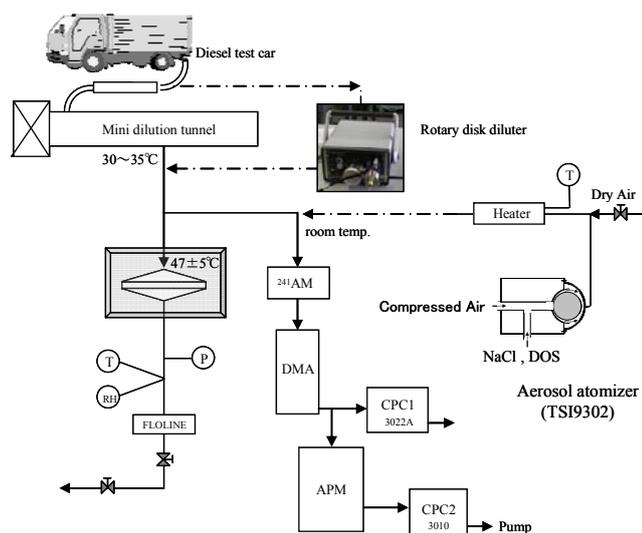


図 1-4-1-3-16 実験装置のセットアップ

以上の基礎的検討の後に、フィルター妥当性評価のための比較測定実験を行った。図 1-4-1-3-16 は実験で使用した装置のセットアップである。シャシダイナモメータ上で運転される試験車（2ton 積小型ディーゼルトラック，直接噴射式，総排気量 5249cc，平成 10 年排出ガス規制適合酸化触媒付き）からの排気をミニ・ダイリューショントンネルで希釈した後（希釈比約 1/6～1/36），一部を DMA，APM，CPC 等で構成されるオンライン質量濃度計測システムに，一部をフィルター法の捕集ラインに導入する。オンライン法での測定は基本的に室温（約 25～30℃）条件で行っているが，フィルター法については希釈トンネル出口部温度で約 30～35℃程度（負荷条件により若干変化），フィルター捕集部温度は 47±5℃の設定をベースとし，室温まで下げた条件での測定を行うことで，フィルター捕集部温度変化の影響についても検討した。フィルター秤量環境については概ね米国 EPA（US '07）に準拠し

たもので、使用フィルター種は Pallflex 社製 φ47 mm の TX40 (TX40HI20-WW : フッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター) 及び Teflo (PTFE メンブレンフィルター : ポアサイズ 1 μm, 2 μm), 秤量用天秤の最小読み取り値は 0.1 μg (UMX2 Mettler 製), 天秤室内温度 25±1℃, 相対湿度 50±4 % である。

実験に先立って行った天秤単体の秤量精度確認実験では、未使用フィルター (Blank Filter) TX40, Teflo の重量を各 6 枚, 6 回ずつの繰り返し測定を行って平均±2 μg 以下の秤量精度となっていることを確認した。結果を表 1-4-3-1 に示す。

Table 1-4-3-1 Weighing accuracy of blank filters

		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
TX40 [mg]	Ave.	81.5402	82.8956	80.7513	81.4099	83.5170	81.5340
	Max.	81.5430	82.8978	80.7524	81.4119	83.5197	81.5364
	Min.	81.5367	82.8944	80.7496	81.4084	83.5146	81.5325
	S.D.	0.0023	0.0011	0.0009	0.0011	0.0017	0.0013
Teflo [mg]	Ave.	199.8136	205.4350	196.5330	210.9872	207.5329	216.2994
	Max.	199.8146	205.4365	196.5353	210.9893	207.5355	216.3011
	Min.	199.8123	205.4330	196.5304	210.9851	207.5314	216.2971
	S.D.	0.0010	0.0014	0.0016	0.0014	0.0016	0.0012

次に、フィルター種による捕集特性の違いについては、比較試験に使用する TX40 及び Teflo フィルターの捕集特性を実験により確認した。前図装置の捕集フィルター一部をダブルフィルターホルダーに変更するとともに、アイドルリング及び負荷運転 (1600 回転 25%負荷) の条件で 2 段直列に接続した上流側フィルター及び下流側フィルターでの捕集重量を測定し、“下流側フィルターでの捕集重量/上流側フィルターでの捕集重量”及び“TX40 上流側フィルターでの捕集重量/Teflo 上流側フィルターでの捕集重量”の値を求め各々表 1-4-3-2 に示した。

Teflo の“下流側/上流側”の値は TX40 フィルターの場合に比べ極端に少なく、アイドルリング時に比べ負荷運転時にさらに顕著となる。また“Teflo/TX40”の値からは、いずれの運転条件でも Teflo が TX40 に比べ約 20~25%程度捕集量が少なくなっていることが分かる。これらは、疎水性の高い特徴を持つ Teflo フィルターの方が TX40 フィルターに比べ炭化水素等のガス成分の吸着が少なくなるためと考えられる。

Table 1-4-3-2 Filtration Efficiency of TX40 and Teflo filter

		Filtration weight (upstream) [μg]	Filtration weight (downstream) [μg]	Ratio of weight (downstream/upstream) [%]	Ratio of Teflo/TX40 (upstream) [%]
Idling	TX40	164.1	22.1	13.4	80.8
	Teflo	132.6	4.5	3.4	
25%Load	TX40	544.0	35.7	6.6	74.2
	Teflo	403.4	1.6	0.4	

また、トンネルバックグラウンド濃度についても、本測定系におけるバックグラウンド濃度 (エンジン OFF 状態) を、フィルター種 (TX40 及び Teflo) と捕集温度条件 (25℃及び 47℃) を変えた実験で確認した。結果を図 1-4-1-3-17 に示す。希釈トンネル入口部の外気取り入れ用アブソリュートフィルターをより高性能のものに変更しており、TX40 フィルターで約 5~18μg/m³ とやや高め濃度値を示すも

の、Teflo フィルターではほぼゼロレベル ($<5\mu\text{g}/\text{m}^3$) の濃度を達成していることを確認した。ここでも、両者の濃度の違いは主にフィルターの疎水性、吸湿性等の違いによるものと考えられる。なお、捕集温度条件の影響については、データに基づきはあるものの本実験の範囲では顕著な傾向は認められなかった。

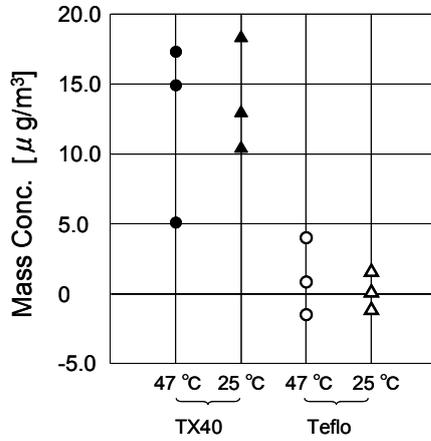


図 1-4-1-3-17 トンネルバックグラウンド

(ii) 有効密度の測定

以上の結果を基に、ここでは運転条件を変化した場合の有効密度測定を行った。図 1-4-1-3-18 は、試験車をアイドリング運転した場合、および、50 km/h (エンジン回転約 1600 rpm) で定速走行させ、シャシダイナモメータのローラ表面駆動力を 500 N, 1000 N, 1500 N (各々 1/4, 1/2, 3/4 負荷程度に相当) に変化して運転した時の有効密度の変化をプロットしたものである。

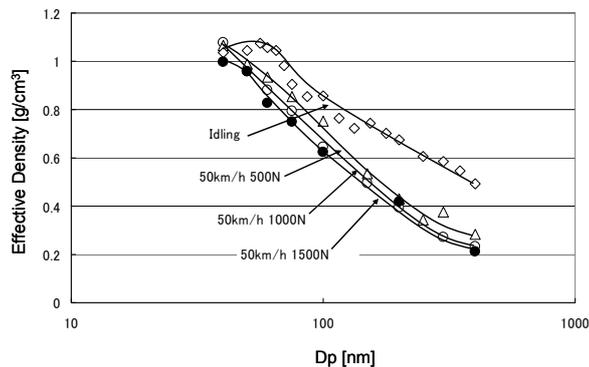


図 1-4-1-3-18 DEP の有効密度測定結果

核モード粒子の生成が起きるアイドリング運転時はいずれの定速走行時に対して高い有効密度が観測された。定速走行時では、粒径が大きくなるに従い有効密度が約 $1.1\text{ g}/\text{cm}^3$ から $0.2\text{ g}/\text{cm}^3$ 程度にまで一様に減少し、かつ負荷の増大とともにそ

の値が低下していくことが確認された。エンジン負荷の増加にともない、排出濃度も高くなり排気系での凝集割合が増大することが推定され、その結果として有効密度が減少してくることがその一因であると推定される。

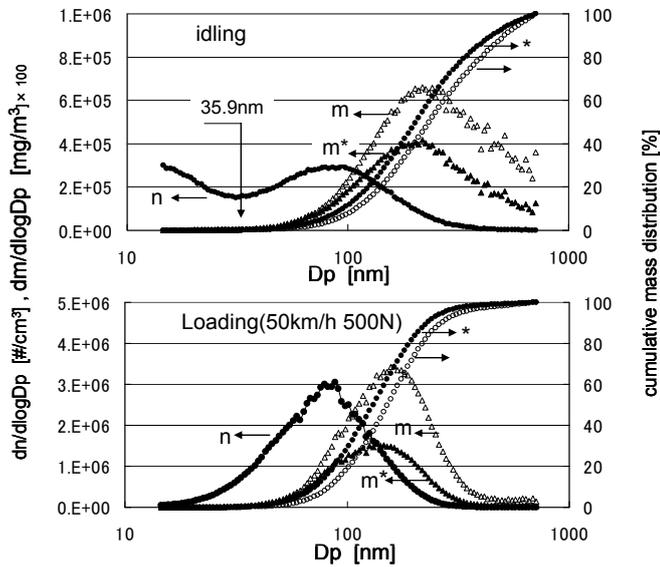


図 1-4-1-3-19 質量濃度分布と累積相対濃度

図 1-4-1-3-19 は、上記の実験で得られたアイドリング及び中負荷運転時の粒径（個数濃度）分布とそれに対応する質量濃度分布及びその累積相対濃度を示したものである。いずれも粒子密度を 1 g/cm^3 一定とした場合と DMA-APM 法で求めた粒径毎有効密度を考慮して得られる質量濃度分布（図中*印を付したプロット）とを比較したものである。運転条件に関わらず粒径毎有効密度を考慮した場合の質量濃度分布（*印）は、従来の粒径に依らず密度を一定に見積もった時の質量濃度分布に比べ粗大粒子側の濃度がより低くなる結果、平均粒径（50%累積濃度）が小粒径側にシフトする。

また、全質量濃度の値は、粒径毎有効密度を考慮した場合に比べ密度一定を仮定した場合の方がアイドリング時で約 1.7 倍、負荷運転時で約 2.3 倍と、いずれも質量濃度を大幅に過大評価する結果となる。このことから、従来粒径に依らず 1 g/cm^3 一定と見積もっていた DEP 粒子密度の値を、同様の実験結果から系統的にはアイドリング時で約 0.6 g/cm^3 、負荷運転時で約 0.45 g/cm^3 と見積もることで、個数濃度を質量濃度に換算する場合の簡易的な目安として従来よりは比較的現実の値に近似させることが可能になると考えられる。

次に、個数濃度と質量濃度の相関について調べた。アイドリング等で生じる核モード粒子は温度や希釈比の影響を敏感に受け個数濃度が大きく変動する。そのため、個数基準による PM 計測においては、個数濃度の大きなばらつき要因となる揮発性粒子を高温に加熱した蒸発管等を利用し除去、低減した状態で測定する手法が検討

されている。ここでは、便宜的に核モード粒子が除去、低減された場合の個数濃度や質量濃度に及ぼす影響を類推することを目的として、個数濃度分布の測定結果から核モード粒径範囲相当の粒子を除外して計算した個数濃度や質量濃度を求めることでその影響を調べることにした。前図アイドリング時の粒径分布の測定結果から、本検討では約 40 nm 以下の粒子をその対象として除外し計算した。

図 1-4-1-3-20 に種々運転条件（濃度範囲）下で測定した全個数濃度と全質量濃度の関係を示す。ここで、白抜きのプロットが核モード粒径範囲に関わる 40 nm 以下の粒子を除いて計算した個数と質量の関係である。

本図における全個数濃度と全質量濃度の関係では、アイドリング等極低負荷、低濃度時の場合と中負荷以上比較的濃度が高くなる条件の場合とで大きく傾向が異なっており、比較的高濃度の範囲ではほぼ一義的に個数と質量の相関を表現できることが分かる。両者の相関を示す近似式を図中に示した。

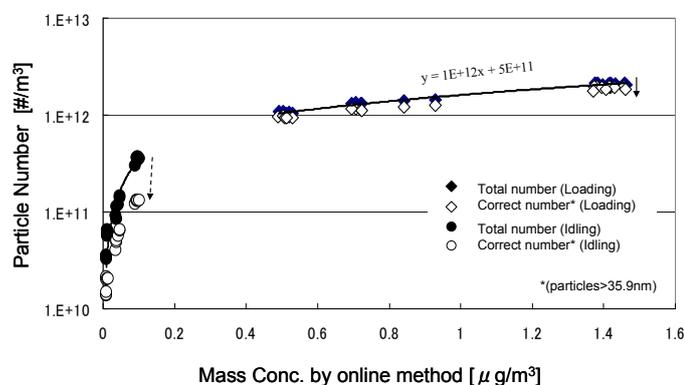


図 1-4-1-3-20 質量濃度と個数濃度の相関

一方、揮発性粒子を多く含む核モード粒子に関わりの大きい 40 nm 以下の粒子を除いた白抜きのプロットからは、質量濃度に対するそれらの影響は全濃度範囲に亘りほぼ無視できる程度のものであるのに対し、個数濃度に対しては高濃度域においてその影響は極めて小さいものの低濃度域、すなわちアイドリング等核モード粒子を生成する運転域のような場合その影響は比較的大きなものとなってくる。一般に、この範囲 (<40 nm) の粒子は温度や濃度、滞留時間など測定雰囲気条件の影響で個数濃度が敏感に変化する粒径域でもあり、単純に個数濃度のみで粒子排出特性の評価を行うことが難しい粒径域でもあることが理解される。

(iii) フィルター法の妥当性評価

以下、オンライン法とフィルター法の比較測定を行うことにより、従来フィルター法の妥当性評価について検討を行った。図 1-4-1-3-21 は、試験車をアイドリング及び中速、軽・中負荷条件（約 20～40 %負荷@1600 rpm）で運転し、排気濃度を種々に変化させた時の質量濃度をフィルター法（捕集温度 47℃）とオンライン法で測定し両者の相関を調べた結果である。Teflo フィルターはポアサイズ 1 μm と 2 μm で差圧の増加傾向が若干異なるものの捕集性能にはほとんど差がなかったので図中では同じプロットで示している。NaCl や DOS などの標準粒子での比較測定結果では両者はほぼ 1 : 1 の関係を示していたが、ディーゼル排気 PM の測定ではオンライン法に比べフィルター法が若干濃度を過少評価する傾向が見られ、ここでは

TX40 で約 10 %，Teflo の場合には約 15 % 程度低めの濃度を示すことが確認された。ここでも，前述のフィルター特性の相違が TX40 と Teflo の濃度差に影響しているものと思われる。

また，オンライン法に比べフィルター法の濃度が低くなる原因としては，前者が常温での測定でありかつ原理的に揮発性粒子の影響を受け難いのに対し，フィルター法は捕集部を 47°C と高温に保っているため捕集時に揮発性粒子の蒸発・離脱等の影響を受けることが考えられる。

図 1-4-1-3-22 は，上記の実験結果から比較的濃度の低いアイドリング時の結果のみを抽出しスケールアップしてみたものである。バックグラウンド濃度の影響も重なり極低濃度域ではフィルター法がオンライン法に比べ幾分高めの値を示していることが分かる。希釈比等を変えて排気微粒子の濃度を上昇していくと徐々にフィルター法の値がオンライン法を下回っていく傾向は見られるが，この濃度範囲では比較的フィルター種の影響や捕集温度の影響が見え難いようにも思われる。

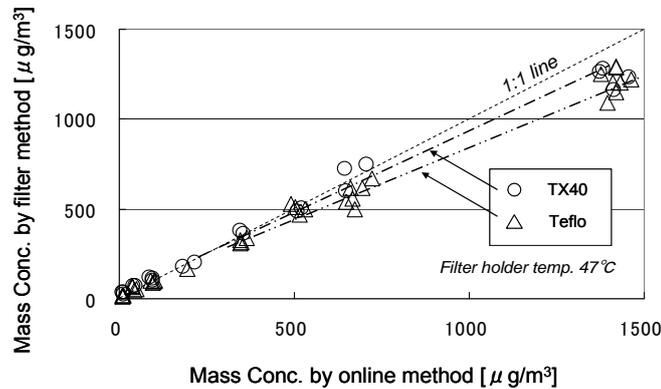


図 1-4-1-3-21 比較測定結果（フィルター温度 47°C）

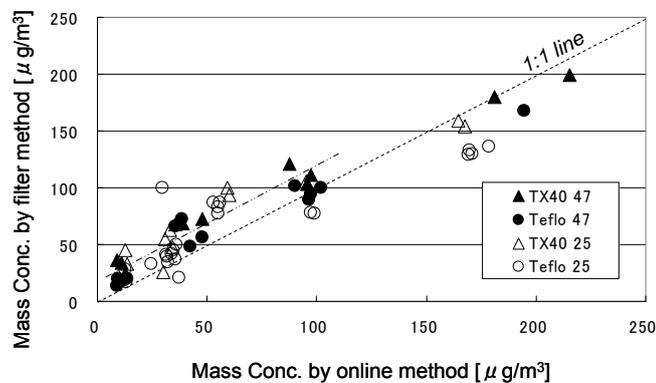


図 1-4-1-3-22 比較測定結果（アイドリング）

図 1-4-1-3-23 は、オンライン法を基準としてオンライン法に対するフィルター法の測定値のずれ（相対誤差），すなわち“フィルター法による質量濃度／オンライン法による質量濃度”の割合を求め、オンライン法で求めた質量濃度を横軸にプロットして示したものである。

前出の比較結果でも明らかなように、比較的濃度の高い範囲でフィルター法がオンライン法に対し系統的に低めの値を示す傾向はあるが、両者の結果に比較的良好な相関が得れていることが分かる。しかし、 $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の濃度では逆にフィルター法がより高濃度の値を示すようになり、またその傾向は Teflo に対し TX40 がより大きなものとなってくる。前出のバックグラウンドでの実験結果からも明らかなように両者の吸湿性、疎水性等の特性がその結果に影響しているものと考えられる。

本実験の結果から、基本的には極低濃度域までの測定が可能なオンライン法をベースとして、低濃度条件下におけるフィルター法の測定濃度の妥当性評価を有効に行うことができるとともに、将来的にさらに厳しい規制が開始され排出濃度値が低下してきた場合にも、フィルター法による測定の有効性（妥当性）がこれにより判断できることの見通しが得られた。

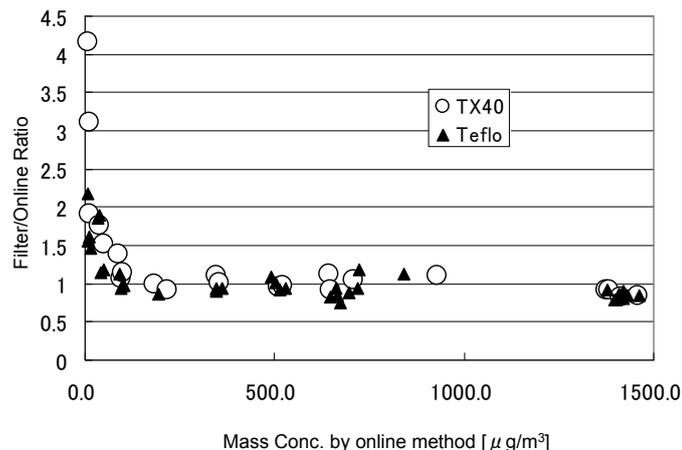


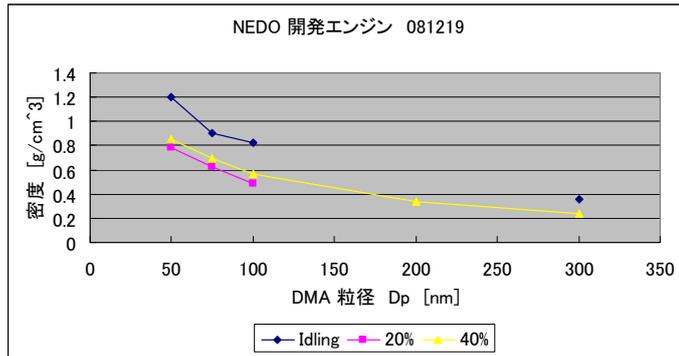
図 1-4-1-3-23 オンライン法とフィルター法の相対誤差

(iv) 最終評価結果

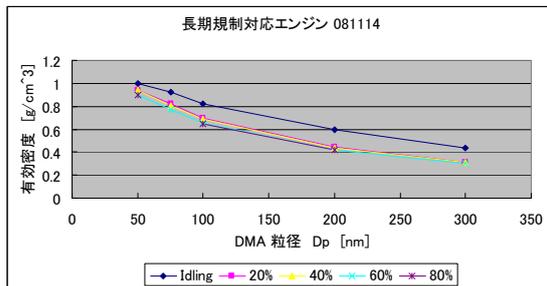
これまでに構築した上記評価技術（オンライン質量濃度計測システム）を本 NEDO プロジェクト開発エンジンの最終評価試験に適用し、有効密度、質量濃度等の値を計測した。図 1-4-1-3-24(a), (b), (c)は NEDO 開発エンジンの有効密度を、比較のために同型式の長期規制対応エンジン及び新長期規制対応エンジンを参照エンジンとしてそれぞれ結果を示したものである。個々には若干の値の相違が見られるものの定性的にはほぼ同様の傾向を示しており、アイドリング時に若干高い有

効密度を示すものの、負荷運転時には全体的にそれより低い値となる。また、いずれの場合も粒子径の増大とともに粒子同士の凝集が進み有効密度の値が低下する傾向は同様である。

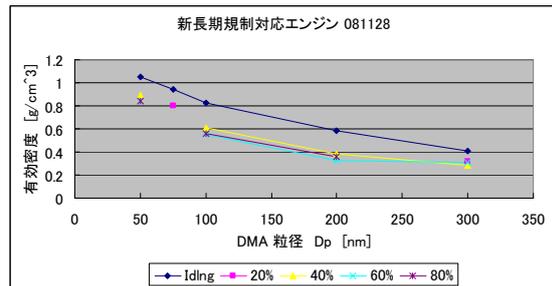
また、図 1-4-1-3-25 はこのときのオンライン法とフィルター法で測定したときの質量濃度の比較測定結果である。長期規制対応エンジンや新長期規制対応エンジンなど比較的濃度が高めの場合には両者の測定結果に良好な相関が見られるものの、NEDO 開発エンジンのように排出微粒子濃度が極めて低くなってきた場合にはその相関性は崩れ、フィルター法の測定限界以下の濃度となっていることが確認された。また、同エンジンでも比較的負荷の高い運転で排出濃度が高めの場合にはオンライン法での測定が可能であるものの、アイドリングや極低負荷時のように排出濃度が極めて低くなってくると、オンライン法によっても正確な測定が困難な領域になってくるといことも確認された。



(a)



(b)



(c)

図 1-4-1-3-24 NEDO 開発エンジンの有効密度の計測例

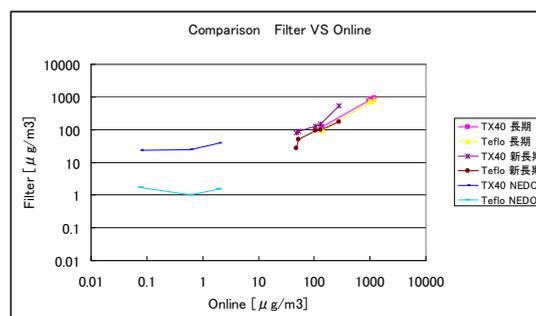


図 1-4-1-3-25 オンライン法とフィルター法による質量濃度

次に、図 1-4-1-3-26 は上記 3 種類のエンジンについて、エンジンの負荷を変えて運転したときの排出微粒子の粒径分布を SMPS で測定し、それぞれの粒径分布変化の結果を示したものである。各々希釈率を掛け戻して排気管出口部での濃度に換算しているため、粒径分布のピーク値より排ガス規制の強化に伴い排出微粒子の質量濃度が大幅に低下していることが確認される。また、NEDO 開発エンジンの場合にはさらに濃度が低下し、本図の比較結果ではピーク位置が確認できない程度までに

低濃度化していることも確認された。

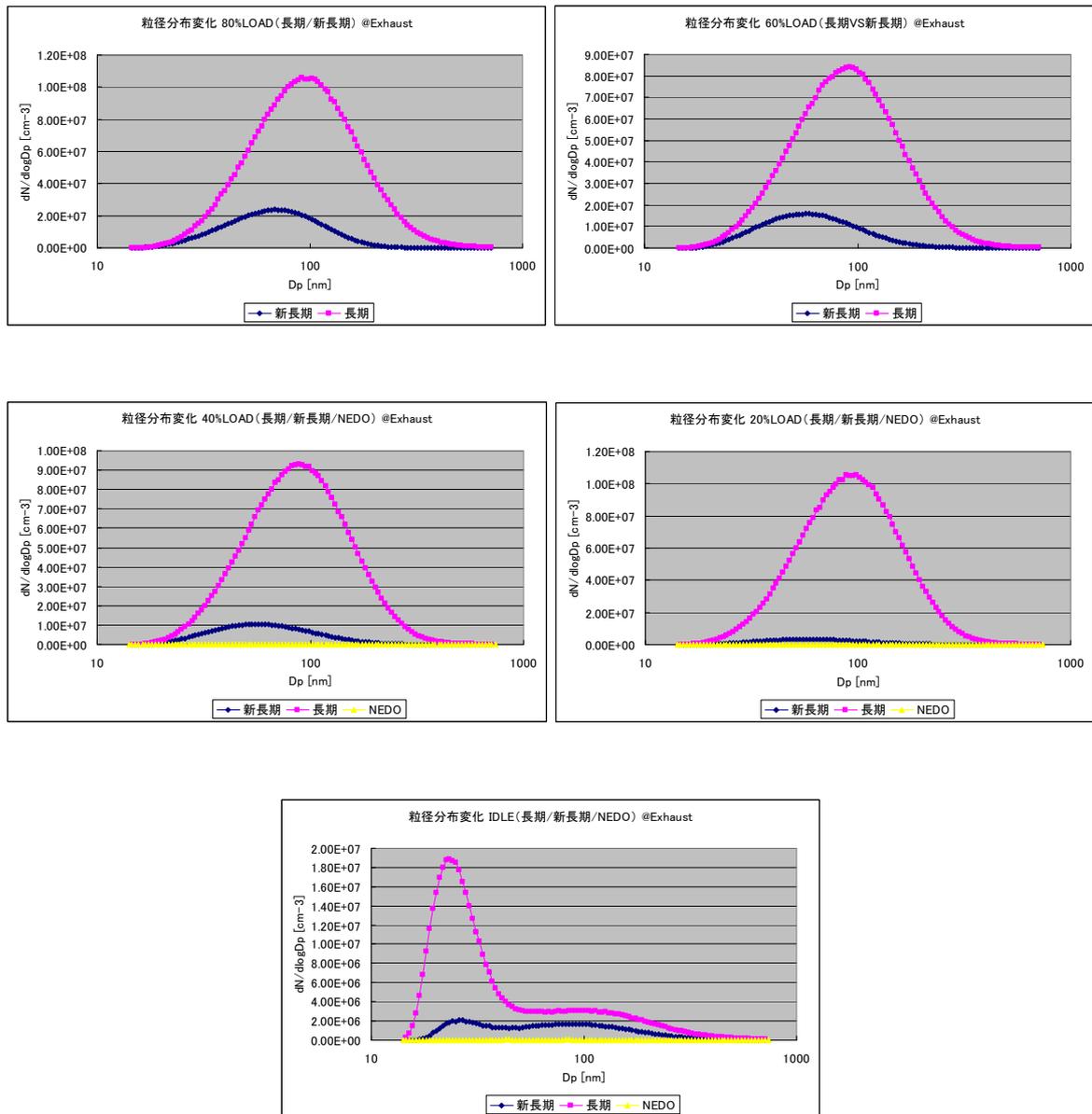


図 1-4-1-3-26 SMPS で測定した粒径分布変化の結果例

本研究は、次世代低公害車からの PM 排出量（総排出質量）の減少に伴い、従来から用いられてきたフィルター法に代表される質量基準計測法が適用限界に近くことの懸念から、今後必須の計測方法になると予測される粒子個数濃度基準の計測法に関し、PM 計測における不確かさを低減した高精度計測技術の確立を目指すことを目的として、個数濃度測定 of 校正・試験技術の開発並びに低 PM 濃度域におけるフィルター法の妥当性評価の課題について平成 16 年度～平成 20 年度の 5 年間に渡り研究を実施したものである。本研究で得られた成果を以下に纏めて列記する。

(i) 一次標準として採用したエアロゾル・エレクトロメータ法において、装置改造と厳密な温度制御による低ノイズ化に加え、新たに高精度流量計の導入により流

量測定の不確かさを低減したことで、標準器による濃度測定 of 拡張不確かさ ($k=2$) を最終的に 10^4 個/cm³ で約 1.3 %以下、 10^3 個/cm³ で約 2~3 %以下までに低減することが可能となった。さらに、エレクトロスプレー法による幅広い粒径範囲での試験粒子の発生が可能となった。これにより、2008 年に国内での校正サービスを開始することができた。

(ii) 現場校正用粒子発生装置の実用可能性評価の研究に着手し、インクジェット式エアロゾル発生器を開発しディーゼル排ガス中の粒子数濃度をモニタリングする目的で使用される CPC の正常動作を現場にて日常的に行うための発生器型の粒子数濃度標準が実現可能であることを実験により実証することができた。

(iii) フィルター法の妥当性評価に関しては、塩化ナトリウム (NaCl: 非球形・不揮発性)、DOS (球形・油性) 等の試験粒子やディーゼル排気微粒子 (DEP) について、高感度オンライン質量濃度測定装置 (DMA-APM 法) により各々の有効密度を測定し、かつフィルター法との質量濃度測定の比較を行うことにより本評価法の有効性を確認するとともに、従来のフィルター法の測定限界をほぼ見極めることができた。また、本評価法を利用し NEDO 開発エンジンの最終評価実験においてその排気微粒子濃度の極低濃度化が実現できていることを確認できた。

以上の成果から、本研究の目的である PM 計測における不確かさを低減した高精度計測技術が、次世代低公害車の排気として想定される極希薄な PM 濃度域において有効な PM 計測・評価技術を提供することを可能にするとともに、その実用化の意義の大きいことが立証された。加えて、PM 排出評価に対応した個数基準計測装置における計測装置の校正・試験技術の確立は、個数濃度測定器に関する国内一次標準の開発に寄与するとともに、国際的な PMP 活動への対応という面からも意義は大きく、今後は個数濃度測定器に関する国内一次標準の確立と供給、PMP への対応や国際標準化に向けたより一層の活動が期待されている。

2. 未規制物質評価

2.1 培養細胞曝露による健康影響評価法の検討（CULTEX 装置の曝露条件検討）

自動車排気がヒトの体内に取り込まれ、最初にダメージ（傷害）を受ける器官は呼吸器系であることから、実際の気道を模した実験系で呼吸器への影響を評価することは重要である。肺を模した実験系として、人工膜上に増殖させたヒトの呼吸器由来培養細胞に希釈排気を接触させる方法¹⁾が既に考案されている。この方法を用いることにより、生体の呼吸曝露に近い状態で細胞毒性（細胞を死滅させる作用）や遺伝子¹⁾発現に基づいた毒性を評価することが可能である。培養細胞曝露装置（CULTEX²⁾装置）を用いた評価を試行するために下記の項目を検討した。

CULTEX 装置（Model. AP-525、柴田科学株式会社製）は、窒素酸化物や硫黄酸化物などのガス状物質をはじめ、ディーゼル排気や煙草煙などの被験物質を培養細胞に曝露させ、その生体影響の研究を行うための試験装置である^{2) -12)}（Fig. 2.1.1）。本システムでは、マスフローコントローラーにより被験物質の曝露流量が設定でき、Φ24 型の細胞曝露モジュールにより気-液相接触曝露を行うことができる。

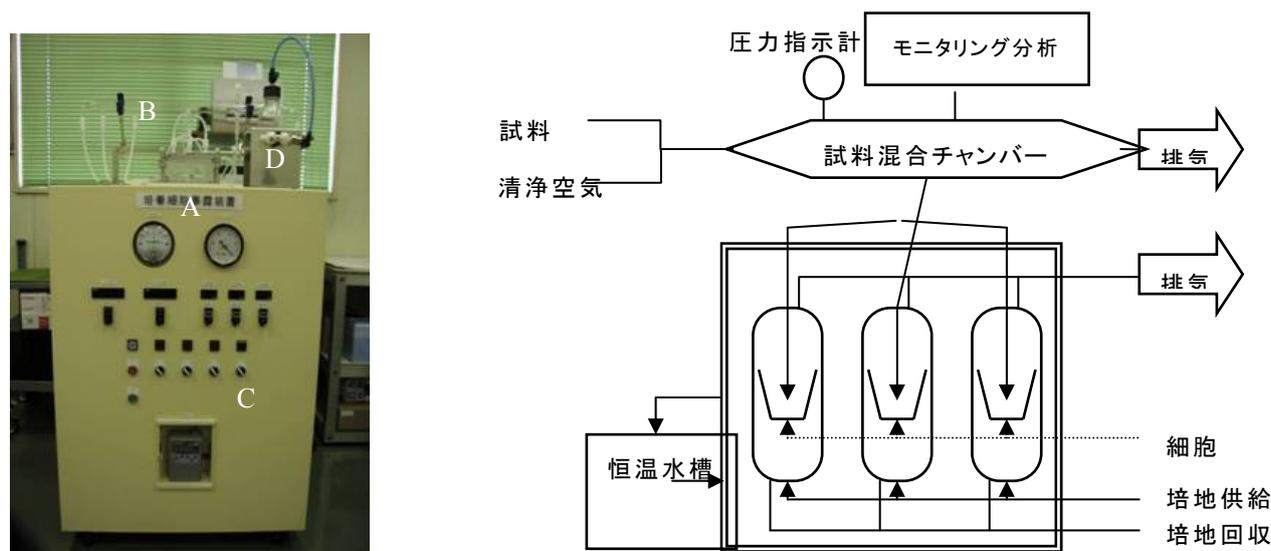


Fig. 2.1.1 培養細胞曝露装置全景と細胞曝露モジュールの模式図

A：細胞曝露モジュール、B：試料混合管チャンバー、C：曝露制御部、D：培地タンク
モジュール内に insert 装着部が 3 つあり、1 度に 3 セットの細胞曝露が可能である。

細胞曝露モジュール内には 3 つの空間があり、その中に細胞を底面に播種した insert

¹⁾ 遺伝子 [gene]：生体の DNA の一部分で、一つのタンパク質の情報を持つ DNA の部分。遺伝子が翻訳されてタンパク質が作られる。細胞分裂の際には DNA が複製され、同じ遺伝子を持つ 2 つの細胞ができる。遺伝子は次の世代にも受け継がれる。

²⁾ CULTEX [Exposure device on the base of the cell cultivation system]：窒素酸化物や硫黄酸化物などのガス状物質をはじめ、ディーゼル排気や煙草の煙を培養細胞に曝露させ、その吸入毒性と生体影響の研究を行うための試験装置。

(FALCON™ Cell Culture Inserts, Cat.No. [35]3090, Becton Dickinson Labware) と呼ばれるカップを収納し、蓋を閉めて細胞にガス状被験物質を曝露する。モジュール内の insert 底面に浸っている無血清培地は、37℃に設定した恒温水により常に保温されている。

ここで、細胞の選定は、自動車排気を含む大気汚染物質を対象とする試験では、重要な標的器官である呼吸器系に由来をもつ細胞を使用するのが一般的である。気道を構成する細胞のうち、特に肺泡マクロファージと肺上皮細胞は肺傷害時に防御的な作用を含む多彩な機能をもつことが知られている。そこで、これら 2 つのタイプの細胞に注目し、入手可能で、かつ安全性の高い培養細胞株を調査した。その結果、大気汚染研究や炎症に関連する研究^{13) 14)}で広く活用され、肺傷害に対し防御作用を示す II 型のヒト肺上皮細胞株 A549 を選定した。A549 は、細胞分譲施設（細胞バンク）として世界的に高い評価を得ている American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。また、DNA マイクロアレイ解析法は、現在、ほぼ全てのヒト遺伝子の発現解析が可能となり、その簡便性や精度の高さからあらゆる疾患を対象とした毒性評価への応用が期待できるようになっている。これまでの JARI の試験経験より、搭載遺伝子数の多さや感度の高さからオリゴ DNA マイクロアレイを選定した。

参考文献

- 1) Aufderheide M, Mohr U. A modified CULTEX system for the direct exposure of bacteria to inhalable substances. *Exp Toxicol Pathol.* 55(6):451-454, 2004.
- 2) Aufderheide M, Mohr U. CULTEX--a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air/liquid interface. *Exp Toxicol Pathol.* 51(6):489-490, 1999.
- 3) Aufderheide M, Mohr U. CULTEX--an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. *Exp Toxicol Pathol.* 52(3):265-270, 2000.
- 4) Aufderheide M, Ritter D, Knebel JW, Scherer G. A method for in vitro analysis of the biological activity of complex mixtures such as sidestream cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 53(2-3):141-152, 2001.
- 5) Ritter D, Knebel JW, Aufderheide M. In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds--development and validation of an optimized system for human lung cells. *Exp Toxicol Pathol.* 53(5):373-386, 2001.
- 6) Knebel JW, Ritter D, Aufderheide M. Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust--development of an optimized in vitro test strategy. *Toxicol In Vitro.* 16(2):185-192, 2002.
- 7) Wolz L, Krause G, Scherer G, Aufderheide M, Mohr U. In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food Chem Toxicol.* 40(6):845-850, 2002.
- 8) Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D. A method for the in vitro exposure of human cells to environmental and complex gaseous mixtures: application to various types of atmosphere. *Altern. Lab. Anim.* 30(4):433-441, 2002.
- 9) Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D. Novel approaches for studying pulmonary toxicity in

- vitro. *Toxicol Lett.* 140-141:205-211, 2003.
- 10) Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D. An improved in vitro model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 55(1):51-57, 2003.
- 11) Aufderheide M, Mohr U. A modified CULTEX system for the direct exposure of bacteria to inhalable substances. *Exp Toxicol Pathol.* 55(6):451-454, 2004.
- 12) Fukano Y, Ogura M, Eguchi K, Shibagaki M, Suzuki M. Modified procedure of a direct in vitro exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 55(5):317-323, 2004.
- 13) Huttunen K, Hyvarinen A, Nevalainen A, Komulainen H, Hirvonen MR. Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ Health Perspect.* 111(1):85-92, 2003.
- 14) Fujii T, Hogg JC, Keicho N, Vincent R, Van Eeden SF, Hayashi S. Adenoviral E1A modulates inflammatory mediator expression by lung epithelial cells exposed to PM10. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284(2):L290-L297, 2003.

2.1.1 細胞への被験物質曝露時間の検討

CULTEX 装置を用いた排気曝露試験を行う前に、A549 細胞に対する被験物質の適正な曝露時間について、細胞への純空気曝露により細胞毒性試験で検討した。

2.1.1.1 細胞と CULTEX 装置の準備と細胞曝露

培地³には、D-MEM/F-12 (No.1320-033, Invitrogen) 500 ml に硫酸ゲンタマイシン⁴ (抗生物質、No.G1522, SIGMA) 500 µl と牛血清 (No. AQC23532, HyClone) 50 ml 添加したものを使用した。A549 細胞は、目標数濃度を 1.0×10^6 cells/ml に設定し、試験の 3 日前に insert 内へ 2 ml 播種した。すなわち、6 穴プレート (FALCON COMPANION TC PLATE, Cat.No. [35]3502, Becton Dickinson Labware) に培地を 3 ml 満たし、一定濃度の細胞を播種した insert を 37°C、5%CO₂ でインキュベートした。

CULTEX 装置は、金属製のチューブを介して希釈トンネルと接続した。細胞に曝露される排気の温度は、細胞曝露モジュール上部にある送気用の 3 本のチューブの接続部に取り付けられたワイヤー状の温度センサーでモニターした (Fig. 2.1.1.1)。供給流量が非常に少ない為、細胞が希釈トンネル内の圧力に影響される可能性を考慮して、CULTEX 装置に排気ポンプを接続して流量を一定に維持した。

³ 培地 [medium]: 微生物や生物組織を培養するときに、その生育する素材となつて、必要な栄養素などの供給源となるもの。

⁴ 硫酸ゲンタマイシン [gentamicin sulfate]: アミノグリコシド系抗生物質。グラム陰性菌、ブドウ球菌、レンサ菌などのタンパク合成を阻害することで、殺菌的に作用する。

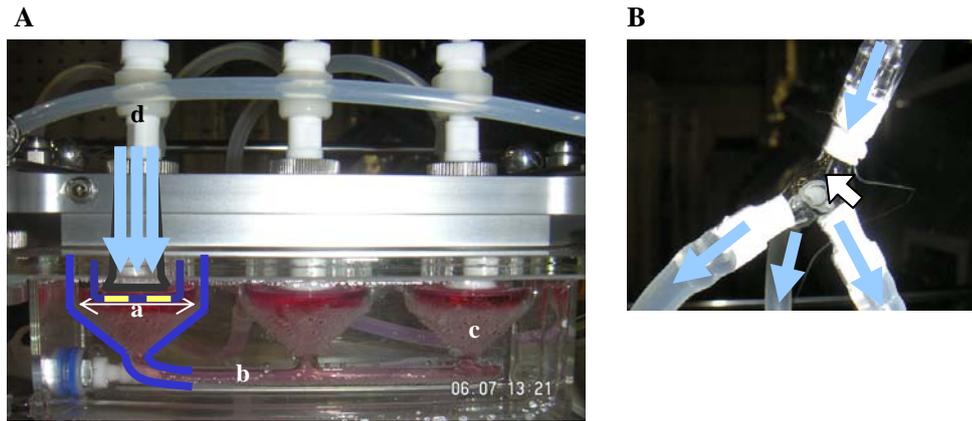


Fig. 2.1.1.1 細胞曝露モジュール (A) および曝露チューブの温度センサ (B ; 白矢印)
 (a) Insert 装着部、(b) 培地供給管、(c) ホルダ、(d) ガス噴出口。青矢印はガスの流れを示す。

2.1.1.2 細胞曝露

試験開始直前に、insert より培地を除去し、速やかに細胞曝露モジュールにセットした。恒温槽で 37°C に保温したモジュール内の細胞は、細胞に栄養を供給するための無血清培地に浸るようにセットした。セット後、速やかに純空気 (O_2+N_2) を曝露した。Air 流量を 2.00 SLM (Standard Liter per Minutes)、供給流量が 15.0 SCCM (Standard Cubic Centimeter per Minutes) になるように設定し、曝露時間を 0、1、2、4 時間とした。細胞曝露モジュールに接続させるチューブ類は滅菌したものを使用した。曝露試験終了後、速やかに 2 ml の培地を insert 内に添加し、その後 3 ml の培地を満たした 6 穴プレートに insert を入れ、37°C、5%CO₂ でインキュベートした。

2.1.1.3 細胞毒性試験

曝露終了 20 時間後に、細胞毒性測定用試薬 WST-8⁵ (Cell Counting Kit-8, (株) 同仁化学研究所) を 50 μ l/well ずつ添加した。4 時間の静置後、insert 内の細胞培養液全量 (2.05 ml) を 24 well plate の 1 well に移し、ピペッティング後、96 well plate に移した 100 μ l の吸光度 (450 nm) をプレートリーダー (LUCY2 Microplate Luminometer, Anthos) で測定して細胞毒性を評価した。この試験は、2 本組みアッセイで行った。

2.1.1.4 統計処理

得られた吸光度の値は、対照群を 100% として平均値 \pm 標準偏差で示した。また、生存率が対照群に比較して 50% を下回った群があった場合には、50% 抑制濃度 (IC₅₀⁶) で評価した。

⁵ WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] : 細胞毒性測定用試薬。高感度水溶性ホルマザンを生成する新規テトラゾリウム塩。発色基質として利用したもの。

⁶ IC₅₀ [Inhibitory Concentration 50%] (50%抑制濃度) : 成長を 50% 阻害する化合物の濃度。

2.1.1.5 結果および考察

CULTEX 装置を用いて適正な曝露時間を検討した結果 (Fig. 2.1.1.2)、IC50 値は算出できなかったものの、2 時間および 4 時間曝露で細胞生存率の減少傾向が認められた。

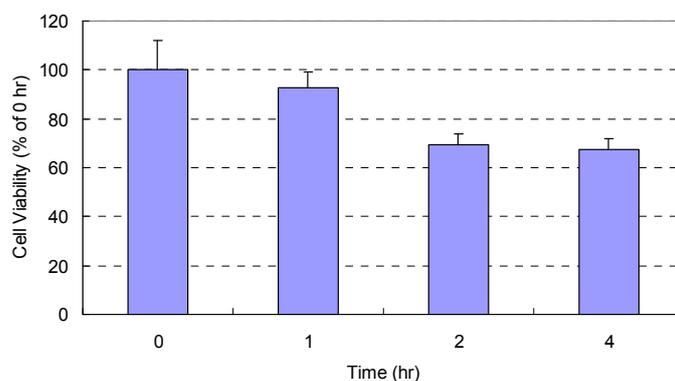


Fig. 2.1.1.2 A549 細胞を用いた CULTEX 装置曝露時間の検討
平均値±標準偏差で示す (n=3)。

以上の結果より、Aufderheide ら¹⁾が報告しているように、1 時間曝露が適切であることが確認できた。

一方、ここでは供給流量を 15 SCCM で検討したが、他の試験結果から、1 時間の曝露時間では 8.3 SCCM 以下の流量の方が細胞生存率への影響がより少ないことが確認できたため適切な曝露条件として、曝露時間は 1 時間、供給流量は 8.3 SCCM を最終的に選定した。

2.1.1.6 参考文献

- 1) Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D. A method for the in vitro exposure of human cells to environmental and complex gaseous mixtures: application to various types of atmosphere. *Altern. Lab. Anim.* 30(4):433-441, 2002.

2.1.2 CULTEX 試験に使用する A549 細胞の insert 内細胞数濃度の検討

2.1.2.1 目的

CULTEX 装置を用いた細胞評価試験結果のバラツキの原因の一つとして、試験毎に細胞を播種することで生じる細胞数濃度のバラツキの可能性が考えられる。また、細胞個々の分裂のタイミングが一定ではないため、計算上で目標細胞数濃度を設定しても播種のタイミングにより細胞数に変化が生じる可能性もある。

A549 細胞による CULTEX 試験では、Aufderheide ら (2003) は、タバコ煙試験において

細胞曝露時にはセミコンフルエント⁷で実施し¹⁾、また、Fukano ら (2004) は、A549 細胞を 4×10^4 cells/insert (2 ml) で播種した 3 日後にタバコ煙試験を行った²⁾ことが報告されている。我々は、Auderheide らと同様にセミコンフルエントで試験に供し、さらに Fukano らよりも高濃度の細胞を播種しているが、データにバラツキが見られるため、播種濃度と細胞培養期間における細胞数濃度の安定性を調べる必要があると考えた。

このため、前章の試験と同様な播種条件に加え、同間隔の播種条件を設定し、さらに細胞数を高くして insert 内の細胞濃度を計測することとした。

2.1.2.2 試験方法

細胞は、これまでと同様 A549 細胞を使用した。細胞培養期間の違いによる細胞数濃度を把握するために、培養期間をもとに目標数濃度から逆算して一定濃度の細胞を播種し、細胞数を計測した。目標細胞数濃度を 1.5×10^6 cells/ml に設定した。CULTEX 試験用プレートにセットした insert 内に細胞を播種し、一定期間培養後、細胞数を計測した。

なお、目標数濃度に対する計算上の播種濃度は、表 2.1.2.1 に示すとおりである。

表 2.1.2.1 培養期間と播種濃度

培養期間	細胞播種濃度	目標細胞数濃度
2日	3.75×10^5 cells/ml	1.5×10^6 cells/ml
3日	1.88×10^5 cells/ml	1.5×10^6 cells/ml
4日	9.38×10^4 cells/ml	1.5×10^6 cells/ml
5日	4.69×10^4 cells/ml	1.5×10^6 cells/ml

2.1.2.3 結果および考察

各培養期間の実測細胞数濃度を Fig.2.1.2.1 に示す。いずれの培養期間でも、目標細胞数濃度の 1.5×10^6 cells/ml より大幅に細胞が増加していた。その原因としては、本細胞が約 22 時間に 1 回分裂という本来の計算予測結果よりもさらに速く分裂している可能性が考えられた。

また、培養期間が 3 日、4 日および 5 日間では、実測細胞数濃度では約 3.5×10^6 cells/ml 前後であり、比較的安定であった。一方、2 日間培養では細胞数濃度は約 2.7×10^6 cells/ml であり、他の培養期間に比し細胞数は少なかった ($P < 0.001$)。この理由として、2 日間培養では他の培養期間に比して、分裂が途中である細胞が多いという可能性が考えられた。

以上より、今後の CULTEX 試験は、A549 細胞の培養期間を 3~5 日間で、また、最終数濃度を 3.5×10^6 cells/ml で行うこととした。

⁷ セミコンフルエント [subconfluent]: 培養細胞が培養容器底面の 50~70%を覆った増殖状態。この増殖割合で供試されることが多い。サブコンフルエントともいう。

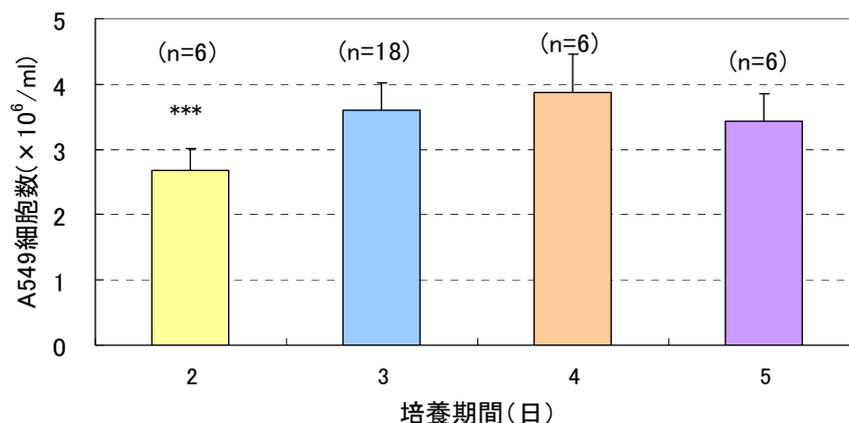


Fig. 2.1.2.1 培養期間の違いによる細胞数の変動

平均値±標準偏差で示す (n=6~18)。

*** : P<0.001 vs. 培養期間 3 日 (by Dunnett test)

2.1.2.4 小括

CULTEX 装置を用いた試験では、これまでに A549 細胞を用いて細胞評価を行ってきた。しかし、本装置を用いた試験での目標細胞数濃度は、経験上や計算上で求めていた。今回、我々は、試験結果の安定性向上と背景データをより強固にするために、試験で用いる細胞の数濃度を検討した。

その結果、培養期間は播種後 3~5 日間が最適であり、その時安定して得られる細胞数濃度は 3.5×10^6 cells/ml であることが判明した。

2.1.2.5 参考文献

- 1) Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D. An improved *in vitro* model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp. Toxic. Pathol.* 55:51-57, 2003.
- 2) Fukano Y, Ogura M, Eguchi K, Shibagaki M, and Suzuki M. Modified procedure of a direct *in vitro* exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke. *Exp. Toxic. Pathol.* 55:317-323, 2004.

2.1.3 CULTEX 装置を用いた純空気による圧力影響試験

2.1.3.1 目的

本試験では、これまでに実施してきた CULTEX 装置を用いたガス曝露試験の精度をより向上させるために、希釈トンネルや小型希釈器装着に起因する圧力変動による細胞への影響について検討した。

2.1.3.2 試験方法

1) CULTEX 装置の設置

純空気 (G3 レベル) のボンベと CULTEX 装置を接続した。また、細胞を収容したモジュール空間をできるだけクリーンな状態にするため、CULTEX 装置本体上部に HEPA フィルタ装置 (ピュアスペース ; PS-100N、アズワン (株)) とアイソレーションシート (クリーンベンチサンプラタイプ ; 800×600×650、アズワン (株)) を取り付け、クリーンベンチ機能をもたせた。さらに、その内部に温度計を取り付け、曝露排気温度とともに装置上部温度もモニターした。

2) CULTEX 装置および曝露細胞の準備

細胞と CULTEX 装置に Insert をセット後、速やかに純空気を細胞に曝露した (供給流量 : 8.3 SCCM、曝露時間 : 1 時間)。また、圧力は大気圧を 0 Pa として、±1,000 Pa、±100 Pa、0 Pa の 5 段階を設定した。これは、ディーゼルエンジン排気試験で想定される範囲内の圧力である。

3) 細胞毒性試験

2.1.1 項に準じた。ただし、ここでは作業の効率を考慮し曝露終了 22 時間後に WST-8 を添加した。

4) 遺伝子解析

【Total RNA 抽出】

Total RNA は、RNeasy Mini Kit (Cat.No. 74104, Qiagen) を用いて抽出した。すなわち、

- (1) 細胞に Buffer RLT (Buffer RLT 1 ml あたり 10 µl の 2-mercaptoethanol (2-ME) を添加した溶液) 350 µl/tube を加え、細胞を溶解してサンプルチューブに移した。
- (2) 70%エタノール 350 µl/tube を細胞溶解液に加え、よくピペッティングして混和した。
- (3) キットに付属している 2 ml Collection tube に RNeasy Mini Column を装着し、上限 700 µl のサンプルを添加した。
- (4) 8,000×g (10,000 rpm) で 15 秒間遠心し、collection tube 内の溶液を tube ごと廃棄した。
- (5) 350 µl/tube の Buffer RW1 を添加し、8,000×g (10,000 rpm) で 15 秒間遠心し、collection tube 内の溶液を廃棄した。
- (6) RNase-Free DNase Set (Cat.No. 79254, QIAGEN) より、10 µl の DNase I stock solution を 70 µl の Buffer RDD に添加し、転倒混和して得られた DNase I stock solution mix を 80 µl ずつ直接 RNeasy Mini Column 内のメンブラン上に添加し、20~30°C で 15 分間インキュベートした。
- (7) 再び、350 µl/tube の Buffer RW1 を添加し、8,000×g (10,000 rpm) で 15 秒間遠心し、Collection tube 内の溶液を廃棄し、Column を未使用の Collection tube に移した。
- (8) エタノールが添加されている Buffer RPE 500 µl/tube を添加し、8,000×g (10,000 rpm) で 15 秒間遠心し、Collection tube 内の溶液を廃棄した。

- (9) さらに、Buffer RPE 500 $\mu\text{l}/\text{tube}$ を再添加し、8,000 $\times\text{g}$ (10,000 rpm) で 2 分間遠心し、Collection tube 内の溶液を廃棄した。
- (10) RNeasy Mini Column をキット付属の 1.5 ml サンプルチューブに移し、30 $\mu\text{l}/\text{tube}$ の RNase-free water をメンブランに直接添加し、8,000 $\times\text{g}$ (10,000 rpm) で 1 分間遠心した。
- (11) チューブ内に得られた total RNA を、マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR 解析に供するまで -80°C に保存した。

【cDNA 合成】

以下の手順に従い、total RNA から cDNA を合成した。合成は、Super ScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Cat. 18080-051, Invitrogen) キットを使用した。すなわち、

- (1) 調製した total RNA 濃度は、260 nm と 280 nm の吸光度を測定することにより算出した。
- (2) 算出した total RNA 量に応じて、キット内の 50 μM Oligo (dt)₂₀ を 1 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、10 mM dNTP mix を 1 $\mu\text{l}/\text{tube}$ および DEPC 処理水を加えて合計 12 $\mu\text{l}/\text{tube}$ にし、混和した後、65 $^{\circ}\text{C}$ 10 分間インキュベートした。
- (3) 1 分間氷浴させた後、10 \times RT buffer (200 mM Tris-HCl (pH8.4)、500 mM KCl) を 2 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、25 mM MgCl₂ を 4 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、0.1 M DTT を 2 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、40 U/ μl RNaseOUTTM を 1 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、そして 200 U/ μl Super ScriptTM III RT を 1 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 混和し、計 10 $\mu\text{l}/\text{tube}$ の cDNA Synthesis Mix を (2) で作成した混合液に加え、軽く混和し、軽く遠心した。
- (4) 50 $^{\circ}\text{C}$ で 50 分間プレインキュベートした後、さらに、85 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間インキュベートし、酵素反応を停止させた。
- (5) 氷浴させた後、軽く遠心して反応液をチューブの底に集め、2 U/ μl RNase H を 1 μl 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 20 分間インキュベートし、リアルタイム PCR 解析に供するまで -20°C に保存した。

【リアルタイム PCR 解析】

cDNA の標的遺伝子に対する遺伝子発現を定量的に判断するために、以下の手順でリアルタイム PCR 解析を実施した。

(1) PCR 増幅

PCR 反応混合液 Master mix を表 2.1.3.1 に、また、評価した標的遺伝子とその遺伝子を増幅させるために必要な Primer の配列を表 2.1.3.2 に示す。検討した標的遺伝子は、DEP 中に多くその存在が確認されている PAH の曝露マーカーとして有用な指標である Cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1)^{4) 5)}、酸化ストレス⁸マーカーである Heme oxygenase-1 (HO-1)⁶⁾、炎症マーカーである Interleukin-1 beta (IL-1 beta)⁷⁾ である。これらは、DE および DEP の曝露により発現変動が確認されている代表的な遺伝子である。なお、内部標

⁸酸化ストレス [oxidative stress]: 生体の酸化反応と抗酸化反応とのバランスが崩れ、酸化反応側に傾く生体にとって好ましくない状態。細胞の DNA、細胞膜上のリン酸脂質、蛋白、糖質を傷害し、血管傷害を進行させる。

準⁹遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、発現量の細胞格差を補正した。

表 2.1.3.1 リアルタイム PCR 解析に用いる Master Mix

	μl/well
Master mix	
2x SYBR I	10
20μM Sense Primer	0.3
20μM Antisense Primer	0.3
DEPC-MQ	4.4
サンプル	
cDNA 1 ng/μl	5
Total	20

表 2.1.3.2 標的遺伝子とその Primer の配列

	Primer	Sequence		mer
GAPDH	Sense	5'- CACAGTCCATGCCATCACTG	-3'	20
	Antisense	5'- TACTCCTTGGAGGCCATGTG	-3'	20
CYP1A1	Sense	5'- GAACTGCTTAGCCTAGTCAACCT	-3'	23
	Antisense	5'- GGTAGCGAAGAATAGGGATGAACT	-3'	24
HO-1	Sense	5'- AGTCTTCGCCCCTGTCTACTT	-3'	21
	Antisense	5'- CTGCATGGCTGGTGTGTAGG	-3'	20
IL-1β	Sense	5'- CCCTAAACAGATGAAGTGCTCCT	-3'	23
	Antisense	5'- GTAGTGGTGGTCGGAGATTCG	-3'	21

PCR 解析は、iCycler IQ リアルタイム PCR 解析システム MC (No. 170-8740MC, BioRad Laboratories, Inc.) を使用し、Well Factor Plate (External) 法にて行った。

- [1] 前述のサンプルと PCR 反応溶液を 96 well プレート (PCR-96-RT、BM Bio) に 1 サンプルにつき 2 well 入れ、プレートにカバー (Optical Adhesive Covers, Part No. 4311971、ABI) をかけて、振盪後、1,500 rpm で 1 分間遠心した。
- [2] 10X External Well Factor Solution (BioRad Laboratories, Inc.) を滅菌蒸留水で 10 倍に希釈し、1 well あたり 20 μl を 96 well プレートに添加して Well Factor Plate を作成し、CCD カメラの補正を行った。
- [3] その後、PCR プレートをかけ、遺伝子の発現量を定量的に解析した。最後に、徐々に温度をあげ、Melt Curve から PCR 産物が単一なものであることを確認した。各サ

⁹内部標準法 [internal standard method]: 実際の検体の中に標準物質を入れ、同時に染色などを行い、測定し、標準物質を基準に算定する測定法。

イクルの条件は、表 2.1.3.3 に示す。

表 2.1.3.3 Well Factor Plate 法による PCR 増幅サイクル

Well Factor	Cycle 1		95°C	10 sec
			60°C	30 sec
	Cycle 2		60°C	45 sec
		Cycle 3		60°C
Change Well factor plate to PCR plate.				
PCR	Cycle 1	1×	95°C	15 min
		Cycle 2	50×	94°C
			55°C	30 sec
			72°C	30 sec
	Data collection and real-time analysis enabled.			
	Cycle 3	1×	95°C	1 min
	Cycle 4	40×	55°C	1 min
	Increase setpoint temperature after cycle 2 by 1°C			
Melt curve data collection and analysis enabled.				

(2) 遺伝子発現量比率の算出

標的遺伝子の発現比較は、内部標準遺伝子である GAPDH の発現量で補正し、対照群を 1 として遺伝子の発現比率を算出した。算出の方法は、増幅が指数関数的に起こり、一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold Cycle: C_T 値¹⁰) を求めた。

遺伝子発現サイクル差 (対 GAPDH) : $\Delta C_T = C_{T(\text{target})} - C_{T(\text{GAPDH})}$

遺伝子発現比率 (対 GAPDH) : $2^{-\Delta C_T}$

遺伝子発現比率 (対 control) : $2^{-\Delta C_T(\text{target})} / 2^{-\Delta C_T(\text{control (mean)})}$

(3) 統計処理

得られた値は、平均値±標準偏差で示した。3 群の比較のときは等分散性があるものとみなして Dunnett の多重比較検定を行い、また、2 群の比較のときは分散性を確認後、Student's *t* 検定を行い有意差を調べた。

2.1.3.3 結果および考察

1) モニタリング分析

表 2.1.3.4 に本試験での試験設定圧力と試験時の各温度を示した。設定圧力で温度と排気ライン圧での大きな変動はなかった。

¹⁰ **Ct [threshold Cycle] 値** : リアルタイム PCR 法を用いた解析で、一定の増幅産物量になるサイクル数のこと。本来、リアルタイム PCR では、任意の PCR プロダクトを得るのに要した PCR サイクル数から標的遺伝子のテンプレート量 (発現量) を計測するが、ターゲット遺伝子間および内部標準との増幅効率がほぼ等しいことを前提にした比較 Ct 法 ($\Delta/\Delta C_t$ 法) では各サンプルを段階希釈し内部標準遺伝子を含む各標的遺伝子に対する検量線を作成する必要がない。

表 2.1.3.4 CULTEX 装置における試験圧力と各温度

圧力 (Pa)	混合管圧力	曝露ガス温度 (°C)	装置上部温度計 (°C)	排気ライン圧 (kPa)
-1000	-1010.1 ± 34.8	30.05 ± 0.74	29.86 ± 0.42	-62.7 ± 0.5
-100	-100.1 ± 0.5	29.29 ± 0.46	29.26 ± 0.41	-62.4 ± 0.5
0	2.7 ± 2.8	28.97 ± 0.32	28.68 ± 0.36	-62.2 ± 0.4
+100	100.3 ± 0.8	28.95 ± 0.38	28.81 ± 0.29	-62.1 ± 0.4
+1000	992.4 ± 27.9	28.96 ± 0.21	28.59 ± 0.33	-62.1 ± 0.3

数値は、平均±標準偏差で示す (n=21-30)。

2) 細胞毒性試験

CULTEX 装置を用いて純空気を A549 細胞に 1 時間曝露して、圧力に対する細胞への影響を調べた。

結果を Fig. 2.1.3.1 に示す。大気圧を 0 Pa (対照群) として、-1,000 Pa、-100 Pa、+100 Pa、+1,000 Pa での細胞毒性試験を行ったが、生存率への影響は認められなかった。

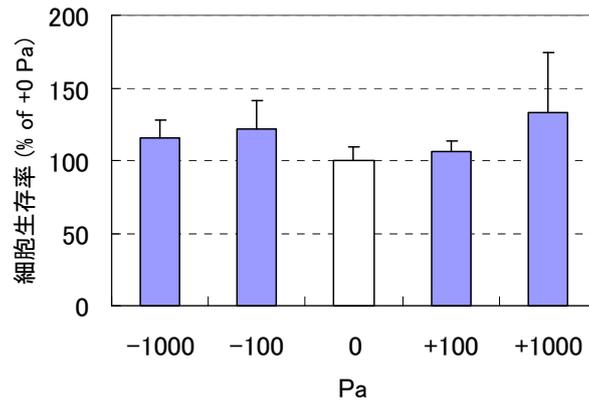


Fig. 2.1.3.1 純空気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の圧力変動
大気圧 (0 Pa) を 100% とし、平均値±標準偏差で示す (n=9)。

3) 遺伝子解析

圧力への影響を確認するために、細胞毒性試験に加え、前章と同様に 3 遺伝子 (CYP1A1, HO-1, IL-1 beta) のリアルタイム PCR 解析を行った。

その結果を Fig. 2.1.3.2 に示す。DEP 曝露マーカーや、酸化ストレスマーカー、炎症マーカーといわれるこれらの遺伝子の発現に影響は見られなかった。

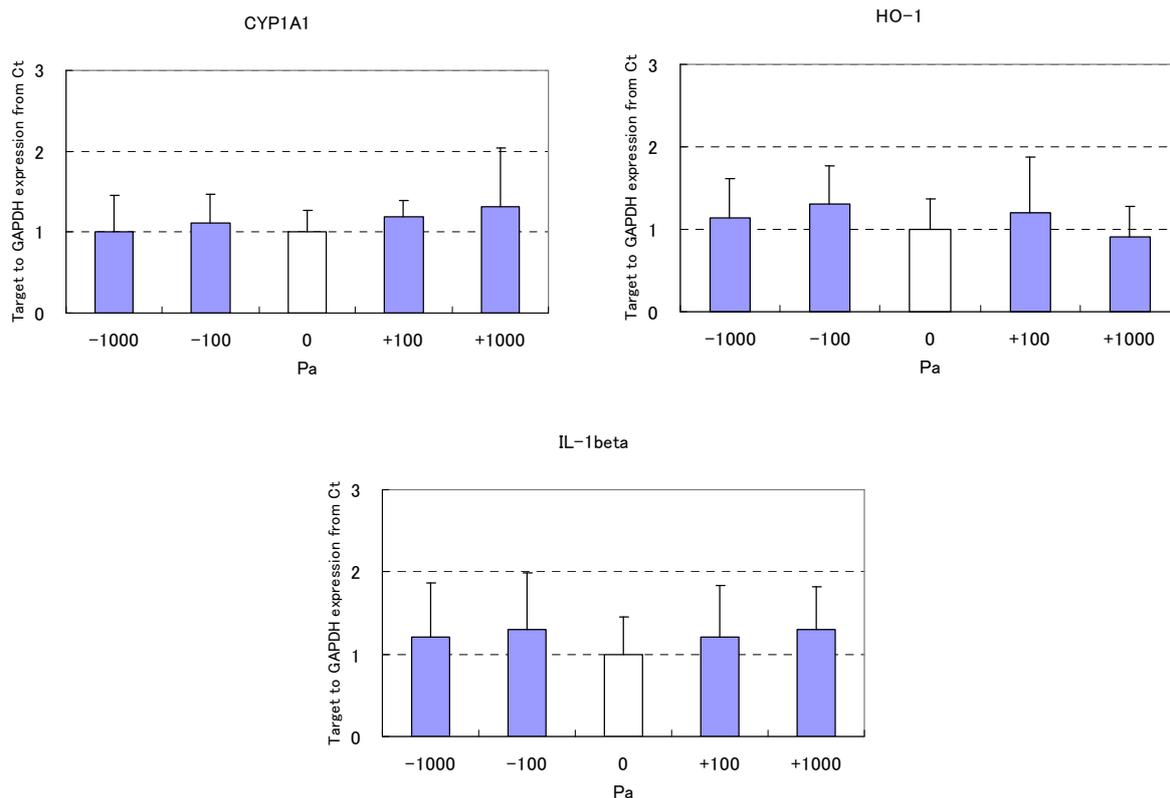


Fig. 2.1.3.2 純空気曝露した A549 細胞の遺伝子発現 (リアルタイム PCR 解析)

2.1.3.4 小括

本試験では、排気曝露試験を想定して、細胞が種々の圧力に対して影響を受けるか否かを調べた。排気を用いる試験では、希釈トンネルでの負圧や小型希釈器の正圧による影響が予想されるため、細胞に物理的に圧力をかけることで、その影響を細胞毒性試験や定量的遺伝子解析にて評価した。その結果、 $-1,000$ Pa から $+1,000$ Pa までの圧力をかけても、細胞生存率や各種遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。これらのことから、排気曝露試験で想定される圧力範囲内では、細胞毒性試験や遺伝子解析といった健康影響評価が可能であることが確認できた。

Li ら¹⁾は、呼吸換気による肺の過伸展により NF- κ B や AP-1 の活性を通じてサイトカイン、特に、IL-8 が放出されるというメカニズムを A549 細胞を用いた *in vitro* 試験で確認した。また、Manome ら²⁾は、重力、静水圧、伸展やずり応力などの機械的な力による細胞反応への影響を解明する為に、ヒト神経芽細胞腫細胞などを用いて 48 時間連続的な圧力 (20-100 psi) をかけた実験を行ったところ、静水圧は直接、哺乳類細胞に特異的な遺伝子発現を調節していることを報告した。これらは、生体に関わる種々の物理的影響について検討した報告であり、本試験のようにエンジンシステムで細胞試験評価が有用かどうかを確認した試験ではないため、圧力設定なども比較の対象とはならない。しかし、同様に圧力による遺伝子発現やサイトカイン産生による影響を評価した本試験の結果では、圧力の細胞に対する影響は見られなかった。

このことにより、新規開発エンジンシステムに対する健康影響は本システムを用いて評

価可能であることが示され、動物を用いた吸入曝露試験の結果との対比や総合評価に活用できると考えている。

2.1.3.5 参考文献

- 1) Li LF, Ouyang B, Choukroun G, Matyal R, Mascarenhas M, Jafari B, Bonventre JV, Force T, Quinn DA. Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH2-terminal and nuclear factor-kappaB-inducing kinases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285(2):L464-475, 2003.
- 2) Manome Y, Saeki N, Yoshinaga H, Watanabe M, Mizuno S. A culture device demonstrates that hydrostatic pressure increases mRNA of RGS5 in neuroblastoma and CHC1-L in lymphocytic cells. *Cells Tissues Organs.* 174(4):155-161, 2003.

2.1.4 CULTEX 装置を用いた排気曝露試験 1

2.1.4.1 目的

生体や培養細胞にとって厳しい曝露条件 (PM rich あるいは NO₂ rich) を設定することで CULTEX 装置が細胞曝露装置として有用であるかについて検討した。

2.1.4.2 試験方法

1) ディーゼルエンジンの運転条件および排気の性状

エンジンは、長期規制対応エンジンをダイナモ上で定常運転 (ノーマルマフラー付き、あるいは CR-DPF^{11,12}付き (Continuously Regenerating Diesel Particulate Filter)、回転数 1,000 rpm、負荷 745 Nm、CVS 流量 40 m³/min) し、得られた排気の一部を希釈トンネルに導入した。Aufderheide らの文献^{1) 2)}を参考に、希釈比を CO₂ ベースで 1/100、1/10 に調整した後、希釈トンネルと接続させた CULTEX 装置に希釈排気を送り込んだ。より PM rich および NO₂ rich な排気条件を作出するために、PM rich および NO₂ poor な排気条件に NO₂ を人為的に添加した。

供試エンジン (表 2.1.4.1)、ダイナモメータ (表 2.1.4.2) の諸元および燃料性状 (表 2.1.4.3) を以下に示す。

¹¹ **CR-DPF** [Continuously Regenerating Diesel Particulate Filter]: ジョンソン・マッセイ社製。フィルターの上流側に配置した酸化触媒により生成させた NO₂ を用いて、下流側のフィルター上で、捕集した PM を比較的低温で連続的に酸化除去しフィルターを再生する方式である。酸化触媒には、白金 (Pt) 系の触媒が担持されている (Pt 量は通常の酸化触媒よりも多い)。

¹² **DPF** [Diesel Particulate Filter] (ディーゼル微粒子除去装置): エンジンの排気系に装着したコーディエライト製等のフィルターにより、自動車の排気ガス中の PM を捕集し、電熱線や触媒の作用等により PM を除去する装置。

表 2.1.4.1 エンジン諸元

適用排ガス規制	長期規制 (1999)
気筒数	直列6気筒
内径×行程	125×125 (mm)
排気量	9.203 (L)
燃料噴射装置	コモンレール式
吸気方式	TC-IC
EGR	無
排ガス後処理装置	無
定格出力	243 kW / 2200 rpm
最大トルク	1324 Nm / 1400 rpm
使用燃料	市販JIS2号軽油 (硫黄分：6 wtppm)

表 2.1.4.2 ダイナモメータ諸元

種類	DCDY
吸収動力	370 (kW)
吸収軸トルク	1765 (Nm)
回転速度	4000 (rpm)
回転方向	可逆
制御方式	定トルク, 定速度, 開度

表 2.1.4.3 燃料性状

		測定値
外観		良好
残留炭素分 (10%残油)	重量%	0.01
セタン指数 (JIS K2280)		58.1
密度 (15°C)	g/cm ³	0.8276
蒸留試験 (90%留出温度)	°C	343.0
引火点 (PM)	°C	72.0
動粘度 (30°C)	mm ² /s	3.743
流動点	°C	-15
目詰まり点 (CFPP)	°C	-9
硫黄分	重量%	0.0005
総発熱量 (推定値)	J/g	45820

2) CULTEX 装置の設置

2.1.1 項に準じた。

また、ガス状成分のみを細胞に曝露するため、希釈トンネルと接続したチューブの途中に設置したフィルタ (TX40HI-20-WW, Pallflex Products.Corp.) で粒子状物質を除去する方法も試みた。細胞を収容したモジュール空間をできるだけクリーンな状態にする目的で、CULTEX 装置本体上部に HEPA フィルタ装置 (ピュアスペース ; PS-100N、アズワン (株)) とアイソレーションシート (クリーンベンチサンプラタイプ ; 800×600×650、アズワン (株)) を取り付け、クリーンベンチ機能をもたせた。さらに、その内部に温度計を取り付け、曝露排気温度とともに装置上部温度もモニターした。

3) 細胞と CULTEX 装置の準備

2.1.1 項に準じた。ただし、最終細胞数濃度を 3.5×10^6 cells/ml に設定し、遺伝子解析に必要な遺伝子量を増やすことで反応のバラツキをできるだけ少なくするように改良した。

細胞と CULTEX 装置に Insert をセット後、速やかに表 2.1.4.4 の条件の希釈排気を細胞に曝露した (供給流量 : 8.3 SCCM、曝露時間 : 1 時間)。曝露は、希釈空気 (Back Ground Air:

BG) の試験を行ったあと、順次、高希釈排気から行った。

表 2.1.4.4 試験エンジン排気条件と評価項目

	設定条件		後処理装置	回転数-負荷	+NO ₂	希釈比		評価項目
	PM	NO ₂						
試験1日目	poor	rich	CR-DPF	40%-80%	—	BG	1/100 1/10	細胞毒性試験および遺伝子解析
試験2日目	rich	rich	マフラー	40%-80%	添加	BG	1/100 1/10	細胞毒性試験および遺伝子解析
試験3日目	rich	poor	マフラー	40%-80%	—	BG	1/100 1/10	細胞毒性試験および遺伝子解析
試験4日目	rich	poor	マフラー	40%-80%	—	BG	1/10ガス 1/10	細胞毒性試験および遺伝子解析

4) 細胞毒性試験

2.1.3.項に準じた。ただし、吸光度測定には、プレートリーダー (Model 680 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いた。

5) 遺伝子解析

以下の手順で細胞から RNA¹³を抽出し、cDNA を合成した。

【Total RNA 抽出】

2.1.3 項に準じた。

【リアルタイム PCR 解析用の cDNA 合成】

2.1.3 項に準じた。

【リアルタイム PCR 解析】

2.1.3 項に準じた。

【DNA マイクロアレイ解析】

(1) マイクロアレイ解析用の cDNA 合成

[1] total RNA を RNA6000 Nano LabChip[®] Kit (No.5065-4776, Agilent Technologies) を用いて、マイクロチップ型電気泳動装置 (Agilent 2100 bioanalyzer, Agilent Technologies) にて品質を確認した。

[2] 5 µg の total RNA を 6.5 µl/tube に分注し、Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (No. 5184-3523, Agilent Technologies) 内の T7 Promoter Primer を 5 µl/tube 加え、さらに nuclease-free 水を加えて全反応量を 11.5 µl/tube にした。

[3] Primer および template を変性させるために 10 分間 65°C でインキュベート後、5 分間氷浴した。

[4] 5X First Strand Buffer を 4.0 µl/tube と、2.0 µl/tube の 0.1 M DTT と、1.0 µl/tube の 10 mM

¹³ RNA [Ribonucleic Acid] (リボ核酸) : リボースを糖成分とする核酸。塩基は、基本的にはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルのいずれかだが、例外も存在する

dNTP mix と、1.0 µl/tube の MMLV RT と、0.5 µl/tube の RNaseOUT を室温にてピペッティングによりゆっくり混和したものを cDNA Master Mix とし、各チューブに 8.5 µl 加えた。

[5] 40°C で 2 時間、さらに 65°C で 15 分間インキュベートして MMLV-RT を不活性化させ、その後、5 分間氷浴させて cDNA を得た。

(2) Cy3-/Cy5-標識 cRNA¹⁴の調製

以下の手順で Cy3-/Cy5-標識 cRNA を調製した。

[1] 対照群のチューブに 2.4 µl cyanine 3-CTP (10 mM) を、また、曝露群のチューブに 2.4 µl cyanine 5-CTP (10 mM) を加えた。

[2] Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit 内の 4X Transcription Buffer を 20 µl/tube、0.1 M DTT を 6 µl/tube、NTP Mix を 8 µl/tube、50% PEG (polyethylene glycol) を 6.4 µl/tube、RNaseOUT を 0.5 µl/tube、Inorganic Pyrophosphatase を 0.6 µl/tube、0.8 µl/tube の T7 RNA Polymerase を混和し、室温にてピペッティングによりゆっくり混和したものを転写 Master Mix とし、それらを各チューブに 57.6 µl 加えた。なお、蛍光色素である cyanine 3-CTP および cyanine 5-CTP を扱うときは光からサンプルを保護した。

[3] その後、40°C で 2 時間ウォーターバス内でインキュベートして Cy3-/Cy5-標識 cRNA を調製した。

(3) 増幅 cRNA の精製

前述の RNeasy Mini Kit を用いて、以下の手順により増幅した cRNA を精製した。

[1] cRNA に 20 µl/tube の nuclease free-water を加え、全量 100 µl/tube にした後、キット内の Buffer RLT を 350 µl/tube 加え、完全に攪拌した。

[2] エタノール (純度 96-100%) を 250 µl/tube 加え、ピペッティングにより完全に攪拌した。

[3] 700 µl の cRNA を 2 ml の収集チューブの RNeasy mini Column に移し、13,000 rpm で 30 秒間遠心し、collection tube 内の溶液を廃棄し、Column を未使用の Collection tube に移した。

[4] 500 µl/tube の buffer RPE を Column に加え、13,000 rpm、30 秒間遠心し、collection tube 内の溶液を廃棄した。

[5] 再び、500 µl/tube の buffer RPE を Column に加え、13,000 rpm、60 秒間遠心し、Collection tube ごと溶液を廃棄した。

[6] RNeasy Mini Column をキット付属の 1.5 ml サンプルチューブに移し、RNeasy filter membrane の中に直接 30 µl/tube RNase-free water を加え 60 秒間静置した後、13,000 rpm、30 秒間遠心し、これを 2 度繰り返して cRNA を精製した。

[7] 得られた精製 cRNA は、前述と同様の RNA6000 Nano LabChip[®] Kit を用いて、マイクロチップ型電気泳動装置にて品質を確認した。

¹⁴ cRNA [complementary RNA] : mRNA に相補的な塩基配列からなる RNA。

[8] 精製 cRNA は、測定に供するまで -80°C に保存した。

(4) ハイブリダイゼーション¹⁵およびオリゴ cDNA マイクロアレイ

以下の手順で、ハイブリダイゼーションおよびオリゴ cDNA マイクロアレイを実施した。

- [1] 精製した Cy3-標識 cRNA と Cy5-標識 cRNA を等量混和し、Agilent In situ Hybridization kit-plus (No. 5184-3568, Agilent Technologies) にある 50 $\mu\text{l}/\text{tube}$ の 10 \times Control targets および Nuclease-free 水を混和し、2 \times target solution として 240 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 作製した。
- [2] 10 $\mu\text{l}/\text{tube}$ の 25X fragmentation buffer をよく混和し、遮光して 60°C 30 分間インキュベートした。
- [3] フラグメンテーションを停止させるために、2X hybridization buffer (In situ Hybridization kit) を 250 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 添加し、ピペッティングによりよく混和したものをハイブリダイゼーション溶液とした。
- [4] Human Whole Genome Oligo Microarray Kit (No. G4112-60510, Agilent Technologies) の Oligo Microarray と Gasket slide kit (No. G2534-60003, Agilent Technologies) の Gasket Slide との間にハイブリダイゼーション溶液 490 $\mu\text{l}/\text{slide}$ を封入し、マイクロアレイハイブリダイゼーションチャンバー (No. G2534A, Agilent Technologies) にセットし、ハイブリダイゼーション用恒温槽 (HL-2000 HybriLinker, UVP Laboratory Products) で 60°C 、4 rpm で Hybridize させた。
- [5] 17 時間後、ハイブリダイゼーションチャンバーから Oligo microarray を取り出し、洗浄した。
- [6] 洗浄したオリゴ cDNA マイクロアレイは、DNA チップ解析装置 ScanArrayTM, Express, Microarray Scanner (Packard BioScience, BioChip Technologies) にて赤色波長 633 nm、緑色波長 543 nm で読み込み、画像解析ソフト ScanArray Express, Microarray Analysis System ver.2.1 (PerkinElmerTM) を用いて画像化した。
- [7] 得られた画像から遺伝子発現解析ソフト ImaGene[®] ver.6.0.1 Standard ver. (BioDiscovery, Inc.) や GeneSpring[®] ver.7.2 (Silicon Genetics) を用いて、蛍光強度を数値化し、補正した。遺伝子発現の評価は Microsoft Excel XP (Microsoft) を用いて行った。

(5) 統計処理

DNA マイクロアレイ法では、遺伝子発現比率のバラツキが 0.67~1.5 倍の間で生じることが多いため、2 倍以上もしくは 0.5 倍以下に発現が変動した場合に「統計学的に有意差がある」と一般的に認知されている。従って、本試験でもこの判定基準を採用した。

6) 多変量解析

曝露した排気と健康影響評価指標との間にどのような相関関係があるのかをノンパラメトリック検定の Spearman の順位相関係数(ρ)で検討した。

¹⁵ ハイブリダイゼーション [hybridaizaition]: 相補的な配列をもつ DNA は互いに結合する。短い合成 DNA 配列に蛍光色素などのプローブを標識してハイブリダイズ(複製)させることによって相補的な遺伝子配列の有無を知ることが出来る。

2.1.4.3 結果および考察

1) モニタリング分析

エンジン条件および排気成分濃度を表 2.1.4.5 と表 2.1.4.6 に示す。試験は 4 日間連続して行った。また、粒子の影響を検討するため、最終日には希釈比 1/10 にフィルタをかけて粒子除去した条件と、粒子除去しない 2 条件を行った。PM 以外のガス濃度は、いずれの条件も大気汚染に係わる環境基準値を下回っていた。

表 2.1.4.5 エンジン希釈

後処理装置		CR-DPF		マフラー	
希釈比		1/100	1/10	1/100	1/10
回転数	[rpm]	1000	1000	1000	1000
トルク	[Nm]	744	742	746	744
希釈比	CO ₂ ベース	98	10	97	10

表 2.1.4.6 曝露希釈排気および粒子濃度

後処理装置			BG	CR-DPF		Normal	
希釈比				1/100	1/10	1/100	1/10
ガス	CO	[ppm]	0.28 ± 0.11	0.21 ± 0.01	0.11 ± 0.01	1.35 ± 0.07	10.70 ± 0.11
	NO _x	[ppm]	0.03 ± 0.02	8.77 ± 0.10	85.58 ± 0.29	9.08 ± 0.23	87.16 ± 1.13
	NO	[ppm]	0.01 ± 0.02	3.95 ± 0.12	39.75 ± 0.42	8.85 ± 0.27	85.13 ± 1.27
	NO ₂	[ppm]	0.02 ± 0.01	4.82 ± 0.08	45.83 ± 0.21	0.23 ± 0.04	2.19 ± 0.27
	HC	[ppmC]	1.99 ± 0.03	2.22 ± 0.04	2.15 ± 0.04	2.50 ± 0.03	6.27 ± 0.14
	CO ₂	[%]	0.04 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.85 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.84 ± 0.01
	SO ₂	[ppb]	9.20 ± 1.99	2.69 ± 0.33	3.85 ± 1.83	7.30 ± 2.77	25.07 ± 2.24
	Formaldehyde	[ppb]	37.45 ± 7.86	42.19 ± 0.55	27.07 ± 0.58	49.32 ± 10.97	116.22 ± 1.99
	Acetaldehyde	[ppb]	36.91 ± 9.67	30.44 ± 2.63	54.38 ± 6.54	37.10 ± 7.16	55.65 ± 5.41
	Acrolein	[ppb]	ND	ND	ND	ND	ND
PM	[mg/m ³]	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.84 ± 0.02	
	(10~392 nm) [個/cm ³]	44 ± 32	426 ± 87	3416 ± 98	101752 ± 1122	1122940 ± 44448	

CR-DPF 条件は日内平均で、その他の条件は日間平均で示した（平均±標準偏差）。

粒子の個数濃度分布を Fig. 2.1.4.1 に示す。CR-DPF では各希釈条件ともにモード径が約 90 nm に分布し、また、ノーマルマフラーでは各希釈条件ともにモード径が約 60 nm に分布しており、ほぼ均一な個数分布にて希釈されていることが確認された。

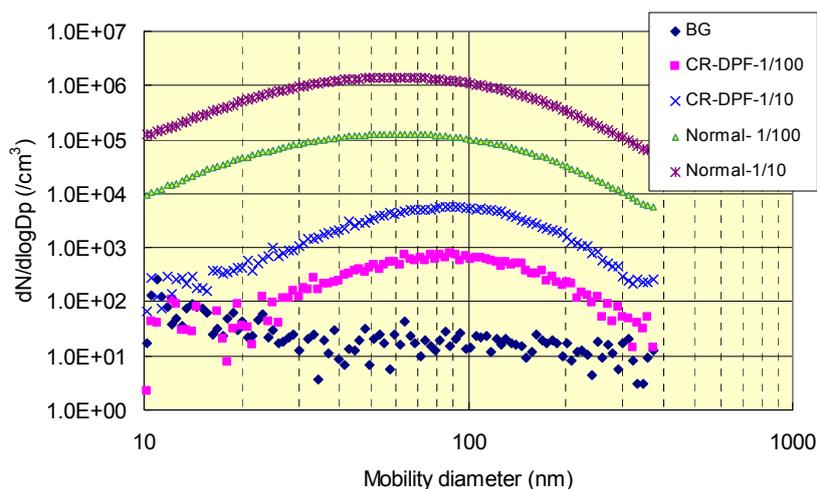


Fig. 2.1.4.1 各希釈条件の粒子個数分布
データは日間平均値で示した (n=2~8)。

なお、今回の PM および NO₂ の曝露条件を表 2.1.4.7 に整理した。エンジンの回転数-負荷条件は全て同一とし、試験 1 日目は、CR-DPF を装着してできるだけ PM 濃度が低く、かつ NO₂ 濃度が高くなるように設定した。試験 2 日目から 4 日目までは、ノーナルマフラーを用いて PM 濃度ができるだけ高くなるように設定した。さらに、試験 2 日目では、NO₂ を人為的に添加して NO₂ 濃度も高くなるように設定した。NO₂ 濃度の付加目標値は、1/100 希釈排気のとときに 10 ppm、1/10 希釈排気のとときに 100 ppm であったが、実際はそれぞれ 4.8 ppm、45.8 ppm であった。試験 4 日目は前章の試験と同様に、希釈トンネルと CULTEX 装置を接続するチューブにフィルタをかけて粒子を除去した試験も行った。

表 2.1.4.7 曝露希釈排気 NO₂ および粒子濃度

	試験条件		後処理装置	回転数-負荷	+NO ₂	希釈比	希釈ガスおよび粒子濃度		添加濃度
	PM	NO ₂					PM [mg/m ³]	NO ₂ [ppm]	+NO ₂ [ppm]
試験1日目	poor	rich	CR-DPF	40%-80%	-	1/100	0.07	4.8	-
						1/10	0.10	45.8	-
試験2日目	rich	rich	マフラー	40%-80%	+	1/100	0.10	0.2	8.6
						1/10	0.82	2.3	78.5
試験3日目	rich	poor	マフラー	40%-80%	-	1/100	0.09	0.3	-
						1/10	0.85	2.4	-
試験4日目	rich	poor	マフラー	40%-80%	-	1/10ガス	0.01	0.1	-
						1/10	0.84	1.9	-

データは日内平均で示した。

2) 細胞毒性試験

CULTEX 装置を用いて各種希釈ディーゼル排気を A549 細胞に 1 時間曝露した。細胞に曝露した希釈排気の温度は、31.2±2.5℃ (平均値±標準偏差) であった。また、装置上部温

度は $30.8 \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ であった。

まず、細胞毒性に日間変動があるか否かを BG で比較したが、大きな日間変動は認められなかった。(Fig. 2.1.4.2)。

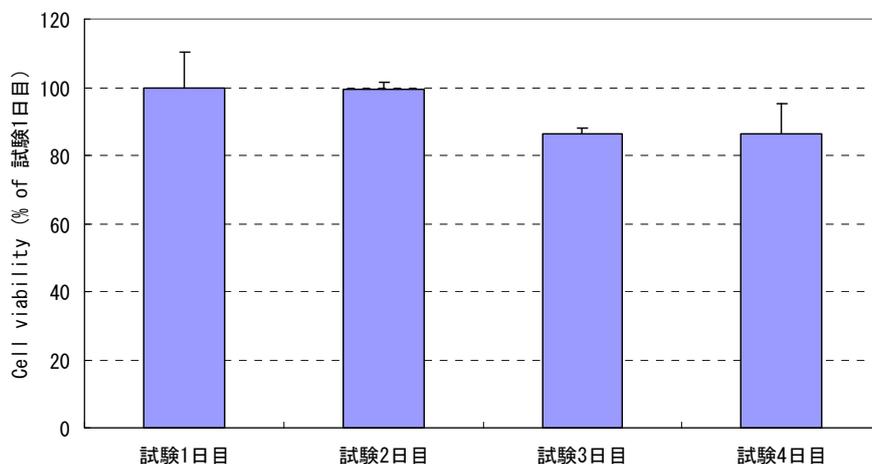


Fig. 2.1.4.2 BG を曝露したときの A549 細胞の細胞生存率
第 1 日目を 100% とし、平均値 \pm 標準偏差で示す (n=3)。

細胞毒性試験では、IC50 (細胞生存率を 50% に抑制する曝露濃度) で細胞毒性を評価するのが一般的であるので、ここでも IC50 を算出して比較した (Fig. 2.1.4.3)。ただし、排気は複合物質であるので、IC50 には排気の CO₂ ベースの希釈比を用いた (高希釈ほど IC50 値は小さくなり、IC50 値が小さいほど細胞毒性が強いと判断する)。

表 2.1.4.8 に IC50 値を示す。本試験条件において、試験 2 日目に行った PM rich および NO₂ rich 条件で最も細胞毒性が強く認められた (IC50 値: 1/14)。一般的に NO₂ の毒性は強いと認識されており、van Bree ら (2000) による 10.6 ppm の NO₂ ラット曝露試験でも肺組織での細胞傷害が報告されている¹⁾。また、NO₂ 曝露は DEP 抽出物による肺癌の発生を促進するという報告もある²⁾。さらに、この条件では、試験終了後に細胞が Insert 底面から剥がれ浮遊しているのが確認された。このことは、細胞が曝露により死んで剥がれ落ちてしまったことを示しており、細胞毒性の強さを伺わせた。

さらに、試験 1 日目に行った PM poor および NO₂ rich 条件でも強い細胞毒性が認められたことから、細胞毒性は PM よりも NO₂ に強く影響を受けている可能性が示唆された。しかしながら、試験 4 日目に行った希釈比 1/10 での粒子除去した条件では、細胞毒性影響は見られなかった。

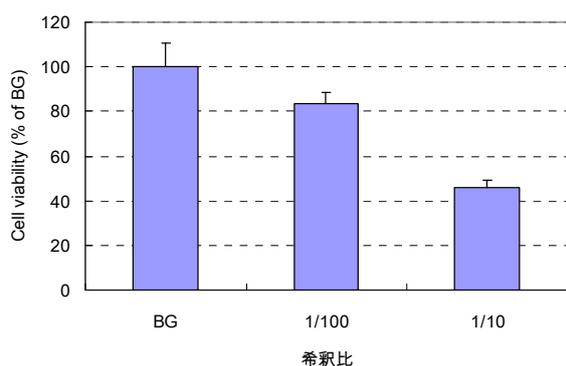
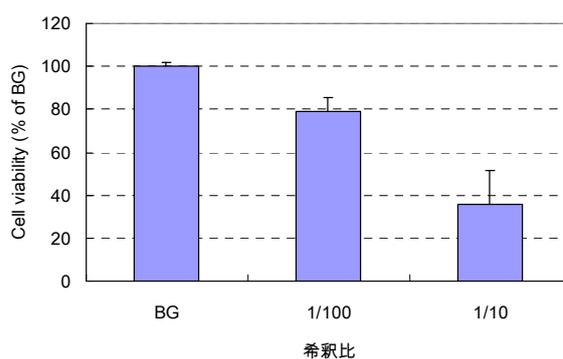
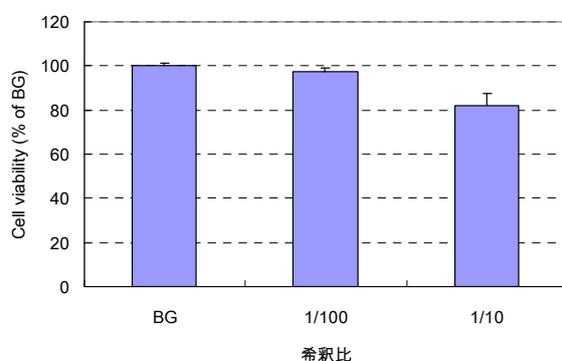
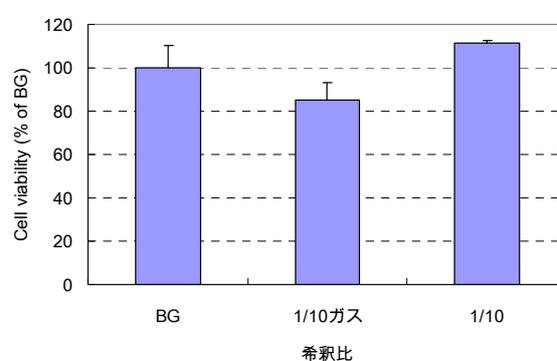
(A) PM poor, NO₂ rich(B) PM rich, NO₂ rich(C) PM rich, NO₂ poor(D) PM rich, NO₂ poor

Fig. 2.1.4.3 ディーゼル排気を曝露した A549 細胞の細胞生存率
 (A)は CR-DPF、(B) から (D) はノーマルマフラーを使用した。さらに
 (B) では、CULTEX 装置に NO₂ ボンベを接続し、NO₂ ガスを添加した。
 BG を 100% とし、平均値±標準偏差で示す (n=3)。

表 2.1.4.8 細胞毒性試験から算出された曝露排気の IC50 (CO₂ 希釈比ベース)

	設定条件		IC50
	PM	NO ₂	
試験1日目	poor	rich	1/11
試験2日目	rich	rich	1/14
試験3日目	rich	poor	>1/10

3) 遺伝子解析

CULTEX 装置を用いて、種々のディーゼル排気を A549 細胞に 1 時間曝露した。

なお、試験 2 日目の PM rich、NO₂ rich 条件の 1/10 希釈排気では、死滅した細胞が多かったため、遺伝子解析用のサンプリングは出来なかった。

(1) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ上には 41,676 のヒト遺伝子が搭載されているが、そのうち、解析した 7 サンプルに共通して発現した遺伝子数は 2,552 であり、全体の 6.1% に過ぎなかった。

各曝露条件での遺伝子発現のバラツキを Fig. 2.1.4.4 に示す。前章で述べた様に、グラフは対照群に対する割合を示しており、縦軸の 1 を基準として 1 よりも大きい数値の遺伝子は発現が亢進したことを、反対に 1 よりも小さい数値の遺伝子は発現が減少したことを示している。

試験 1 日目から 3 日目において、1/100 希釈排気より 1/10 希釈排気でバラツキの変化が大きかった。とくに、試験 2 日目の PM rich および NO₂ rich 条件の 1/100 希釈排気では、他の条件での 1/100 希釈排気に比べてバラツキの変化が大きかった。さらに、試験 4 日目の 1/10 の除粒子および全ガスの条件では、粒子除去したものより全ガスの方がバラツキの変化は大きかった。

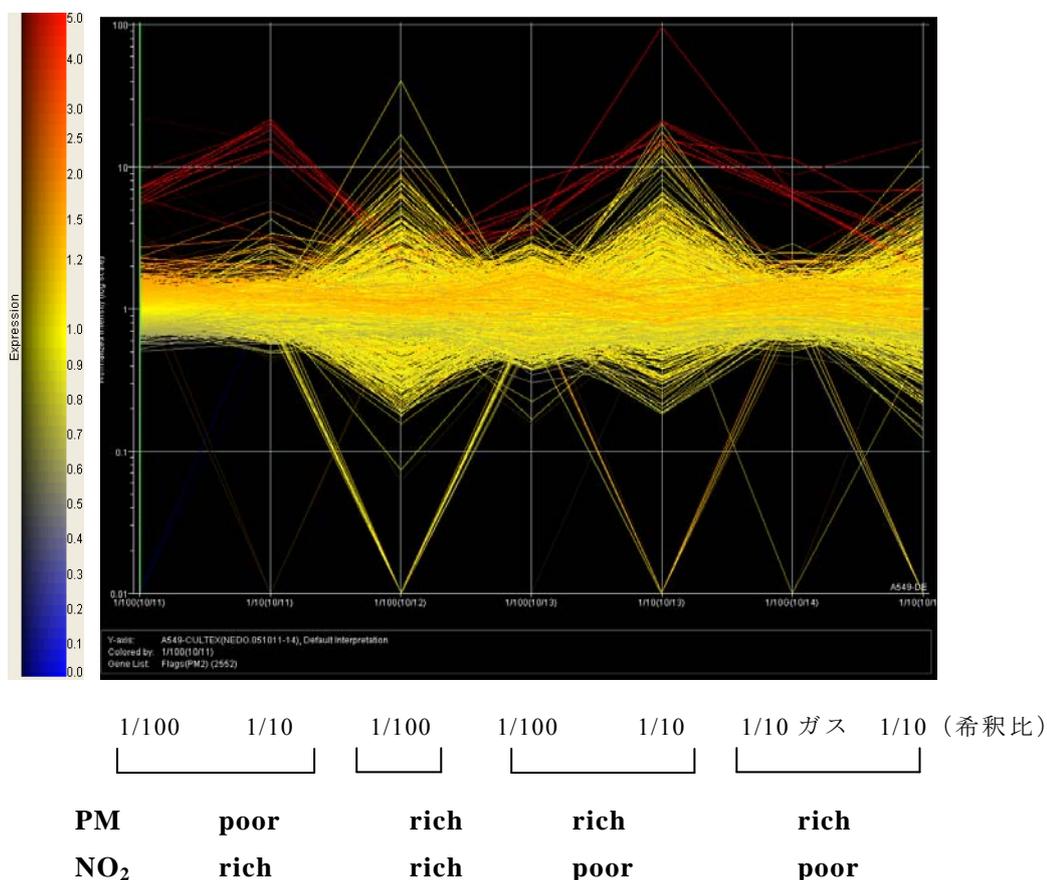


Fig. 2.1.4.4 ディーゼル排気曝露された A549 細胞の遺伝子発現変化 (マイクロアレイ解析)

これらはグラフの目視判断であるので、次に遺伝子発現変動の群差について、バラツキを示す SD (標準偏差) を求めて定量的に検討した。2 倍以上もしくは 0.5 倍以下に発現が

有意に変動した遺伝子数を、表 2.1.4.9 に示す。

試験 1 日目の PM poor、NO₂ rich 条件では、いずれの希釈比でも変化した標的遺伝子数は他に比べて少ない傾向にあった。

試験 2 日目の PM rich、NO₂ rich 条件での 1/100 希釈排気と、試験 3 日目の PM rich、NO₂ poor 条件での 1/10 希釈排気で SD 値が高く、有意な変動を示した遺伝子が多かった。

全体的には、1/100 希釈排気より 1/10 希釈排気での SD 値が大きかった。さらに、7 サンプル共通で 2 倍以上に発現変動した遺伝子の種類を表 2.1.4.10 に記載したが、その中には発癌に関する遺伝子や免疫に関与する遺伝子が含まれていた。一方、7 サンプル共通で 0.5 倍以下の発現変動が認められた遺伝子は認められなかった。

また、表 2.1.4.11 から表 2.1.4.15 に、各曝露条件下で発現量の亢進した遺伝子を上位列挙した。

PM poor および NO₂ rich 条件下では、細胞分裂に関わる遺伝子や、炎症に関与する遺伝子の発現亢進が確認された(表 2.1.4.11)。また、希釈比 1/10 を中心とした比較を行ったが、それでも上位 10 位までの遺伝子のほとんどが同条件での希釈比 1/100 よりも発現量が亢進していた。

PM rich および NO₂ rich 条件下では、核タンパク質遺伝子や発癌に関与する遺伝子の発現亢進が確認された(表 2.1.4.12)。

PM rich および NO₂ poor 条件(試験 3 日目)下では、細胞骨格や炎症に関与する遺伝子の発現亢進が確認された(表 2.1.4.13)。

PM rich および NO₂ poor 条件(試験 4 日目)下の希釈比 1/10 のガス曝露では、DNA 合成など細胞分裂に関与する遺伝子や免疫応答に関与する遺伝子の発現亢進が確認された(表 2.1.4.14)。また、連続して行った希釈比 1/10 曝露でも、同様な遺伝子の発現亢進が確認された(表 2.1.4.15)。

表 2.1.4.9 マイクロアレイ解析による A549 細胞の遺伝子発現変動数

	設定条件		希釈比	Up		Down		発現比率のばらつき (SD)
	PM	NO ₂		(×2~)	(%)	(×~0.5)	(%)	
試験1日目	poor	rich	1/100	33	(1.3%)	2	(0.1%)	0.63
			1/10	38	(1.5%)	6	(0.2%)	1.05
試験2日目	rich	rich	1/100	157	(6.2%)	169	(6.6%)	1.17
			1/10	ND		ND		ND
試験3日目	rich	poor	1/100	82	(3.2%)	71	(2.8%)	0.46
			1/10	248	(9.7%)	79	(3.1%)	2.41
試験4日目	rich	poor	1/10ガス	27	(1.1%)	4	(0.2%)	0.44
			1/10	150	(5.9%)	89	(3.5%)	0.72

ND: Not Data

表 2.1.4.10 7 サンプル共通して 2 倍以上発現亢進が認められた遺伝子
(マイクロアレイ解析)

PM NO ₂ 希釈比	poor		rich	rich		rich		Gene Name
	rich	rich	rich	poor		poor		
	1/100	1/10	1/100	1/100	1/10	1/10ガス	1/10	
	7.02	13.14	3.17	3.62	96.92	6.56	6.91	ALU5_HUMAN (P39192) Alu subfamily SC sequence contamination warning entry, partial (6%)
	9.31	19.09	2.48	4.64	20.61	8.68	15.38	N47124 yy53b06.r1 Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP Homo sapiens cDNA clone IMAGE:277235 5', mRNA sequence
	6.44	21.65	2.16	5.17	16.92	6.15	2.02	Unknown
	7.14	20.21	2.71	5.31	14.16	6.93	3.05	Homo sapiens CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen) (CD86), transcript variant 2, mRNA
	7.18	16.00	2.27	7.76	15.43	11.32	3.75	C40201 artifact-warning sequence (translated ALU class C) - human {Homo sapiens;} , partial (11%)

表 2.1.4.11 PM poor および NO₂ rich 条件下での希釈比 1/10 における
遺伝子発現の上位

PM NO ₂ 希釈比	poor		rich	rich		rich		Gene Name
	rich	rich	rich	poor		poor		
	1/100	1/10	1/100	1/100	1/10	1/10ガス	1/10	
上位1位	6.44	21.65	2.16	5.17	16.92	6.15	2.02	Unknown
上位2位	6.04	20.47	2.19	4.06	14.88	5.99	1.90	Homo sapiens vacuolar protein sorting protein 18 (VPS18), mRNA
上位3位	7.14	20.21	2.71	5.31	14.16	6.93	3.05	Homo sapiens CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen) (CD86), transcript variant 2, mRNA
上位4位	9.31	19.09	2.48	4.64	20.61	8.68	15.38	N47124 yy53b06.r1 Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP Homo sapiens cDNA clone IMAGE:277235 5', mRNA sequence
上位5位	5.60	18.39	2.25	3.62	20.22	6.21	1.91	Homo sapiens iroquois homeobox protein 5 (IRX5), mRNA
上位6位	7.18	16.00	2.27	7.76	15.43	11.32	3.75	C40201 artifact-warning sequence (translated ALU class C) - human {Homo sapiens;} , partial (11%)
上位7位	22.47	14.62	2.37	3.71	9.44	5.18	1.98	Unknown
上位8位	7.02	13.14	3.17	3.62	96.92	6.56	6.91	ALU5_HUMAN (P39192) Alu subfamily SC sequence contamination warning entry, partial (6%)
上位9位	5.41	12.84	1.97	3.38	20.92	6.59	2.96	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (SMARCA4), mRNA
上位10位	5.05	9.19	1.18	0.79	1.98	1.00	0.83	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 32 (C17orf32), mRNA
上位11位	2.73	5.85	2.17	1.23	0.42	0.83	0.01*	Homo sapiens squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 2 (SART2), mRNA
上位12位	2.31	4.85	1.95	1.46	2.76	1.92	1.03	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686K2237 (from clone
上位13位	0.86	4.27	0.99	1.04	1.11	1.06	1.31	Unknown
上位14位	0.95	3.38	2.33	1.03	1.52	1.26	1.68	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA
上位15位	2.01	3.33	0.98	2.46	0.85	0.89	1.29	Homo sapiens HESB like domain containing 2 (HBLD2), mRNA
上位16位	6.05	3.22	2.66	1.65	4.34	2.33	7.34	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), mRNA
上位17位	2.71	3.17	1.30	1.39	2.16	2.19	2.69	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), mRNA
上位18位	1.50	3.09	1.12	1.63	3.17	1.27	1.21	Homo sapiens butyrophilin, subfamily 2, member A1 (BTN2A1), transcript variant 2, mRNA
上位19位	8.61	2.91	1.20	1.09	2.79	0.96	1.09	Homo sapiens retinoic acid induced 14 (RAI14), mRNA
上位20位	0.85	2.88	0.81	4.78	0.91	1.21	3.42	Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA

表 2.1.4.12 PM rich および NO₂ rich 条件下での希釈比 1/100 における
遺伝子発現の上位

PM NO ₂	poor		rich	rich		rich		Gene Name
	rich	1/10	rich	poor	poor	1/10ガス	1/10	
希釈比	1/100	1/10	1/100	1/100	1/10	1/10ガス	1/10	
上位1位	1.06	0.97	40.59	0.69	1.99	1.26	0.93	Homo sapiens H3 histone, family 3A (H3F3A), mRNA
上位2位	0.91	1.29	16.82	0.95	0.61	1.00	1.21	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A-like (LOC388817), mRNA
上位3位	1.50	1.16	13.46	1.31	1.56	1.23	1.65	Homo sapiens jun D proto-oncogene (JUND), mRNA
上位4位	1.50	0.89	12.05	0.84	0.76	0.99	0.60	Unknown
上位5位	1.18	1.23	9.93	0.67	1.45	1.44	2.34	Homo sapiens pim-1 oncogene (PIM1), mRNA
上位6位	1.16	0.94	8.83	0.90	1.01	1.25	0.99	Homo sapiens phosphoglycerate mutase 1 (brain) (PGAM1), mRNA
上位7位	0.96	0.91	8.54	0.98	4.24	1.10	2.27	Unknown
上位8位	1.03	0.89	8.50	0.87	2.84	1.07	0.37	Unknown
上位9位	1.28	1.25	8.36	0.99	0.99	1.14	1.19	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6301163, containing frame-shift
上位10位	1.12	0.93	7.65	0.97	0.88	0.98	0.72	Unknown
上位11位	1.14	0.88	7.58	1.35	0.89	1.23	1.35	Homo sapiens ubiquitin B (UBB), mRNA
上位12位	1.14	1.07	7.53	0.92	1.91	1.14	0.87	Homo sapiens ribosomal protein L11 (RPL11), mRNA
上位13位	0.97	0.98	7.11	0.80	2.64	1.05	0.72	Homo sapiens ribosomal protein L21 (RPL21), mRNA
上位14位	1.00	0.89	7.00	1.06	0.79	1.20	0.25	Homo sapiens ribosomal protein L30 (RPL30), mRNA
上位15位	1.04	1.28	6.48	0.79	2.85	1.22	1.19	Unknown
上位16位	1.56	0.83	6.34	0.98	2.06	1.59	1.32	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA
上位17位	1.29	1.39	6.23	1.16	5.11	1.40	0.76	PREDICTED: Homo sapiens similar to 60S ribosomal protein L26 (LOC400055), mRNA
上位18位	1.28	1.11	6.21	0.71	3.80	1.19	0.98	Homo sapiens integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), transcript variant 1A,
上位19位	0.92	0.81	6.09	0.83	2.58	0.95	0.89	Homo sapiens low molecular mass ubiquinone-binding protein (9.5kD) (QP-C), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
上位20位	1.28	0.90	6.09	0.57	1.50	0.85	0.72	Homo sapiens ribosomal protein L24 (RPL24), mRNA

表 2.1.4.13 PM rich および NO₂ poor 条件下での希釈比 1/10 における
遺伝子発現の上位

PM NO ₂	poor		rich	rich		rich		Gene Name
	rich	1/10	rich	poor	poor	1/10ガス	1/10	
希釈比	1/100	1/10	1/100	1/100	1/10	1/10ガス	1/10	
上位1位	7.02	13.14	3.17	3.62	96.92	6.56	6.91	ALU5_HUMAN (P39192) Alu subfamily SC sequence contamination warning entry, partial (6%)
上位2位	5.41	12.84	1.97	3.38	20.92	6.59	2.96	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (SMARCA4), mRNA
上位3位	9.31	19.09	2.48	4.64	20.61	8.68	15.38	N47124 yy53b06.r1 Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP Homo sapiens cDNA clone IMAGE:277235 5', mRNA sequence
上位4位	5.60	18.39	2.25	3.62	20.22	6.21	1.91	Homo sapiens iroquois homeobox protein 5 (IRX5), mRNA
上位5位	0.81	0.91	0.97	0.67	20.12	0.99	0.58	Homo sapiens Sec61 beta subunit (SEC61B), mRNA
上位6位	1.07	1.02	0.96	0.88	17.64	1.41	1.07	Homo sapiens triosephosphate isomerase 1 (TPI1), mRNA
上位7位	6.44	21.65	2.16	5.17	16.92	6.15	2.02	Unknown
上位8位	1.14	1.12	4.16	0.89	15.69	1.14	0.93	Homo sapiens ribosomal protein S11 (RPS11), mRNA
上位9位	7.18	16.00	2.27	7.76	15.43	11.32	3.75	C40201 artifact-warning sequence (translated ALU class C) - human {Homo sapiens;} , partial (11%)
上位10位	1.09	0.95	1.02	1.03	15.04	0.86	0.73	Unknown
上位11位	6.04	20.47	2.19	4.06	14.88	5.99	1.90	Homo sapiens vacuolar protein sorting protein 18 (VPS18), mRNA
上位12位	7.14	20.21	2.71	5.31	14.16	6.93	3.05	Homo sapiens CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen) (CD86), transcript variant 2, mRNA
上位13位	1.35	1.10	1.02	1.09	13.60	0.87	1.06	Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA
上位14位	0.89	0.87	1.18	0.98	13.15	1.13	0.44	Homo sapiens lysocardiolipin acyltransferase (LYCAT), transcript variant 1, mRNA
上位15位	2.25	2.00	2.06	1.56	12.78	1.55	4.56	Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1), mRNA
上位16位	1.00	1.11	1.40	1.40	12.05	1.13	0.86	Homo sapiens immediate early response 3 (IER3), transcript variant
上位17位	1.05	0.90	1.41	1.08	11.90	0.95	1.57	Unknown
上位18位	0.58	1.98	0.97	1.14	11.25	1.22	1.60	Homo sapiens ribosomal protein L10 (RPL10), mRNA
上位19位	0.67	1.16	1.04	3.10	10.49	0.91	1.21	Homo sapiens midkine (neurite growth-promoting factor 2) (MDK), transcript variant 1, mRNA
上位20位	1.10	0.97	0.90	0.81	10.07	0.99	0.26	PREDICTED: Homo sapiens similar to 60S ribosomal protein L12 (LOC441840), mRNA

表 2.1.4.14 PM rich および NO₂ poor 条件下での希釈比 1/10 ガスにおける
遺伝子発現の上位

PM NO ₂	poor		rich	rich		rich		Gene Name
	rich	rich	rich	poor	poor	1/10ガス	1/10	
希釈比	1/100	1/10	1/100	1/100	1/10	1/10ガス	1/10	
上位1位	7.18	16.00	2.27	7.76	15.43	11.32	3.75	C40201 artifact-warning sequence (translated ALU class C) - human {Homo sapiens;} , partial (11%)
上位2位	9.31	19.09	2.48	4.64	20.61	8.68	15.38	N47124 yy53b06.r1 Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP Homo sapiens cDNA clone IMAGE:277235 5', mRNA sequence
上位3位	7.14	20.21	2.71	5.31	14.16	6.93	3.05	Homo sapiens CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen) (CD86), transcript variant 2, mRNA
上位4位	5.41	12.84	1.97	3.38	20.92	6.59	2.96	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (SMARCA4), mRNA
上位5位	7.02	13.14	3.17	3.62	96.92	6.56	6.91	ALU5_HUMAN (P39192) Alu subfamily SC sequence contamination warning entry, partial (6%)
上位6位	5.60	18.39	2.25	3.62	20.22	6.21	1.91	Homo sapiens iroquois homeobox protein 5 (IRX5), mRNA
上位7位	6.44	21.65	2.16	5.17	16.92	6.15	2.02	Unknown
上位8位	6.04	20.47	2.19	4.06	14.88	5.99	1.90	Homo sapiens vacuolar protein sorting protein 18 (VPS18), mRNA
上位9位	22.47	14.62	2.37	3.71	9.44	5.18	1.98	Unknown
上位10位	0.92	1.25	1.10	0.74	1.34	2.89	1.05	Homo sapiens SEC63-like (S. cerevisiae) (SEC63), mRNA
上位11位	1.00	1.31	2.65	1.43	2.23	2.48	2.23	full-length cDNA clone CS0DE002YM12 of Placenta of Homo sapiens
上位12位	6.05	3.22	2.66	1.65	4.34	2.33	7.34	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), mRNA
上位13位	0.84	0.89	1.04	0.85	0.96	2.25	1.14	Unknown
上位14位	1.63	0.77	2.37	1.19	5.87	2.24	1.22	Homo sapiens KIAA0870 protein (KIAA0870), mRNA
上位15位	1.23	0.85	1.83	0.90	1.19	2.20	1.58	Homo sapiens human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1 (HIVEP1), mRNA
上位16位	2.71	3.17	1.30	1.39	2.16	2.19	2.69	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), mRNA
上位17位	1.01	0.83	0.32	1.06	1.22	2.19	2.05	full-length cDNA clone CS0DL005YJ22 of B cells (Ramos cell line) Cot 25-normalized of Homo sapiens (human).
上位18位	1.36	1.50	1.04	1.53	1.48	2.17	2.07	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10), mRNA
上位19位	1.87	2.57	1.43	3.32	3.24	2.16	2.62	Homo sapiens peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM), transcript variant 1, mRNA
上位20位	0.74	0.93	3.05	1.28	2.65	2.11	0.45	Homo sapiens cDNA FLJ32509 fis, clone SMINT1000054.

表 2.1.4.15 PM rich および NO₂ poor 条件下での希釈比 1/10 における
遺伝子発現の上位

PM NO ₂	poor		rich	rich		rich		Gene Name
	rich	rich	rich	poor	poor	1/10ガス	1/10	
希釈比	1/100	1/10	1/100	1/100	1/10	1/10ガス	1/10	
上位1位	9.31	19.09	2.48	4.64	20.61	8.68	15.38	N47124 yy53b06.r1 Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP Homo sapiens cDNA clone IMAGE:277235 5', mRNA sequence
上位2位	1.12	1.16	3.21	0.81	2.54	1.07	13.64	Homo sapiens ribosomal protein S18 (RPS18), mRNA
上位3位	1.13	1.04	1.35	1.01	2.84	1.67	8.34	Homo sapiens actin, gamma 1 (ACTG1), mRNA
上位4位	1.99	2.74	1.16	1.06	2.50	1.60	7.74	Homo sapiens Kruppel-like factor 6 (KLF6), transcript variant 2, mRNA
上位5位	6.05	3.22	2.66	1.65	4.34	2.33	7.34	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), mRNA
上位6位	7.02	13.14	3.17	3.62	96.92	6.56	6.91	ALU5_HUMAN (P39192) Alu subfamily SC sequence contamination warning entry, partial (6%)
上位7位	1.01	0.80	1.02	0.77	0.99	1.17	6.38	Homo sapiens heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1), mRNA
上位8位	1.24	1.00	1.06	1.71	1.17	1.77	5.72	Homo sapiens actin, gamma 1 (ACTG1), mRNA
上位9位	1.57	1.31	1.99	1.40	1.01	1.70	5.30	Homo sapiens Kruppel-like factor 5 (intestinal) (KLF5), mRNA
上位10位	0.84	1.08	0.87	1.63	0.75	0.86	5.22	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide (YWHAQ), mRNA
上位11位	0.69	1.82	1.33	0.80	2.24	1.54	5.15	Homo sapiens RIO kinase 2 (yeast) (RIOK2), mRNA
上位12位	0.95	0.98	1.12	1.10	1.19	1.25	5.07	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2) (HNRPC), transcript variant 1, mRNA
上位13位	0.97	2.06	1.30	0.74	0.81	0.98	5.03	Homo sapiens hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit (HADHA), mRNA
上位14位	0.82	1.24	0.99	0.71	1.06	1.30	4.73	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 117 (C10orf117),
上位15位	1.10	0.87	1.04	0.79	0.31	1.09	4.64	PREDICTED: Homo sapiens similar to ribosomal protein L35 (LOC390876), mRNA
上位16位	2.25	2.00	2.06	1.56	12.78	1.55	4.56	Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1), mRNA
上位17位	1.24	1.21	1.17	1.62	1.20	1.02	4.54	Homo sapiens Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived); ribosomal protein S30 (FAU),
上位18位	0.89	1.29	0.99	1.12	0.83	1.34	4.38	Homo sapiens Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7 (PARK7), mRNA
上位19位	1.17	1.23	1.49	1.00	4.07	1.29	4.21	Homo sapiens PALM2-AKAP2 protein (PALM2-AKAP2), transcript variant 2, mRNA
上位20位	0.99	1.34	1.17	1.42	1.35	0.93	4.19	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A-like (LOC388817), mRNA

(2) リアルタイム PCR 解析

3つの遺伝子 (CYP1A1, HO-1, IL-1beta) の解析^{3) 4) 5) 6)}を行った (Fig.2.1.4.5)。

その結果、CYP1A1 遺伝子での発現には、曝露条件による差は見られなかった。

HO-1 遺伝子および IL-1beta 遺伝子での発現亢進が一部の条件で認められたが、濃度依存的な反応や NO₂ あるいは PM に依存した明瞭な発現変動は見られなかった。強いて言えば、HO-1 遺伝子で、PM rich および NO₂ rich 条件で有意な発現の亢進が認められ、NO₂ や PM に対して反応していることが示唆された。また、試験4日目での除粒子および全ガスの曝露による差はさほど小さくなく、さらに、同条件曝露の試験3日目および試験4日目の希釈比 1/10 で同様の変動が見られていないことも判明した。

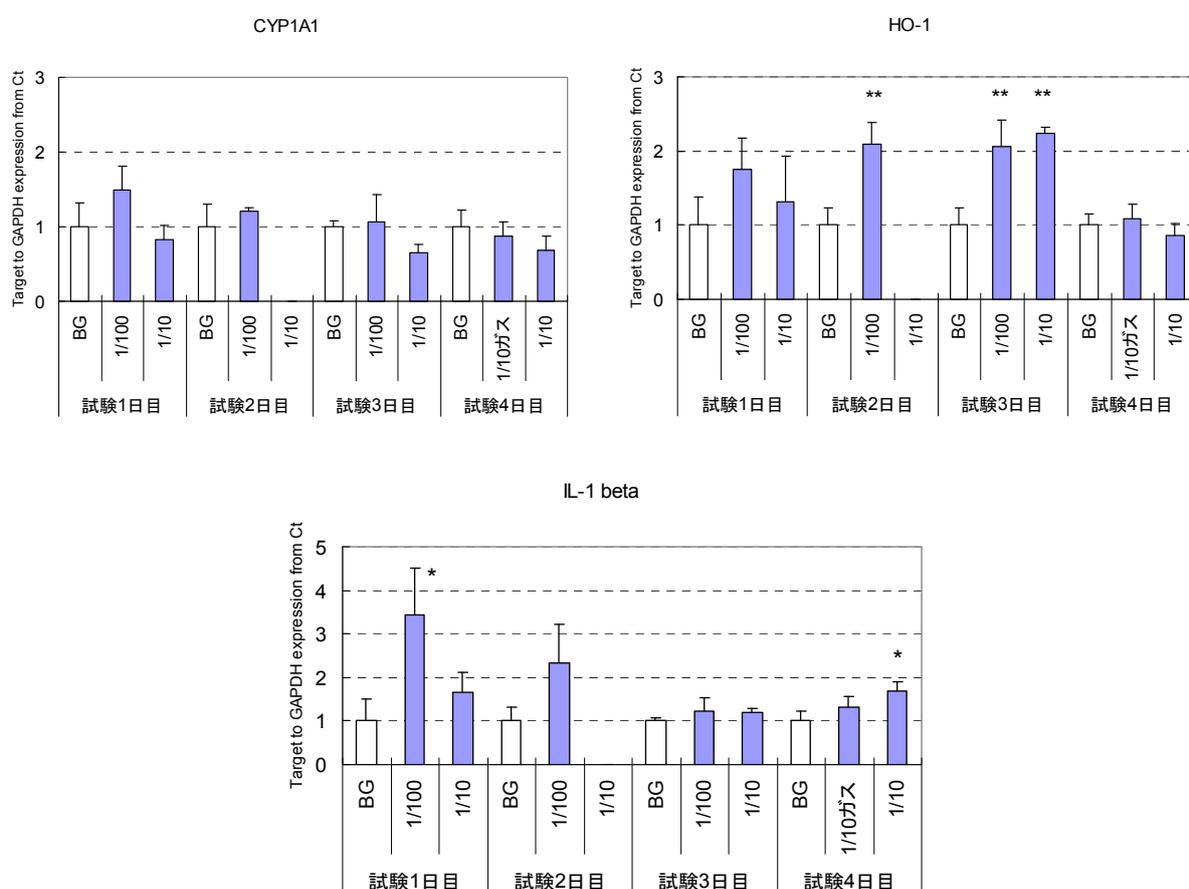


Fig. 2.1.4.5 リアルタイム PCR 解析による A549 細胞の遺伝子発現変動
横軸の数字は希釈比。平均値±標準偏差で示す (n=3)。(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. BG)

2.1.4.4 多変量解析

本試験結果で得られた各項目に対する相関係数を、ノンパラメトリック検定の Spearman の順位相関係数(ρ)で検討した (表 2.1.4.16)。

(1) 細胞毒性試験と、NO₂ 濃度や PM 濃度との間には有意な負の相関がみられ、これは

NO₂ 濃度や PM 濃度が高くなるほど、細胞生存率が低下する（細胞毒性が強い）ことを示唆した。

- (2) 遺伝子解析のうち、リアルタイム PCR 解析での HO-1 遺伝子発現量では、細胞毒性試験とは逆に NO₂ 濃度や PM 濃度との間に正の相関が見られた。このことは NO₂ 濃度や PM 濃度が高くなるほど、HO-1 遺伝子の発現量が亢進することを示唆している。
- (3) IL-1beta 遺伝子の発現量では、NO₂ 濃度との正の相関が見られたものの、PM 濃度では相関が見られなかった。
- (4) CYP 1A1 遺伝子発現量では、Acetaldehyde 濃度との負の相関が確認されたのみで、他の分析ガス項目との相関は見られなかった。
- (5) なお、CO₂ ベースで希釈比を設定しているため、CO₂ に対する各項目の相関係数は高かった。

以上より、細胞毒性試験や一部の遺伝子解析では、NO₂ 濃度や PM 濃度に関連した評価が可能であると考えられた。

表 2.1.4.16 各測定項目・試験項目に対する相関係数（Spearman の順位相関係数 ρ）

	排気分析											細胞毒性	リアルタイムPCR			アレイ	
	CO [ppm]	NOx [ppm]	NO [ppm]	NO ₂ [ppm]	HC [ppmC]	CO ₂ [ppm]	CO ₂ [%]	SO ₂ [ppb]	Formaldehyde [ppb]	Acetaldehyde [ppb]	PM [mg/m ³]	PM [No./cm ³]	Cell Viability (%)	CYP1A1	HO-1	IL-1beta	SD
CO [ppm]	1.000	0.659	0.635	0.075	0.780	0.464	0.477	0.740	0.773	0.464	0.653	0.773	-0.292	-0.127	0.443	0.089	-0.086
NOx [ppm]		1.000	0.986	0.742	0.934	0.954	0.953	0.440	0.606	0.743	0.927	0.936	-0.789	-0.424	0.779	0.614	0.314
NO [ppm]			1.000	0.752	0.947	0.940	0.966	0.409	0.651	0.689	0.968	0.940	-0.800	-0.432	0.794	0.626	0.314
NO ₂ [ppm]				1.000	0.632	0.837	0.863	-0.140	0.242	0.363	0.679	0.642	-0.819	-0.200	0.690	0.807	0.086
HC [ppmC]					1.000	0.823	0.884	0.430	0.757	0.570	0.944	0.963	-0.694	-0.195	0.799	0.636	-0.147
CO ₂ [ppm]						1.000	0.264	0.464	0.691	0.873	0.864	-0.828	-0.406	0.769	0.669	0.543	
CO ₂ [%]							1.000	0.270	0.506	0.641	0.910	0.877	-0.863	-0.417	0.735	0.696	0.098
SO ₂ [ppb]								1.000	0.636	0.600	0.418	0.409	-0.140	-0.519	-0.006	-0.394	0.257
Formaldehyde [ppb]									1.000	0.309	0.773	0.700	-0.372	-0.044	0.532	0.256	0.257
Acetaldehyde [ppb]										1.000	0.573	0.527	-0.419	-0.700	0.250	0.138	0.029
PM [mg/m ³]											1.000	0.927	-0.331	0.807	0.619	0.371	
PM [No./cm ³]												1.000	-0.689	-0.269	0.819	0.557	0.086
Cell Viability (%)													1.000	0.136	-0.807	-0.845	-0.714
CYP1A1														1.000	0.058	0.303	-0.314
HO-1															1.000	0.703	0.771
IL-1beta																1.000	-0.086
SD																	1.000

P<0.05 P<0.001

2.1.4.5 小活

曝露条件を高濃度 PM や高濃度 NO₂ に設定することで、健康影響評価の妥当性を検討した。その結果、本試験条件では、NO₂ rich 条件下で、特にヒト呼吸器系由来培養細胞に対する細胞毒性が強いことを把握した。また、低希釈な排気ほど遺伝子の発現変動が大きく、さらに一部の条件下では酸化ストレスや炎症に対するマーカー遺伝子の発現亢進が認められた。これらのことから、細胞に対する毒性試験等の健康影響評価が可能と判断され、細胞への排気曝露はほぼ満足できるものと考えられた。

さらに、健康に影響を与えると報告のある NO₂ 曝露^{1) 2)}により、細胞への影響を評価できることが確認されたことから、新規開発エンジンに対しても、このシステムを用いた健康影響評価が有用であると考えられる。

2.1.4.6 参考文献

- 1) van Bree L, Rietjens I, Alink GM, Dormans J, Marra M, Rombout P. Biochemical and morphological changes in lung tissue and isolated lung cells of rats induced by short-term nitrogen dioxide exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 19(7):392-401, 2000.
- 2) Ohyama K, Ito T, Kanisawa M. The roles of diesel exhaust particle extracts and the promotive effects of NO₂ and/or SO₂ exposure on rat lung tumorigenesis. *Cancer Lett.* 139(2):189-197, 1999.
- 3) Vogel CF, Sciullo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N, Matsumura F. Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ. Health Perspect.* 113(11):1536-1541, 2005.
- 4) Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285(3):L671-L679, 2003.
- 5) Li N, Kim S, Wang M, Froines J, Sioutas C, Nel A. Use of a stratified oxidative stress model to study the biological effects of ambient concentrated and diesel exhaust particulate matter. *Inhal. Toxicol.* 14(5):459-486, 2002.
- 6) Pacheco KA, Tarkowski M, Sterritt C, Negri J, Rosenwasser LJ, Borish L. The influence of diesel exhaust particles on mononuclear phagocytic cell-derived cytokines: IL-10, TGF-beta and IL-1 beta. *Clin. Exp. Immunol.* 126(3):374-383, 2001.

2.1.5 CULTEX 装置を用いた排気曝露試験 2

2.1.5.1 目的

これまでの検討結果から、生体や細胞にとって厳しい条件を設定して試験を行うことで、CULTEX 装置を用いた適正なシステムの構築を確認できた。一方、本来の NEDO 事業の目的である新規開発エンジン排気の低減技術を評価するためには、PM 計測と健康影響の両面から評価することが望ましいが、そのためには、それぞれの計測試験を同時に行うことにシステム上問題がないか否かを確かめる必要がある。

本試験では、PM 計測評価と CULTEX 試験を同時平行して行い、問題点を洗い出した。細胞毒性試験は、同じ曝露条件を計 3 回繰り返して、日内および日間による再現性への影響を調べた。

2.1.5.2 試験方法

1) エンジン運転条件およびモニタリング分析

長期規制対応エンジンを回転数 1,320 rpm、負荷 1,089 Nm、CVS 流量 40 m³/min にてダイナモ上で定常運転し、得られた排気の一部を希釈トンネルに導入した。希釈比を CO₂ ベ

ースで 1/30 (47°C) あるいは Idling 状態 (希釈なし) にし、希釈トンネルと接続した CULTEX 装置に送気した。なお、後処理装置の条件として、ノーマルマフラーのみ、OCC (Oxidation Catalytic Converter)¹⁶付き、あるいは CR-DPF 付きを用いた。試験条件を表 2.1.5.1 に示す。なお、実験の日程上、試験 1 回目のノーマルマフラーの 2 条件 (Idling および 1/30) での BG 群は、同じデータを用いた。また、供試エンジンおよびダイナモメーターの諸元および燃料性状は、前述と同様である。

さらに、培養細胞が曝露されている排気の性状を把握するため、希釈トンネル内をモニタするとともに種々の捕集・計測も行った。

2) CULTEX 装置および曝露細胞の準備, 細胞毒性試験

CULTEX 装置の設置は 2.1.1 項, CULTEX 装置および曝露細胞の準備, 細胞毒性試験は 2.1.4 項に準じた。

表 2.1.5.1 試験エンジン排気条件と評価項目

後処理装置	分割	試験1日目	試験2日目	
			1回目	2回目
マフラー	BG (常温)	1 (=2)	A, C	B, D
	Idling (47°C)	1'	A'	B'
	1/30 (47°C)	2'	C'	D'
OCC	BG (常温)	3	E	F
	1/30 (47°C)	3'	E'	F'
CR-DPF	BG (常温)	4	G	H
	1/30 (47°C)	4'	G'	H'

2.1.5.3 結果および考察

1) モニタリング分析

排気成分濃度を表 2.1.5.2 と表 2.1.5.3 に示す。試験は計 7 日間かけて行い、日間および日内による変動を検討した。また SO₂、アルデヒド濃度および SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer)¹⁷による個数分布については、前半の試験 (試験群 1~4、1'~4') で測定した。また、BG 群の分析も前半の試験でのみ実施した。ここでは、各実験時の平均値のみを示したが、同条件による日間での大きな差異はなかった。

¹⁶ OCC [Oxidation Catalytic Converter]: 車の排気ガス後処理技術。排気中の PM を白金などの触媒による酸化作用で削減させる装置。

¹⁷ SMPS [Scanning Mobility Particle Sizer] (走査型モビリティ粒径分析装置): 粒子の粒径分布を測定する装置。

表 2.1.5.2 エンジン希釈と粒子濃度

後処理装置	分割	群	エンジン条件			PM	
			回転数 [rpm]	トルク [Nm]	CO ₂ ベース	[mg/m ³]	(10-392 nm) [No./cm ³]
マフラー	BG	1 (=2)	—	—	—	—	34
	全量	1'	アイドル	—	—	0.20	955361
		A', B'	アイドル	—	—	0.33	—
	1/30	2'	1320	1090	29	1.67	1584600
		C', D'	1320	1093	30	2.83	—
OCC	BG	3	—	—	—	—	34
	1/30	3'	1320	1091	30	1.68	1597578
		E', F'	1320	1093	31	2.98	—
CR-DPF	BG	4	—	—	—	—	30
	1/30	4'	1320	1084	31	0.08	3583752
		G', H'	1320	1085	31	—	—

数値は、日内平均を示す。

表 2.1.5.3 エンジン希釈と曝露ガス濃度

後処理装置	分割	群	暴露希釈排ガス濃度										
			CO [ppm]	NO _x [ppm]	NO [ppm]	NO ₂ [ppm]	HC [ppmC]	CO ₂ [ppm]	CO ₂ [%]	SO ₂ [ppb]	Form aldehyde [ppb]	Acet aldehyde [ppb]	Acrolein [ppb]
マフラー	BG	1 (=2)	—	—	—	—	—	—	—	1.32	12.1	9.0	ND
	全量	1'	1.89	4.3	3.9	0.48	5.26	753.2	0.08	5.85	96.6	37.1	2.2
		A', B'	2.00	5.0	4.4	0.53	5.85	802.8	0.08	—	—	—	—
	1/30	2'	9.45	13.8	13.3	0.45	2.52	3149.4	0.31	21.83	73.3	19.1	1.4
		C', D'	9.23	13.2	12.8	0.40	2.81	3078.7	0.31	—	—	—	—
OCC	BG	3	—	—	—	—	—	—	—	2.55	10.0	10.1	ND
	1/30	3'	0.36	13.3	10.1	3.17	2.09	3099.2	0.31	5.02	18.6	11.4	ND
		E', F'	0.39	13.1	10.1	3.00	2.19	3071.2	0.31	—	—	—	—
CR-DPF	BG	4	—	—	—	—	—	—	—	2.28	9.2	9.0	ND
	1/30	4'	0.30	12.9	9.6	3.30	2.07	3084.7	0.31	8.74	15.1	10.0	ND
		G', H'	0.20	12.9	9.7	3.26	2.04	3044.1	0.30	—	—	—	—

数値は、日内平均を示す。

粒子の個数濃度分布を Fig. 2.1.5.1 に示す。ノーマルマフラーでの 1/30 希釈条件および OCC の 1/30 希釈条件では粒径約 80 nm にピークを持つ分布を、また、ノーマルマフラーでの Idling 条件や CR-DPF での 1/30 希釈条件では、粒径約 10 nm 以下にピークを持つ分布を示した。

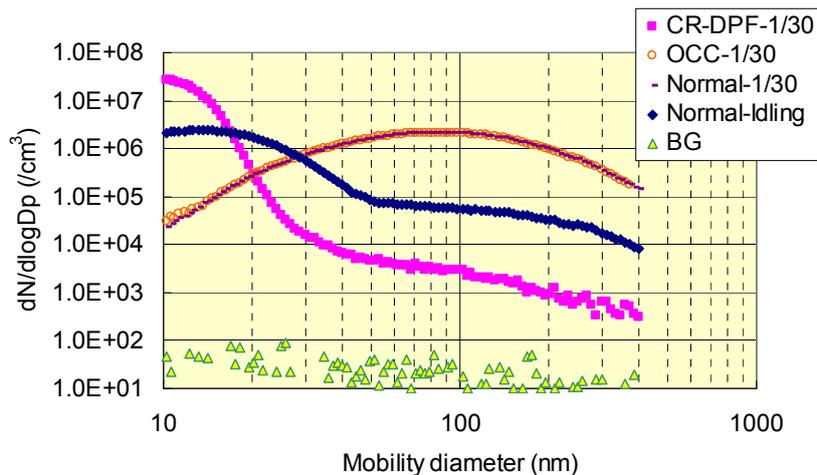


Fig. 2.1.5.1 各希釈条件の粒子個数分布
データは日間平均値で示した (n=1~3)。

2) 細胞毒性試験

健康影響評価の再現性を確認するために、同じ曝露条件を数回繰り返して、日内および日間の変動を細胞毒性試験で検討した。細胞に曝露した希釈排気の温度は $29.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$ (平均値 \pm 標準偏差)、装置上部の温度は $29.0 \pm 1.9^\circ\text{C}$ で、細胞に対する影響は認めなかった。

今回の試験の曝露群は1濃度であり、IC50を用いた統計評価が出来ないため、傾向を判断するのに留めた。

結果を Fig. 2.1.5.2~Fig. 2.1.5.4 に示す。

各曝露試験2日目に行った2回分のデータを用い、各試験1回目のBGを100%として、日内変動を検討した結果を Fig. 2.1.5.2 に示す。試験群Aでは細胞生存率が減少傾向を示したが、これは、排気試験の際、CULTEX装置のモジュール内に溜まった水滴により生存細胞に影響があったことが原因と判明している。その他の試験群では、細胞生存率の日内変動は少なかった。

各曝露試験1回目のBGを100%として、日間変動を検討するため、試験1日目と試験2日目のデータを比較した結果を Fig. 2.1.5.3 に示す。試験2日目は、同日で各曝露条件下で2回ずつ試験しているため、それらの平均を用いた(ただし、試験群Aは、前述のアーチファクトの要因が大きいため、ここでは除外した)。その結果、CR-DPFのBG群(試験群4と試験群G+H)、1/30希釈群(試験群4'と試験群G'+H')、Normalマフラーの1/30希釈群(試験群2'と試験群C'+D')で、日間の変動傾向が認められた。

3回行った試験データを平均化し、BGを100%として群間の変動を検討した結果を Fig. 2.1.5.4 に示す(ここでも試験群Aは除外した)。その結果、CR-DPFやOCCを装着したときに、1/30希釈排気(試験群4'+G'+H'および試験群3'+E'+F')で細胞毒性が強い傾向が認められた。

このように、培養細胞の生存率に影響を及ぼす傾向がいくつかみられたが、使用した細胞が約1日で1回細胞分裂する背景や、細胞播種の時間のずれによる曝露時濃度の不均一

性の可能性等を考慮しても、IC50 で算出評価したほうが毒性影響を検討するには妥当と判断した。

今回は、種々のマフラーを装着して希釈率を 1/30 あるいは Idling 条件に設定して試験を行ったが、どの試験条件でも細胞生存率が 50%以下に達することはなく、細胞毒性は見られないことが分った。ただし、BG 群で日間変動の傾向が見られたことから、可能な限り同日内で細胞試験を行った方が良いことも明らかになった。

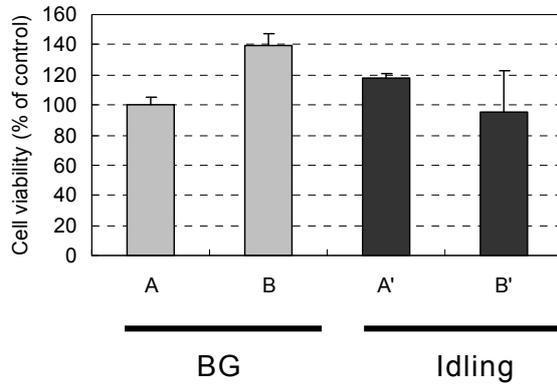
2.1.5.4 小活

先の試験で、細胞に対する悪条件を設定して試験を行うことでシステム構築を確認した。ここでは、本来の NEDO 事業の目的である PM 計測との総合評価を行うための合同試験を試みた。今回は、健康影響評価の再現性を確認するために、同条件を数回繰り返して、日内および日間の影響を細胞毒性試験により評価した。

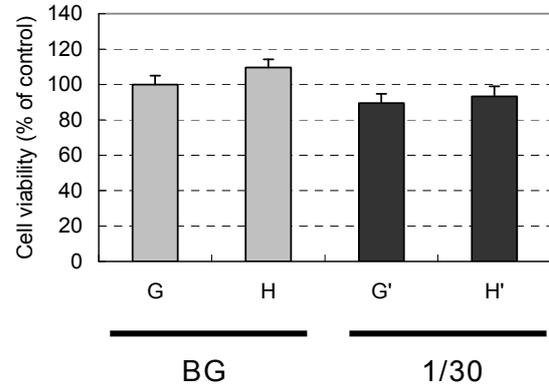
細胞毒性試験は 2 日に分けて試験し、そのうちの 1 日については 2 回試験を行い、計 3 回の試験評価で日内および日間の影響を検討した。その結果、日内では細胞の生存率に大きな影響は認められないことが分った。また、日間では多少の差は生じるものの、ほとんど影響のない範囲であったため、実験の良好な再現性が確認できたが、今後、細胞毒性試験で評価していくためには、同日内で評価することが望ましいと判断した。

ピーク粒径 10 nm

Normal-Idling

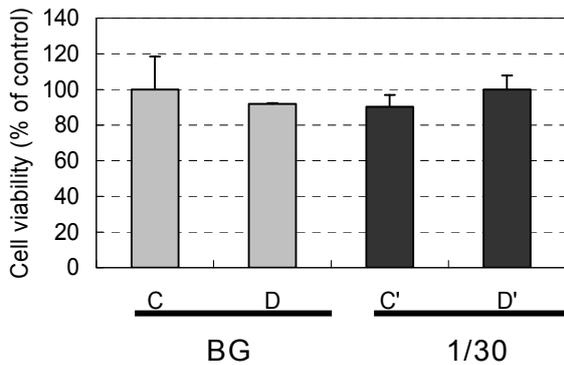


CR-DPF-1/30



ピーク粒径 80 nm

Normal-1/30



OCC-1/30

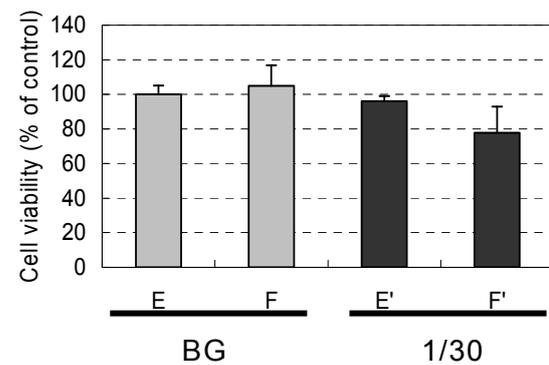


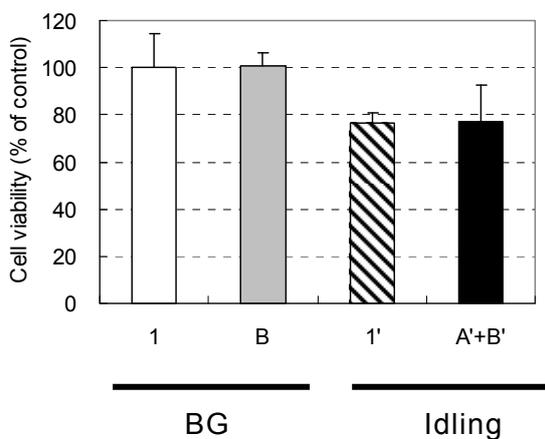
Fig. 2.1.5.2 ディーゼル排気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の日内変動比較

A~F 群は BG 群、A'~F' 群は曝露群。

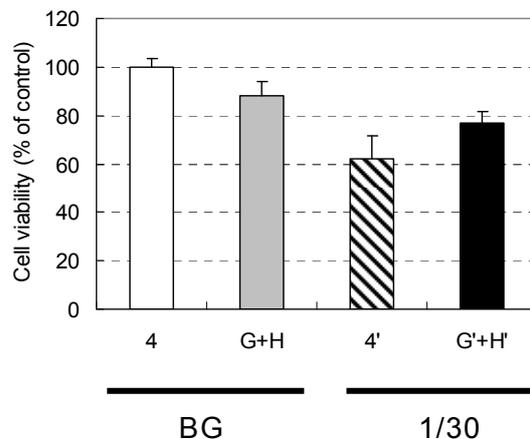
初回 BG (A、C、G、E 群) を 100% とし、平均値±標準偏差で示す (n=3)。

ピーク粒径 10 nm

Normal-Idling

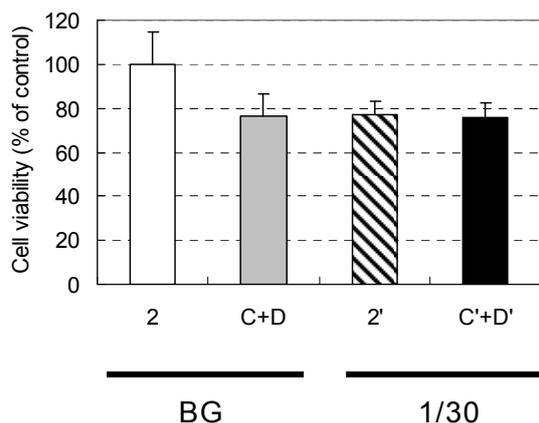


CR-DPF-1/30



ピーク粒径 80 nm

Normal-1/30



OCC-1/30

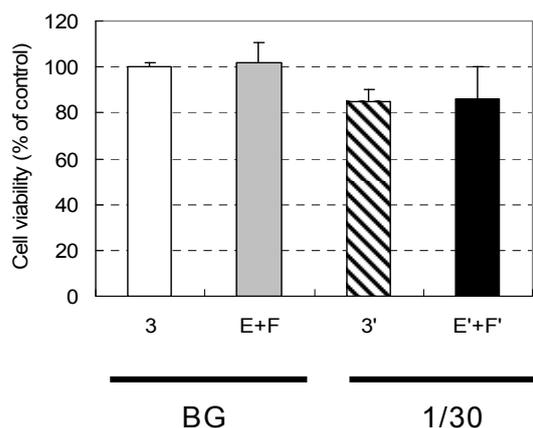
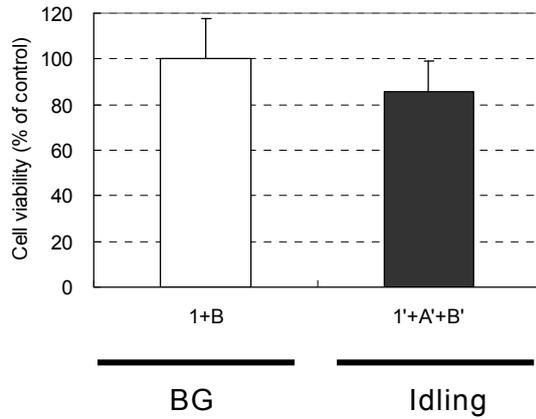


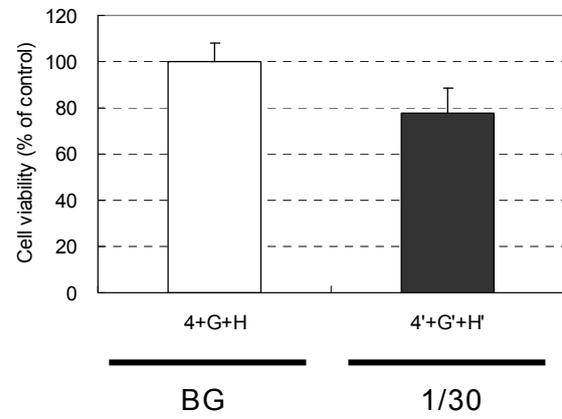
Fig. 2.1.5.3 ディーゼル排気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の日間変動比較
 1~4 群および A~F 群は BG 群、1'~4'群および A'~F'群は曝露群。
 初回 BG (1~4 群) を 100%とし、平均値±標準偏差で示す (n=3~6)。

ピーク粒径 10 nm

Normal-Idling

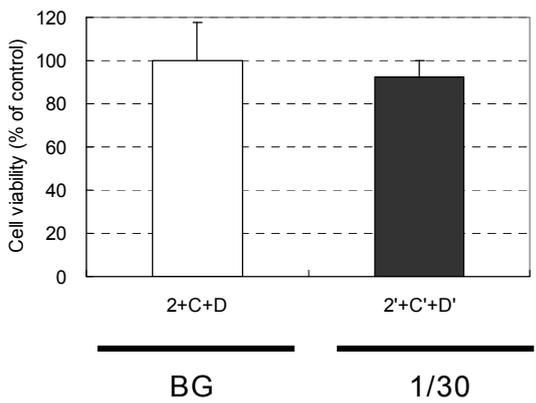


CR-DPF-1/30



ピーク粒径 80 nm

Normal-1/30



OCC-1/30

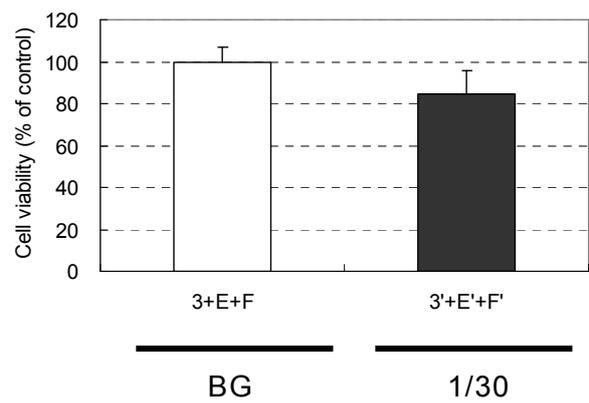


Fig. 2.1.5.4 ディーゼル排気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の群間変動比較
1~4 群および A~F 群は BG 群、1'~4'群および A'~F'群は曝露群。
BG を 100% とし、平均値±標準偏差で示す (n=6~9)。

2.1.6 健康影響調査小括

本研究の最終目的は、開発される次世代低公害車の排気が、既存のエンジン排気と比べ健康面に対する改善効果がみられることを、あるいは少なくとも増悪しないことを確認することにある。ここでは、今後開発される次世代低公害自動車の排気に対する健康影響調査での手法の確立を目的とした。

使用した試験装置は、JARI 所有の培養細胞曝露装置（CULTEX 装置）であるが、そのシステムの構築と、排気に対する影響の第一標的器官として考えられる呼吸器系の細胞を用いて影響評価を行った。

その結果、下記の知見を得ることができた。

(1) 培養細胞曝露システムの構築

JARI 所有の CULTEX 装置を用いて、ヒト呼吸器由来培養細胞（ヒト肺上皮細胞株 A549）にダイナモ上で発生させた希釈排気を曝露するシステムの構築を行った。

(2) 培養細胞を用いた毒性評価の検討

A549 細胞と上記の CULTEX 装置を用いて、影響評価に適した被験物質の曝露時間や曝露時の圧力などについて、細胞毒性試験や遺伝子解析評価法を用いて検討し、細胞への影響評価ができることを確認した。

特に、高濃度 PM や高濃度 NO₂ などの細胞にとって悪条件の排気を設定することで、通常の曝露試験での排気条件で影響が明確ではなかった細胞に対する毒性試験等による健康影響評価を明確にすることができたため、細胞への排気曝露は満足できると判断できた。

以上より、排気の細胞に対する影響を評価できることが確認されたことから、次年度以降に予定している動物吸入曝露試験での排気や開発システムの総合評価に対しても、今回検討した培養細胞への排気曝露システムと毒性評価法を用いることが可能であると考えられた。

3. 尿素 SCR 排気の動物曝露評価（未規制物質評価）

3.1 緒言

3.1.1 背景

ディーゼル自動車の排気はPM¹⁸による大気汚染の主要因として考えられており、その健康影響は、日本だけでなく世界的にも深刻な問題となってきた。ディーゼル自動車からは、NO₂などのガス状物質だけではなくディーゼル排気粒子（Diesel Exhaust Particles; DEP）、多環芳香族炭化水素類（PAHs）、ニトロ化合物やキノン類などの有害物質が排出されていることが知られており、健康に様々な影響を与えていることが懸念されている。

大気環境改善のために、ディーゼルエンジンは数次にわたる排気規制をクリアしてきたが、エンジン燃焼タイプ、燃料の組成、排気後処理装置などによって、その排気の物理的・化学的組成は異なる。そのため、排気規制物質の低減により健康リスクが低減されることが考えられるが、予測しえない影響についても考慮する必要がある。このような観点から、新たな低減技術による排気性状の変化に関して、米国では、最新エンジンシステムからの排気に対する健康影響評価研究（Advanced Collaborative Emissions Study（ACES）プロジェクト、2006年から2012年）を、HEI¹⁹、Coordinating Research Council（CRC）、自動車業界など産官学が協力して実施している（The Advanced Collaborative Emissions Study（ACES）, 2004）。その研究内容としては、新エンジン、後処理装置、潤滑油と燃料の新技术が新たな健康影響の要因となる可能性を懸念し、2007年および2010年のNO_x・PM排気基準に適合したheavy dutyディーゼルエンジンからの排出ガス特性を調査すること、また、実験動物に対する2年間（2007年適合車）および3ヶ月間（2010年適合車）の吸入曝露試験による健康影響を調査することが挙げられている。

現在、日本では、新長期規制（平成17年排出ガス規制）対応エンジンである尿素SCR²⁰エンジンシステムが車両に搭載され実用化されている。尿素SCRエンジンシステムの市場導入は、2002年に経済産業省とNEDOによる実用化研究が契機となった。尿素SCRエンジンシステムは、超高压噴射によるエンジン燃焼改善でPMが低減されること、さらに、添加した尿素水から加水分解により生成されたアンモニアを使用して、PM低減に伴って増加したNO_xを還元することでNO_xを低減させることが特徴である。また、尿素水の供給は、自動車メーカー、石油メーカー、化学品メーカー、商社や石油販売業者の協力により、インフラの整備が全国で行われている（日産ディーゼル工業株式会社ホームページ）。さらに、燃費やCO₂問題などからも、特に重量車のNO_x低減対策として、尿素SCRエンジンシステムは有望視されている。

一方、このエンジンシステムは従来では使用されたことのない尿素を使用していることから、排気中の尿素由来生成物や、二次生成物質を含めた新たな化学物質が排出、生成される可能性がある。これまでに、尿素由来生成物は少なくとも7種類の熱分解生成物と未反応の尿素が検出されており、それらは尿素、アンモニア、シアン酸塩イオン、ピウレッ

¹⁸ PM [Particulate Matter]（粒子状物質）：一般的には数 10 μm 以下の固体や液体の粒。主に燃焼による炭素粒子や煤塵、黄砂などの土壌粒子、海塩粒子などを指す。

¹⁹ 米国 HEI [U.S. Health Effects Institute]：米国健康影響研究所。

²⁰ 尿素 SCR [Urea-Selective Catalytic Reduction]：ディーゼル排気中の NO_x を低減する装置。排気中に尿素を添加して触媒で NH₃ として、NO_x を NH₃ で還元除去する。

ト、シアヌル酸、アンメリド、アンメリン、メラミンであることが報告されている (Ball, 2001)。尿素 SCR エンジンシステムに関しては、平成 15 年度の NEDO プロジェクトで、その排気が公道走行に問題ないことを確認して、車両の走行試験を行っている。これには、プロトタイプのシステムから排出される PM の有機溶媒可溶成分に対して、細菌を用いたスクリーニング試験 (エームス試験) を行い、仕事量あたりの変異原性について、SCR を装着することによる増加傾向は認められなかったことが示されている (NEDO 高効率クリーンエネルギー自動車の研究開発 成果報告書)。しかし、その後さらに完成され、実際に市場に供給されたシステムからの全排気に対する健康影響評価に関する報告については、ほぼ皆無に等しい。

特に、わが国では、自動車排ガスによる呼吸器の影響が注目されている (環境省・局地的大気汚染の健康影響に関する疫学調査；大気汚染に係る環境保健サーベイランス調査) ことから、排気を吸入した時の第一標的器官である呼吸器を中心とした影響について、尿素SCRエンジンシステム排気 (以下、尿素SCRエンジン排気と略す) が従来のエンジンシステム排気 (以下、対照エンジン排気と略す) より軽減されていることを確認することは、市場拡大前の予防原則の観点から重要と思われる。

以上より、本調査では、尿素SCRエンジンシステム (新長期規制対応エンジン) と長期規制対応エンジンシステムからの排気を実験小動物に短期間吸入曝露し、その曝露に対する影響を比較評価することで、尿素SCRエンジン排気への健康への影響の軽減効果を確認した。また、ヒト呼吸器系由来培養細胞を用いた細胞曝露試験により、排気の簡易スクリーニング評価も実施した。

3.1.2 外部委員会の設置

本調査を実施するにあたり、研究計画の妥当性と結果の科学的および中立的な評価を審議するため、学識経験者等による委員会 (健康影響調査ワーキング (WG)) を設置した。

本委員会は、下記のメンバーで構成した。

【WG委員】

委員長	香川 順	(東京女子医科大学 名誉教授)
委員	内山 巖雄	(京都大学大学院 工学研究科 教授)
委員	小林 隆弘	(東京工業大学 統合研究院 特任教授)
委員	中井 里史	(横浜国立大学大学院 環境情報研究院 教授)
委員	早川 和一	(金沢大学大学院 自然科学研究科 教授)
委員	平田 公信	(日産ディーゼル工業 (株) 研究部 グループリーダー)

本WGは計2回実施した。第1回 (2007年5月11日、於：くるまプラザ) は計画案に対する審議を、また第2回 (2007年12月21日、於：航空会館) は試験実施後の評価結果に対する審議を行い、了承を得た。

3.2 試験方法

3.2.1 曝露設備、供試エンジン、燃料

3.2.1.1 曝露設備

エンジン排気の曝露は、(財)日本自動車研究所 (Japan Automobile Research Institute, JARI) に設置された曝露設備を用いて実施した。

この曝露設備は、主としてエンジンダイナモメータ、吸入トンネル (希釈トンネル) 装置、曝露チャンバー、空調装置、給排気装置などから構成される。これらの主な仕様を表 3.2.1.1 に示す。エンジン排気は吸入トンネルで希釈した後、曝露チャンバー直上部に設置した混合槽で、清浄空気により再希釈して濃度調整を行い、その後曝露チャンバーに導入する (Fig. 3.2.1.1)。吸入トンネル用と再希釈用の空気は、プレフィルタ、活性炭フィルタ、高性能フィルタで濾過して、温度 23°C、相対湿度 55% に調整した。

表 3.2.1.1 エンジンダイナモメータと吸入試験装置の主な仕様

名称	仕様	製造元
ダイナモメータ	型式: DC-DY 吸収/駆動容量: 370/300kW 回転速度最大: 4000rpm 軸トルク: 1961N _m (200kgf _m)	明電舎
吸入トンネル装置	内径450mm, 長さ8m	柴田科学器械
曝露チャンバー	横層流方式, 内容積3m ³	
給排気装置	活性炭フィルタ, HEPAフィルタ除塵空調空気供給	
モニタリングシステム	チャンバー内流量, 圧力, 温度, 湿度 チャンバー内ガス濃度	堀場製作所

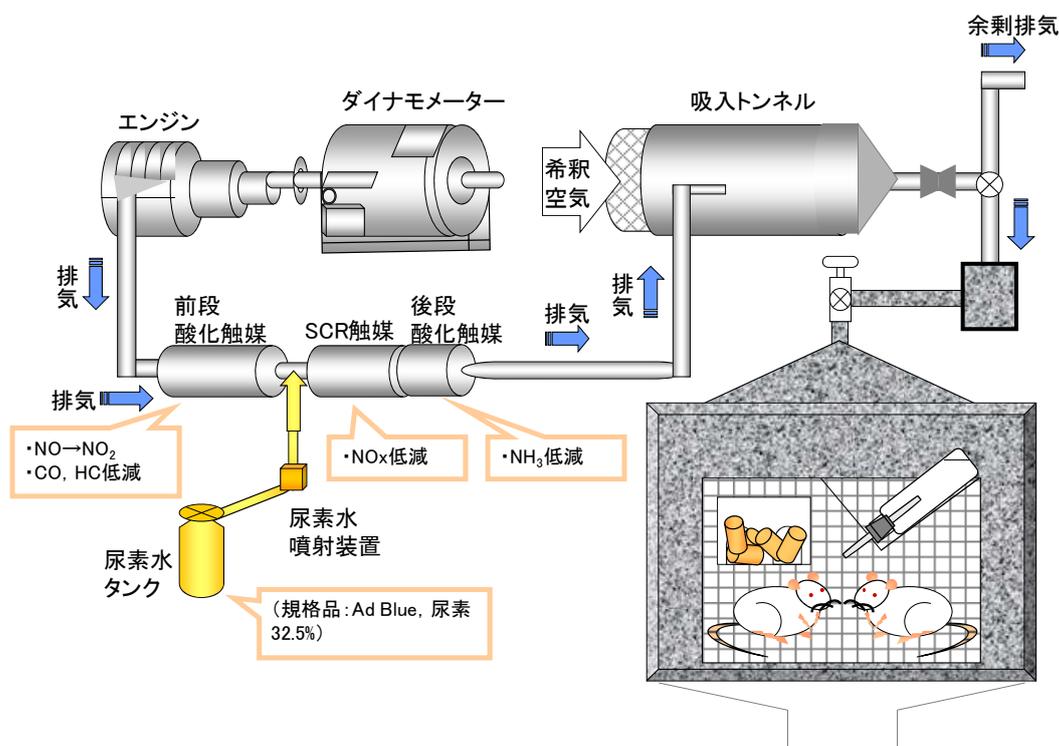


Fig. 3.2.1.1 実験小動物曝露試験装置の概略図

曝露チャンバーの構造を Fig. 3.2.1.2 に示す。本チャンバーは多段型の横層流型であり、エンジン排気をチャンバー中央に供給し、オリフィスを介して均一に動物に曝露する構造である。チャンバー気積は 3 m³、換気回数は毎時 60 回である。本試験では、このチャンバー5 基を試験に用いた。

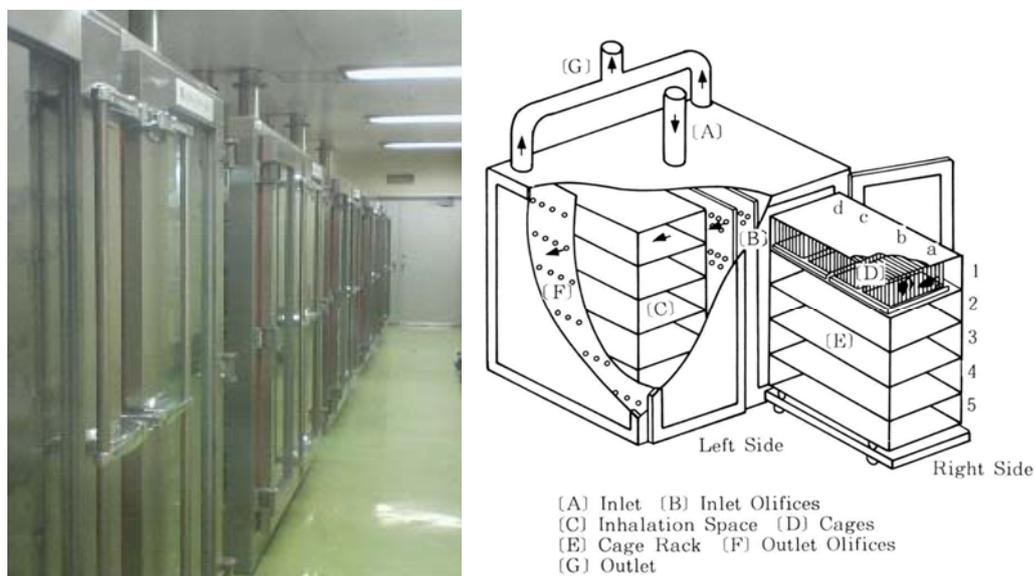


Fig. 3.2.1.2 試験に用いた動物曝露用チャンバー（概観と構造）

3.2.1.2 供試エンジン

本試験で使用した 2 台の供試エンジンの主要諸元を表 3.2.1.2 に示す。尿素 SCR エンジンと長期規制対応エンジン（対照エンジン）は、エンジン型式は同じであるが、燃料噴射方式などエンジンシステムとしては異なっている。

表 3.2.1.2 供試エンジンの主要諸元

	尿素SCRエンジン	対照エンジン
エンジン型式	MD92TB,IC	MD92TB,IC
気筒数	直列6気筒	直列6気筒
内径×行程 (mm)	125×125	125×125
総行程容積 (L)	9.203	9.203
定格出力 (kW/rpm)	250/2200	243/2200
最大トルク (Nm/rpm)	1400/1400	1324/1400
排出ガス低減装置	高圧噴射 Cooled EGR	なし
規制区分	尿素-SCR 新長期規制	長期規制

尿素 SCR エンジンシステムの模式図を **Fig. 3.2.1.3** に示す。このシステムは主に触媒と尿素水溶液の添加装置から構成される。尿素水溶液 (32.5%) は NO_x の還元剤として、SCR 触媒前の排気中に噴射され加水分解され NH_3 となる、この NH_3 が NO_x と反応して NO_x を無害な N_2 に変える。尿素 SCR システムにおいては、尿素水溶液を効果的に添加することが NO_x の浄化、 NH_3 スリップの防止、尿素水溶液の消費量等の観点から重要である。

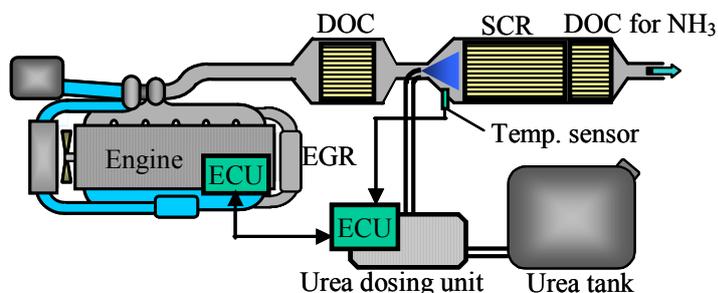


Fig. 3.2.1.3 尿素 SCR エンジンシステム

出典：大型商用車用尿素 SCR システムの開発（第 1 報）、自動車技術会学術講演会前刷集、No.108-04（2004）

尿素 SCR システムによる排気浄化の工程は、以下の通りである。

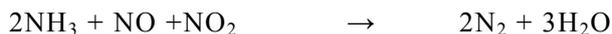
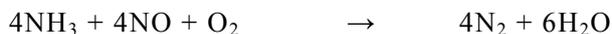
(1) 前段酸化触媒での反応

排気中の NO を酸化し、SCR 上でより低い温度で還元されやすい NO_2 に変換する。



(2) SCR 触媒での反応

尿素が熱分解されることにより生成されるアンモニアと NO_x を反応させ、 NO_x を低減する (NO_x 還元)。



(3) 後段酸化触媒での反応

SCR 触媒で NO_x 還元消費されずに排出されるアンモニアを酸化して、除去する。



尿素 SCR システムの装着を前提としたエンジンと尿素 SCR システムを組み合わせたエンジンを JE05 モードで運転したところ、尿素 SCR システムの装着により、長期規制値に

対して NO_x、PM とも大幅に低減した (Fig. 3.2.1.4)。

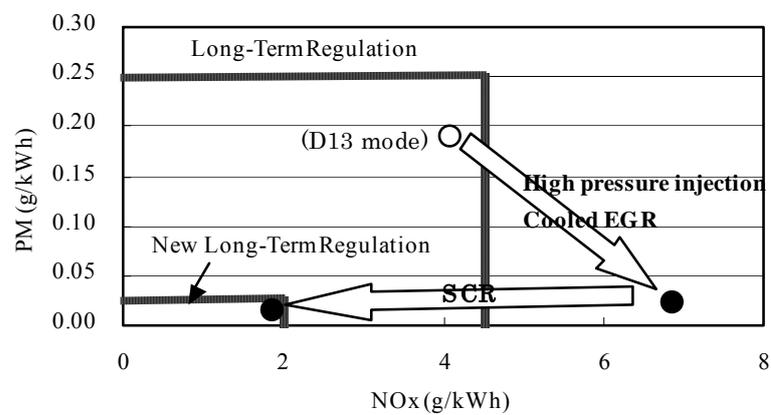


Fig. 3.2.1.4 尿素 SCR エンジンシステムの PM および NO_x 排出量の低減効果
出典：大型商用車用尿素 SCR システムの開発（第 1 報）、
自動車技術会学術講演会前刷集、No.108-04（2004）

このように、尿素 SCR エンジンシステムは、ディーゼルエンジンの PM と NO_x 排出量の同時低減を可能とし、燃費改善にも有利であるが、従来使用されていない尿素を添加することで、排気中の尿素由来生成物や未知の排気成分に対する健康への影響が新たな課題になった。尿素の熱分解生成物の例を **Fig. 3.2.1.5** に示す。熱分解によって、メラミン、ビウレット、イソシアヌル酸などが生成するとされるが、システム排気全体としての健康影響に関しては知見がない。

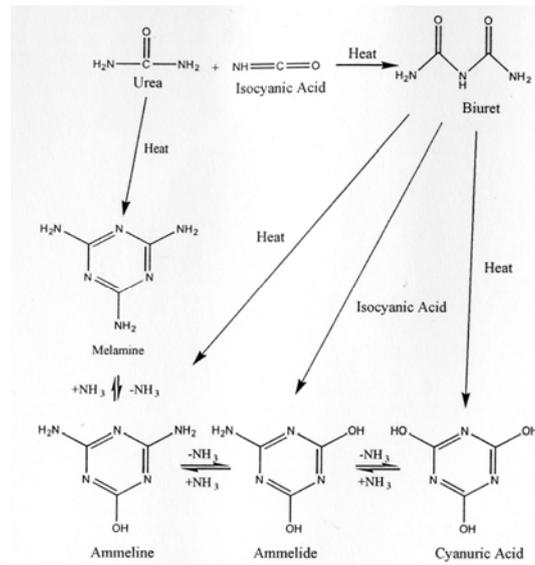


Fig. 3.2.1.5 尿素の熱分解生成物
(Ball, J.C., 2001)

このようなことから、現在完成され市場導入されている尿素SCRエンジンシステムを評価対象に選定した。なお、本試験に用いた尿素SCRエンジンシステムは、実際に工業製品として市場に供給されトラックで使用されているものであり、特別な改造を加えたものではない。

3.2.1.3 燃料、潤滑油

燃料は、市販の JIS2 号軽油（硫黄分 4 wtppm）を用いた。燃料の性状を表 **3.2.1.3** に示す。

尿素水は、市販品（32.5%，JIS K2247-1）を用いた。

エンジン潤滑油には、供試エンジン提供メーカー指定品を用いた。

表 3.2.1.3 燃料の性状

品名：JIS2号軽油			
密度 (15℃)	g/cm ³	0.8272	JIS K2249
動粘度 (30℃)	mm ² /s	4.005	JIS K2283
引火点	℃	72.0	JIS K2265
曇り点	℃	-3.0	JIS K2269
目詰まり点	℃	-14.0	JIS K2288
流動点	℃	-15.0	JIS K2269
硫黄分	wtppm	4	JIS K2541-6
セタン指数		60.7	JIS K2280
蒸留性状(90%留出温度)	℃	338.5	JIS K2254
窒素分	wtppm	3	JIS K2609
組成			JPI-5S-49-97
飽和脂肪族	vol%	79.9	
不飽和脂肪族	vol%	0.1	
芳香族	vol%	20.0	
1環芳香族	vol%	18.0	
2環芳香族	vol%	1.4	
3環芳香族	vol%	0.6	

3.2.1.4 曝露条件の設定

1) エンジン運転条件

エンジン運転条件は、下記項目を選定根拠とした。

- 尿素水が噴霧されること（このためには排気温度が 200℃以上にあること）
- 尿素 SCR エンジンシステムの本来的な目的である NO_x 還元効果が大きいこと
- エンジン使用領域内での頻度の高い運転条件であること

対照エンジンは長期規制対応であり、排気試験法として D13 モードが定められている。このモードは 13 段階のエンジン定常運転を行い、各運転条件に対して定められた重み係数を反映した時間の排出量を計測して、モード全体の排出量を求める。したがって、この重み係数がモード全体に対する各運転条件の割合の大きさを表す。重み係数を丸印のサイズで Fig. 3.2.1.6 に示す。ここで、尿素水を噴射する条件（排気温度 200℃以上）は、回転数 40%以上、負荷 20%以上であり、この条件で最も使用頻度の高いのは、回転数 60%、負荷 60%である。

また、エンジン過渡運転の試験モードである JE05 モード走行時のエンジン使用頻度を簡略化（回転数：アイドル～無負荷最大回転数を 10 分割、負荷：最大トルクを 10 分割した）して丸印のサイズで Fig. 3.2.1.7 に示す。尿素水噴霧条件を考慮すると、使用頻度の高い運転条件は、おおよそ回転数 40～70%、負荷 20～70%の範囲内にある。D13 モードで選定したエンジン運転条件はこの過渡運転時の条件内にあることから、曝露評価のためのエンジン運転条件の候補として、回転数 60%、負荷率 60%を選定した。排気中の PM と NO₂ の濃度を主に比較する予備試験を行なった結果、この条件は、尿素 SCR の最大の特徴である NO_x 低減効果が大きい条件である。以上より曝露のためのエンジン運転条件として、両エンジンとも、回転数 60%（1320 rpm）-負荷 60%（840 Nm）の定常運転条件を選定した。

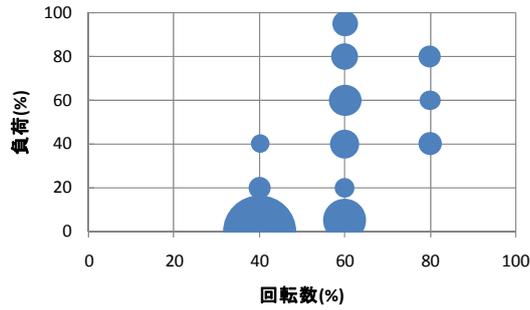


Fig. 3.2.1.6 D13 モード排気試験の重み係数
 (排気温度 200℃以上では回転数 60%、負荷 60%の重み係数が最も大)

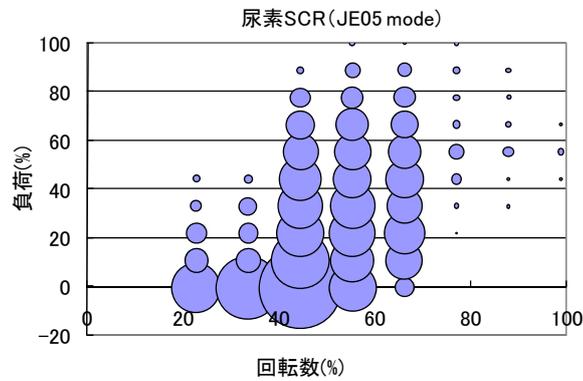


Fig. 3.2.1.7 JE05 モードのエンジン運転使用頻度
 (アイドリングのみ 1/10)

2) 試験群

両エンジン排気の色・反応関係の評価のために同一希釈倍率下での曝露（同一希釈系列）と、各エンジン排気中の PM と NO₂ 濃度を同一とした群（エンジン比較群）を設定した。

(1) 量・反応関係による検討（同一希釈系列）

試験群は両エンジン排気とも、高濃度群、中濃度群、低濃度群、清浄空気群の 4 群を設定した。対照エンジン排気の高濃度群は PM、NO₂ 濃度を環境基準の 10 倍を目安に設定した。結果の項にて後述するが、直接排気濃度に対する高濃度群の希釈倍率は 29 倍（CO₂ 濃度ベース）となる。中濃度群は、高濃度群の 1/10 の濃度とした。従って、中濃度群の濃度は直接排気濃度の 1/290 となる。同様に、低濃度群は、高濃度群の 1/20 の濃度とした。従って、低濃度群の濃度は直接排気濃度の 1/580 となる。清浄空気群には、プレフィルタ、活性炭フィルタ、高性能フィルタで濾過し、温度 23℃、相対湿度 55% の空調空気を供給した。

(2) 尿素添加システムの有無による検討（エンジン排気比較系列）

同一運転条件下では、尿素 SCR エンジン排気と対照エンジン排気で排気中の PM 濃度、NO₂ 濃度が異なることから、尿素添加システムの有無による排気の影響を明らかにするため、健康リスクの大きい PM と NO₂ をそれぞれの排気で同一に設定した。

尿素 SCR エンジン排気のエンジン比較群の NO₂ 濃度は、対照エンジン排気の高濃度群の濃度になるよう清浄空気で希釈した。対照エンジン排気のエンジン比較群では、NO₂ 濃度は高濃度群と同一にして、PM 濃度は PM 除去用フィルタを用いて、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の約 1/2 に設定した。その結果、尿素 SCR エンジン排気の希釈倍率が対照エンジン排気に比して 2 倍（濃度 1/2）になるが、尿素添加システムの有無による排気の評価が可能となる。

3.2.1.5 モニタリング

曝露チャンバー内の流量、圧力、温度、湿度をモニタリングした。

エンジン排気成分は、曝露チャンバーと希釈トンネルで測定した。測定項目と測定回数等を表 3.2.1.4 に示す。

1) 各曝露チャンバー（試験群）

NO_x、NO、NO₂ (NO_x-NO)、CO、CO₂、THC (HFID)、O₂は、連続分析計（堀場製作所 MEXA7100D）を用いて測定した。

PMはテフロン被覆ガラス繊維フィルタ (Pallflex TX40HI20WW) 上に捕集し、25°C、50%RH 下で恒量化後に重量測定 (Mettler UMX2) した。

PM個数濃度は、走査型移動度粒径測定器 (SMPS, TSI Model 3081) を用いて測定した。

NH₃、SO₂は、吸収液としてそれぞれ0.5%硼酸水溶液、3%過酸化水素水を用いて捕集し、イオンクロマトグラフ (IC) で分析した。また、RCHOは3.8N過塩素酸性2,4-DNPH溶液に捕集し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) で分析した。

ガス状のHC類とN₂Oはテドラーバッグに捕集後、ガスクロマトグラフ (GC) で分析した。

高沸点の多環芳香族炭化水素 (PAH) はテフロン被覆ガラス繊維フィルタフィルタで、ガス状PAHは吸着剤としてAmberlite XAD2樹脂を含んだエムポアフィルタにそれぞれ捕集後、ジクロロメタンを用いて湯浴温度60°Cで24時間ソックスレー抽出し、KD濃縮後にDMSO置換してHPLCで分析した。

尿素由来成分のうちPM状の成分は円筒ろ紙 (Advantec 88RH) で、ガス状の成分はメタノール吸収液にそれぞれ捕集した。円筒ろ紙はメタノールを溶媒としてソックスレー抽出し、吸収液と合わせてエバポレーターで溶媒除去した。次に、尿素由来成分をトリメチルシリル化してGCMS (Agilent 6890, JEOL SX-102A) 分析した。CN化合物は、2%NaOH吸収液に捕集後、ピリジン・ピラロゾン吸光光度法で測定した。

2) 希釈トンネル

分析に多量のPMを必要とする項目に対しては、曝露チャンバーからの捕集は困難である。

そのため希釈トンネル装置からハイボリュームサンプラーを用いてテフロン被覆ガラス繊維フィルタ（Pallflex TX40HI20WW）あるいは石英繊維フィルタ上にPMを捕集した。このPM捕集フィルタのうち数枚を解析用とし、それらを合せて1サンプルとした。ジクロロメタンを用いてソックスレー抽出して化学成分分析や*in vitro*試験に供した。抽出物（SOF）中のPAHはHPLCにより分析した。ジニトロピレンは前処理後にオンライン還元濃縮化学発光HPLC法により、キノン類はGCMS法により分析した。PM中の金属元素は、酸分解後にICPMSにより分析した。

表 3.2.1.4 曝露チャンバーと希釈トンネルの測定項目概要

測定項目	サンプリング材等	測定方法	測定箇所	測定回数
NO _x , NO, (NO ₂)		連続測定 (CLA)	チャンバ	7~8/日
CO		連続測定 (NDIR)	チャンバ	7~8/日
CO ₂		連続測定 (NDIR)	チャンバ	7~8/日
THC		連続測定 (FID)	チャンバ	7~8/日
O ₂		連続測定 (MP)	チャンバ	7~8/日
粒子	フィルタ	重量測定	チャンバ	1~2/日
粒子個数濃度分布		走査型移動度粒径測定器 (SMPS)	チャンバ	2~3/7日
NH ₃	0.5%ホウ酸吸収液	イオンクロマトグラフィ (EC)	チャンバ	3/7日
RCHO	2,4-DNPH/3.8N過塩素酸吸収液	高速液体クロマトグラフィ (UV/VIS)	チャンバ	2/7日
SO ₂	3%H ₂ O ₂ 吸収液	イオンクロマトグラフィ (EC)	チャンバ	3/7日
HC	バッグ	ガスクロマトグラフィ (FID)	チャンバ	2/7日
N ₂ O	バッグ	ガスクロマトグラフィ (ECD)	チャンバ	2/7日
PAH	フィルタ	高速液体クロマトグラフィ (FL)	チャンバ	2/7日
PAH(Gas)	吸着剤	高速液体クロマトグラフィ (FL)	チャンバ	2/7日
尿素由来	メタノール吸収液	TMS後GCMS	チャンバ	2/7日
HCN	2%NaOH吸収液	吸光度法	チャンバ	2/7日
PM	フィルタ	重量測定	希釈トンネル	7/7日
金属元素	フィルタ	高周波誘導結合プラズマ発光分析 (ICPMS)	希釈トンネル	1/7日
SOF		CH ₂ Cl ₂ 抽出	希釈トンネル	1/7日
PAH	SOFについて分析	高速液体クロマトグラフィ (FL)	希釈トンネル	1/7日
DNP	SOFについて分析	高速液体クロマトグラフィ (CL)	希釈トンネル	1/7日
Quinone類	SOFについて分析	ガスクロマトグラフィ (MS)	希釈トンネル	1/7日
変異原性	SOFについて分析	エームス試験	希釈トンネル	1/7日

(1) エームス試験

希釈トンネルより捕集したPMの抽出物(SOF)の変異原性をエームス試験で評価した。試験にはジメチルスルホオキシド(DMSO)で溶解したSOFを用いた。試験菌株は、塩基対置換型(TA100)、フレイムシフト型(TA98)の2菌株を用い、プレインキュベーション法により、直接法(-S9mix)と代謝活性化法(+S9mix)で試験した。陰性対照物質(溶媒対照)には、被験物質の調製に用いたDMSOを用いた。陽性対照物質として、直接法(-S9mix)にはAF²¹(和光純薬工業(株)製、98%、特級)を、代謝活性化法(+S9mix)にはBaP²²(和光純薬工業(株)製、98%、特級)を用いた。結果の判定基準は、復帰変異コロニー数が用量-反応関係を示し、さらに、陰性対照(DMSO)の復帰変異コロニー数の2倍

²¹ **AF-2** [2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide]: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド。エームス試験の直接法(-S9mix)で陽性対照の標準物質として使用。

²² **BaP** [Benzo(a)pyrene]: ベンゾ(a)ピレン。エームス試験の代謝活性化法(+S9mix)で陽性対照の標準物質として使用。

以上を示す場合を陽性 (+)、1.5 倍から 2 倍を疑陽性 (±)、1.5 倍以下を陰性 (-) とした。さらに、用量-反応関係が直線性となる場合、その範囲について抽出物 (mg) 当たりの復帰変異コロニー数を変異原性の強さとして比活性値で表した。

(2) 酸化活性測定 (DTT アッセイ)

DTT²³を用いて粒子の酸化活性を評価した。サンプルは、希釈トンネルより捕集した PM 中の SOF を DMSO に溶解して用いた。Tris-HCl 緩衝液 250 mM (pH 8.9) を窒素でバブリングしてアッセイ溶媒とし、サンプルごとに希釈系列を作製した。準備したサンプル溶液を 1 ml に対し、20 mM DTT 溶液 10 µl をチューブ内で混和し、37°C の温水槽にて 30 分間インキュベートした。さらに、サンプル 1 ml に対し 20 mM DTNB²⁴溶液 16.6 µl を加え、その反応液を 405 nm で吸光度を測定し、DDT50%消費濃度を算出して評価した。

3.2.2 健康影響評価

3.2.2.1 ラット短期吸入曝露試験

1) 供試動物

吸入曝露に供する実験小動物は、近交系²⁵である雄性 Fischer 344 ラットを用いた。本系統は、下記のような特性をもつことが知られている (フィッシャーラット、1996 ; 日本チャールス・リバー株式会社ホームページ、2008)。

- 遺伝的に安定した近交系
- 小型・温和で取り扱いが容易
- 寿命が長く丈夫
- 悪性固形腫瘍の発生率が低い
- 1週間の交尾率は50%であり、SDやWistarなどの系統よりも低率
- 出生率、哺育率は95%と高率
- 繁殖性安定 (異常産子が少ない)
- 産子数²⁶が少ない

これらの特性から、安全性又は一般毒性、癌原性試験、炎症、免疫 (アレルギー、移植)、発癌、循環、神経系 (中枢や行動)、老化などの試験に使用されている。また、既知のディーゼル排気の吸入曝露試験にも多く使用されており (Tsukue et al., 2001 ; Ishinishi et al., 1986 ; Gross KB, 1981)、過去の知見データと比較しやすい。また、性周期によるデータのばらつきが少ない雄を選択した。

ラット (F344/DuCrI CrIj) は日本チャールス・リバー株式会社より 7 週齢で導入し、1 週

²³ DTT[dithiothreitol] : ジチオスレイトール。還元剤。

²⁴ DTNB[5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] : チオール基を比色定量する試薬。イールマン試薬。

²⁵ 近交系[inbred strain] : 兄妹交配あるいは親子交配を 20 代以上継続している系統。

²⁶ 産子数 [litter size] : 1 回の分娩で出産される (一腹あたりの) 子数。

間の検疫後、性成熟の安定した 8 週齢より吸入曝露試験に供した。1 群 24 匹（6 匹／評価項目）を使用し、各エンジン排気に対して 120 匹（5 群）、総計 240 匹を用いた（Fig. 3.2.2.1）。検疫から曝露を通して微生物学的に清浄な環境下で飼育した。また、飼育状況は 1 ケージあたり 3 匹ずつ金網ケージで、自由摂餌（CRF-1、ガンマ線照射滅菌飼料 30kGy、日本チャールス・リバー（株））および自由摂水（紫外線殺菌水道水）とした。明暗周期は 12 時間周期とし、午前 7 時から午後 7 時までを明期とした。

体重、摂餌量および摂水量は、曝露前日より曝露終了までの毎日、曝露終了時に測定した。なお、摂餌量および摂水量は、ケージごとに計測した。

実験動物の使用にあたっては、JARI が定めた「動物実験に関する指針」に基づき、JARI 動物実験委員会の承認を得て、本試験を実施した。

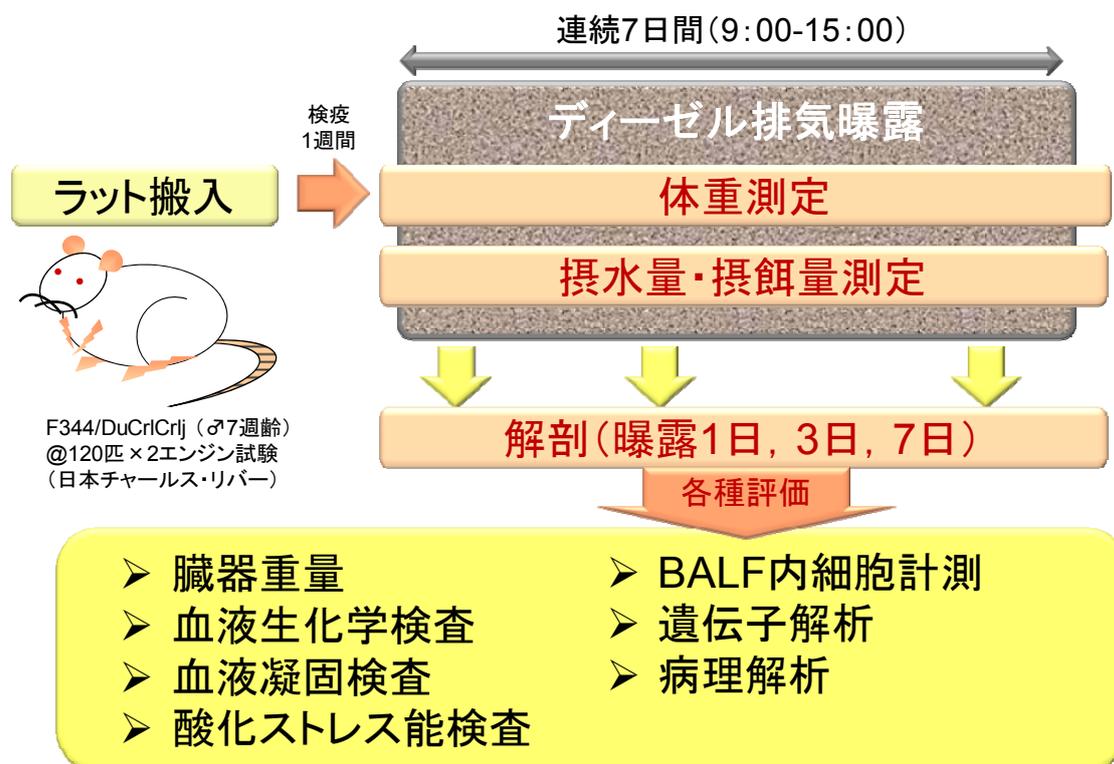


Fig. 3.2.2.1 計測項目および評価項目

2) 試験群と曝露期間

試験群は、前述のように両エンジン排気とも高濃度群、中濃度群、低濃度群、清浄空気群、エンジン比較群の 5 群を設定し、量・反応関係による検討（同一希釈系列）および尿素添加システムの有無による検討（エンジン排気比較系列）を行った。

曝露時間は午前 9 時から午後 3 時までの 6 時間とし、1、3、7 日間の吸入曝露を実施した。（表 3.2.2.1）

また、曝露チャンバー内の温度および湿度をモニターし、チャンバー内環境を管理した。

表 3.2.2.1 各試験群の目標曝露濃度（清浄空気群を除く）

	試験群 希釈比	高濃度 1/1	中濃度 1/10	低濃度 1/20	エンジン比較
尿素SCRエンジン	PM mg/m ³	0.04	0.004	0.002	0.02
	NO ₂ ppm	0.8	0.08	0.04	0.4
対照エンジン	PM mg/m ³	0.9	0.09	0.05	0.02
	NO ₂ ppm	0.4	0.04	0.02	0.4

3) 評価項目

本試験では、吸入時の第一標的臓器である呼吸器系の急性炎症を中心に関連する酸化ストレス²⁷誘導や病態生理・生化学的変化を解析評価した。加えて、呼吸器系に深い循環器系や、超微小粒子の移行（Oberdörster et al., 2004）が報告されている中枢神経系への影響も同時に評価した（Fig. 3.2.2.2）。各臓器の評価には、疾病発症予測の目的で遺伝子解析²⁸（リアルタイム PCR 解析²⁹および DNA マイクロアレイ解析）を、また、病態生理・生化学的変化把握のために生理学的見地から BALF³⁰および血液検査（酸化活性、血液生化学、血液凝固能）を、形態学的見地から臓器重量測定および病理解析を行った（Fig. 3.2.2.3）。なお、ディーゼル排気（Diesel Exhaust ; DE）の吸入曝露による生体内の影響、およびその評価についてのフローチャートを Fig. 3.2.2.4 に示した。曝露を受けた生体内では、それに応答するために細胞核内で DNA から遺伝子情報が転写され、アミノ酸代謝により薬物代謝酵素などのタンパク質の合成が行われる。それらは炎症や病態生理・生化学的変化となって発現し、最後には疾病となり発症にいたると考えられる。

また、細胞曝露試験により、排気の簡易スクリーニング評価を行った。この試験では、排気成分の濃度ではなく希釈比で評価するために、希釈比1/1の高濃度群と希釈比1/10の中濃度群の排気を用いた。入手可能で、かつ安全性の高い培養細胞株で、大気汚染研究や炎症に関連する研究（Huttunen et al., 2003 ; Fujii et al., 2003）で広く活用され、肺傷害に対し防御作用を示すヒト呼吸器系由来培養細胞A549を細胞曝露装置にセットし、清浄空気群から中濃度群、高濃度群の順で1時間ずつ曝露した。なお、A549³¹は、細胞バンクとして世界的に高い評価のある American Type Culture Collection（ATCC）より入手した。

²⁷ 酸化ストレス [Oxidative stress] : 体内で発生する活性酸素と、活性酸素を消去する抗酸化能のバランスが崩れることによって生じ、細胞機能障害や細胞死を引き起こす。

²⁸ 遺伝子解析 [gene analysis] : 遺伝子の発現量（タンパク質の合成量）について、その鋳型となる mRNA の発現量を解析する。

²⁹ リアルタイム PCR [Real Time-Polymerase Chain Reaction] 解析 : リアルタイムに定量しながら酵素を用いて核酸増幅し、特定の配列の DNA 量を検出する方法。遺伝子の発現量を測定するためには、mRNA の情報を DNA に逆転写してから測定する。

³⁰ BALF [Bronchoalveolar Lavage Fluid] : 気管支肺胞洗浄液。BALF 内の白血球数やその分画を確認することで、炎症状態を把握できる。

³¹ ヒト呼吸器由来培養細胞（ヒト肺上皮細胞株 A549） [human lung alveolar carcinoma cells、 type II pneumocytes] : 大気汚染研究や炎症に関連する研究で活用されており、肺傷害に対し防御作用を示す II 型のヒト肺上皮細胞。

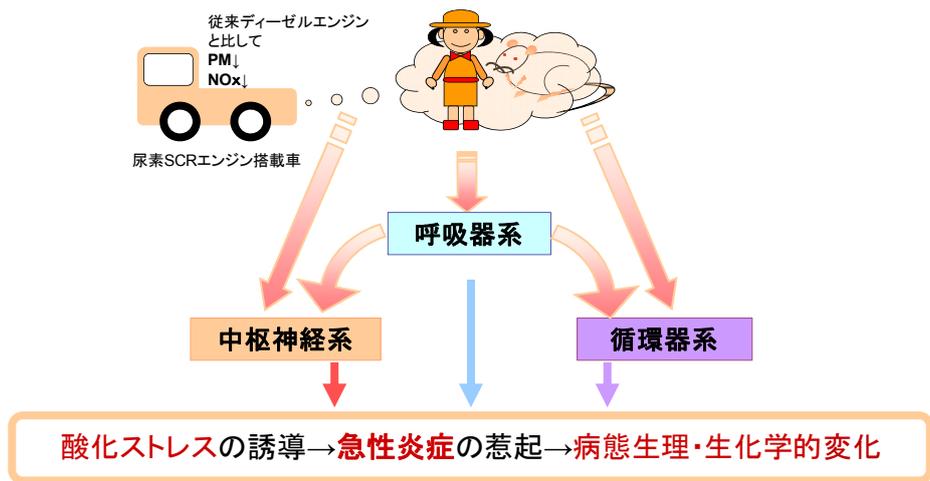


Fig. 3.2.2.2 尿素 SCR エンジン排気曝露による影響についての仮説

	酸化ストレス	炎症	病態生理・ 生化学的变化
呼吸器系 	遺伝子解析 : CYP1A1, HO-1	遺伝子解析 : IL-1 β , TNF α BALF (気管支肺胞洗浄液) : 細胞数, 細胞分画	血液生化学 : PO ₂ , PCO ₂ , pH 病理 (光顕) : 形態変化
循環器系 	遺伝子解析 : CYP1A1, HO-1 血液酸化ストレス : 8-OHdG, PAO	遺伝子解析 : IL-1 β , TNF α	血液生化学 : Na ⁺ , K ⁺ , BUN 病理 (光顕) : 形態変化
中枢神経系 	遺伝子解析 : CYP1A1, HO-1	遺伝子解析 : IL-1 β , TNF α	病理 (光顕) : 形態変化

Fig. 3.2.2.3 健康影響解析項目概覧

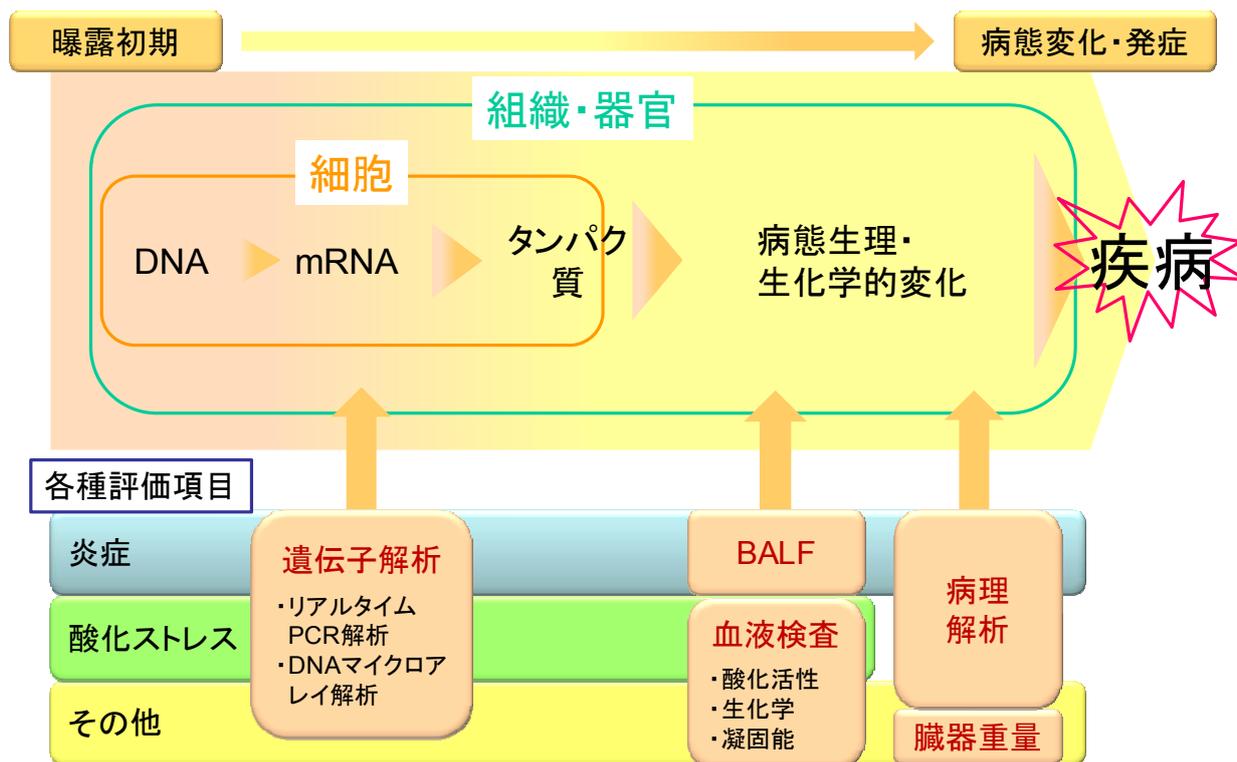


Fig. 3.2.2.4 吸入曝露試験評価のながれ

4) 動物解剖

各吸入曝露期間終了後、ラットを解剖した。試料採取スケジュールを表 3.2.2.2 に示した。1 日曝露動物の解剖は曝露終了後、3、7 日曝露動物は曝露終了翌日にサンプリングした。なお、7 日曝露動物は病理解析用に曝露終了後にサンプリングした。両エンジン排気とも、曝露の影響を考慮し、排気濃度の高い群から、高濃度群、中濃度群、低濃度群、エンジン比較群、清浄空気群の順で解剖した。

ラットにペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液、50 mg/mL、大日本製薬株式会社）を 1 匹あたり 15 mg 腹腔内投与し全身麻酔処置をした後、開胸し心採血（右心室）を行った。

摘出臓器は、1 日曝露では気管・肺、心臓、大脳のみ採取し、3、7 日曝露では気管・肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、大脳、小脳を採取した。各サンプリング手順を Fig. 3.2.2.5 に示した。

表 3.2.2.2 試料採取スケジュール

曝露期間(日)		1	2	3	4	5	6	7	(8)
解剖・サンプリング	サンプリング数	◎ 曝露直後			◎ 曝露翌日			◎ 曝露直後	◎ 曝露翌日
ラット吸入曝露試験									
体重・摂餌量・摂水量計測	~24	○	○	○	○	○	○	○	○
臓器重量	6	○			○				○
血液生化学検査		○			○				○
血液酸化ストレス		○			○				○
BALF採取					○				○
遺伝子解析		○			○				○
血液凝固検査	6							○	
病理解析								○	
細胞曝露試験									
細胞毒性試験	3		○						
遺伝子解析	3			○					

但し、計24匹/群、5群、120匹/エンジン試験。1日曝露は曝露直後、3および7日曝露は曝露翌日に解剖した。ペントバルビタールNa処置(ip)後、右心採血にて解剖に供した

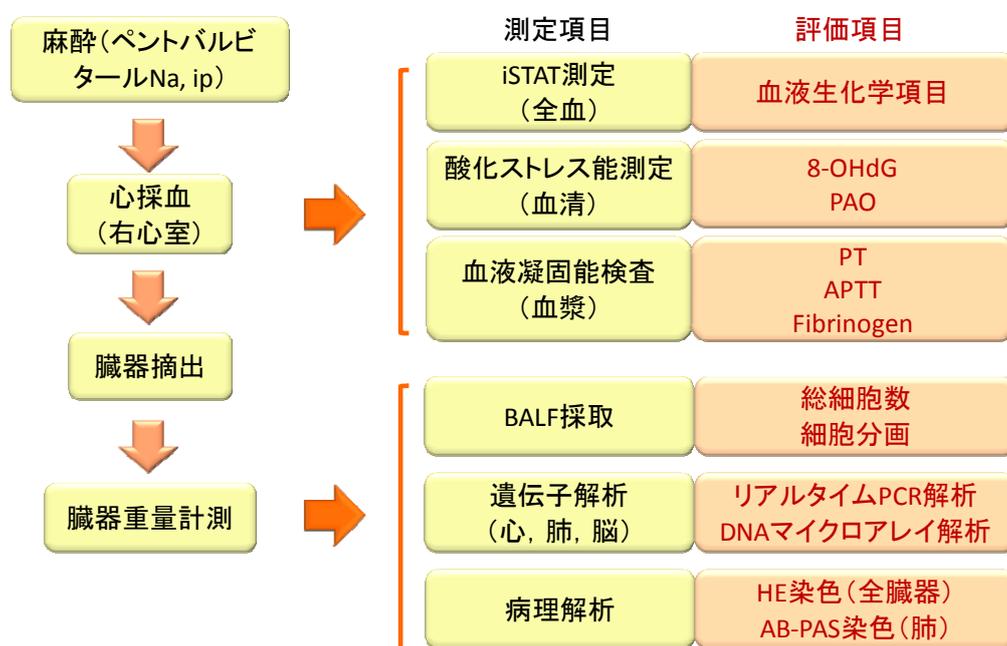


Fig. 3.2.2.5 各種サンプリングフロー

5) BALF 採取

3、7日曝露ではBALF³²採取を行い、気道および肺内の炎症を評価した (Fig. 3.2.2.6)。

³² BALF[Bronchoalveolar Lavage Fluid]:気管支肺胞洗浄液。

ラットの気管・肺を摘出し、重量計測後、気管にカテーテルを挿入した。右肺前葉は遺伝子解析に使用するため、右主気管支肺門部を結紮し BAL 液が混入しないようにした。甲状腺下部より、カテーテル（アトム静脈カテーテル節付 5Fr.、Cat.No. 44405、アトムメディカル株式会社）を気管内に挿入し、調整しておいた BAL 液（9.6 g/L PBS³³, 1 g/L BSA³⁴, 18.6 mg/L EDTA 2Na³⁵）1.5 ml を 4 回出し入れし、それを 3 回繰り返して、気管・肺を洗浄し回収した。

採取した BALF を 4°C、1000 rpm で 10 分間遠心し上清を採取した。また、沈査（上清を含む 500 μL）のうち、50 μL を Türk 150 μL と混和し、細胞数を Bürker-Türk 血球計算盤で測定し、下記の式で総細胞数を計算した。

$$4 \text{ 視野平均計測数} \times 10 \text{ (深さ)} \times \text{希釈倍率} = \text{細胞数 (}/\mu\text{L)}$$

一方、沈査のうち 100 μL を BAL 液 300 μL と混和し、その溶液 100 μL と BAL 液 100 μL をサイトスピンした。風乾後、ディフクイック（Diff-Quik、国際試薬株式会社）染色³⁶して細胞を 200 個計測し、細胞分画（マクロファージ（Mφ）、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球）を算出した。

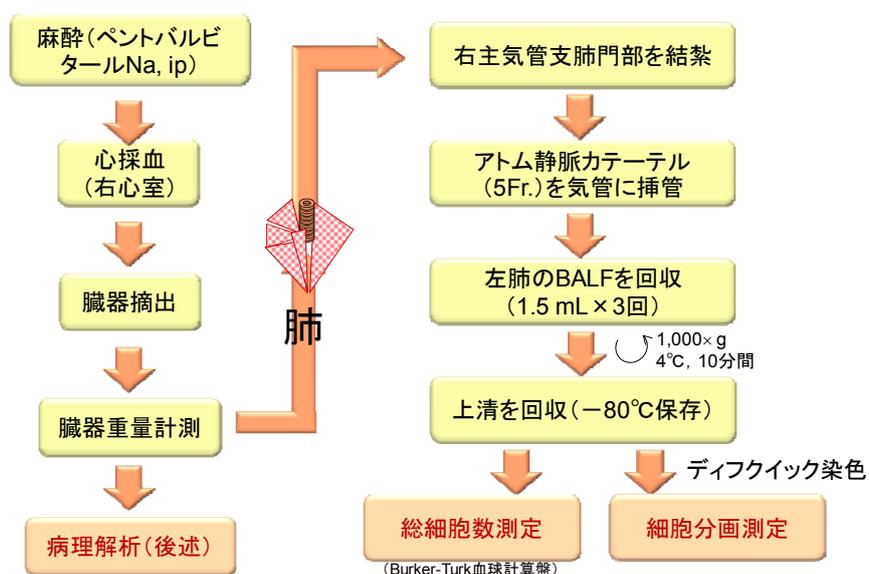


Fig. 3.2.2.6 BALF 採取フロー

³³ PBS [Phosphate-Buffered Salines]: リン酸緩衝液。生体内で普遍的に見出されるイオンで構成されるため、等張になるように調製されている。

³⁴ BSA [Bovine Serum Albumin]: 酵素を安定化するが、それ自身は酵素の性質には影響しない。

³⁵ EDTA 2Na [Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate]: エチレンジアミン四酢酸。抗凝固作用や保存効果がある。

³⁶ ディフクイック染色: 迅速な鑑別用血液染色液。

6) 血液検査

(1) 血液生化学検査

血液生化学検査は、1、3、7日曝露したラットの血液（全血）を用いた。アイ・スタットカートリッジEG7+、6+およびCrea（扶桑薬品工業株式会社）に全血を適量滴下し、汎用血液ガス分析装置（アイ・スタットアナライザー300F、扶桑薬品工業株式会社）を用いて下記の生化学検査項目を測定した（Fig. 3.2.2.7、表 3.2.2.3）。

アイ・スタットカートリッジEG7+は、Na（ナトリウム）、K（カリウム）、iCa（イオン化カルシウム）、Hct（ヘマトクリット）、pH、pCO₂（炭酸ガス分圧）およびpO₂（酸素分圧）の測定値、およびHgb（ヘモグロビン）、HCO₃（重炭酸）、TCO₂（総炭酸ガス）、BE（ベークエクセス）およびsO₂（酸素飽和度）の計算値。

アイ・スタットカートリッジ6+は、Glu（ブドウ糖）、BUN（尿素窒素）、Na、K、Cl（クロール）およびHctの測定値、およびHgbの計算値。

アイ・スタットカートリッジCreaは、Crea（クレアチニン）の測定値。

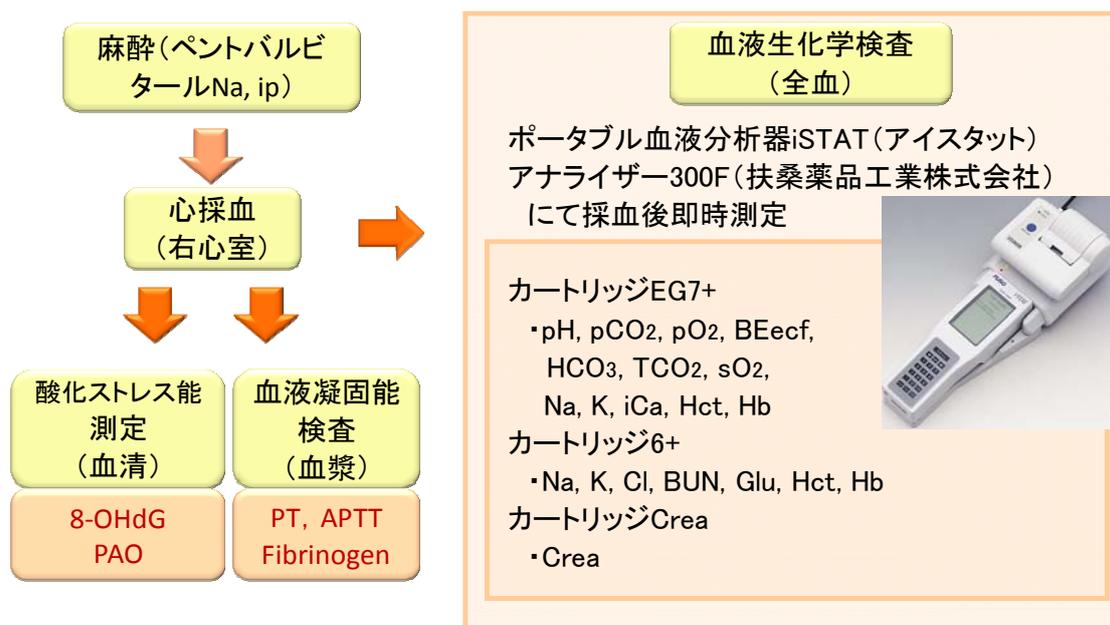


Fig. 3.2.2.7 血液生化学検査フロー

表 3.2.2.3 血液生化学検査項目一覧

検査項目	英名	和名	単位
pH	potential hydrogen, power of hydrogen	水素イオン指数	-
pCO ₂	carbon dioxide tension	炭酸ガス分圧	mmHg
pO ₂	oxygen tension	酸素分圧	mmHg
BEecf	base excess	ベークエクセス	mmol/L
HCO ₃	bicarbonate	重炭酸	mmol/L
TCO ₂	bicarbonate, total CO ₂	総炭酸ガス	mmol/L
sO ₂	oxygen saturation	酸素飽和度	%
Hct	hematocrit	ヘマトクリット	%PCV
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン	g/dL
Na	sodium	ナトリウム	mmol/L
K	potassium	カリウム	mmol/L
Cl	chlorine	クロール	mmol/L
iCa	calcium	イオン化カルシウム	mmol/L
BUN	blood urea nitrogen	尿素窒素	mg/dL
Crea	creatinine	クレアチニン	mg/dL
Glu	glucose	ブドウ糖	mg/dL

(2) 血液凝固能検査

血液凝固³⁷能検査には、7日曝露の病理解析用ラットの血漿を用いた (Fig. 3.2.2.8)。採血後、クエン酸ナトリウム³⁸と血液が1:9になるように、3.13%クエン酸ナトリウム溶液に血液を加え、血漿を分離した。全自動血液凝固線溶測定装置 STA Compact (ロシュ社)を用いた粘度変化検知方式により、血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT³⁹)、プロトロンビン時間 (PT⁴⁰)、フィブリノーゲン量を測定した。

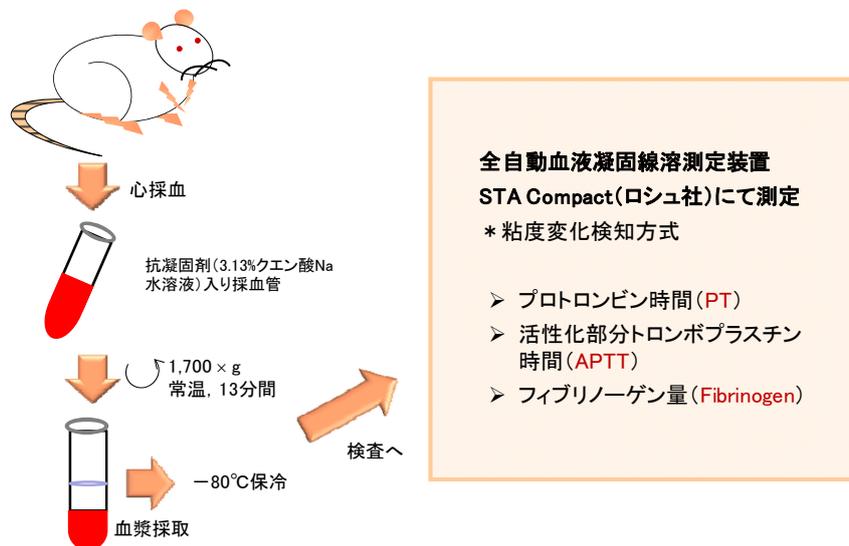


Fig. 3.2.2.8 血液凝固能検査フロー

³⁷ 凝固：フィブリノーゲンがトロンビンの作用によって フィブリンに変化する現象。

³⁸ クエン酸ナトリウム：血液抗凝固剤。血液中に遊離している Ca²⁺がクエン酸カルシウムとなって除去され、凝固が進行しない。

³⁹ APTT [Activated Partial Thromboplastin Time]：第 XII、XI 因子（内因系）、高分子キニノゲン、プレカリクレインを十分に活性化して、第 IX、VIII 因子（内因系）と共通凝固系を見る検査。

⁴⁰ PT [Prothrombin Time]：第 VII 因子（外因系）と共通凝固系の因子を見る検査。

(3) 酸化ストレス能検査

酸化ストレス⁴¹能検査では、1、3、7日曝露したラットの血清を用いた。

採血後、血液をプレイン真空採血管（真空採血システム・ベネジェクト II、VP-P070K30、テルモ株式会社）に入れ、遠心後、血清を得た。

酸化ストレス能測定には、酸化的損傷の指標としてディーゼル排気影響によく用いられている 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)⁴² (Valavanidis et al., 2005) および全般的な抗酸化能として Potential Anti Oxidant (PAO)⁴³を用いた。なお、測定レンジ範囲外の数値については、検出されないデータ (Not Detected: ND) として解析からは除外した。

⁴¹ **酸化ストレス** [Oxidative stress]: 体内で発生する活性酸素と、活性酸素を消去する抗酸化能のバランスが崩れることによって生じ、膜脂質、DNA、蛋白質などの生体高分子に修飾や障害を与え細胞機能障害や細胞死を引き起こす。的確な評価には生体内における活性酸素（損傷レベル）と抗酸化能の両面を測定する必要がある。

⁴² **8-OHdG** [8-hydroxy-2'-deoxyguanosine]: 遺伝子 DNA が修復される過程で細胞外に排出され、さらに血液を経て尿中に排泄される。また、比較的安定な物質で、生体内で代謝や分解されることなく尿中に速やかに排泄されることから、活性酸素による生体損傷を鋭敏に反映する優れたバイオマーカーとされている。

⁴³ **PAO** [Potential Anti Oxidant]: 尿酸を利用して、水溶性、脂溶性の抗酸化物質を幅広く検出することで抗酸化能（還元能）を評価。

a) 酸化損傷 (8-OHdG) の測定

「高感度 8-OHdG Check ELISA」(Cat.No. KOG-HS10/E, 測定レンジ: 0.125~10 ng/mL, 日本老化制御研究所) キットを用いて、血清中の 8-OHdG を測定した。測定方法は、キット添付のプロトコールに従った。添加回収試験で回収率を確認した後、特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA⁴⁴を行い、マイクロプレートリーダー (Model 680、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)) を用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。なお、血清はマイクロコン (Microcon Ultracel YM-10, Cat.No. 42407, MILLIPORE) を用いた限外濾過法⁴⁵で遠心し、その濾液をサンプルとした。

b) 抗酸化能 (PAO) の測定

抗酸化能測定キット「PAO」(Cat.No. KPA-050, 測定レンジ: 21.9~4378 $\mu\text{mol/L}$ (reduction power), 日本老化制御研究所) を用いて、血清中の抗酸化力の評価を行った。キット添付のプロトコールに従って血清を処置し、マイクロプレートリーダーで波長 490 nm の吸光度を測定した。サンプルの吸光度から検量線により尿酸相当濃度 (mmol/L) を算出し、さらに下式にて銅イオンに対する還元力を計算した。

$$\text{Cu 還元力 } (\mu\text{M}) = \text{尿酸 } (1 \text{ mM}) \times 2189$$

7) 遺伝子解析

生体内での反応を解析するには血液検査や病理解析などの方法があるが、病態生理・生化学的变化として発現する前の変化は、目的遺伝子の発現変動により捉えることが可能である。ほとんどの遺伝子⁴⁶はタンパク質をコードしており、一部の例外を除きセントラルドグマ⁴⁷に従って転写、翻訳が行われる (Fig. 3.2.2.9)。そのため、遺伝子の発現量 (タンパク質の合成量) は、その鋳型となる mRNA⁴⁸ の発現量を見ることで、ある程度の定量化が可能となる。

⁴⁴ **ELISA** [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay]: 試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられる方法。

⁴⁵ **限外濾過法**: 限外濾過膜 (細孔径が 1 nm から 100 nm (0.1 μm) の範囲の多孔質膜) による膜分離。

⁴⁶ **遺伝子** [gene]: 生体の DNA の一部分で、一つのタンパク質の情報を持つ DNA の部分。遺伝子が翻訳されてタンパク質が作られる。細胞分裂の際には DNA が複製され、同じ遺伝子を持つ 2 つの細胞ができる。遺伝子は次の世代にも受け継がれる。

⁴⁷ **セントラルドグマ** [Central dogma]: フランシス・クリックが 1958 年に提唱した分子生物学の概念。遺伝情報は DNA \rightarrow (複製) \rightarrow DNA \rightarrow (転写) \rightarrow RNA \rightarrow (翻訳) \rightarrow タンパク質の順に伝達されると主張するもの。

⁴⁸ **mRNA** [messenger ribonucleic acid]: 伝令 RNA。蛋白質に翻訳され得る塩基配列情報と構造を持った RNA。DNA からコピーした遺伝情報を担っており、その遺伝情報は、特定のアミノ酸に対応するコドンと呼ばれる 3 塩基配列になっている。

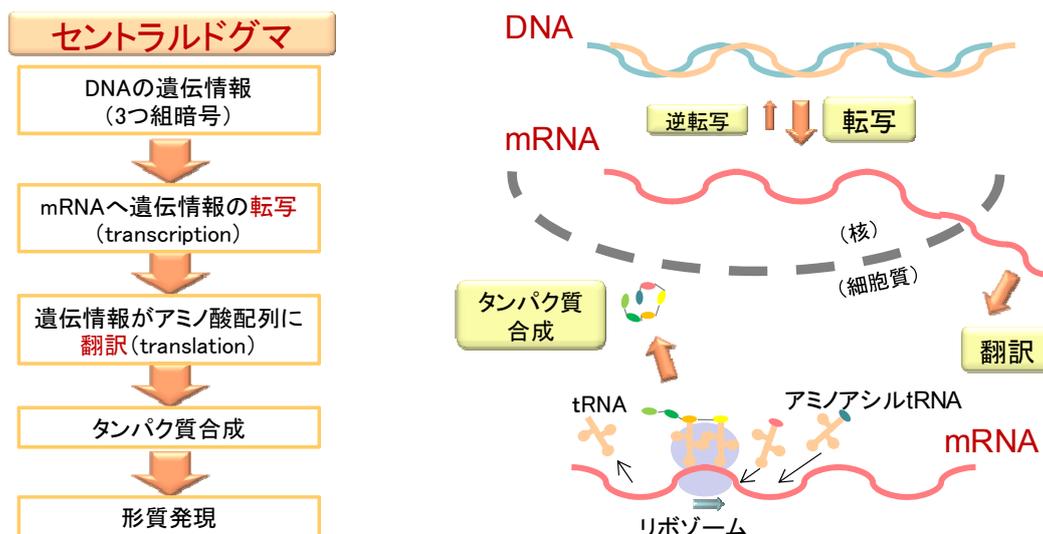


Fig. 3.2.2.9 遺伝情報の流れ

ここでは、JARIで頻用しているリアルタイムPCR法とDNAマイクロアレイ法を用いて、遺伝子発現量を解析した（表 3.2.2.4）。

リアルタイムPCR解析は、増幅させた検討遺伝子の立ち上がりサイクル数（Cycle Threshold:Ct値）を求めて、内部標準遺伝子と比較する方法で解析した。一方、DNAマイクロアレイ解析は、細胞や組織から抽出したmRNAからcDNAを合成し、蛍光色素で標識したものとハイブリダイズさせることで、発現変動している遺伝子を蛍光強度により検出し、網羅的に定性評価した。

遺伝子解析は、1日、3日、7日曝露したラットの気管・肺、心臓、大脳での遺伝子発現を解析した（Fig. 3.2.2.10）。遺伝子解析用の採取部位は、肺が右肺前葉、心臓が左心室壁（冠状動脈の回旋枝付近）とした。また、大脳は、右側の脳皮質を3等分に前頭断したうち中央部の側頭葉（およびArea 6）とした。

表 3.2.2.4 リアルタイムPCR解析とDNAマイクロアレイ解析の特徴

リアルタイムPCR解析		DNAマイクロアレイ解析
定量的	評価	定性的
リアルタイムPCRでは、PCR増幅産物をリアルタイムでモニタリングし指数関数的増幅領域で定量を行う	概念	複数の遺伝子を同時に、網羅的に解析
PCR産物の増幅速度は、蛍光色素の蛍光強度によって検出	検出方法	mRNAを抽出し、逆転写によって合成したcDNAをそれぞれ異なる蛍光色素(Cy3(緑)、Cy5(赤))で標識することにより、競合的にハイブリダイゼーションさせ検出
1遺伝子	解析遺伝子数	搭載遺伝子数(4万など)

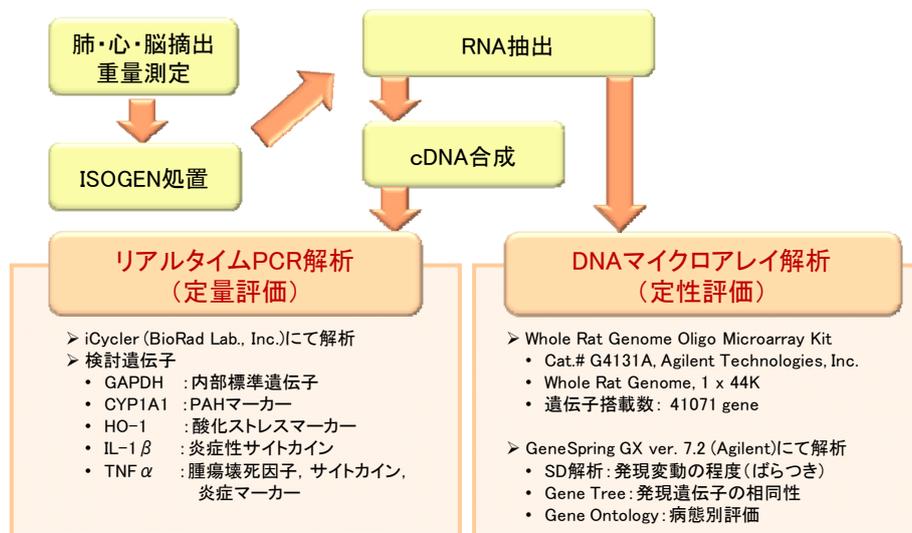


Fig. 3.2.2.10 遺伝子解析概要

(1) RNA 抽出

RNA 抽出用試薬 ISOGEN (Cat.No. 311-02501、株式会社ニッポンジーン) 記載マニュアルに従って、各臓器サンプルを total RNA 抽出した。臓器をホモジネートし、クロロホルムおよびイソプロピルアルコールで処置後、アルコールを除き、風乾させた。その後、DEPC⁴⁹処理水を加え、分光光度計により 260 nm と 280 nm の OD⁵⁰値を測定し、RNA 量を計算した。

(2) cDNA 合成

逆転写酵素キット (SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Cat. No. 18080-051, Invitrogen) を用い、キット内に添付されたマニュアルに従って、total RNA を cDNA に合成した。

(3) リアルタイム PCR 解析

QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR kit (Cat.# 204143, QIAGEN) を使用し、キット添付のプロトコールに従って解析した。96 wellプレート (PCR-96-RT, BM Bio) にサンプルおよびPCR反応試薬(表3.2.2.5)をアプライした。10X External Well Factor Solution (BioRad Laboratories, Inc.) で CCDカメラの補正を行った (Well Factor Plate (External) 法) 後、iCycler IQリアルタイムPCR解析システムMC (No. 170-8740MC, BioRad Laboratories, Inc.) で、遺伝子の発現量を定量的に解析した (表3.2.2.6)。最後に、Melt CurveからPCR産物が単一なものであることを確認し、単一でなかったときにはデータを除外した。なお、サンプル解析は2本組みアッセイで行った。

⁴⁹ DEPC [Diethylpyrocarbonate]: DEPC で処理することにより RNase を不可逆的に失活させる。

⁵⁰ OD [Optical Density]: 光学密度。一般的には吸光度と呼ばれる。

表 3.2.2.5 リアルタイム PCR 解析に用いる Master Mix

	μl/well
Master mix	
2x SYBR I	10
20μM Sense Primer	0.3
20μM Antisense Primer	0.3
DEPC-MQ	4.4
サンプル	
cDNA 1 ng/μl	5
Total	20

表 3.2.2.6 Well Factor Plate 法による PCR 増幅サイクル

Well Factor	Cycle 1		95°C	10 sec	
			60°C	30 sec	
	Cycle 2		60°C	45 sec	
	Cycle 3		60°C	Hold	
Change Well factor plate to PCR plate.					
PCR	Cycle 1	1×	95°C	15 min	
	Cycle 2	50×	94°C	30 sec	
			55°C	30 sec	
			72°C	30 sec	
	Data collection and real-time analysis enabled.				
	Cycle 3	1×	95°C	1 min	
	Cycle 4	40×	55°C	1 min	
	Increase setpoint temperature after cycle 2 by 1°C				
Melt curve data collection and analysis enabled.					

評価した標的遺伝子とその遺伝子を増幅させるために必要な Primer の配列を表 3.2.2.7 に示した。検討した標的遺伝子は、Cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1)⁵¹、Heme oxygenase-1 (HO-1)⁵²、Interleukin-1 beta (IL-1β)⁵³そして Tumor necrosis factor alpha (TNFα)⁵⁴とした。

CYP1A1 は、DEP 中の多環芳香族炭化水素 (PAH) の曝露マーカーとして知られている (Baulig et al., 2003 ; Vogel et al., 2005)。

⁵¹ **CYP1A1** [Cytochrome P450 1A1]: PAH により発現誘導する酵素の一つで、酵素のシトクロム P-450 遺伝子 1A1 のタンパク質をコードする。

⁵² **HO-1** [Heme oxygenase-1]: ヘム (酸化促進剤、Mφ から TNFα を分泌させる) を、ビリベルジン (強力な抗酸化作用) と、一酸化炭素 (抗炎症作用、抗アポトーシス作用) と遊離鉄 (ROS 生成を触媒するが、分解反応時にフェリチンに取り込まれる) に分解する酵素。

⁵³ **IL-1β** [Interleukin-1 beta]: B 細胞を増殖させ、抗体産生を増強させる。単球、Mφ に作用して、TNFα、IL-1、IL-6、IL-8 の産生を誘導するなどの作用がある。

⁵⁴ **TNFα** [Tumor necrosis factor alpha]: Mφ、好中球の活性化により微小血栓形成作用がある。また、腫瘍細胞を障害 (抗腫瘍効果) したり、炎症を起した細胞のアポトーシスを誘発したりする作用がある。

HO-1 は、酸化ストレスマーカーであり、酸化ストレスから細胞を保護する生体防御機構の一つとして、重要な酵素である（高橋ら、2007；Li et al., 2002）。

IL-1 β は炎症マーカーであり（Pacheco et al., 2001）、単球・M ϕ 、リンパ球（B 細胞）、内皮細胞、ケラチノサイトなどから産生され、急性期反応を誘導する。

TNF α は腫瘍壊死因子、サイトカイン、炎症マーカーであり（Le Prieur et al., 2000）、M ϕ 、好中球、線維芽細胞、リンパ球（T 細胞）、肥満細胞、NK 細胞で産生される。

以上の検討遺伝子は、DE および DEP の曝露により発現変動が確認されている。なお、内部標準遺伝子⁵⁵として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を用い、発現量のサンプル間格差を補正した

表 3.2.2.7 ラット標的遺伝子とその Primer の配列

	Primer	Sequence		mer
GAPDH	Sense	5'- CAGTCAAGGCTGAGAATGG	-3'	19
	Antisense	5'- CGACATACTCAGCACCAGC	-3'	19
CYP1A1	Sense	5'- TGTGTATGGATTCCCAGCCTTC	-3'	22
	Antisense	5'- TGGACTCTTCAGACCTTTGGGA	-3'	22
HO-1	Sense	5'- AGAGTTTCCGCCTCCAACCA	-3'	20
	Antisense	5'- CGGGACTGGGCTAGTTCAGG	-3'	20
IL-1 β	Sense	5'- CTCACAGCAGCATCTCGACAA	-3'	21
	Antisense	5'- GCTCCACGGGCAAGACATAG	-3'	20
TNF α	Sense	5'- GACAAGGCTGCCCCGACTAT	-3'	20
	Antisense	5'- CAAGGGCTCTTGATGGCGGA	-3'	20

標的遺伝子の発現比較は、清浄空気群の発現量を 1 として発現比率を算出し、増幅が指数関数的に起こり一定の増幅産物量になるサイクル数（threshold Cycle: C_T 値⁵⁶）で評価した。

遺伝子発現サイクル差（対 GAPDH）： $\Delta C_T = C_{T(\text{target})} - C_{T(\text{GAPDH})}$

遺伝子発現比率（対 GAPDH）： $2^{-\Delta C_T}$

遺伝子発現比率（対 control）： $2^{-\Delta C_T(\text{target})} / 2^{-\Delta C_T(\text{control (mean)})}$

⁵⁵ 内部標準遺伝子：相対定量解析を行う際、サンプル間の定量値を補正するための遺伝子。

⁵⁶ Ct [Threshold cycle]値：リアルタイム PCR 法を用いた解析で、一定の増幅産物量になるサイクル数のこと。本来、リアルタイム PCR では、任意の PCR プロダクトを得るのに要した PCR サイクル数から標的遺伝子のテンプレート量（発現量）を計測するが、ターゲット遺伝子間および内部標準との増幅効率がほぼ等しいことを前提にした比較 Ct 法（ $\Delta\Delta C_T$ 法）では各サンプルを段階希釈し内部標準遺伝子を含む各標的遺伝子に対する検量線を作成する必要がない。

(4) DNA マイクロアレイ解析

DNA⁵⁷マイクロアレイ解析⁵⁸法により、現在、ほぼ全てのヒトやラットの遺伝子発現解析が可能であり、その簡便性や精度の高さからあらゆる疾患を対象とした毒性評価への応用が期待できるようになっている。これまでの JARI の試験経験より、搭載遺伝子数の多さや感度の高さからオリゴ DNA マイクロアレイを選定した。

複数の遺伝子を網羅的に定性解析する方法で、コントロールサンプルと比べて遺伝子発現量の変化が見られる遺伝子について、蛍光強度の増減と色調の変化の形で検出した (2色法)。

同一希釈系列の臓器サンプルは、1日曝露、7日曝露した高濃度群を被験物質とし、それぞれの清浄空気群を標準化物質とした。また、エンジン排気比較系列の臓器サンプルでは、7日曝露したエンジン比較群を比較するため、尿素 SCR エンジン排気を被験物質とし、対照エンジン排気を標準化物質とした。

抽出した total RNA を RNA6000 Nano LabChip[®] Kit (No.5065-4776, Agilent Technologies) を用いて、マイクロチップ型電気泳動装置 (Agilent 2100 bioanalyzer, Agilent Technologies) にて品質を確認した。抽出した total RNA を Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (No. 5184-3523, Agilent Technologies) のプロトコールに従って、cDNA を合成し、cyanine 3-CTP (Cy3-) / cyanine 5-CTP (Cy5-) 標識 cRNA⁵⁹を調製 (ただし、Cy3-は標準化群、Cy5-は検討群)、さらに、前述の RNeasy Mini Kit を用いて、cRNA を精製し、再度品質を確認した。Agilent In situ Hybridization kit-plus (No. 5184-3568, Agilent Technologies) を用いて、ハイブリダイゼーション⁶⁰溶液を作成し、Whole Rat Genome Oligo Microarray Kit (No. G4131A-60510, Agilent Technologies, Inc.) を用いて cRNA を Hybridize した。17時間後、ハイブリダイゼーションチャンバーから Oligo microarray を取り出し洗浄した。洗浄したオリゴ cDNA マイクロアレイは、Micro Array Scanner (No. G2505B, Agilent Technologies, Inc.) を用いて緑色波長 532 nm、赤色波長 633 nm で読み込み、Feature Extraction 9.5 で数値化を行った。画像解析ソフト Gene Spring GX ver. 7.3.1 (Agilent Technologies, Inc.) を用いて各遺伝子の発現量を解析した。さらに、遺伝子発現に関する各評価の計算は Microsoft Excel XP (Microsoft) を用いた。

DNA マイクロアレイ法では、遺伝子発現比率のばらつきが 0.67~1.5 倍の間で生じることが多いため、2 倍以上もしくは 0.5 倍以下に発現が変動した場合に「統計学的に有意差がある」と一般的に認知されている。従って、本試験でもこの判定基準を採用した。

⁵⁷ DNA [Deoxyribo Nucleic Acid] (デオキシリボ核酸) : アデニン(A)・チミン(T)・グアニン(G)・シトシン(C)の4つの塩基、デオキシリボース (五炭糖)、リン酸から成り立つ構成単位 (ヌクレオチド) をもつ。ヌクレオチド同士が結合して鎖を作る。2本のヌクレオチド鎖が、互いに、塩基を中心側に向けて水素結合でつながる。ヌクレオチド鎖は、糖分子の構造に基づく方向性を持っているが、2本が結合する時には常に逆向きに (反平行に) 結合することが知られている。これにより二重螺旋構造が形成される。

⁵⁸ DNA マイクロアレイ解析 [DNA microarray analysis] : 1回の試験で膨大な量の遺伝子発現データを得ることができる技術。細胞や組織から抽出した mRNA から cDNA を合成して蛍光色素で標識したものとハイブリダイズさせることで、発現変動している遺伝子を蛍光強度により検出して、網羅的に解析することが可能。

⁵⁹ cRNA [complementary RNA] : mRNA に相補的な塩基配列からなる RNA。

⁶⁰ ハイブリダイゼーション [hybridization] : 相補的な配列をもつ DNA は互いに結合する。短い合成 DNA 配列に蛍光色素などのプローブを標識してハイブリダイズ (複製) させることによって相補的な遺伝子配列の有無を知ることが出来る。

さらに、標準偏差 (Standard Deviation; SD)、Gene Tree⁶¹、Gene Ontology⁶²による解析も行った。SDによる解析は、検出可能な全ての搭載遺伝子を対象に、標準化した発現量の変動の程度を示すためにSDを「ばらつき」として評価した。Gene Treeによる解析では、カラーバーにより各試験群間での発現傾向 (赤が発現亢進、緑が発現抑制) を視覚的に判断し、発現遺伝子の相同性を評価した。また、Distanceで示した数値は発現傾向の類似性を示しており、数値が近いほど発現傾向が似ていることを示す。また、Gene Ontologyによる解析では、項目に関連した遺伝子の大きな発現変動をとらえるため、各病態生理・生化学的変化別に分類された遺伝子の変動傾向を確認した。

8) 病理解析

病理学的評価は、第一標的臓器である呼吸器 (気管、肺) を中心に、大脳、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、副腎、精巣、胸腺、腸管 (空腸、回腸、結腸) に関して、光学顕微鏡 (光顕) による観察により行った (Fig. 3.2.2.11)。光顕標本作製は、常法により、各臓器をホルマリン浸漬固定後水洗し、アルコール系列による脱水、クロロホルムによる置換を経て、パラフィン包埋によりパラフィンプロックを作製した。なお、肺は解剖時にホルマリンを気管内より注入固定後に処置した。パラフィンプロックは約2~5 μmで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE⁶³) 染色を施し光顕観察に供した。なお、呼吸器はHE染色に加え、炎症による粘液産生を評価するためPAS・アルシアン青 (AB-PAS⁶⁴) 染色も施した。

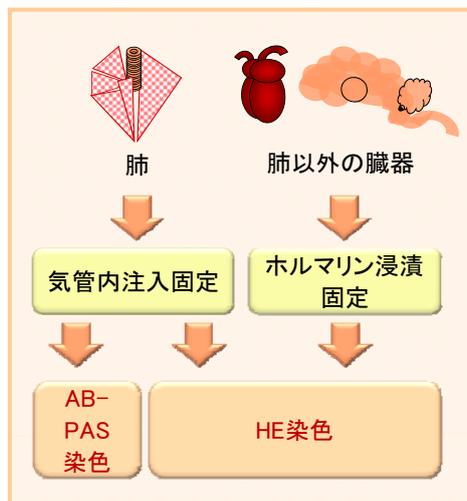


Fig. 3.2.2.11 病理解析フロー

⁶¹ **Gene Tree** : 遺伝子系統樹。それらの種の持つある遺伝子同士の系統関係を示すもの。

⁶² **Gene Ontology** : 遺伝子産物 (転写産物とタンパク質産物) に機能アノテーションを行うための用語集 (GO term) とその用語間の関係 (Ontology) を定義したもの。アノテーションとは、遺伝子のデータベースに遺伝子の属性を登録すること。

⁶³ **HE** [Hematoxylin-Eosin] : 病理組織の最も一般的な染色法。ヘマトキシリンは核・リボソーム等を青紫色 (好塩基性) に、エオジンは細胞質・線維・赤血球を赤色 (好酸性) に染色する。

⁶⁴ **AB-PAS** [Alcian Blue-Periodic Acid-Schiff] : シッフ試薬で中性ムコ多糖類を赤色に、アルシアン青で酸性ムコ多糖類を青色に染色する。気道の多列線毛上皮上に形成される杯細胞中の粘液産生が確認できる。

9) 統計解析

データは、平均値±標準偏差で示した。また、独立 2 標本間では、ANOVA (analysis of variance) の F 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.05$) には Student の t 検定を、認められなかったときには Wilcoxon 検定を行った。また、多群比較では、Bartlett 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.1$) には Dunnett 多重比較検定を、有意差が認められなかったときは Steel 検定を行った。 $P < 0.05$ で有意差ありとした。清浄空気群との比較は*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 、***: $P < 0.001$ で、1 日曝露(1 日曝露データをサンプリングしていないものは 3 日曝露)との比較は†: $P < 0.05$ 、††: $P < 0.01$ 、†††: $P < 0.001$ で、そして、尿素 SCR エンジン排気と対照エンジン排気の比較は#: $P < 0.05$ 、##: $P < 0.01$ 、###: $P < 0.001$ で示した。

3.2.2.2 培養細胞曝露試験

1) 試験概要

細胞はヒト呼吸器系由来細胞 A549 (Cat.No. CCL-185, ATCC) を用い、曝露試験時に 7.0×10^6 cells/2 mL/insert になるように細胞濃度を調整した。曝露による影響を希釈比 (CO₂ ベース比) で比較するため、試験群には高濃度群 (1/1)、中濃度群 (1/10)、清浄空気群を用いた。細胞毒性試験⁶⁵および CYP1A1、HO-1、IL-1 β を標的遺伝子としたリアルタイム PCR 解析を実施し評価した。

2) 培養細胞曝露

曝露は、CULTEX^{®66}を用いた培養細胞曝露装置を用いた。培地⁶⁷は、D-MEM/F-12 (No.1320-033, Invitrogen) 500 mlに硫酸ゲンタマイシン⁶⁸ (抗生物質, No.G1522, SIGMA) 500 μ lと牛血清 (No. AQC23532, HyClone) 50 mlを添加したものを使用した。A549細胞は目標数濃度を 3.5×10^6 cells/mlになるように試験の3~5日前にinsert (FALCON[™] Cell Culture Inserts, Cat. No. [35]3090, Becton Dickinson Labware) 内へ2 ml播種し、37°C、5%CO₂でインキュベートした。試験開始直前に、insertより培地を除去し、培養細胞曝露装置上段に設置した細胞曝露モジュールにinsertを設置し、37°Cの恒温槽で保温した無血清培地に浸るようにした。設置完了後、曝露流量を8.3 cc/minに設定し、動物曝露チャンバー内に給気されている排気をモジュール内に通して曝露を開始した (Fig. 3.2.2.12)。清浄空気群、中濃度群、高濃度群の順で1時間ずつ実施した。曝露終了後、速やかに2 mlの培地をinsert内に添加し37°C、5%CO₂で再インキュベートした。

⁶⁵ 細胞毒性試験 [Cytotoxicity test]: 体内に存在する各細胞の機能や構造に作用する毒性を確認、評価するための試験。細胞の生存率に及ぼす影響を、毒性の強弱比較することで判定する。

⁶⁶ CULTEX[®]: 窒素酸化物や硫黄酸化物などのガス状物質をはじめ、ディーゼル排気や煙草の煙を培養細胞に曝露させる装置。

⁶⁷ 培地: 微生物や生物組織を培養するとき、その生育する素材となって、必要な栄養素などの供給源となるもの。

⁶⁸ 硫酸ゲンタマイシン: アミノグリコシド系抗生物質。グラム陰性菌、ブドウ球菌、レンサ菌などのタンパク合成を阻害することで、殺菌的に作用する。

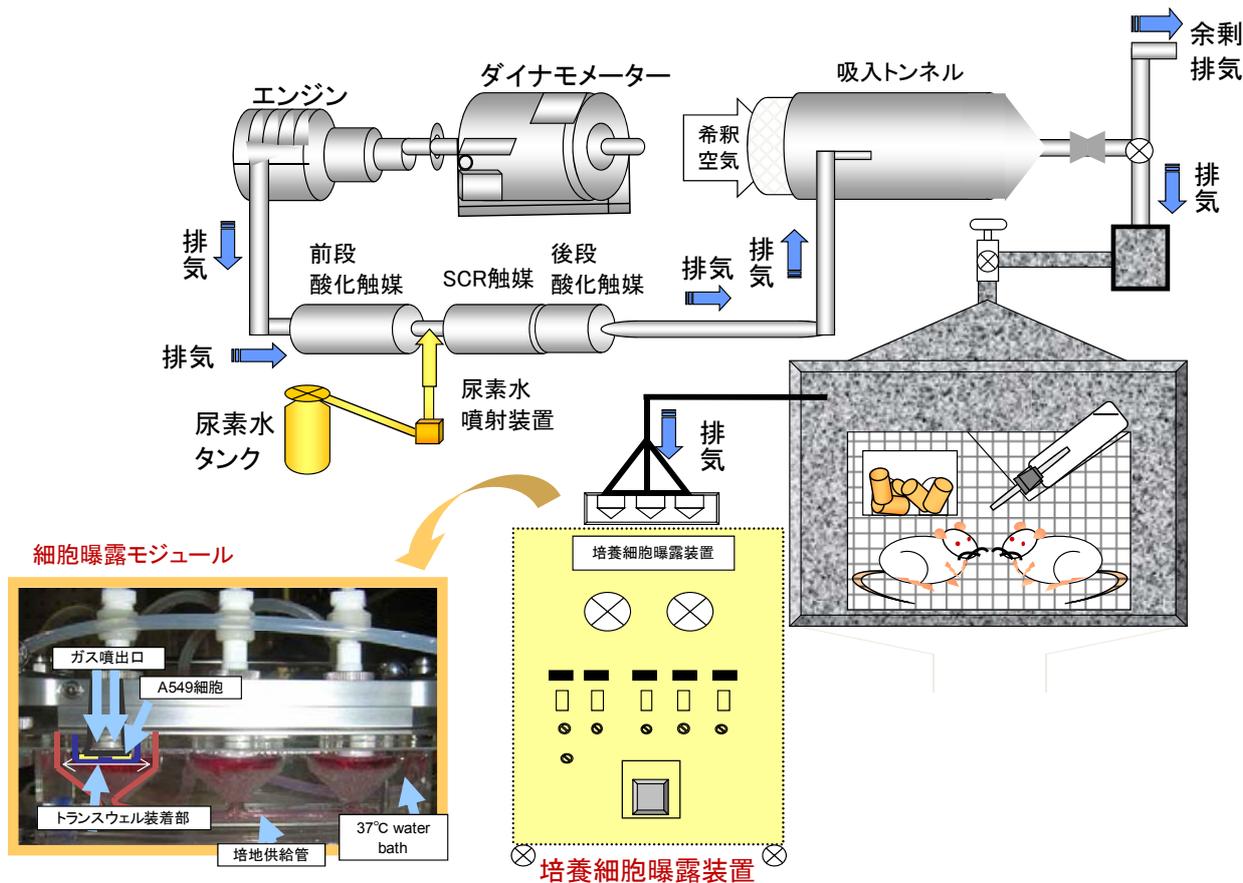


Fig. 3.2.2.12 培養細胞曝露装置概略図

3) 細胞毒性試験

曝露終了 22 時間後に、insert 内に細胞毒性測定用試薬 WST-8⁶⁹ (Cell Counting Kit-8, (株) 同仁化学研究所) を 50 μ l ずつ添加した。2 時間の静置後、100 μ l の吸光度 (450 nm) をプレートリーダー (Model680 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc.) で測定し細胞生存率を算出した。本試験は、2 本組みアッセイで行った。

4) 遺伝子解析 (リアルタイム PCR 解析)

3. 2. 2. 1 の 7) に示した方法に準じて、リアルタイム PCR 解析を行った。ただし、A549 細胞株はヒト由来細胞であるため、プライマーはヒト用を使用した (表 3.2.2.8)。

⁶⁹ WST-8 [Water Soluble Tetrazolium salts]: 細胞毒性測定用試薬。高感度水溶性ホルマザンを生成する新規テトラゾリウム塩。発色基質として利用したもの。

表 3.2.2.8 ヒト標的遺伝子とその Primer の配列

	Primer	Sequence		mer
GAPDH	Sense	5'- CACAGTCCATGCCATCACTG	-3'	20
	Antisense	5'- TACTCCTTGGAGGCCATGTG	-3'	20
CYP1A1	Sense	5'- GAACTGCTTAGCCTAGTCAACCT	-3'	23
	Antisense	5'- GGTAGCGAAGAATAGGGATGAACT	-3'	24
HO-1	Sense	5'- AGTCTTCGCCCCTGTCTACTT	-3'	21
	Antisense	5'- CTGCATGGCTGGTGTGTAGG	-3'	20
IL-1 β	Sense	5'- CCCTAAACAGATGAAGTGCTCCT	-3'	23
	Antisense	5'- GTAGTGGTGGTCGGAGATTCG	-3'	21

5) 統計処理

値はすべて平均値 \pm 標準偏差で示した。

細胞毒性試験については、清浄空気群 (BG) を 100% として相対的に評価し、対照群と比較して細胞生存率が 50% を下回った群があった場合には毒性ありとし、50% 細胞生存率を算出した。

また、リアルタイム PCR 解析については、BG を 1 として相対的に評価した。独立 2 標本間では、ANOVA (analysis of variance) の F 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.05$) には Student の t 検定を、認められなかったときには Wilcoxon 検定を行った。また、多群比較では、Bartlett 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.1$) には Dunnett 多重比較検定を、有意差が認められなかったときは Steel 検定を行った。 $P < 0.05$ をもって有意差ありとした。なお、清浄空気群との比較 (*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 、***: $P < 0.001$)、尿素 SCR エンジン排気と対照エンジン排気の比較 (#: $P < 0.05$ 、##: $P < 0.01$ 、###: $P < 0.001$) を示した。

3.3 結果

3.3.1 曝露環境モニタリング結果

3.3.1.1 エンジン運転

曝露期間中のエンジン運転条件を表 3.3.1.1 に示す。運転中は連続してモニタリングし、記録は曝露中に 1 時間毎に行った。

尿素 SCR エンジン、対照エンジンとも目標どおりに運転された。

表 3.3.1.1 エンジン運転条件

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		平均	SD	平均	SD
回転数	[rpm]	1320	0	1320	0
トルク	[Nm]	850	0	827	0
出力	[kW]	118	0	114	0
尿素添加量	[g/min]	52	0.1	-	-
排気温度	[°C]	373	0	457	0
排気圧	[kPa]	9	0	4	0
燃料流量	[g/min]	404	0	390	0
OCC入口温度	[°C]	369	0	-	-
SCR入口温度	[°C]	363	0	-	-
SCR出口温度	[°C]	361	0	-	-
吸入DT入口温度	[°C]	181	1.7	357	0

3.3.1.2 曝露ディーゼル排気の性状

希釈トンネルでの排気性状および捕集したPMの性状分析結果を表3.3.1.2に示した。NO₂以外の各測定成分濃度は、尿素SCRエンジン排気の方が低値であった。

表3.3.1.2 ディーゼル排気の性状（希釈トンネル）

	尿素SCRエンジン		対照エンジン	
	平均	SD	平均	SD
希釈比	29	0.1	29	0.1
吸入DT (°C)	22.5	0.0	28.7	0.2
CO (ppm)	0.7	0.0	7.6	0.0
CO ₂ (%)	0.30	0.00	0.30	0.00
THC (ppmC)	1.6	0.0	2.5	0.0
NO _x (ppm)	4.2	0.0	13.3	0.1
NO (ppm)	3.4	0.0	13.0	0.1
NO ₂ (ppm)	0.84	0.02	0.30	0.04
PM (HV) (mg/m ³)	0.034	0.001	1.032	0.025
SOF (%)	4.3		8.5	
Naphthalene (ng/m ³)	0.24		3.21	
Acenaphthene (ng/m ³)	N.D.		5.33	
Fluorene (ng/m ³)	N.A.		N.A.	
Phenanthrene (ng/m ³)	1.72		143	
Anthracene (ng/m ³)	0.11		15.6	
Fluoranthene (ng/m ³)	0.33		21.3	
Pyrene (ng/m ³)	0.40		23.3	
B[a]A (ng/m ³)	0.01		N.A.	
Chrysene (ng/m ³)	N.D.		N.A.	
B[b]F (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
B[k]F (ng/m ³)	N.D.		0.00	
B[a]P (ng/m ³)	Tr.		0.02	
DB[ah]A (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
B[ghi]P (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
I[123-cd]P (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
1-NP (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
1,3-DNP (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
1,6-DNP (ng/m ³)	N.D.		0.02	
1,8-DNP (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
Benzoquinone (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
Naphthoquinone (ng/m ³)	N.D.		20.6	
Anthraquinone (ng/m ³)	2.24		140	
Phenanthrenequinone (ng/m ³)	N.D.		55.2	
Chrysenequinone (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
TA100-S9 (R/m ³)	*		120	
TA100+S9 (R/m ³)	*		100	
TA98-S9 (R/m ³)	*		40	
TA98+S9 (R/m ³)	*		30	

*: 復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以下

N.D. (Not Detected) : 検出されない

N.A. : 分析せず

Tr. : 検出されているが、定量不可

両エンジン排気のPM抽出物（SOF）の被験物質濃度と復帰変異コロニー数との関係をFig. 3.3.1.1に示した。尿素SCRエンジン排気では復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以下であり、変異原性は認められなかった。対照エンジン排気のSOFは陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したことから、このSOFには変異原性を示すことが認められた。比活性値とPM捕集時の流量から単位体積当りの復帰変異コロニー数（R/m³）を求めたのが、

表3.3.1.2中の数値である。

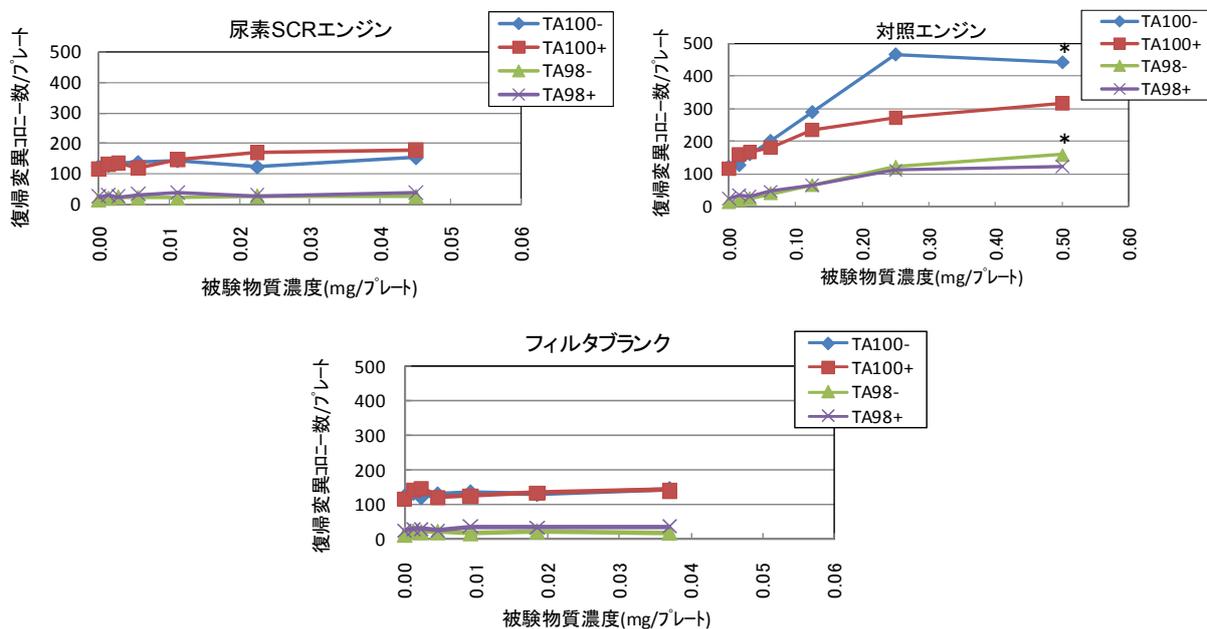


Fig. 3.3.1.1 SOFの変異原性 (エームス試験)

(* 生育阻害)

SOFのDTTアッセイ (Fig. 3.3.1.2) より、200 nmolのDTTを消費するSOF濃度 (DTT50%消費濃度、試験に用いたSOF量が少ないため外挿値) (Fig. 3.3.1.3) は、尿素SCRエンジン排気のSOF濃度はフィルタブランクよりも低値であった。さらに、尿素SCRエンジン排気は対照エンジン排気と比較してDTTを消費するSOF濃度が高いことから、尿素SCRエンジン排気は対照エンジン排気よりもSOFの酸化活性が低いことが示された。

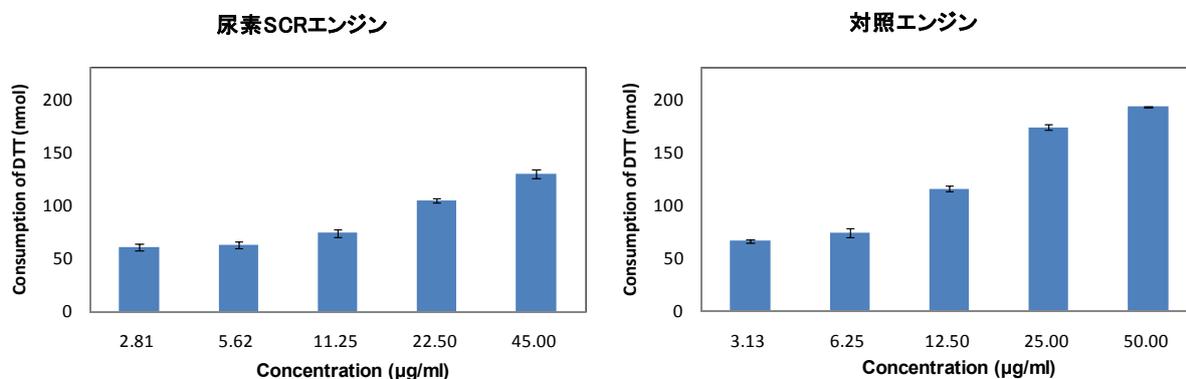


Fig. 3.3.1.2 SOFの酸化活性 (DTTアッセイ)

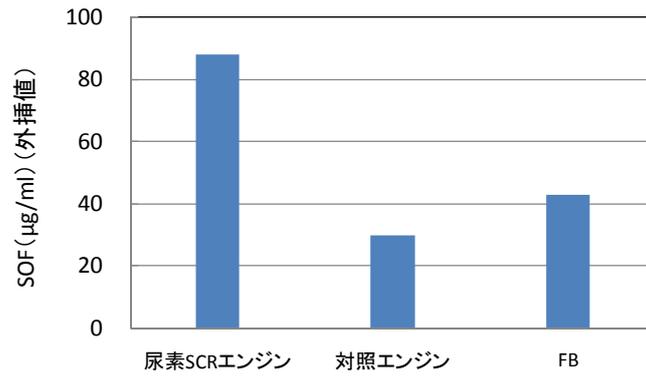


Fig. 3.3.1.3 DTT50%消費濃度（外挿値）

なお、金属元素はPM捕集フィルタの分析値がブランクフィルタの分析値よりも低かったため、両エンジン排気中の濃度は算出できなかった。

3.3.1.3 曝露チャンバー内の曝露濃度

1) 同一希釈系列

尿素SCRエンジン排気の各試験群の7日間における被験物質濃度測定結果を表3.3.1.3に、同様に対照エンジン排気の各群の測定結果を表3.3.1.4に示す。高濃度群のPM濃度とNO₂濃度は、尿素SCRエンジン排気で約0.04 mg/m³、0.78 ppm、対照エンジン排気で0.95 mg/m³、0.3 ppmであり、PM濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約0.04倍、NO₂濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約2.5倍であった。

高濃度群の微量成分（アルデヒド類や炭化水素類など）は、対照エンジン排気に比して尿素SCRエンジン排気で酸化触媒処理の効果により大きく低減された。各群のPM濃度とガス中のPAH濃度については、高濃度群のガス中のナフタレンなどは分析上の妨害成分が多く定量できなかったが、環数の少ないピレン以下のPAHはガス中に多い傾向がある。5環以上のPAHの多くは捕集流量の制約もあり検出されなかった。

尿素由来成分は曝露期間中2回測定した。尿素SCRエンジン排気中の尿素は、高濃度群で14.9 µg/m³、2回目に1.1 µg/m³が検出され、1回目が高値であったが、他の成分には特異的な変化は見られなかったため、2回の平均値を用いて約8 µg/m³の濃度とした。尿素SCRエンジン排気のみシアヌル酸とメラミンが微量検出された。対照エンジン排気で約0.5 µg/m³検出されたが、これは清浄空気と同程度であった。

PM個数濃度分布をFig.3.3.1.4に示した。また、個数最多径（モード径）と個数濃度を表3.3.1.3、表3.3.1.4中に示した。尿素SCRエンジン排気はモード径が50 nm前後であり、対照エンジン排気に比して粒径は小さく、個数濃度は対照に比して一桁近く低値であった。対照エンジン排気のモード径は80～90 nmであり、高濃度群のモード径が若干大きくなる傾向にあるが、これはPMの凝集によるものと思われる。

曝露動物の評価を行う1日目、3日目、7日目までの曝露濃度を表3.3.1.5および表3.3.1.6に示す。1、3日間の平均濃度は、7日間曝露の平均値と大差ないことから、1、3日間の微量成分濃度は7日間での測定値を適用可能であると見なした。

表3.3.1.3 各試験群の曝露濃度（尿素SCRエンジン）

		高濃度		中濃度		低濃度		清浄空気		エンジン比較																																																																																																				
		平均	± SD																																																																																																											
PM	(mg/m ³)	0.036	± 0.002	0.006	± 0.001	0.003	± 0.001	0.004	± 0.001	0.019	± 0.003																																																																																																			
NO ₂	(ppm)	0.78	± 0.06	0.08	± 0.01	0.04	± 0.01	0.002	± 0.001	0.40	± 0.03																																																																																																			
NO _x	(ppm)	4.16	± 0.19	0.42	± 0.04	0.21	± 0.02	0.011	± 0.003	2.09	± 0.10																																																																																																			
NO	(ppm)	3.38	± 0.16	0.35	± 0.03	0.18	± 0.02	0.009	± 0.003	1.70	± 0.09																																																																																																			
CO	(ppm)	0.50	± 0.11	0.17	± 0.11	0.15	± 0.11	0.13	± 0.09	0.34	± 0.11																																																																																																			
CO ₂	(%)	0.302	± 0.003	0.066	± 0.002	0.053	± 0.001	0.040	± 0.001	0.171	± 0.003																																																																																																			
O ₂	(%)	20.5	± 0.1	20.8	± 0.1	20.8	± 0.1	20.8	± 0.1	20.7	± 0.1																																																																																																			
THC	(ppmC)	2.90	± 0.09	2.93	± 0.09	2.93	± 0.09	2.93	± 0.09	2.92	± 0.09																																																																																																			
CH ₄	(ppm)	1.87	± 0.11	1.92	± 0.11	1.92	± 0.11	1.94	± 0.11	1.89	± 0.11																																																																																																			
NH ₃	(ppb)	53.4	± 23.5	10.9	± 0.6	10.2	± 0.7	5.3	± 0.9	21.50	± 6.61																																																																																																			
HCHO	(ppb)	1.27	± 0.21	1.26	± 0.25	1.18	± 0.21	1.21	± 0.19	1.35	± 0.12																																																																																																			
Acetaldehyde	(ppb)	0.57	± 0.09	0.55	± 0.06	0.53	± 0.05	0.54	± 0.04	0.62	± 0.05																																																																																																			
SO ₂	(ppb)	0.85	± 0.44	0.92	± 0.04	0.91	± 0.63	0.74	± 0.05	1.12	± 0.04																																																																																																			
1,3-Butadiene	(ppb)	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00																																																																																																			
Benzene	(ppb)	0.49	± 0.16	0.41	± 0.17	0.41	± 0.18	0.40	± 0.17	0.41	± 0.17																																																																																																			
N ₂ O	(ppm)	3.50	± 0.09	0.60	± 0.04	0.46	± 0.02	0.31	± 0.00	1.83	± 0.05																																																																																																			
PM個数	(N/cc)	1.38E+05	± 4.24E+03	1.42E+04	± 1.70E+03	7.12E+03	± 8.70E+02	0.00E+00	± 0.00E+00	7.07E+04	± 6.15E+02																																																																																																			
モード径	(nm)	51.8	± 3.3	50.9	± 1.1	45.5	± 1.1	9.8	± 0.0	48.8	± 4.4																																																																																																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Naphthalene (ng/m³)</td> <td>N.D.</td> <td>1.9</td> <td>N.D.</td> <td>1.5</td> <td>N.D.</td> <td>1.7</td> <td>N.D.</td> <td>1.4</td> <td>N.D.</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>Acenaphthene (ng/m³)</td> <td>N.D.</td> </tr> <tr> <td>Fluorene (ng/m³)</td> <td>N.D.</td> <td>0.3</td> <td>N.D.</td> <td>0.4</td> <td>N.D.</td> <td>0.6</td> <td>N.D.</td> <td>0.2</td> <td>N.D.</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Phenanthrene (ng/m³)</td> <td>1.6</td> <td>1.4</td> <td>Tr.</td> <td>1.1</td> <td>Tr.</td> <td>3.4</td> <td>Tr.</td> <td>0.0</td> <td>0.9</td> <td>0.9</td> </tr> <tr> <td>Anthracene (ng/m³)</td> <td>Tr.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.Q.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>Tr.</td> <td>N.D.</td> </tr> <tr> <td>Fluoranthene (ng/m³)</td> <td>1.0</td> <td>Tr.</td> <td>0.4</td> <td>N.D.</td> <td>0.4</td> <td>0.9</td> <td>N.D.</td> <td>0.2</td> <td>0.7</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>Pyrene (ng/m³)</td> <td>1.3</td> <td>0.5</td> <td>0.7</td> <td>0.2</td> <td>0.6</td> <td>1.3</td> <td>N.D.</td> <td>0.4</td> <td>1.0</td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td>B[a]A (ng/m³)</td> <td>N.D.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Chrysene,B[b]F,B[k]F,B[a]P,DB[ah]A,B[ghi]P,I[123-cd]P,1-NP: Tr. or N.D.</p>													PM	GAS	Naphthalene (ng/m ³)	N.D.	1.9	N.D.	1.5	N.D.	1.7	N.D.	1.4	N.D.	1.5	Acenaphthene (ng/m ³)	N.D.	Fluorene (ng/m ³)	N.D.	0.3	N.D.	0.4	N.D.	0.6	N.D.	0.2	N.D.	0.4	Phenanthrene (ng/m ³)	1.6	1.4	Tr.	1.1	Tr.	3.4	Tr.	0.0	0.9	0.9	Anthracene (ng/m ³)	Tr.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	Tr.	N.D.	Fluoranthene (ng/m ³)	1.0	Tr.	0.4	N.D.	0.4	0.9	N.D.	0.2	0.7	0.3	Pyrene (ng/m ³)	1.3	0.5	0.7	0.2	0.6	1.3	N.D.	0.4	1.0	0.7	B[a]A (ng/m ³)	N.D.																										
	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS																																																																																																				
Naphthalene (ng/m ³)	N.D.	1.9	N.D.	1.5	N.D.	1.7	N.D.	1.4	N.D.	1.5																																																																																																				
Acenaphthene (ng/m ³)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.																																																																																																				
Fluorene (ng/m ³)	N.D.	0.3	N.D.	0.4	N.D.	0.6	N.D.	0.2	N.D.	0.4																																																																																																				
Phenanthrene (ng/m ³)	1.6	1.4	Tr.	1.1	Tr.	3.4	Tr.	0.0	0.9	0.9																																																																																																				
Anthracene (ng/m ³)	Tr.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	Tr.	N.D.																																																																																																				
Fluoranthene (ng/m ³)	1.0	Tr.	0.4	N.D.	0.4	0.9	N.D.	0.2	0.7	0.3																																																																																																				
Pyrene (ng/m ³)	1.3	0.5	0.7	0.2	0.6	1.3	N.D.	0.4	1.0	0.7																																																																																																				
B[a]A (ng/m ³)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.																																																																																																				
尿素	(μg/m ³)	7.98						0.47		0.52																																																																																																				
シアヌル酸	(μg/m ³)	0.09						N.D.		N.D.																																																																																																				
アンメリド	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.																																																																																																				
アンメリン	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.																																																																																																				
メラミン	(μg/m ³)	0.01						N.D.		N.D.																																																																																																				
シアン	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.																																																																																																				

表3.3.1.4 各試験群の曝露濃度（対照エンジン）

		高濃度		中濃度		低濃度		清浄空気		エンジン比較																																																																																																				
		平均	± SD																																																																																																											
PM	(mg/m ³)	0.952	± 0.127	0.101	± 0.008	0.059	± 0.005	0.003	± 0.000	0.032	± 0.003																																																																																																			
NO ₂	(ppm)	0.31	± 0.10	0.05	± 0.02	0.02	± 0.01	0.02	± 0.01	0.32	± 0.09																																																																																																			
NO _x	(ppm)	13.14	± 0.25	1.33	± 0.08	0.71	± 0.08	0.05	± 0.03	13.15	± 0.26																																																																																																			
NO	(ppm)	12.83	± 0.26	1.29	± 0.08	0.69	± 0.07	0.03	± 0.03	12.83	± 0.24																																																																																																			
CO	(ppm)	7.29	± 0.22	0.81	± 0.10	0.46	± 0.10	0.10	± 0.09	7.26	± 0.22																																																																																																			
CO ₂	(%)	0.306	± 0.005	0.067	± 0.001	0.054	± 0.001	0.041	± 0.001	0.306	± 0.005																																																																																																			
O ₂	(%)	20.5	± 0.1	20.8	± 0.1	20.8	± 0.1	20.9	± 0.1	20.5	± 0.1																																																																																																			
THC	(ppmC)	4.08	± 0.06	3.04	± 0.05	2.97	± 0.05	2.90	± 0.05	4.00	± 0.05																																																																																																			
CH ₄	(ppm)	1.84	± 0.03	1.88	± 0.02	1.87	± 0.04	1.91	± 0.05	1.84	± 0.02																																																																																																			
NH ₃	(ppb)	31.8	± 18.8	12.0	± 8.0	11.5	± 3.6	5.9	± 3.8	24.8	± 10.1																																																																																																			
HCHO	(ppb)	46.95	± 0.01	6.61	± 2.01	4.29	± 1.16	1.76	± 1.47	49.98	± 0.72																																																																																																			
Acetaldehyde	(ppb)	10.64	± 0.82	2.58	± 0.99	2.12	± 0.95	1.63	± 1.11	11.23	± 0.62																																																																																																			
SO ₂	(ppb)	6.58	± 0.91	1.24	± 0.93	1.72	± 1.14	0.84	± 0.29	1.37	± 0.71																																																																																																			
1,3-Butadiene	(ppb)	4.90	± 0.36	0.57	± 0.12	0.19	± 0.16	0.00	± 0.00	4.60	± 0.32																																																																																																			
Benzene	(ppb)	2.69	± 0.11	0.61	± 0.01	0.50	± 0.02	0.41	± 0.03	2.61	± 0.16																																																																																																			
N ₂ O	(ppm)	0.32	± 0.00	0.31	± 0.00	0.31	± 0.01	0.31	± 0.00	0.32	± 0.01																																																																																																			
PM個数	(N/cc)	1.07E+06	± 3.40E+03	1.15E+05	± 1.42E+03	6.32E+04	± 1.18E+03	8.16E+00	± 4.52E+00	3.63E+04	± 2.62E+01																																																																																																			
モード径	(nm)	91.5	± 4.7	81.3	± 1.1	77.8	± 3.9	58.2	± 0.5	80.2	± 14.7																																																																																																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> <th>PM</th> <th>GAS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Naphthalene (ng/m³)</td> <td>3.0</td> <td>N.Q.</td> <td>N.D.</td> <td>90.7</td> <td>N.D.</td> <td>46.2</td> <td>N.D.</td> <td>1.6</td> <td>N.D.</td> <td>N.Q.</td> </tr> <tr> <td>Acenaphthene (ng/m³)</td> <td>5.1</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>1.2</td> <td>N.D.</td> <td>1.1</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> </tr> <tr> <td>Fluorene (ng/m³)</td> <td>3.0</td> <td>N.Q.</td> <td>Tr.</td> <td>N.Q.</td> <td>N.D.</td> <td>N.Q.</td> <td>N.D.</td> <td>0.2</td> <td>N.D.</td> <td>N.Q.</td> </tr> <tr> <td>Phenanthrene (ng/m³)</td> <td>144.3</td> <td>46.2</td> <td>7.3</td> <td>5.5</td> <td>2.3</td> <td>4.2</td> <td>Tr.</td> <td>0.8</td> <td>1.3</td> <td>22.2</td> </tr> <tr> <td>Anthracene (ng/m³)</td> <td>18.0</td> <td>1.2</td> <td>1.0</td> <td>0.6</td> <td>0.4</td> <td>0.5</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Fluoranthene (ng/m³)</td> <td>30.6</td> <td>0.6</td> <td>3.7</td> <td>0.5</td> <td>2.0</td> <td>Tr.</td> <td>Tr.</td> <td>0.4</td> <td>1.1</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Pyrene (ng/m³)</td> <td>37.1</td> <td>1.0</td> <td>5.0</td> <td>1.1</td> <td>3.0</td> <td>0.2</td> <td>Tr.</td> <td>1.1</td> <td>1.1</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>B[a]A (ng/m³)</td> <td>0.3</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> <td>N.D.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Chrysene,B[b]F,B[k]F,B[a]P,DB[ah]A,B[ghi]P,I[123-cd]P,1-NP: Tr. or N.D.</p>													PM	GAS	Naphthalene (ng/m ³)	3.0	N.Q.	N.D.	90.7	N.D.	46.2	N.D.	1.6	N.D.	N.Q.	Acenaphthene (ng/m ³)	5.1	N.D.	N.D.	1.2	N.D.	1.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Fluorene (ng/m ³)	3.0	N.Q.	Tr.	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.	0.2	N.D.	N.Q.	Phenanthrene (ng/m ³)	144.3	46.2	7.3	5.5	2.3	4.2	Tr.	0.8	1.3	22.2	Anthracene (ng/m ³)	18.0	1.2	1.0	0.6	0.4	0.5	N.D.	N.D.	N.D.	0.4	Fluoranthene (ng/m ³)	30.6	0.6	3.7	0.5	2.0	Tr.	Tr.	0.4	1.1	0.4	Pyrene (ng/m ³)	37.1	1.0	5.0	1.1	3.0	0.2	Tr.	1.1	1.1	0.4	B[a]A (ng/m ³)	0.3	N.D.																
	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS																																																																																																				
Naphthalene (ng/m ³)	3.0	N.Q.	N.D.	90.7	N.D.	46.2	N.D.	1.6	N.D.	N.Q.																																																																																																				
Acenaphthene (ng/m ³)	5.1	N.D.	N.D.	1.2	N.D.	1.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.																																																																																																				
Fluorene (ng/m ³)	3.0	N.Q.	Tr.	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.	0.2	N.D.	N.Q.																																																																																																				
Phenanthrene (ng/m ³)	144.3	46.2	7.3	5.5	2.3	4.2	Tr.	0.8	1.3	22.2																																																																																																				
Anthracene (ng/m ³)	18.0	1.2	1.0	0.6	0.4	0.5	N.D.	N.D.	N.D.	0.4																																																																																																				
Fluoranthene (ng/m ³)	30.6	0.6	3.7	0.5	2.0	Tr.	Tr.	0.4	1.1	0.4																																																																																																				
Pyrene (ng/m ³)	37.1	1.0	5.0	1.1	3.0	0.2	Tr.	1.1	1.1	0.4																																																																																																				
B[a]A (ng/m ³)	0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.																																																																																																				
尿素	(μg/m ³)	0.49						0.62		0.55																																																																																																				
シアヌル酸	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.																																																																																																				
アンメリド	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.																																																																																																				
アンメリン	(μg/m ³)	N.D.						0.00		N.D.																																																																																																				
メラミン	(μg/m ³)	N.D.						0.00		N.D.																																																																																																				
シアン	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.																																																																																																				

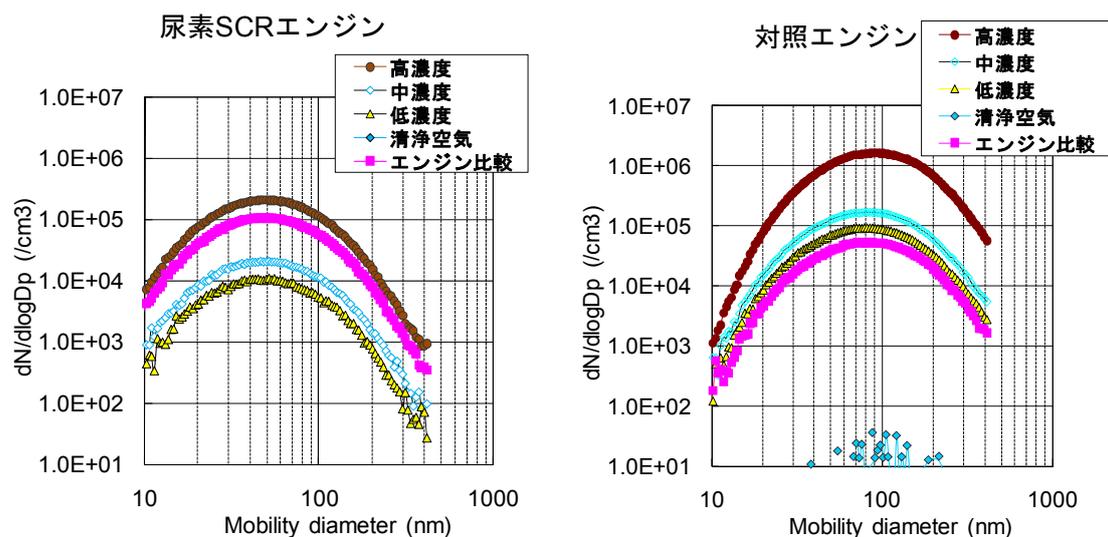


Fig. 3.3.1.4 各試験群のPM個数濃度分布

表3.3.1.5 1、3、7日曝露の曝露濃度（尿素SCRエンジン）

1日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.037 ± 0.003	0.005	0.002	—	0.019 ± 0.002
NO _x	(ppm)	4.34 ± 0.06	0.36 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.011 ± 0.001	2.16 ± 0.05
NO	(ppm)	3.55 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.009 ± 0.001	1.76 ± 0.04
NO ₂	(ppm)	0.80 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.003 ± 0.001	0.40 ± 0.04
CO ₂	(vol%)	0.30 ± 0.001	0.06 ± 0.001	0.05 ± 0.000	0.04 ± 0.000	0.17 ± 0.002
CO	(ppm)	0.51 ± 0.10	0.17 ± 0.11	0.18 ± 0.10	0.13 ± 0.09	0.36 ± 0.13
O ₂	(vol%)	20.53 ± 0.12	20.89 ± 0.11	20.90 ± 0.11	20.92 ± 0.10	20.73 ± 0.10
THC	(ppmC)	3.01 ± 0.09	3.04 ± 0.09	3.04 ± 0.07	3.04 ± 0.07	3.02 ± 0.09
3日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.037 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.005	0.019 ± 0.001
NO _x	(ppm)	4.33 ± 0.059	0.42 ± 0.05	0.22 ± 0.024	0.011 ± 0.003	2.16 ± 0.05
NO	(ppm)	3.52 ± 0.060	0.34 ± 0.04	0.18 ± 0.019	0.010 ± 0.003	1.75 ± 0.04
NO ₂	(ppm)	0.81 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.40 ± 0.03
CO ₂	(vol%)	0.30 ± 0.003	0.07 ± 0.002	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.17 ± 0.002
CO	(ppm)	0.50 ± 0.09	0.16 ± 0.09	0.16 ± 0.08	0.12 ± 0.07	0.34 ± 0.10
O ₂	(vol%)	20.47 ± 0.09	20.82 ± 0.10	20.84 ± 0.09	20.86 ± 0.08	20.67 ± 0.09
THC	(ppmC)	2.92 ± 0.09	2.94 ± 0.08	2.95 ± 0.08	2.94 ± 0.08	2.93 ± 0.09
7日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.036 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.019 ± 0.003
NO _x	(ppm)	4.16 ± 0.19	0.42 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.011 ± 0.003	2.09 ± 0.10
NO	(ppm)	3.38 ± 0.16	0.35 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.009 ± 0.003	1.70 ± 0.09
NO ₂	(ppm)	0.78 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.40 ± 0.03
CO ₂	(vol%)	0.30 ± 0.003	0.07 ± 0.002	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.17 ± 0.003
CO	(ppm)	0.50 ± 0.11	0.17 ± 0.11	0.15 ± 0.11	0.13 ± 0.09	0.34 ± 0.11
O ₂	(vol%)	20.46 ± 0.08	20.81 ± 0.08	20.82 ± 0.08	20.84 ± 0.07	20.65 ± 0.08
THC	(ppmC)	2.90 ± 0.09	2.93 ± 0.09	2.93 ± 0.09	2.93 ± 0.09	2.92 ± 0.09

表3.3.1.6 1、3、7日曝露の曝露濃度（対照エンジン）

1日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	1.050 ± 0.021	0.092 ± 0.017	0.062	—	0.034 ± 0.010
NO _x	(ppm)	13.29 ± 0.20	1.35 ± 0.06	0.77 ± 0.08	0.04 ± 0.01	13.38 ± 0.27
NO	(ppm)	13.08 ± 0.21	1.30 ± 0.06	0.74 ± 0.07	0.03 ± 0.01	13.05 ± 0.22
NO ₂	(ppm)	0.21 ± 0.13	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.32 ± 0.10
CO ₂	(vol%)	0.31 ± 0.004	0.07 ± 0.001	0.06 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.31 ± 0.005
CO	(ppm)	7.39 ± 0.14	0.81 ± 0.04	0.51 ± 0.05	0.09 ± 0.05	7.39 ± 0.16
O ₂	(vol%)	20.49 ± 0.11	20.85 ± 0.11	20.90 ± 0.10	20.95 ± 0.07	20.54 ± 0.08
THC	(ppmC)	4.16 ± 0.02	3.09 ± 0.04	3.03 ± 0.04	2.97 ± 0.03	4.06 ± 0.01
3日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	1.050 ± 0.017	0.097 ± 0.011	0.061 ± 0.002	0.003	0.033 ± 0.006
NO _x	(ppm)	13.08 ± 0.28	1.30 ± 0.06	0.70 ± 0.07	0.04 ± 0.01	13.11 ± 0.30
NO	(ppm)	12.81 ± 0.32	1.26 ± 0.06	0.69 ± 0.07	0.02 ± 0.01	12.81 ± 0.27
NO ₂	(ppm)	0.27 ± 0.13	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.30 ± 0.10
CO ₂	(vol%)	0.31 ± 0.005	0.07 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.31 ± 0.005
CO	(ppm)	7.31 ± 0.15	0.80 ± 0.08	0.47 ± 0.08	0.09 ± 0.07	7.29 ± 0.15
O ₂	(vol%)	20.49 ± 0.06	20.85 ± 0.06	20.88 ± 0.05	20.92 ± 0.05	20.53 ± 0.04
THC	(ppmC)	4.11 ± 0.07	3.06 ± 0.05	2.99 ± 0.05	2.93 ± 0.05	4.01 ± 0.05
7日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.952 ± 0.127	0.101 ± 0.008	0.059 ± 0.005	0.003 ± 0.000	0.032 ± 0.003
NO _x	(ppm)	13.14 ± 0.25	1.33 ± 0.08	0.71 ± 0.08	0.05 ± 0.03	13.15 ± 0.26
NO	(ppm)	12.83 ± 0.26	1.29 ± 0.08	0.69 ± 0.07	0.03 ± 0.03	12.83 ± 0.24
NO ₂	(ppm)	0.31 ± 0.10	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.32 ± 0.09
CO ₂	(vol%)	0.31 ± 0.005	0.07 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.31 ± 0.005
CO	(ppm)	7.29 ± 0.22	0.81 ± 0.10	0.46 ± 0.10	0.10 ± 0.09	7.26 ± 0.22
O ₂	(vol%)	20.46 ± 0.07	20.81 ± 0.07	20.84 ± 0.06	20.88 ± 0.06	20.49 ± 0.06
THC	(ppmC)	4.08 ± 0.06	3.04 ± 0.05	2.97 ± 0.05	2.90 ± 0.05	4.00 ± 0.05

2) エンジン排気比較系列

エンジン比較群の曝露濃度を上記の表3.3.1.3～表3.3.1.6中に、PM個数濃度分布をFig. 3.3.1.4中に示した。上記、表中のエンジン比較群のみの値を抜き出して、表3.3.1.7に示す。PM濃度、NO₂濃度の差は両エンジン排気でそれぞれ0.013 mg/m³、0.08 ppmとわずかな差であった。NO、COやアルデヒド類の濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気よりも低値であった。PM個数モード径は、尿素SCRエンジン排気で約50 nm、対照エンジン排気で約80 nmであり、尿素SCRエンジン排気中のPMの粒径は対照エンジン排気よりも小さかった。個数濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気よりも約2倍高かった。尿素濃度は両エンジン排気ともほぼ同一濃度であった。

表 3.3.1.7 エンジン比較群の曝露濃度

		尿素SCRエンジン	対照エンジン
PM	(mg/m ³)	0.019	0.032
NO ₂	(ppm)	0.40	0.32
NO _x	(ppm)	2.09	13.15
NO	(ppm)	1.70	12.83
CO	(ppm)	0.34	7.26
CO ₂	(%)	0.171	0.306
O ₂	(%)	20.7	20.5
THC	(ppmC)	2.92	4.00
CH ₄	(ppm)	1.89	1.84
NH ₃	(ppb)	21.50	24.8
HCHO	(ppb)	1.35	49.98
Acetaldehyde	(ppb)	0.62	11.23
SO ₂	(ppb)	1.12	1.37
1,3-Butadiene	(ppb)	0.00	4.60
Benzene	(ppb)	0.41	2.61
N ₂ O	(ppm)	1.83	0.32
Phenanthrene	(ng/m ³)	0.9	1.3
Fluoranthene	(ng/m ³)	0.7	1.1
Pyrene	(ng/m ³)	1.0	1.1
モード径	(nm)	48.8	80.2
PM個数	(N/cc)	7.1E+04	3.6E+04
尿素	(μg/m ³)	0.52	0.55

3.3.1.4 曝露環境モニタリング結果のまとめ

曝露チャンバー内のPM濃度やNO₂濃度は、各試験群とも目標曝露濃度に近く、ほぼ安定していた。

1) 同一希釈系列

高濃度群のPM重量濃度とNO₂濃度は、尿素SCRエンジン排気で約0.04 mg/m³、0.78 ppm、対照エンジン排気で0.95 mg/m³、0.3 ppmであり、PM濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約1/25倍、NO₂濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約2.5倍であった。尿素SCRエンジン排気のNO₂濃度が高値であったのは、排気後処理の酸化触媒によるものと考えられる。

高濃度群の微量成分（アルデヒド類や炭化水素類など）は、尿素SCRエンジン排気では対照エンジン排気に比して大きく低減された。これは尿素SCRエンジンの酸化触媒処理の効果と考えられる。尿素SCRエンジン排気からの尿素は約8 μg/m³であった。尿素SCRエンジン排気のみシアヌル酸とメラミンが微量検出された。対照エンジン排気で約0.5 μg/m³検出されたが、これは清浄空気レベルであった。

PM個数濃度分布のモード径は、尿素SCRエンジン排気で50 nm前後、対照エンジン排気で80～90 nmであった。

2) エンジン排気比較系列

PM濃度、NO₂濃度は両エンジン排気でわずかに差があった。また、NO、COやアルデヒド類の濃度は尿素SCRエンジン排気が低濃度であった。

PM 個数濃度分布のモード径は、尿素 SCR エンジン排気で約 50 nm、対照エンジン排気で約 80 nm であり、尿素 SCR エンジン排気の方が小さかった。

3.3.2 健康影響評価

3.3.2.1 ラット短期吸入曝露試験

ここでは、両系列に共通した結果を示した。

1) 飼育環境

曝露時および非曝露時におけるチャンバー内環境を表 3.3.2.1 に示した。曝露チャンバー内の温度は、対照エンジン排気の高濃度群およびエンジン比較群で曝露時に 25℃台を示したが、その他の試験群では曝露時および非曝露時ともほぼ 22℃台であった。また、湿度は平均値 54.9~69.9%であった。流量は、約 3.0 m³/分でほぼ一定であった。さらに、圧力では、曝露時は平均値 29.1~48.7 Pa で、非曝露時では平均値 47.4~53.8 Pa であった。

表 3.3.2.1 ラット飼育環境

曝露時	高濃度	中濃度	低濃度	清浄空気	エンジン比較
	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
尿素SCRエンジン					
温度 (°C)	22.8 ± 0.2	22.2 ± 0.1	22.0 ± 0.1	22.4 ± 0.1	22.4 ± 0.1
湿度 (%RH)	69.9 ± 0.7	64.3 ± 1.0	61.3 ± 1.0	57.6 ± 1.0	65.9 ± 0.8
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1
圧力 (Pa)	40.4 ± 9.3	40.0 ± 5.7	46.7 ± 15.1	44.9 ± 3.2	42.3 ± 4.6
対照エンジン					
温度 (°C)	25.4 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.6 ± 0.1	22.9 ± 0.1	25.0 ± 0.2
湿度 (%RH)	60.0 ± 1.5	60.0 ± 1.4	61.5 ± 1.2	55.1 ± 1.3	60.2 ± 4.1
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1
圧力 (Pa)	44.2 ± 3.4	38.6 ± 7.5	39.2 ± 6.5	48.7 ± 1.1	29.1 ± 7.9
非曝露時					
非曝露時	高濃度	中濃度	低濃度	清浄空気	エンジン比較
	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
尿素SCRエンジン					
温度 (°C)	22.0 ± 0.0	22.2 ± 0.1	22.0 ± 0.1	22.5 ± 0.0	22.0 ± 0.0
湿度 (%RH)	60.9 ± 0.7	63.3 ± 0.9	60.3 ± 0.9	57.1 ± 0.7	61.0 ± 0.8
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1
圧力 (Pa)	52.7 ± 5.8	53.4 ± 4.7	53.8 ± 3.0	51.5 ± 3.8	50.0 ± 5.6
対照エンジン					
温度 (°C)	22.6 ± 0.2	22.3 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.9 ± 0.1	22.8 ± 0.3
湿度 (%RH)	58.1 ± 0.6	59.4 ± 1.0	61.3 ± 0.6	54.9 ± 0.6	57.9 ± 0.5
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
圧力 (Pa)	51.7 ± 4.5	47.4 ± 7.0	50.3 ± 8.3	52.5 ± 3.1	53.3 ± 5.6

2) 曝露期間中の体重、摂餌量および摂水量

曝露期間中の体重変化を **Fig. 3.3.2.1** に示した。尿素 SCR エンジン排気は、曝露期間が長くなるにつれて成長による体重の増加が見られたが、曝露濃度による影響は認められなかった。なお、対照エンジン排気の中濃度群の曝露 2 日目で体重の減少傾向が認められた。これは 1 つの飼育ケージで飲水量が減少したためで、給水瓶の詰りによる飲水不良によるものであることが推測された。なお、翌日には体重が回復したことから、曝露濃度による影響ではないと判断した。

曝露期間中の摂餌量の変化を **Fig. 3.3.2.2** に示した。尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 1 日曝露で摂餌量の減少がみられたが、その後の変化はみられなかった。対照エンジン排気では、特に影響を認めなかった。

曝露期間中の摂水量の変化を **Fig. 3.3.2.3** に示した。尿素 SCR エンジン排気は、特に影響を認めなかった。しかし、前述のように、対照エンジン排気の中濃度群の曝露 2 日目で給水瓶の詰りによる摂水量の減少傾向が認められたが、翌日には摂水量が回復したため、曝露濃度による影響ではないと判断した。

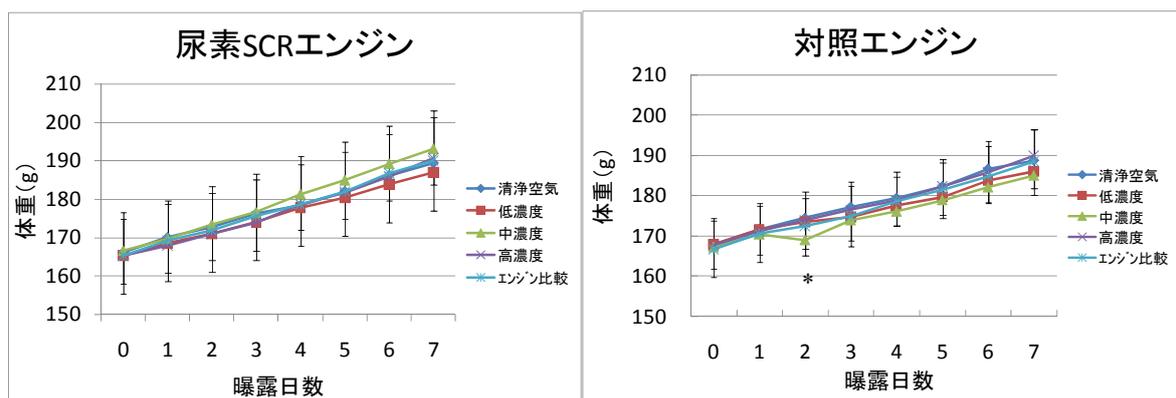


Fig. 3.3.2.1 曝露期間中のラット体重 (n = 12~24)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群)

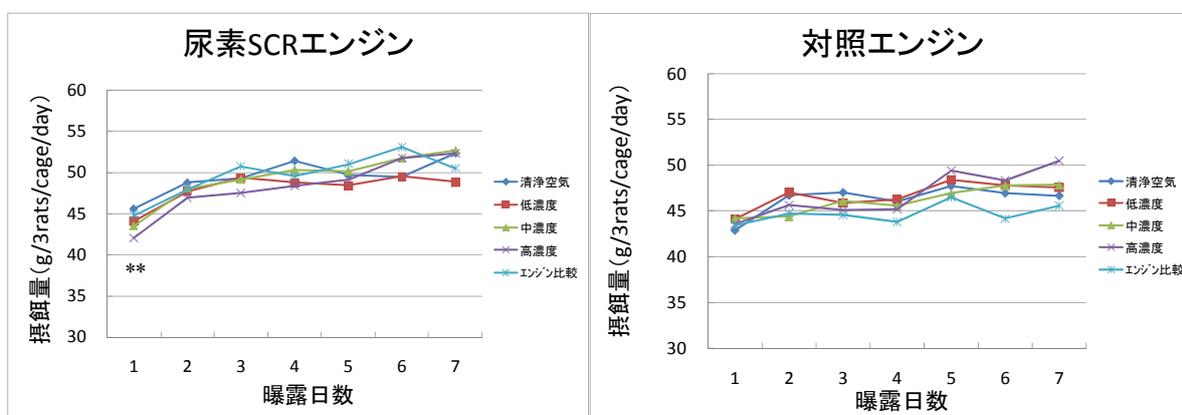


Fig. 3.3.2.2 曝露期間中のラット摂餌量 (n = 4~8)

(**: P<0.01 vs.清浄空気群)

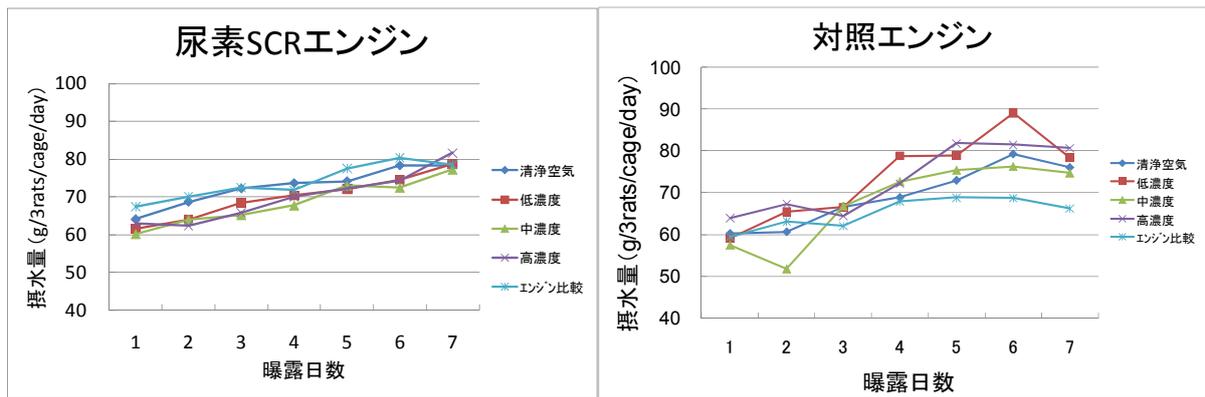


Fig. 3.3.2.3 曝露期間中のラット摂水量 (n = 4~8)

3.3.2.2 ラット短期吸入曝露試験 (同一希釈系列)

1) 解剖時体重および臓器重量

1、3、7日曝露したラットの解剖時データを示した。臓器の相対重量 (体重換算重量) は、絶対重量 (生重量) とほぼ同様な傾向であったため、ここでは絶対重量のみ示した。

(1) 体重、気管・肺重量、心臓および大脳重量

体重、気管・肺重量は、両エンジン排気とも各試験群で成長に伴う増加が認められ、曝露濃度による抑制性的変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.4、Fig. 3.3.2.5)。

心臓および大脳重量では、両エンジン排気とも各試験群で曝露濃度による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.6、Fig. 3.3.2.7)。

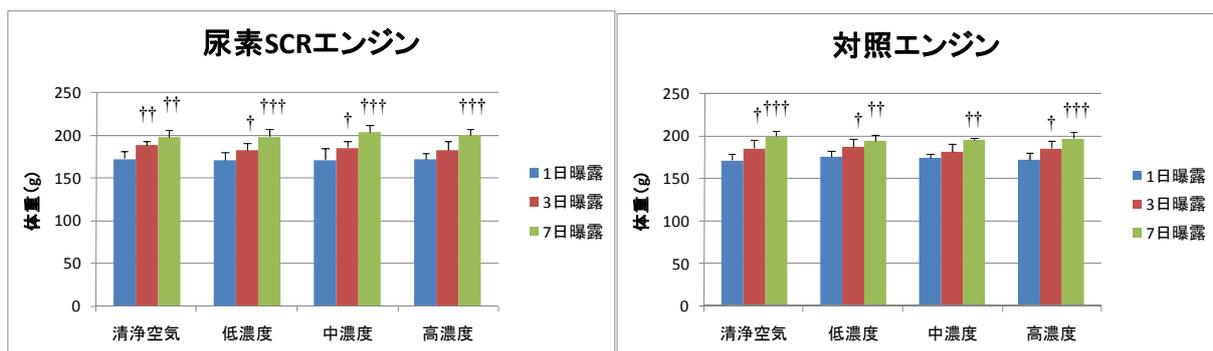


Fig. 3.3.2.4 解剖時のラット体重 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

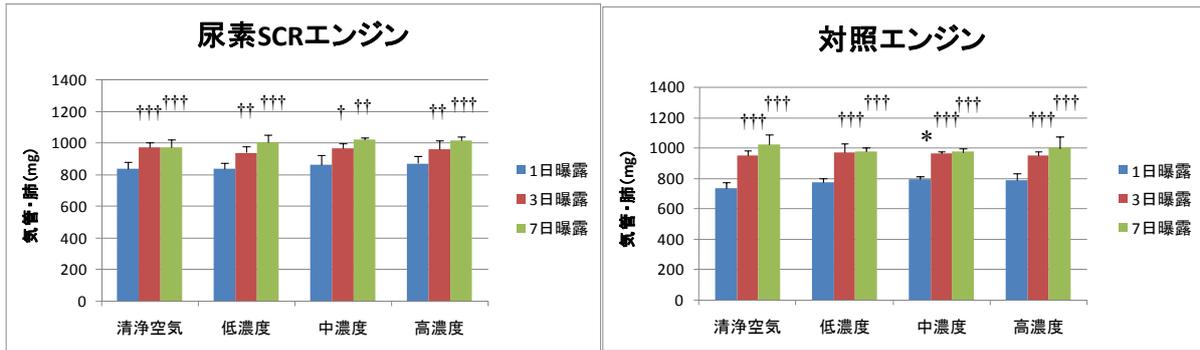


Fig. 3.3.2.5 ラット気管・肺重量 (n = 6)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

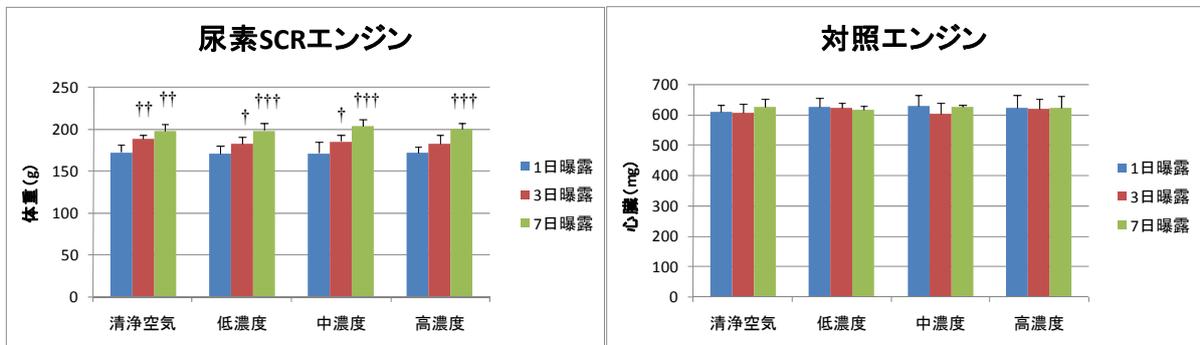


Fig. 3.3.2.6 ラット心臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 1日曝露)

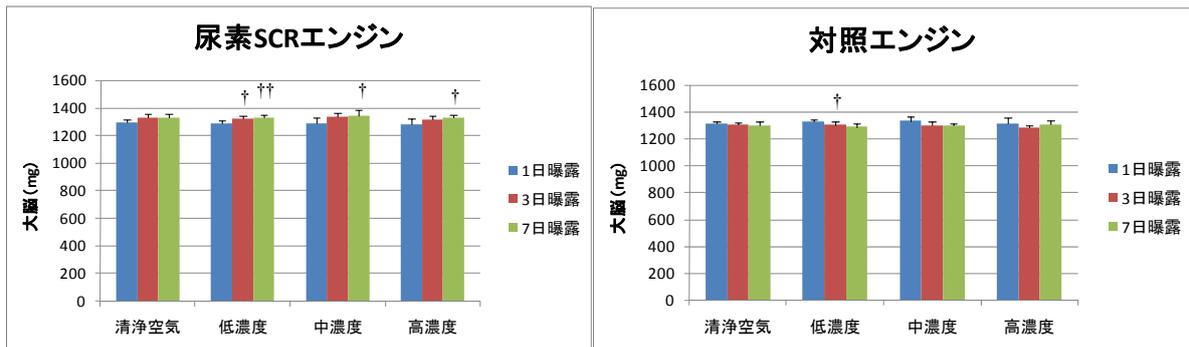


Fig. 3.3.2.7 ラット大脳重量 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1日曝露)

(2) 肝臓重量

肝臓重量は、曝露濃度依存的および曝露期間依存的な増加が認められた (Fig. 3.3.2.8)。また、相対重量でも曝露濃度依存的な増加が見られていた。

この肝臓重量の増加が曝露濃度による影響であるかを確認するため、曝露をしていない

ラットを用いて、同日内の午前と午後それぞれ肝臓重量を計測した。その結果、肝臓重量は午前と比べて午後の重量が減少する傾向にあり、さらに相対重量では有意差のあることが認められた (Fig. 3.3.2.8-2)。また、後述の肝臓の病理解析で、両エンジン排気とも試験群で違いがほとんど認められなかったことも併せて、Fig. 3.3.2.8 でみられた変動は曝露濃度による影響ではなく、各試験群の解剖開始時間の差異による日内変動による変化であると推測された。

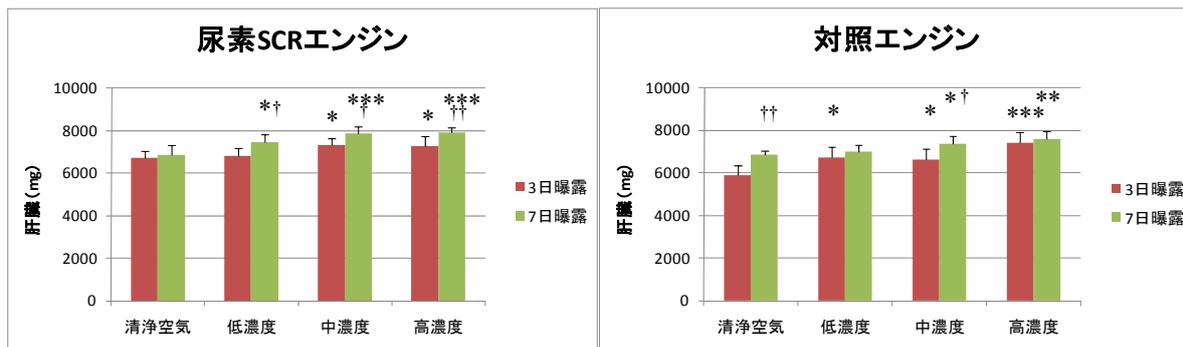


Fig. 3.3.2.8 ラット肝臓重量 (n = 6)

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

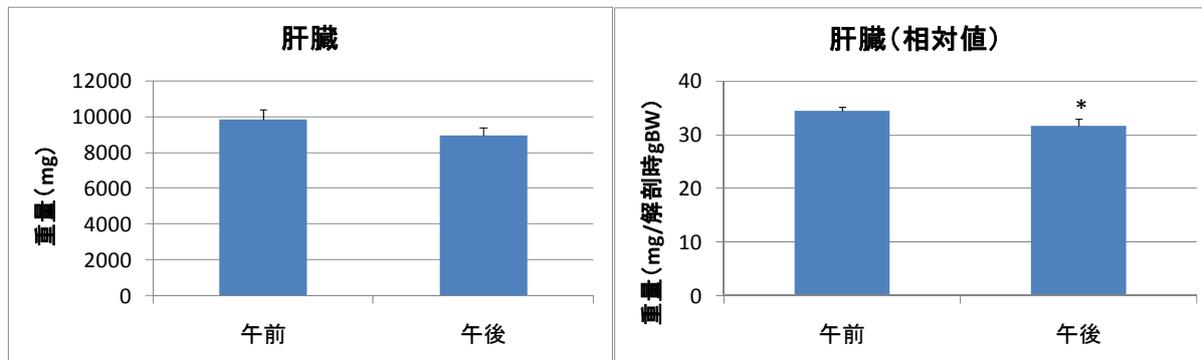


Fig. 3.3.2.8-2 ラット肝臓重量の日内変動 (n = 4)

(*: P<0.05 vs. 午前)

(3) 小脳、腎臓、副腎、胸腺、脾臓および精巣重量

小脳重量では、対照エンジン排気の高濃度群と清浄空気群で曝露期間による差がみられたものの、曝露濃度による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.9)。

腎臓、副腎および胸腺重量では、両エンジン排気とも曝露濃度や曝露期間による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.10~Fig. 3.3.2.12)。また、脾臓および精巣重量では、両エンジン排気とも各試験群で成長による重量増加傾向がみられ、曝露濃度による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.13、Fig. 3.3.2.14)。

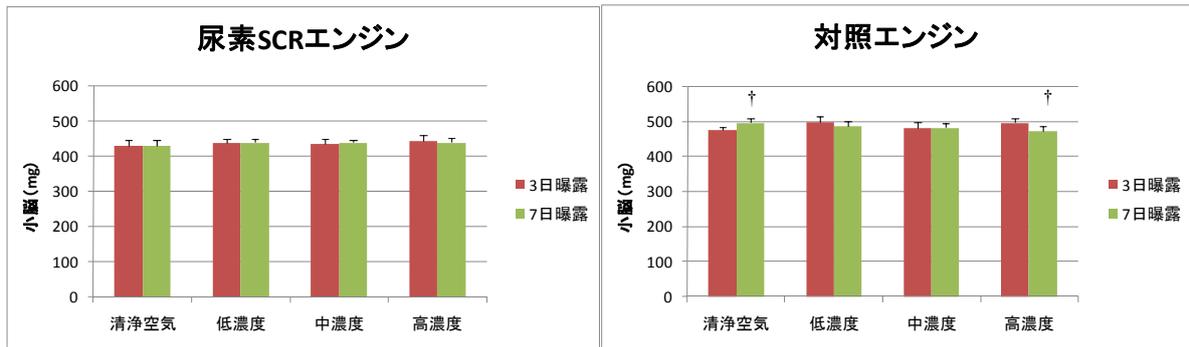


Fig. 3.3.2.9 ラット小脳重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露)

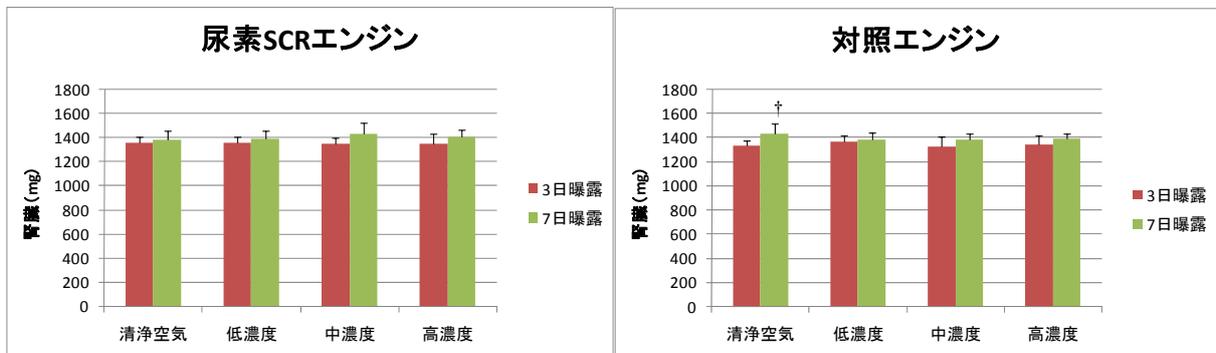


Fig. 3.3.2.10 ラット腎臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露)

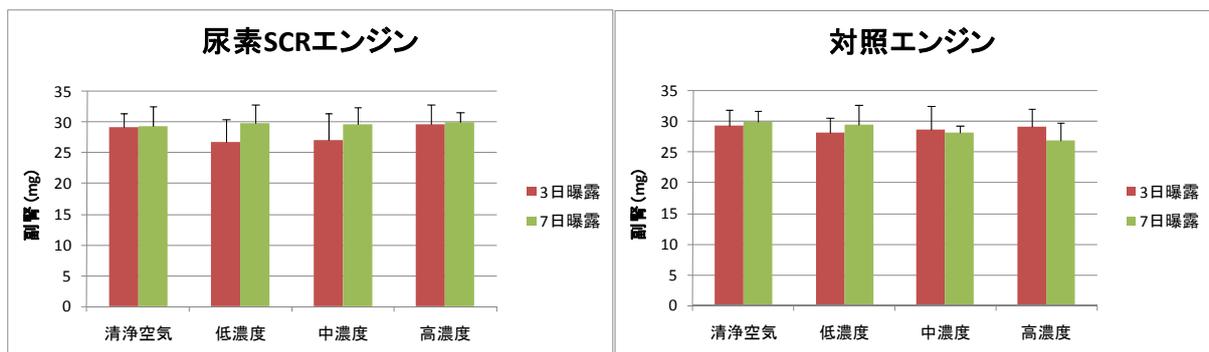


Fig. 3.3.2.11 ラット副腎重量 (n = 6)

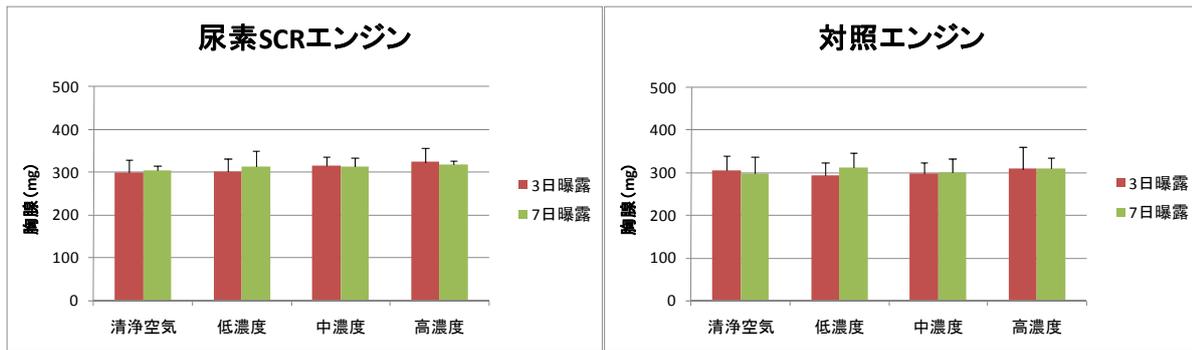


Fig. 3.3.2.12 ラット胸腺重量 (n = 6)

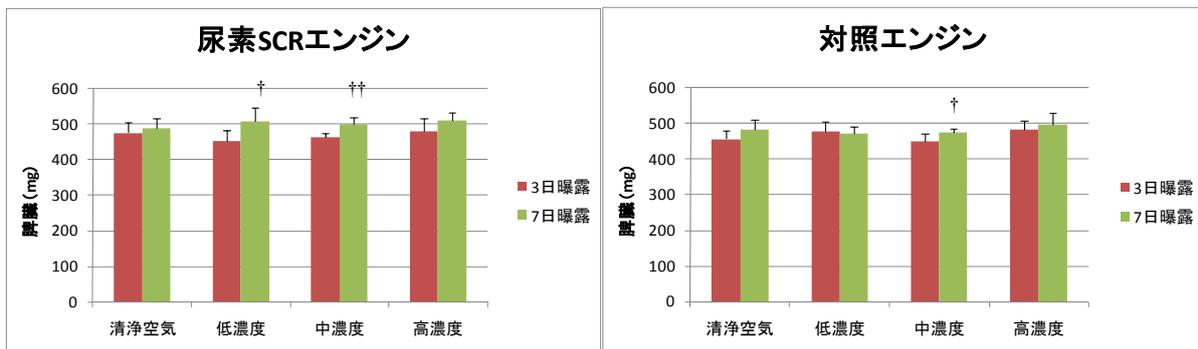


Fig. 3.3.2.13 ラット脾臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

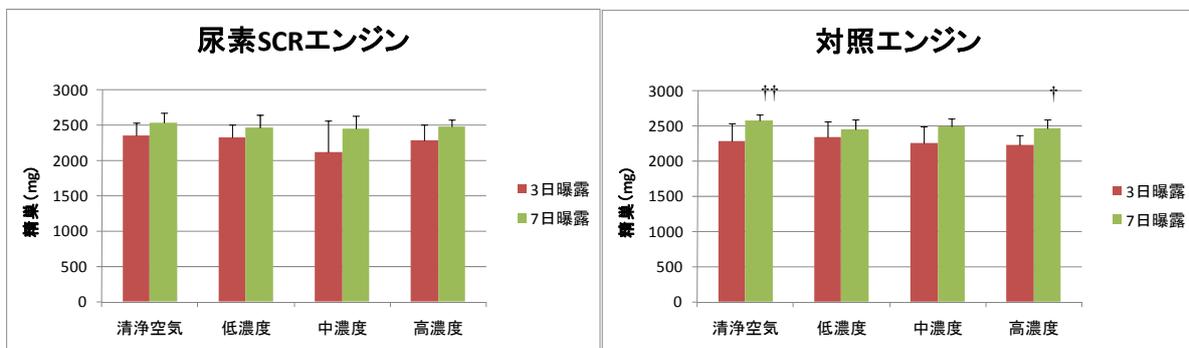


Fig. 3.3.2.14 ラット精巣重量 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

(4) 解剖時体重および臓器重量のまとめ

- 体重、気管・肺、肝臓、精巣など一部の臓器において、解剖時間の差異や成長に伴う重量増加が認められたが、曝露濃度による変化は認められなかった。
- 両エンジン排気による臓器重量の特異的な影響は認められなかった。

2) BALF 中炎症細胞数

BALF は 3、7 日曝露の解剖時に採取した。

表 3.3.2.2 に回収率を示した。なお、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3 日曝露で、一個体が回収率 62.2%であったため、総細胞数のデータから除外した。なお、細胞分画のデータは、この個体も含めて解析した。

その結果、尿素 SCR エンジン排気は各試験群で回収率に差が認められなかった。対照エンジン排気では、清浄空気群と比べて中濃度群の 7 日曝露で回収率に有意な増加が認められた。

表 3.3.2.2 BALF 4.5 mL (1.5 mL×3 回) で肺胞洗浄したときの回収率 (n = 4~6)

	試験群	3日曝露(%)	7日曝露(%)
尿素SCRエンジン	高濃度	92.8 ± 2.1	93.3 ± 3.4
	中濃度	94.4 ± 2.7	96.7 ± 1.9
	低濃度	91.5 ± 4.3	95.2 ± 3.0
	清浄空気	94.7 ± 5.1	91.1 ± 5.2
	エンジン比較	91.9 ± 3.6	92.2 ± 3.9
対照エンジン	高濃度	91.1 ± 5.2	93.3 ± 3.1
	中濃度	95.6 ± 4.4	94.8* ± 2.3
	低濃度	92.0 ± 5.1	92.6 ± 3.3
	清浄空気	93.7 ± 4.1	93.3 ± 2.8
	エンジン比較	93.8 ± 4.8	93.8 ± 5.5

*: P<0.05 vs.清浄空気群

(1) BALF 中総細胞数

Fig. 3.3.2.15 に、各試験群の BALF 中の総細胞数を示した。尿素 SCR エンジン排気 of 各試験群は、3 日曝露と比べて 7 日曝露で減少傾向が認められた。一方、対照エンジン排気では、清浄空気群と比べて高濃度群の 3 日曝露で有意に減少した。

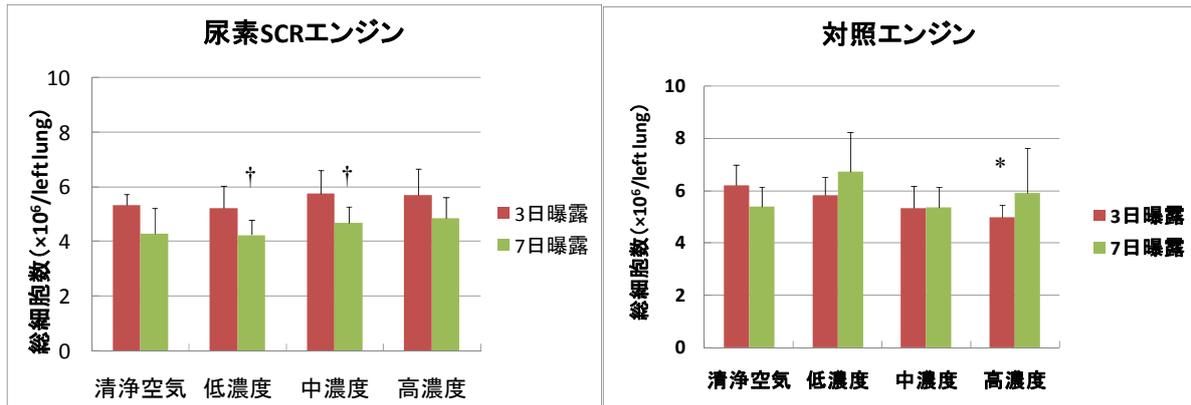


Fig. 3.3.2.15 ラット BALF 中総細胞数 (n = 5~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 3日曝露)

(2) BALF 中細胞分画

BALF 中の細胞構成成分は大部分が Mφ で占められており、その他、好中球、好酸球、リンパ球が認められた (Fig. 3.3.2.16)。

Mφ 分画は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群と比べて有意に減少した。対照エンジン排気では、低濃度群と高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群と比べて有意に減少した。(Fig. 3.3.2.17)。

好中球分画および好酸球分画は、曝露濃度や曝露期間による影響はほとんど認められなかった (Fig. 3.3.2.18、Fig. 3.3.2.19)。

リンパ球分画は、両エンジン排気とも高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群と比べて有意な増加が認められた (Fig. 3.3.2.20)。

しかし、細胞分画の計測総数が 200 であったことから、これらの変化は軽微であり、曝露濃度による影響とは判断できなかった。

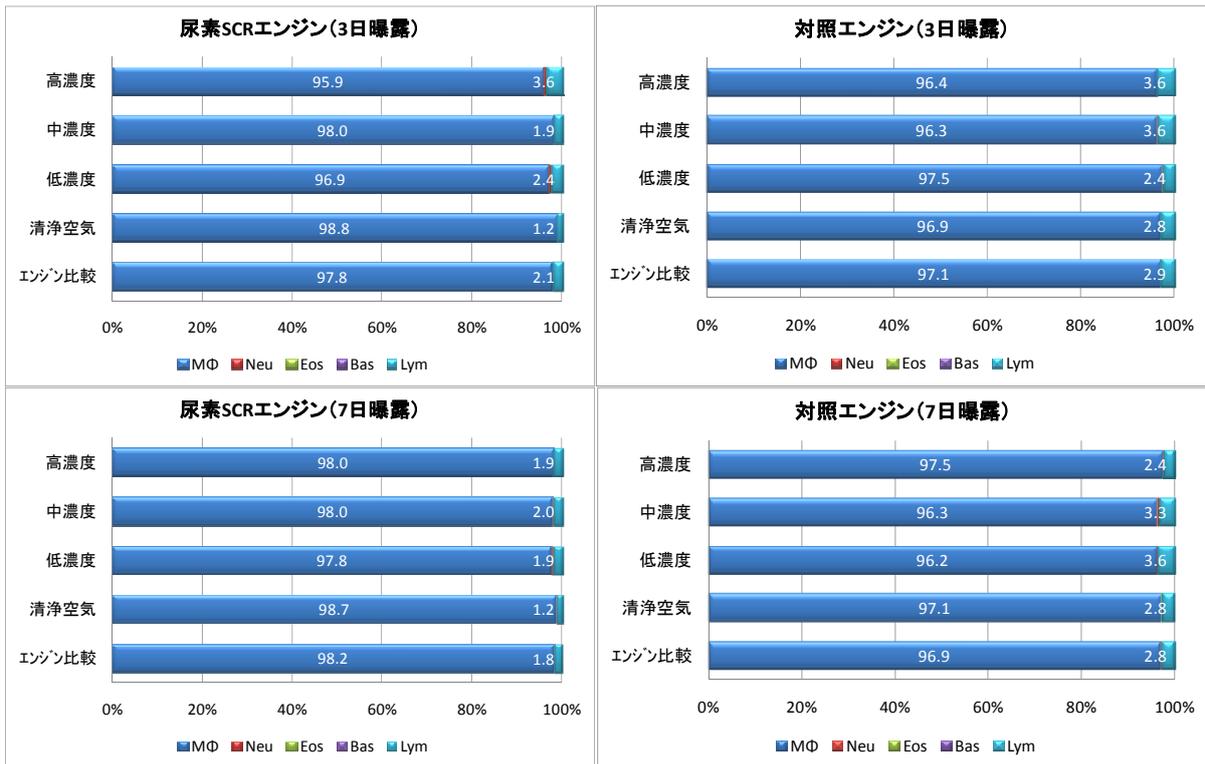


Fig. 3.3.2.16 BALF の細胞分画 (n = 5~6)

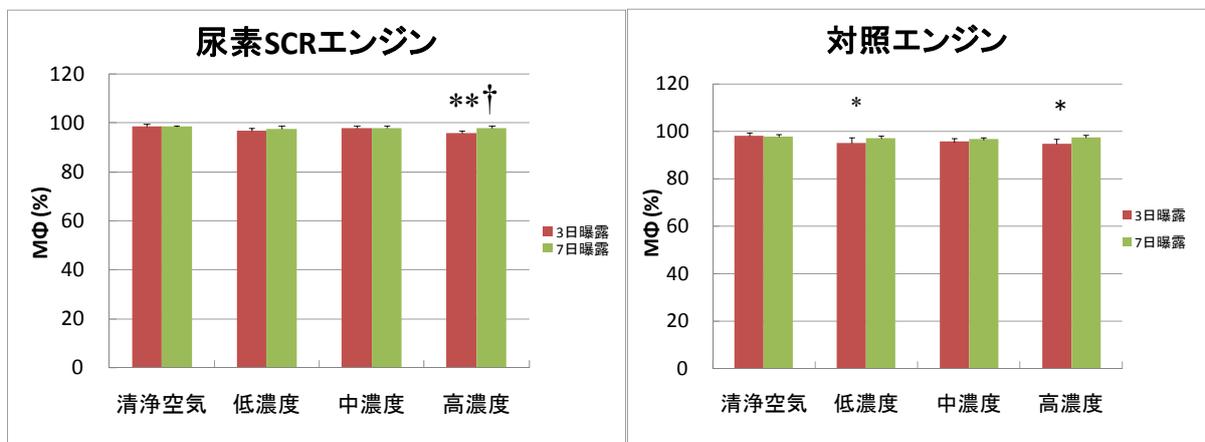


Fig. 3.3.2.17 BALF の Mφ 分画 (%) (n = 5~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05 vs. 3日曝露)

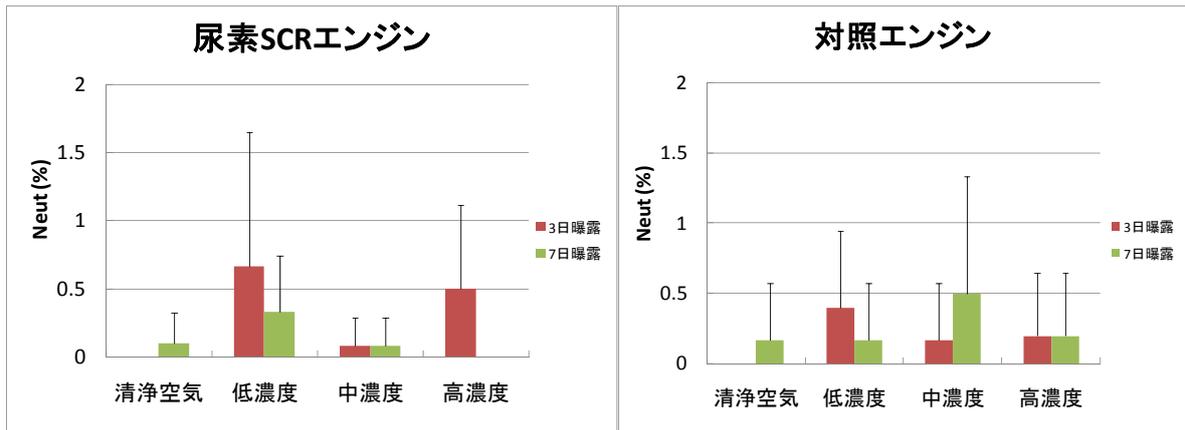


Fig. 3.3.2.18 BALF の好中球分画 (%) (n = 5~6)

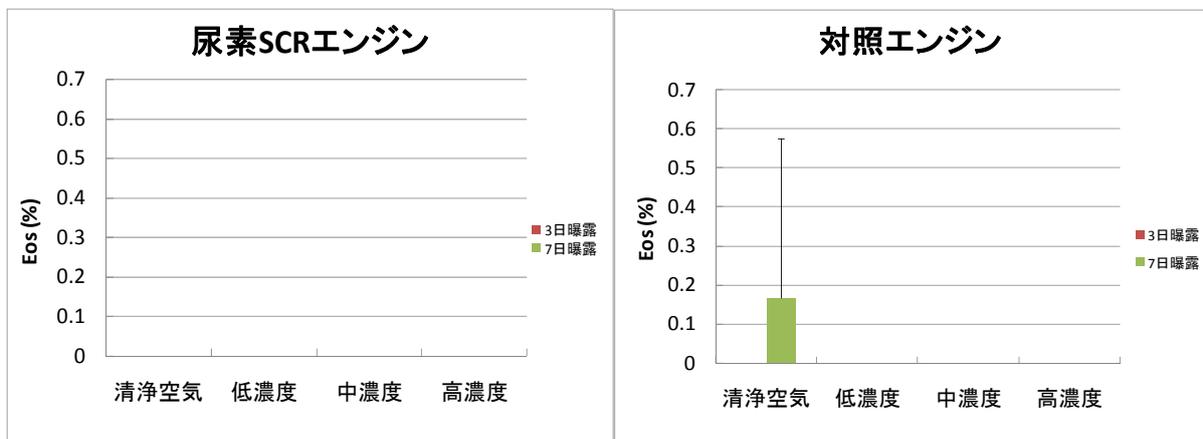


Fig. 3.3.2.19 BALF の好酸球分画 (%) (n = 5~6)

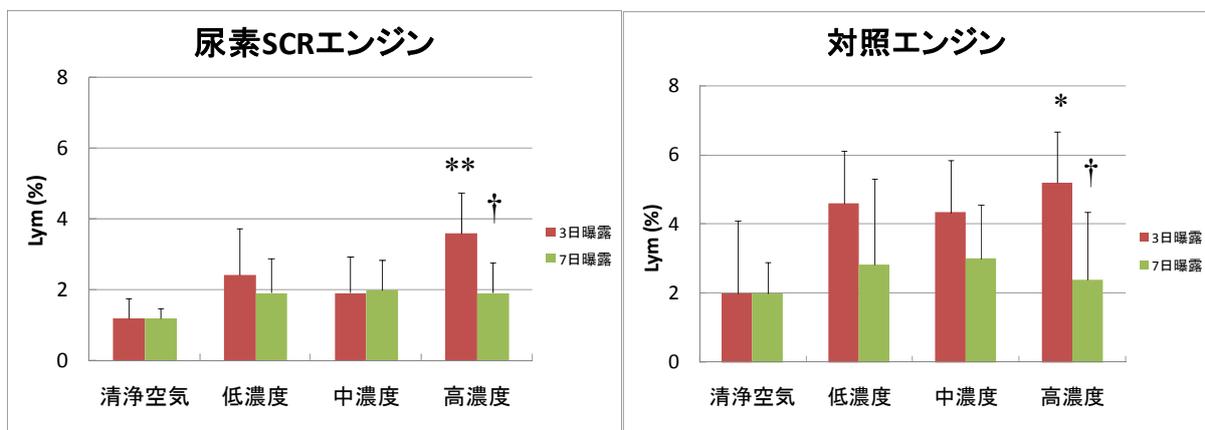


Fig. 3.3.2.20 BALF のリンパ球分画 (%) (n = 5~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05 vs. 3日曝露)

(3) BALF 中炎症細胞数のまとめ

*BALF 中の総細胞数

- 尿素 SCR エンジン排気の低および中濃度群の 7 日曝露は、3 日曝露よりも減少した。
- 対照エンジン排気では、清浄空気群と比べて高濃度群の 3 日曝露で有意に減少した。

*BALF 中の構成細胞（百分率）

- 大部分が Mφ であり、その他、好中球、好酸球、リンパ球が認められた。
- Mφ は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3 日曝露で有意に減少した。
- リンパ球は、両エンジン排気とも高濃度群の 3 日曝露で有意な増加が認められた。
- 好酸球および好中球では曝露濃度やエンジン排気による影響は見られなかった。

これら BALF 中の炎症細胞数の変化は軽微であることから、曝露濃度やエンジン排気により肺に炎症を与えるとまでは言い難かった。

3) 血液検査

(1) 血液生化学検査

1、3、7 日曝露した血液検査の結果を表 3.3.2.3 および表 3.3.2.4 に示した。なお、特に変化のみられた項目はグラフでも示した。

pH は、尿素 SCR エンジン排気の清浄空気群や対照エンジン排気の高濃度群で曝露期間による上昇が認められた。

pCO₂ は、尿素 SCR エンジン排気では清浄空気群の 7 日曝露で 3 日曝露に比べて有意な低下が認められたが、対照エンジン排気では高濃度群の 1、3 日曝露で清浄空気群と比べて有意な上昇が認められた。

pO₂、Cl および iCa は、曝露濃度や曝露期間による影響はほとんど認められなかった。

BE_{ecf} は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3、7 日曝露で 1 日曝露に比べて上昇傾向が認められた。対照エンジン排気では高濃度群の 1、3 日曝露で、また、中濃度群の 3 日曝露で清浄空気群に比べて有意に上昇した。

HCO₃⁻、TCO₂ および Hb は、両エンジン排気とも曝露期間が長くなるにつれて上昇する傾向がみられた。

Hct⁷⁰ は、特に対照エンジン排気の高濃度群の 3、7 日曝露で上昇が認められたが、曝露濃度による影響はほとんど認められなかった。

Na は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 1、7 日曝露で清浄空気群に比べて有意に低下した。また、対照エンジン排気でも低、中濃度の 3 日曝露で有意に低下した。

K⁷¹ は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で、3、7 日曝露で上昇傾向が認められたが、曝露濃度による影響はほとんどみられなかった (Fig. 3.3.2.21)。

⁷⁰ Hct [hematocrit]: ヘマトクリット。血液の中にどのくらいの血球成分があるのかを容積比で表したものであり、正常では、血球と血漿の容積比はほぼ一定だが、脱水、多血症などでは高値となり、鉄欠乏性貧血、溶血性貧血などでは低値を示す。

⁷¹ K [potassium]: カリウム。神経の興奮や心筋（心臓の筋肉）の働きを助けるなど生命活動の維持調節に重要な電解質の一つで、細胞内液からの流出、腎臓での濾過や再吸収などによって変動する。体内のカリウムの 90% は尿からの排泄によるため、腎不全などにより腎臓の機能が低下すると尿量が減少し、血液中のカリウムは高値になる。一方、激しい下痢や嘔吐のときには吐物や便とともに体外に排出されるため、血液中のカリウムは低値になる。

BUN⁷²は、両エンジン排気の中、高濃度群の3、7日曝露で清浄空気群に比べて、有意に上昇した。また、低から高濃度群の3、7日曝露で1日曝露と比べて有意に上昇した（Fig. 3.3.2.22）。尿素 SCR エンジン排気では、K と発現変動が類似していた。

Glu⁷³は、尿素 SCR エンジン排気の1日曝露と、対照エンジン排気の3日曝露でそれぞれ清浄空気群と比べて有意な上昇を認めた。（Fig. 3.3.2.23）。

⁷² **BUN** [blood urea nitrogen]: 血液尿素窒素。尿素の中に含まれる窒素分で、血液中の尿素は腎臓に運ばれ、糸球体でろ過されて尿中に排泄される。腎臓の排泄機能が低下（尿毒症、ネフローゼ症候群など）すると尿素窒素が尿中にうまく排泄されず、血液中に増加する。また、尿素は肝臓で合成されるため、重症肝機能障害（中毒性肝炎、劇症肝炎、肝硬変の末期など）には合成能力が低下し、低値になる。分子量から、尿素窒素（N-N）(mg/dL) × 2.144 = 尿素（O=C-NH₂-NH₂）(mg/dL) で示される。

⁷³ **Glu** [glucose]: 血糖。インスリンやグルカゴン、甲状腺ホルモンなどにより一定の量に保たれている。しかし、インスリンの減少や、ストレス、肥満などにより血糖値が上昇する。また、インスリンノーマ（インスリン分泌過剰）、肝臓がん、絶食などにより血糖値が低下する。

表 3.3.2.3 iSTAT によるラット血液生化学検査（尿素 SCR エンジン）

1日曝露	n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH	6	7.372	6	7.363	6	7.349	6	7.342
pCO ₂ (mmHg)	6	52.30	6	52.63	6	53.08	6	53.38
pO ₂ (mmHg)	6	12.3	6	15.8	5	13.8	6	14.3
BEecf (mmol/L)	6	5.0 *	6	4.5	6	3.3	6	3.0
HCO ₃ (mmol/L)	6	30.38 *	6	29.93	6	29.15	6	28.85
TCO ₂ (mmol/L)	6	32.2 *	6	31.7	6	30.7	6	30.7
sO ₂ (%)	6	13.3	6	20.0	5	15.6	6	16.7
Hct (%PCV)	6	41.0	6	41.3	6	41.3	6	41.7
Hb (g/dL)	6	13.9	6	14.1	6	14.1	6	14.2
Na (mmol/L)	6	137.8 **	6	138.2 **	6	139.3	6	140.2
K (mmol/L)	6	3.8 *	6	3.6	6	3.6	6	3.4
Cl (mmol/L)	5	102.0	6	102.0 *	6	103.2	6	103.3
iCa (mmol/L)	6	1.423	6	1.417 *	6	1.417	6	1.388
BUN (mg/dL)	5	8.4 ***	6	10.7 **	6	10.8 **	6	13.3
Glu (mg/dL)	5	183.4 **	6	184.0 **	6	176.7 *	6	154.8
3日曝露	n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH	3	7.352	5	7.406 †	5	7.387	4	7.391 †††
pCO ₂ (mmHg)	3	55.27	5	50.96	5	51.6	4	50.9
pO ₂ (mmHg)	3	14.7	5	16.8	5	14.2	4	14.5
BEecf (mmol/L)	3	4.7	5	7.0	5	6.0 ††	4	6.0 ††
HCO ₃ (mmol/L)	3	30.43	5	32.02	5	31.0 ††	4	30.9 †
TCO ₂ (mmol/L)	3	32.0	5	33.6	5	32.6 ††	4	32.5 †
sO ₂ (%)	3	20.0	5	24.6	5	17.6	4	19.5
Hct (%PCV)	4	43.3	6	43.8 ††	6	44.7 ††	6	43.3
Hb (g/dL)	4	14.7 †	6	14.9 ††	6	15.2 ††	6	14.7333
Na (mmol/L)	4	138.3	6	138.8	6	138.833	6	138.7 †
K (mmol/L)	4	4.08	6	3.93 †	6	3.95 †	6	4.07 †††
Cl (mmol/L)	4	102.8	6	102.3	6	101.8 †	6	101.8 †
iCa (mmol/L)	3	1.42	5	1.42	5	1.40	4	1.41
BUN (mg/dL)	4	16.5 **,†††	6	16.7 **,†††	6	14.7 †††	6	13.7
Glu (mg/dL)	4	172.5	6	180.3	6	185.0	6	180.8 ††
7日曝露	n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH	5	7.382	4	7.398	5	7.387	6	7.398 †††
pCO ₂ (mmHg)	5	53.94	4	52.60	5	52.0	6	49.9 †
pO ₂ (mmHg)	5	12.2	4	17.0	5	20.6	6	17.7
BEecf (mmol/L)	5	7.0 †	4	7.5 *,†	5	6.2 †††	6	5.8 ††
HCO ₃ (mmol/L)	5	32.04	4	32.38	5	31.3 ††	6	30.7 ††
TCO ₂ (mmol/L)	5	33.8	4	34.0 *	5	32.6 ††	6	32.2 †
sO ₂ (%)	5	15.0	4	23.3	5	32.4	6	26.2
Hct (%PCV)	5	42.4	6	43.8 ††	4	44.5	6	44.2 ††
Hb (g/dL)	5	14.4	6	14.9 ††	4	15.2 †	6	15 ††
Na (mmol/L)	5	138.2 *	6	138.2 *	4	139.3	6	139.8
K (mmol/L)	5	4.22 †	6	4.18 ††	4	3.93	6	3.95 †††
Cl (mmol/L)	5	103.8 ††	6	102.7	4	102.8	6	102.7
iCa (mmol/L)	5	1.41 *	4	1.40	5	1.40	6	1.35 †
BUN (mg/dL)	5	17.4 **,†††	6	18.7 **,†††	4	16.3 **,†††	6	13.2
Glu (mg/dL)	5	180.2	6	178.0	4	181.8	6	189.2 ††

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs.1日曝露

表 3.3.2.4 iSTAT によるラット血液生化学検査 (対照エンジン)

1日曝露		n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH		3	7.361	4	7.391	6	7.363	6	7.385
pCO ₂	(mmHg)	3	56.03 **	4	48.78	6	52.13	6	48.82
pO ₂	(mmHg)	3	8.7	4	17.5	6	11.8	6	15.0
BEecf	(mmol/L)	3	6.3 *	4	4.5	6	4.3	6	4.0
HCO ₃	(mmol/L)	3	31.77 **	4	29.55	6	29.67	6	29.10
TCO ₂	(mmol/L)	3	33.7 ***	4	31.0	6	31.2	6	30.5
sO ₂	(%)	3	7.3	4	24.5	6	12.5	6	19.3
Hct	(%PCV)	4	40.8	5	41.0	6	40.7	6	42.0
Hb	(g/dL)	4	13.9	5	13.9	6	13.8	6	14.3
Na	(mmol/L)	4	137.8	5	138.5	6	137.5	6	138.2
K	(mmol/L)	4	4.3 **	5	3.8	6	4.0	6	3.8
Cl	(mmol/L)	4	102.3	5	102.4	5	102.4	5	103.2
iCa	(mmol/L)	3	1.400	4	1.405	6	1.397	6	1.383
BUN	(mg/dL)	4	10.3	5	10.8	5	10.2	5	11.8
Glu	(mg/dL)	4	183.5 **	5	168.2	5	167.0	5	158.4
3日曝露		n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH		4	7.386	5	7.404	5	7.398 ††	3	7.380
pCO ₂	(mmHg)	4	53.18	5	49.74	5	49.5	3	48.5
pO ₂	(mmHg)	4	11.3	5	15.8	5	16.6	3	15.0
BEecf	(mmol/L)	4	6.8 **	5	6.6 **†	5	5.6	3	3.7
HCO ₃	(mmol/L)	4	31.80 **	5	31.12 *	5	30.4	3	28.7
TCO ₂	(mmol/L)	4	33.5 **	5	32.6 *	5	31.8	3	30.0
sO ₂	(%)	4	11.8	5	21.2	5	23.0	3	19.7
Hct	(%PCV)	6	43.3 *.†	6	44.7 ††	6	44.5 †††	4	45.3 †††
Hb	(g/dL)	6	14.7 *.†	6	15.2 ††	6	15.1 †††	4	15.4 †††
Na	(mmol/L)	6	139.7	6	139.2 *	6	138.5 **	4	141.3 †††
K	(mmol/L)	6	3.93	6	3.78	6	3.93	4	4.05
Cl	(mmol/L)	6	102.0	6	101.3	6	102.0	4	102.8
iCa	(mmol/L)	4	1.42	5	1.39	5	1.42	3	1.40
BUN	(mg/dL)	6	16.0 ***,†††	6	15.5 ***,†††	6	13.0 ††	4	12.3
Glu	(mg/dL)	6	179.0 **	6	188.0 ***,††	6	191.3 ***,†††	4	167.0
7日曝露		n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH		4	7.371	4	7.389	6	7.402 †††	3	7.320
pCO ₂	(mmHg)	4	54.78	4	52.65	6	50.7 *	3	62.4 †
pO ₂	(mmHg)	4	16.0	4	12.3	6	13.5	2	12.0
BEecf	(mmol/L)	4	6.3	4	6.5 †	6	6.7 ††	3	5.7
HCO ₃	(mmol/L)	4	31.68	4	31.75 †	6	31.6 ††	3	31.9 ††
TCO ₂	(mmol/L)	4	33.3	4	33.5 †	6	33.0 ††	3	33.7 ††
sO ₂	(%)	4	23.5	4	14.0	6	16.8	2	13.5
Hct	(%PCV)	6	44.8 †††	6	45.7 †	6	45.5 †††	4	44.5 ††
Hb	(g/dL)	6	15.3 †††	6	15.5 †	6	15.5 †††	4	15.125 ††
Na	(mmol/L)	6	140.0	6	140.0	6	139.8 †††	4	140.0 †
K	(mmol/L)	6	4.33	6	3.98	6	3.78 *	4	4.08
Cl	(mmol/L)	6	102.5	6	102.0	6	102.0	4	101.8
iCa	(mmol/L)	4	1.41	4	1.40	6	1.41	3	1.40
BUN	(mg/dL)	6	17.8 ***,†††	6	17.5 ***,†††	6	14.2 †††	4	12.8
Glu	(mg/dL)	6	174.7	6	178.5	6	183.2 ††	4	185.0 ††

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs.1日曝露

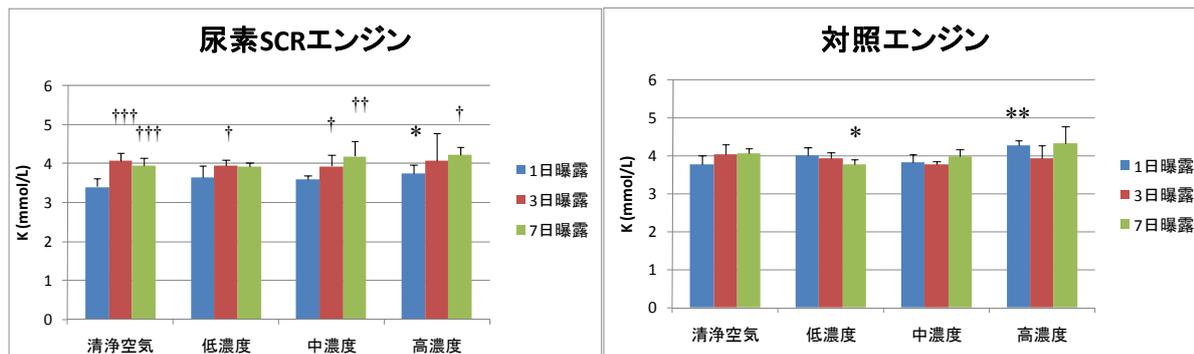


Fig. 3.3.2.21 ラット血液 K (n = 4~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs.1 日曝露)

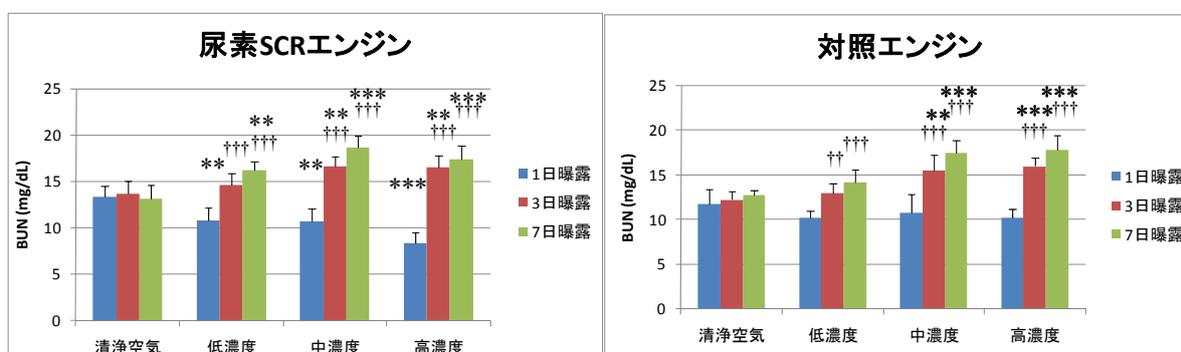


Fig. 3.3.2.22 ラット血液 BUN (n = 4~6)

(**: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, †: P<0.01, ††: P<0.001 vs.1 日曝露)

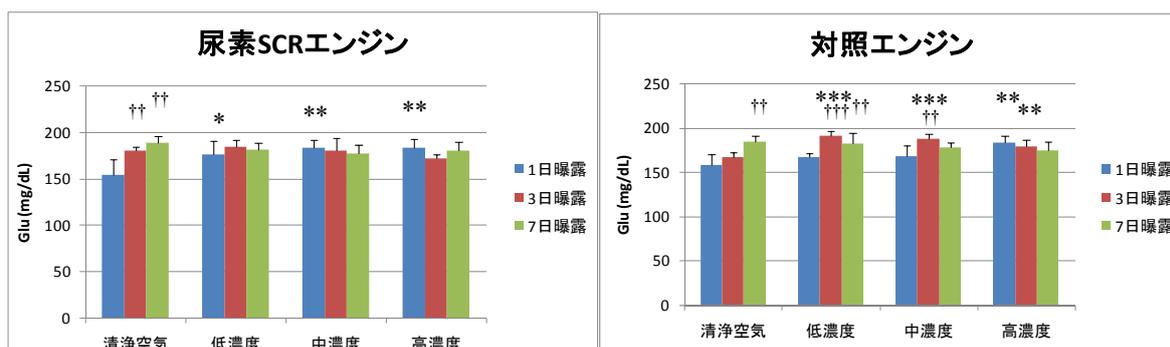


Fig. 3.3.2.23 ラット血液 Glu (n = 4~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, †: P<0.01, ††: P<0.001 vs.1 日曝露)

(2) 血液凝固能検査

7日曝露したラットの血液凝固能検査の結果を表 3.3.2.5 および Fig. 3.3.2.24 に示した。尿素 SCR エンジン排気は、曝露濃度による有意差は認められなかった。また、対照エンジン排気と比較しても有意な差は認められなかった。PT は両エンジン排気の清浄空気群で差が認められた。また、対照エンジン排気の高濃度群で APTT の短縮傾向、フィブリノーゲンの上昇傾向が認められた。

表 3.3.2.5 ラット血液凝固能 (7日曝露)

		n	PT (sec)		n	APTT (sec)		n	Fibrinogen (mg/dL)	
			平均 ± SD			平均 ± SD			平均 ± SD	
尿素SCRエンジン	高濃度	9	15.8 ± 0.34		9	19.3 ± 2.55		9	258.7 ± 12.3	
	清浄空気	7	15.9 [#] ± 0.30		7	18.9 ± 1.50		7	254.4 ± 10.5	
対照エンジン	高濃度	1	16.0		1	16.8		1	281.0	
	清浄空気	3	16.6 ± 0.12		3	18.6 ± 0.25		3	265.7 ± 10.5	

#: P<0.05 vs. 対照エンジン排気

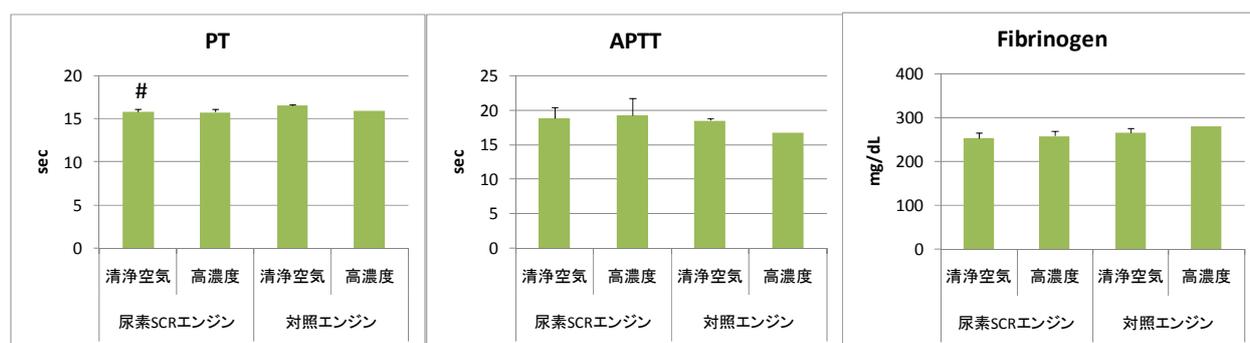


Fig. 3.3.2.24 ラット血液凝固能 (7日曝露) (表 3.3.2.5 をグラフ化) (n = 1~9)

(#: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

(3) 酸化ストレス能検査

酸化ストレス損傷マーカーである 8-OHdG を Fig. 3.3.2.25 に、また、抗酸化能を示す PAO を Fig. 3.3.2.26 に示した。また、Fig. 3.3.2.25-2 および Fig. 3.3.2.26-2 は、Fig. 3.3.2.25 および Fig. 3.3.2.26 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気では、低濃度群の 7日曝露、また、中、高濃度群の全曝露期間で 8-OHdG が有意に低下あるいは検出限界以下 (ND) であった。また、PAO は 8-OHdG が低下した試験群でほぼ有意に上昇した。

一方、対照エンジン排気では、8-OHdG は全ての曝露濃度および曝露期間の中で、高濃度群の 1日曝露が最も高値であり、これは尿素 SCR エンジン排気の試験群と比べても高値であった。しかし、清浄空気群の 1日曝露で全てのサンプルが ND であったことから、有意差検定を行っていない。また、高濃度群では曝露期間が延長すると、8-OHdG が検出されなくなった。中濃度群では、曝露期間に依存して 8-OHdG が上昇した。しかし、PAO は

高濃度群を含めて 8-OHdG を反映した応答を示していなかった。

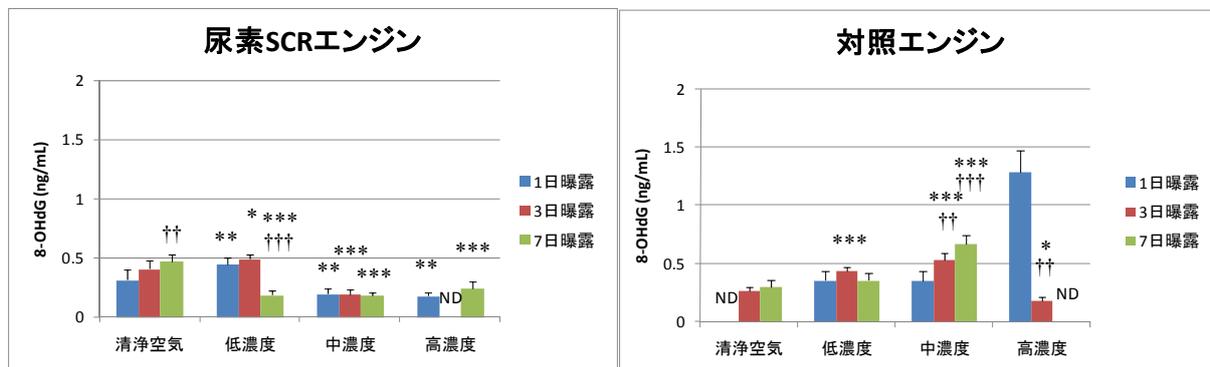


Fig. 3.3.2.25 ラット血清 8-OHdG (曝露濃度ごと) (n = 3~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. 清浄空気群, †: P<0.01, ††: P<0.001 vs. 1日曝露)

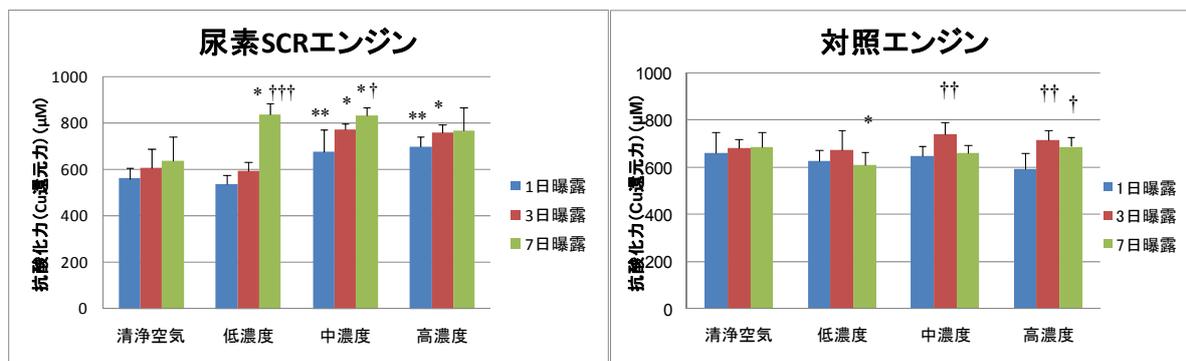


Fig. 3.3.2.26 ラット血清 PAO (抗酸化能) (曝露濃度ごと) (n = 6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

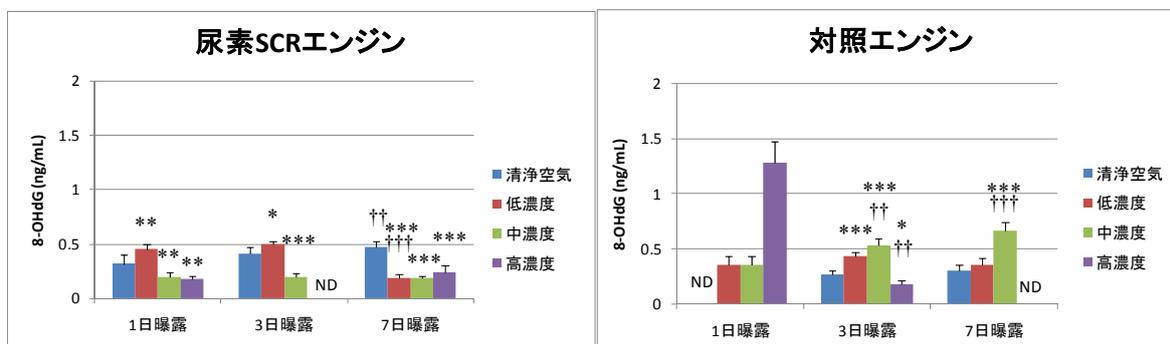


Fig. 3.3.2.25-2 ラット血清 8-OHdG (曝露期間ごと)
(Fig. 3.3.2.25 を改変) (n = 3~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. 清浄空気群, †: P<0.01, ††: P<0.001 vs. 1日曝露)

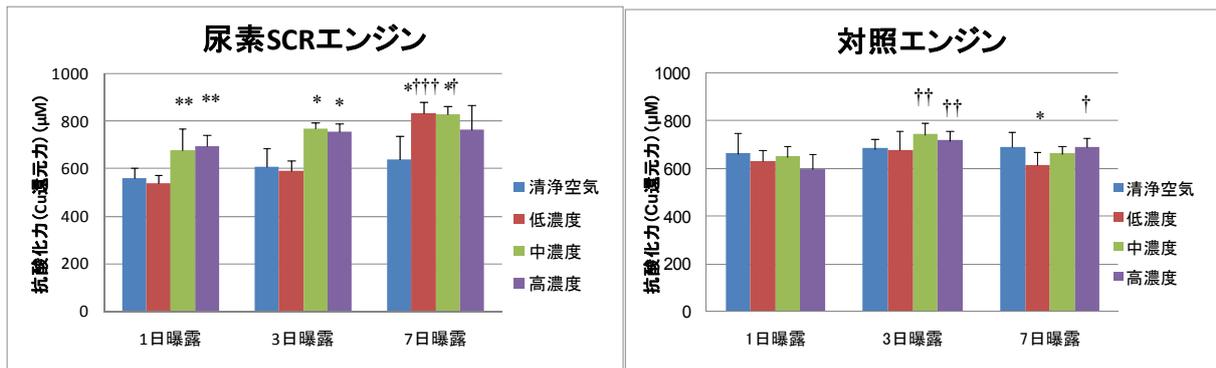


Fig. 3.3.2.26-2 ラット血清 PAO (曝露期間ごと) (Fig. 3.3.2.26 を改変) (n = 6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

(4) 血液検査のまとめ

- 血液生化学検査では、両エンジン排気で BUN および Glu が上昇したことから、何らかの影響を与えている可能性が示唆された。
- 血液凝固能検査では、エンジン排気の違いによる影響は認められなかった。
- 尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも活性酸素による損傷が少ないことが推測された。
- 対照エンジン排気の高濃度群の 1 日曝露で、活性酸素による損傷が大きいことが認められた。

4) 遺伝子解析

(1) リアルタイム PCR 解析

a) 肺の遺伝子発現量

肺の CYP1A1 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.27 に示した。また、Fig. 3.3.2.27-2 は Fig. 3.3.2.27 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、中、高濃度群の 7 日曝露で 1 日曝露より発現量が増加した。対照エンジン排気では、低、中濃度群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。

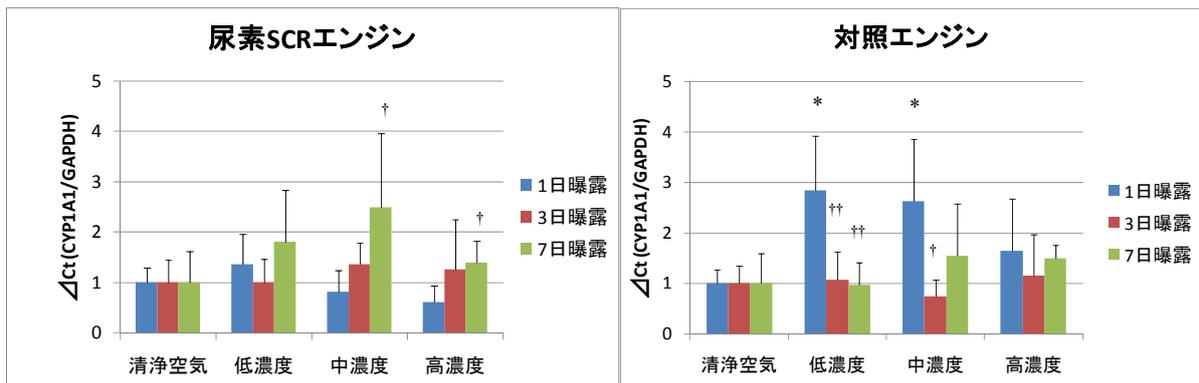


Fig. 3.3.2.27 ラット肺の CYP1A1 遺伝子発現量（曝露濃度ごと）

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

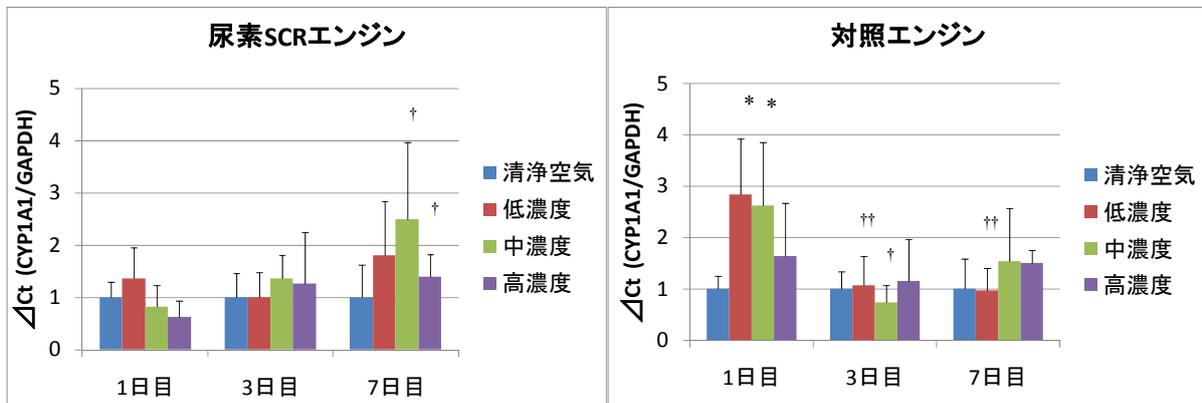


Fig. 3.3.2.27-2 ラット肺の CYP1A1 遺伝子発現量（曝露期間ごと）

(Fig. 3.3.2.27 を改変)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

肺の HO-1 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.28 に示した。また、Fig. 3.3.2.28-2 は Fig. 3.3.2.28 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、高濃度群の 1、3 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。対照エンジン排気では、発現量への影響が見られなかった。

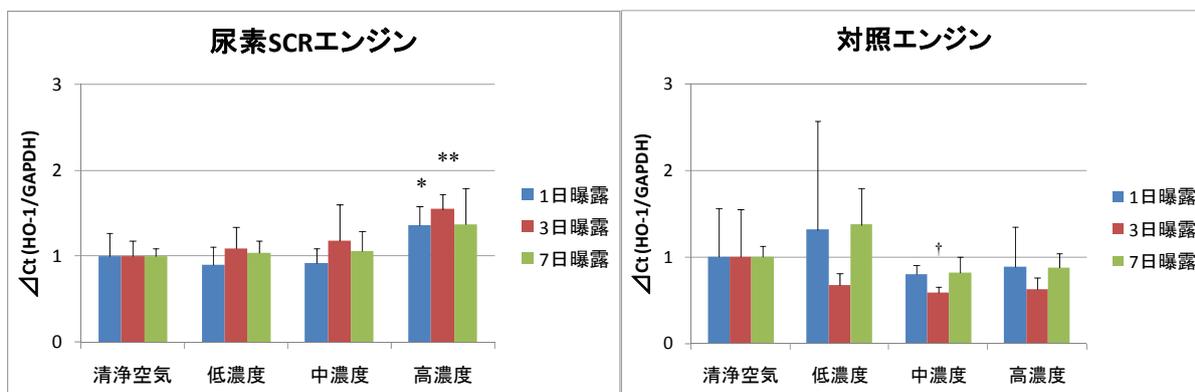


Fig. 3.3.2.28 ラット肺の HO-1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

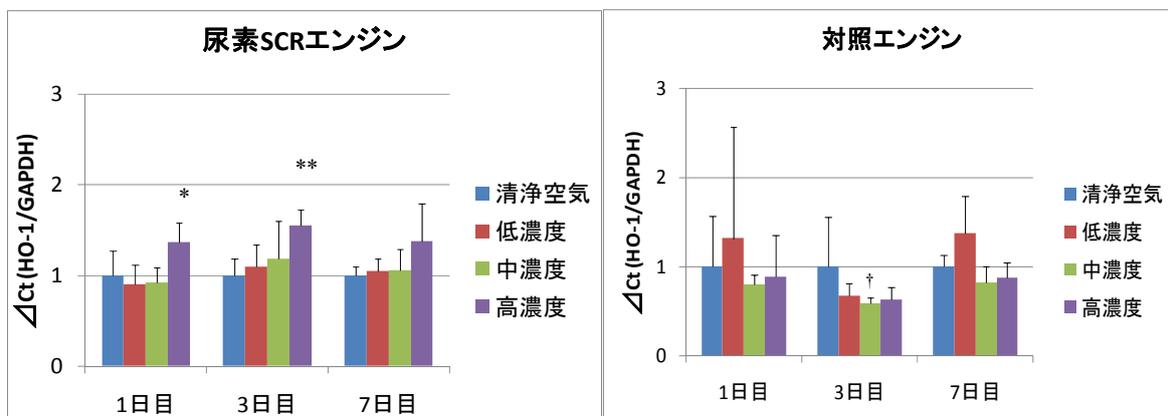


Fig. 3.3.2.28-2 ラット肺の HO-1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.28 を改変)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

肺の IL-1 β 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.29 に示した。また、Fig. 3.3.2.29-2 は Fig. 3.3.2.29 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、中濃度群の全ての曝露期間で清浄空気群よりも発現量が低下傾向にあった。対照エンジン排気では、中、高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群よりも発現量が低下した。

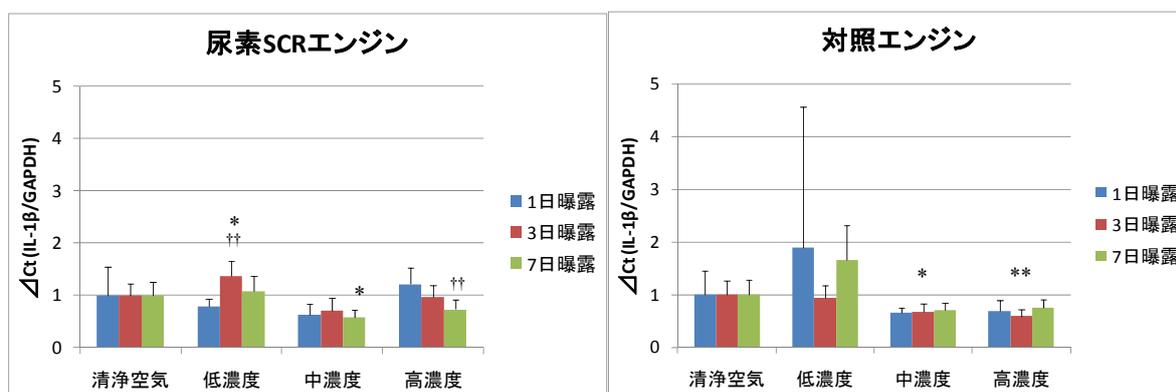


Fig. 3.3.2.29 ラット肺の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

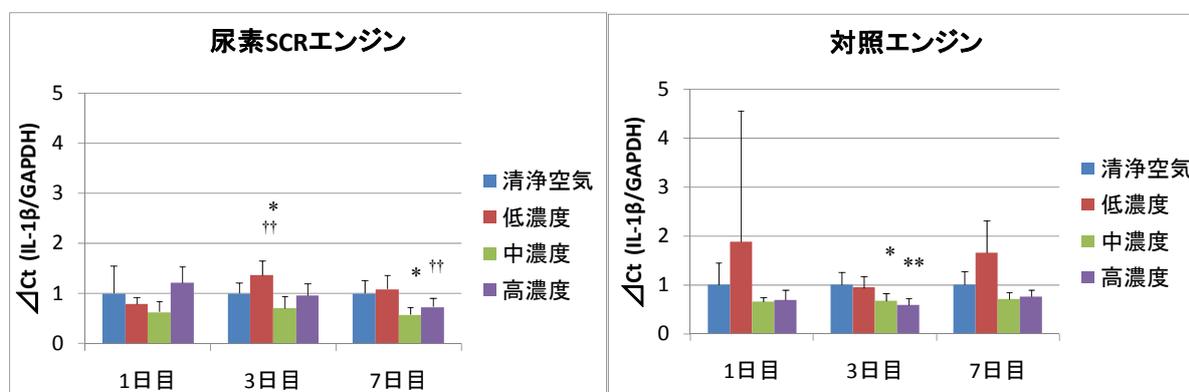


Fig. 3.3.2.29-2 ラット肺の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.29 を改変)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

肺の TNF α 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.30 に示した。また、Fig. 3.3.2.30-2 は Fig. 3.3.2.30 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、低濃度群の 3、7 日曝露、高濃度群の 1 日曝露で清浄空気群より発現量が増加した。対照エンジン排気では、各試験群で発現量への影響がみられなかった。

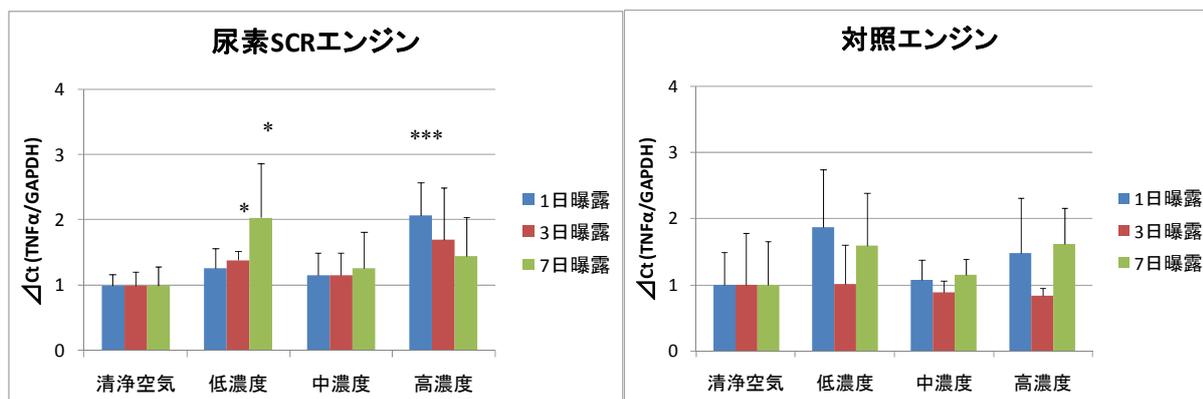


Fig. 3.3.2.30 ラット肺の TNF α 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群)

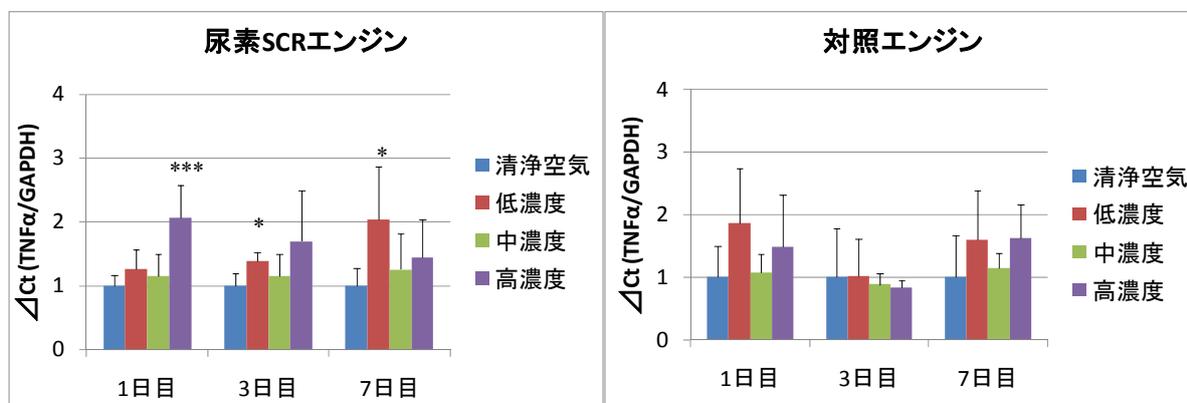


Fig. 3.3.2.30-2 ラット肺の TNF α 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.30 を改変)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群)

b) 心臓の遺伝子発現量

心臓の CYP1A1 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.31** に示した。また、**Fig. 3.3.2.31-2** は **Fig. 3.3.2.31** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は各試験群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。対照エンジン排気では、中、高濃度群の 1、7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。

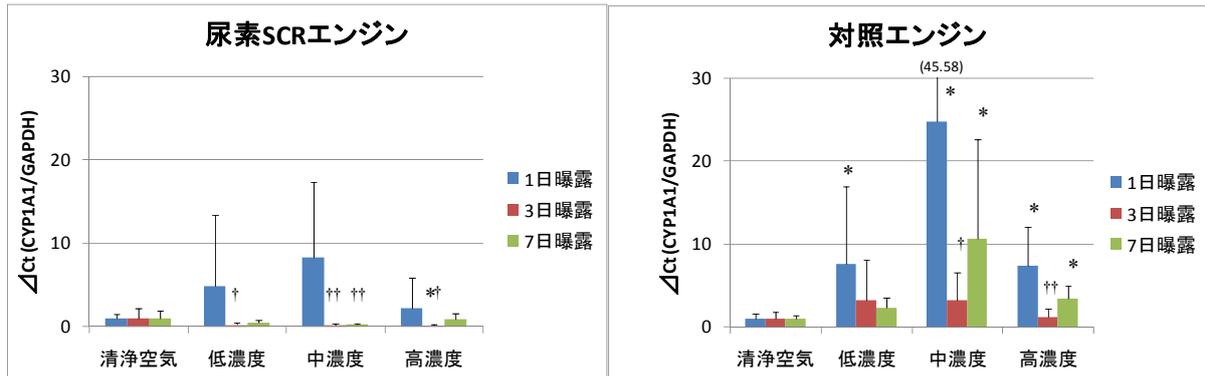


Fig. 3.3.2.31 ラット心臓の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: $P < 0.05$ vs. 清浄空気群, †: $P < 0.05$, ††: $P < 0.01$ vs. 1 日曝露)

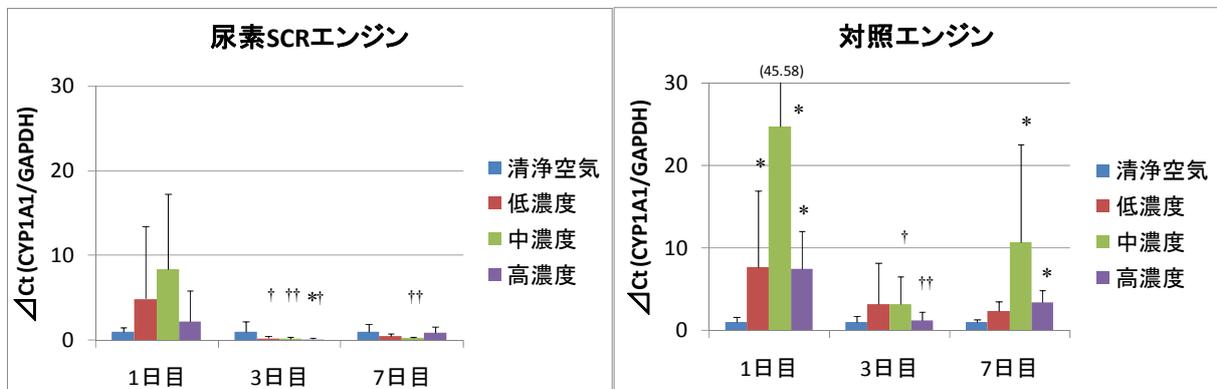


Fig. 3.3.2.31-2 ラット心臓の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)
(**Fig. 3.3.2.31** を改変)

(*: $P < 0.05$ vs. 清浄空気群, †: $P < 0.05$, ††: $P < 0.01$ vs. 1 日曝露)

心臓の HO-1 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.32 に示した。また、Fig. 3.3.2.32-2 は Fig. 3.3.2.32 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群で発現量への影響がみられなかった。対照エンジン排気では、特に中、高濃度群の 7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。

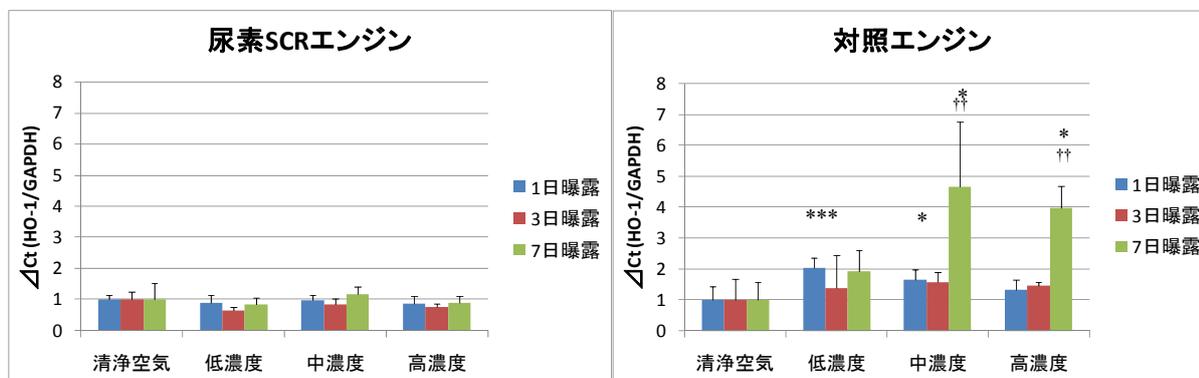


Fig. 3.3.2.32 ラット心臓の HO-1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

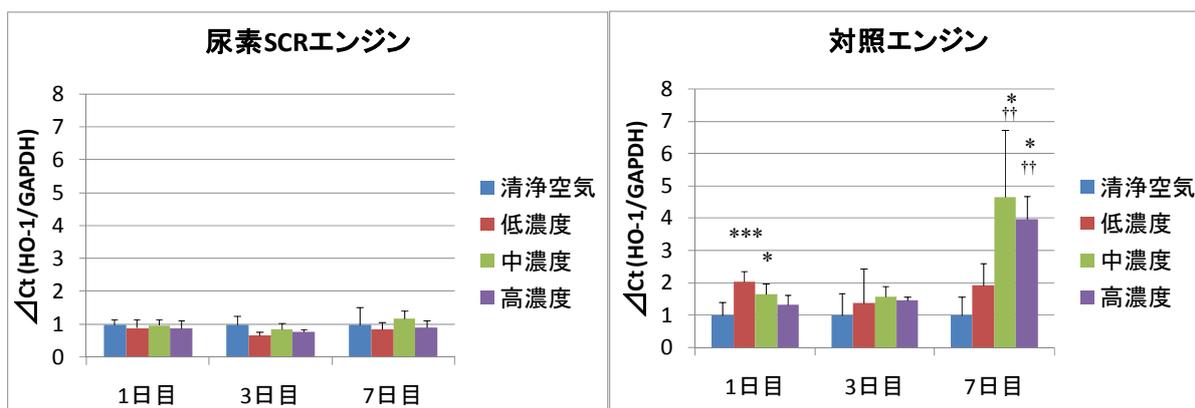


Fig. 3.3.2.32-2 ラット心臓の HO-1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)
(Fig. 3.3.2.32 を改変)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

心臓の IL-1 β 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.33** に示した。また、**Fig. 3.3.2.33-2** は **Fig. 3.3.2.33** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。対照エンジン排気では、各試験群で曝露濃度および曝露期間により発現量が増加した。

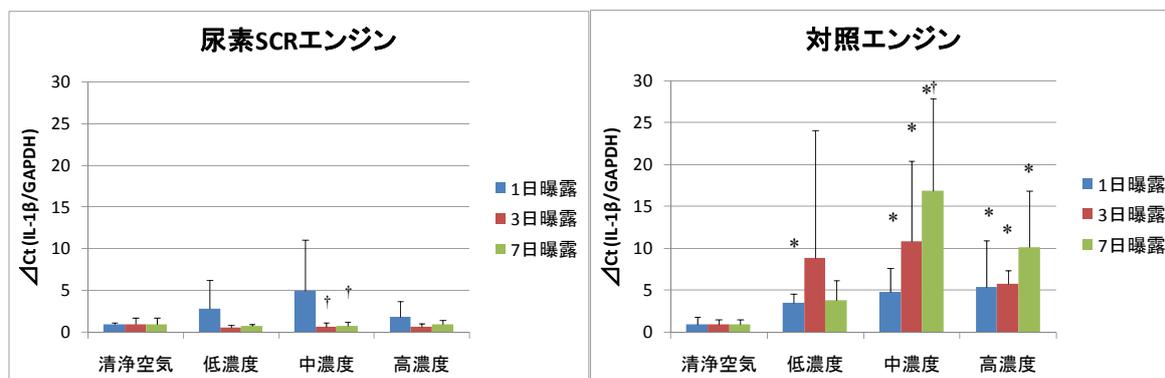


Fig. 3.3.2.33 ラット心臓の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

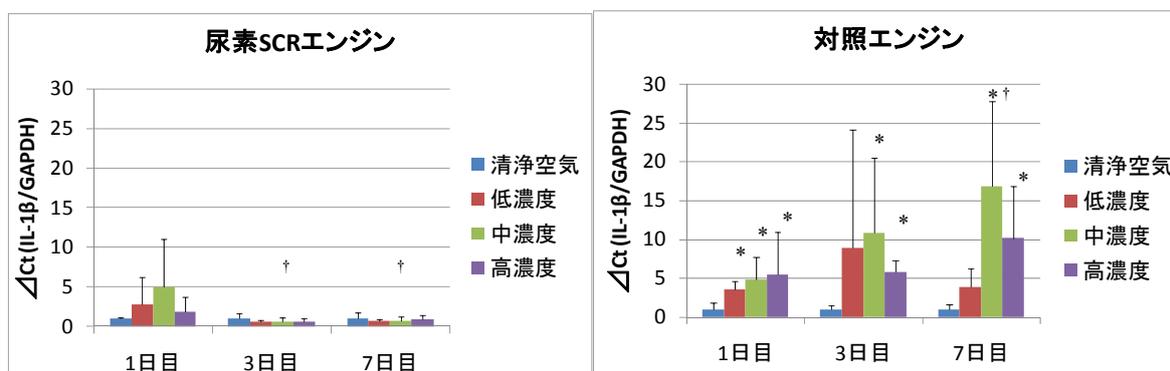


Fig. 3.3.2.33-2 ラット心臓の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(**Fig. 3.3.2.33** を改変)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

心臓の TNF α 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.34 に示した。また、Fig. 3.3.2.34-2 は Fig. 3.3.2.34 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。対照エンジン排気では、曝露濃度や曝露期間により発現量が増加した。

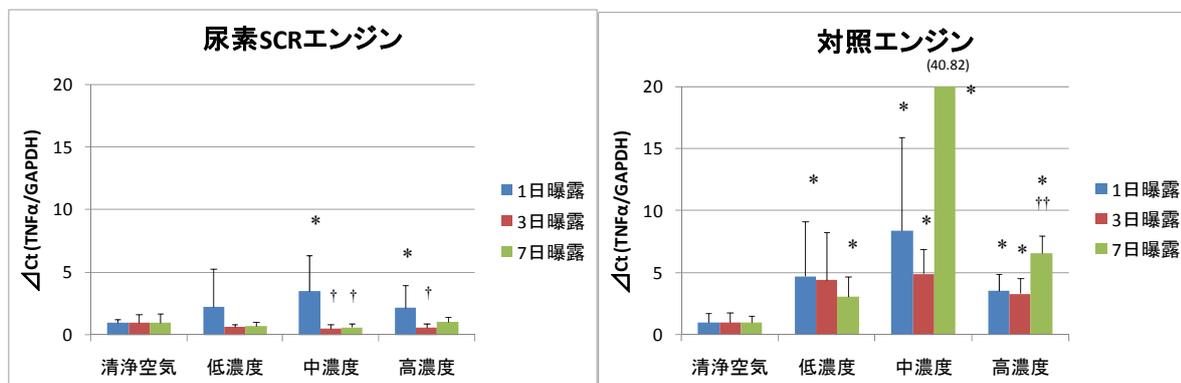


Fig. 3.3.2.34 ラット心臓の TNF α 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

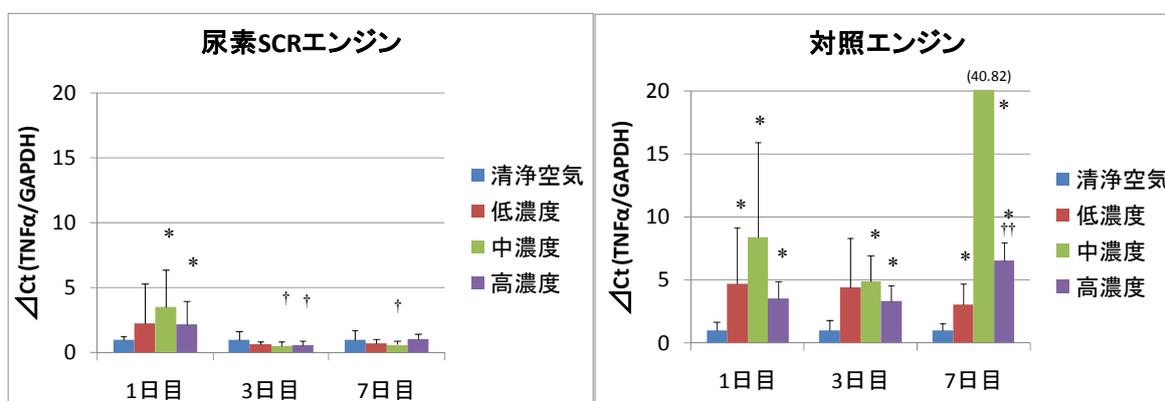


Fig. 3.3.2.34-2 ラット心臓の TNF α 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.34 を改変)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

c) 大脳遺伝子発現量

大脳の CYP1A1 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.35** に示した。また、**Fig. 3.3.2.35-2** は **Fig. 3.3.2.35** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、中、高濃度群で清浄空気群よりも発現量が低下傾向にあった。対照エンジン排気は、各試験群で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。

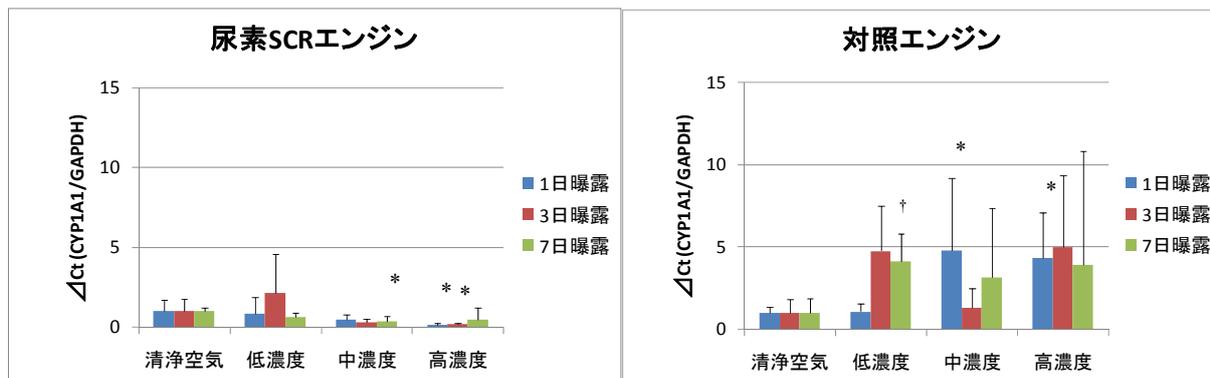


Fig. 3.3.2.35 ラット大脳の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

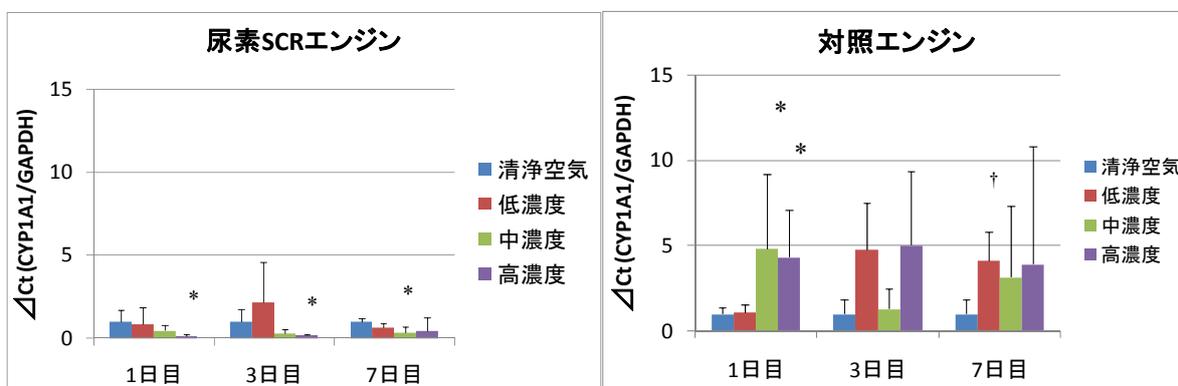


Fig. 3.3.2.35-2 ラット大脳の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(**Fig. 3.3.2.35** を改変)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

大脳の HO-1 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.36** に示した。また、**Fig. 3.3.2.36-2** は **Fig. 3.3.2.36** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群で発現量への影響はみられなかった。対照エンジン排気では、低濃度群の 3、7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加し、高濃度群の 7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が低下した。

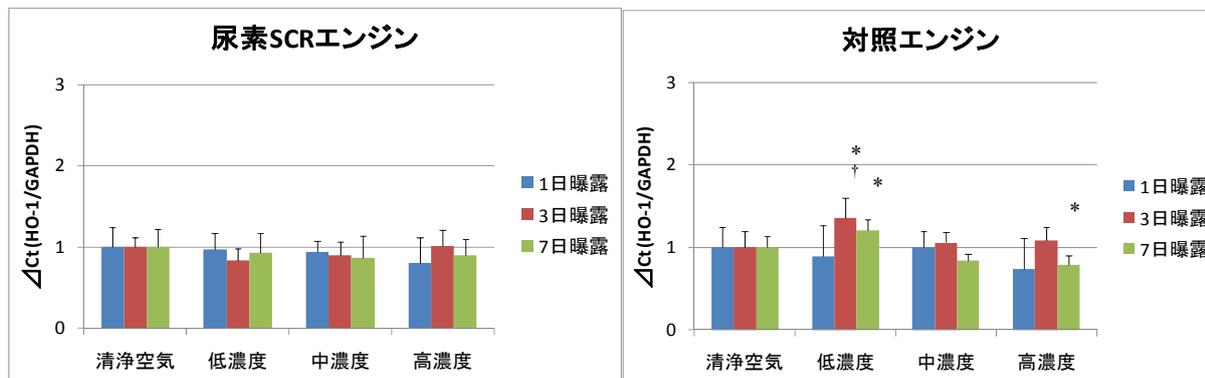


Fig. 3.3.2.36 ラット大脳の HO-1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

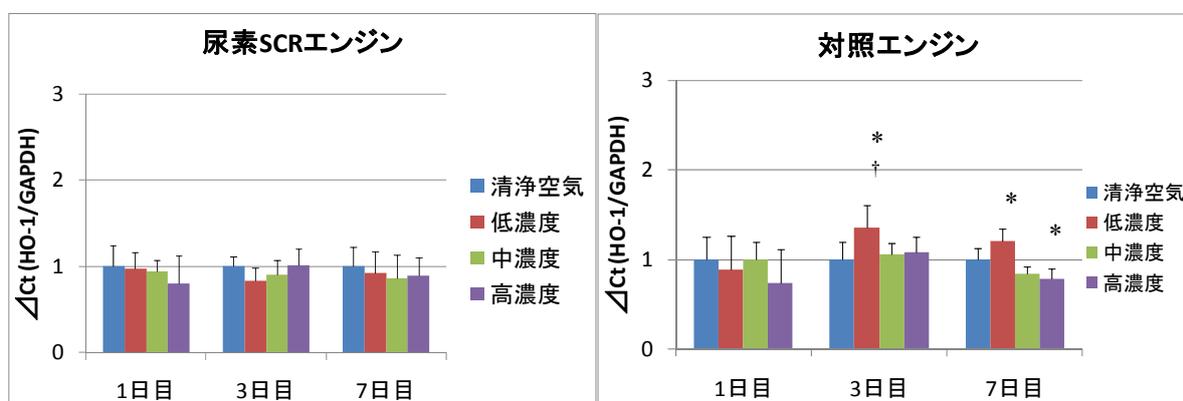


Fig. 3.3.2.36-2 ラット大脳の HO-1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(**Fig. 3.3.2.36** を改変)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

大脳の IL-1 β 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.37** に示した。また、**Fig. 3.3.2.37-2** は **Fig. 3.3.2.37** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、低濃度群の 3 日曝露で発現量が増加した。対照エンジン排気では、低濃度群の 3、7 日曝露、および高濃度群の 3 日曝露で、清浄空気群および 1 日曝露よりも発現量が増加した。

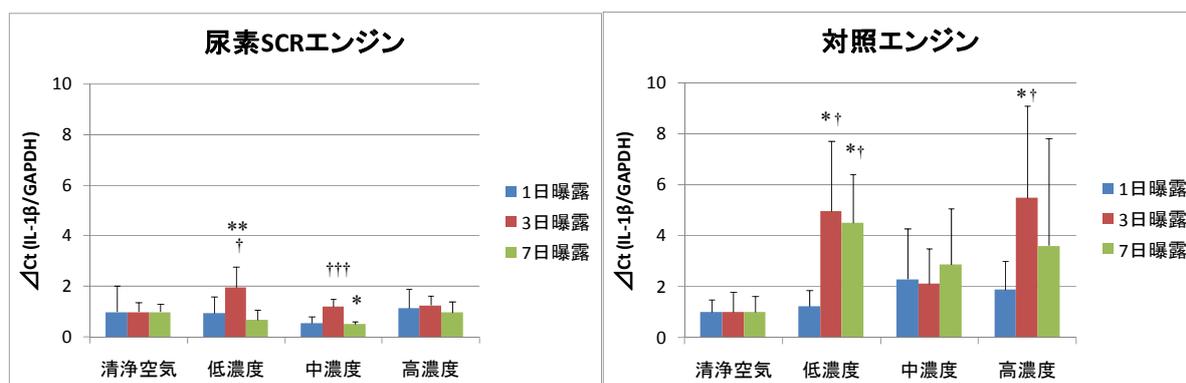


Fig. 3.3.2.37 ラット大脳の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露)

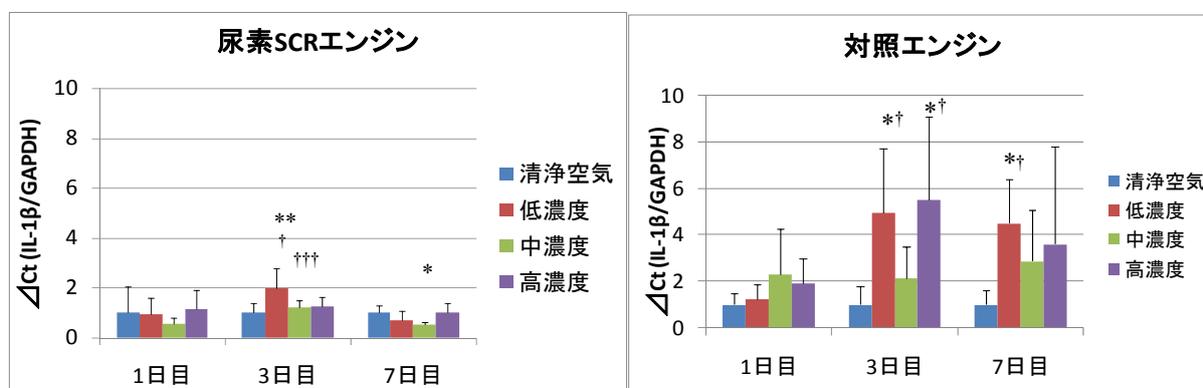


Fig. 3.3.2.37-2 ラット大脳の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(**Fig. 3.3.2.37** を改変)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露)

大脳の TNF α 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.38 に示した。また、Fig. 3.3.2.38-2 は Fig. 3.3.2.38 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群で発現量に変動がみられなかった。対照エンジン排気では、低濃度群の 3、7 日曝露、高濃度群の 3 日曝露で発現量が増加傾向にあった。

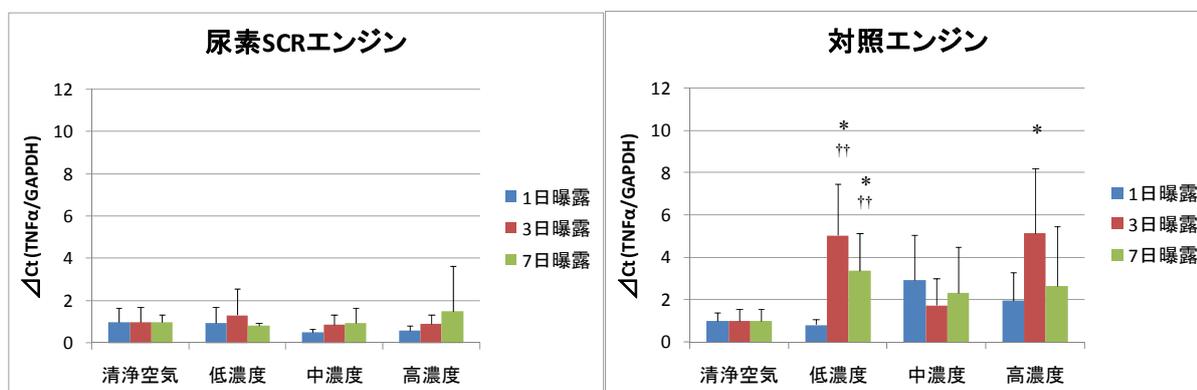


Fig. 3.3.2.38 ラット大脳の TNF α 遺伝子発現量

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

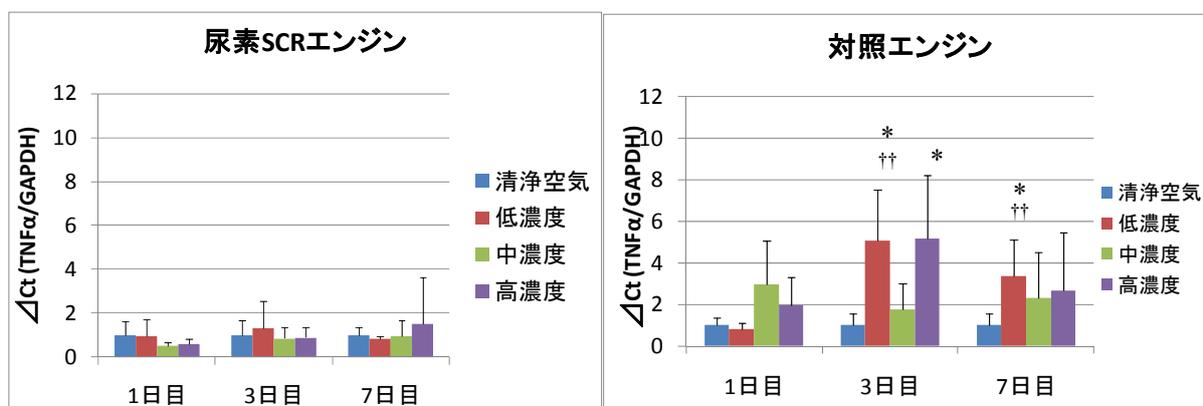


Fig. 3.3.2.38-2 ラット大脳の TNF α 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.38 を改変)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

d) リアルタイム PCR 解析まとめ

- 肺では、尿素 SCR エンジン排気で HO-1 と TNF α の遺伝子発現量が増加したことから、酸化ストレスや炎症に影響を与えていることが示唆された。
- 心臓では、対照エンジン排気の 7 日曝露で、CYP1A1、HO-1 および IL-1 β の遺伝子発現量が増加した。これらは、対照エンジン排気の PM 濃度が高値であったことによる影響である可能性が示唆された。

- 心臓では、尿素 SCR エンジン排気で CYP1A1、IL-1 β および TNF α 遺伝子の発現の傾向が類似していた。
- 大脳では、対照エンジン排気で IL-1 β および TNF α の遺伝子発現量が増加していたことから、炎症に影響を与えていることが示唆された。
- 大脳では、CYP1A1、IL-1 β および TNF α 遺伝子は、両エンジン排気で発現の傾向が類似していた。
- CYP1A1 遺伝子は、各臓器に共通して対照エンジン排気で発現が増加する傾向があった。

遺伝子レベルでは、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓、大脳に影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) DNA マイクロアレイ解析

表 3.3.2.6 は、DNA マイクロアレイ解析の遺伝子発現量の結果の概要を示した。

肺では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも発現変動の程度を示す SD がやや大きく、変動している遺伝子数も若干多かった。

心臓では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気より SD はやや小さかった。また、変動している遺伝子数は尿素 SCR エンジン排気では 7 日曝露よりも 1 日曝露で、対照エンジン排気は 1 日曝露よりも 7 日曝露で多く、両エンジン排気で発現傾向の異なっていることが認められた。

大脳において、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも SD が小さく、変動している遺伝子数も少なかった。

表 3.3.2.6 ラットの各臓器における遺伝子発現量のばらつき (SD) と発現変動した数

エンジン排気	検討試験群/標準試験群	曝露期間	肺			心臓			大脳		
			SD	≥ 2.0	≤ 0.5	SD	≥ 2.0	≤ 0.5	SD	≥ 2.0	≤ 0.5
尿素SCRエンジン	高濃度群/清浄空気群	1日	0.46	1343	527	0.44	1268	467	0.36	497	277
		7日	0.46	1325	686	0.40	713	243	0.39	1022	331
対照エンジン	高濃度群/清浄空気群	1日	0.39	906	229	0.42	989	281	0.52	1752	889
		7日	0.40	1075	475	0.50	1456	456	0.46	1303	585

a) Gene Tree

Fig. 3.3.2.39 に、遺伝子発現の傾向を確認する Gene Tree を示した。対照とする群の遺伝子発現量よりも検討した群での発現量が亢進しているときは赤で示され、抑制しているときには緑で示される。Fig. 3.3.2.39 内に示された各 Bar は各遺伝子の発現傾向が上から下へ示されており、横並びに比較すると、各試験群での発現傾向の違いを確認できる。ここでは、一つ一つの遺伝子の発現傾向に着目するのではなく、両エンジン排気で 1、7 日曝露した各臓器における各試験群での発現全体の違いを検討した。

肺では、両エンジン排気の 1 日曝露で発現傾向に差異がみられた。7 日曝露の両エンジン排気では、1 日曝露ほどではないが若干の差異がみられた。尿素 SCR エンジン排気では、

1日曝露と7日曝露で発現傾向が逆になっている遺伝子が多くみられ、曝露期間の延長で、発現遺伝子が増えていることが認められた。また、対照エンジン排気では、7日曝露で1日曝露よりも強い発現抑制がかかっている傾向がみられた。一方、各試験群で Distance 値に似か寄りは見られなかった。

心臓では、両エンジン排気の1日曝露で、発現傾向の類似性がみられた。また、7日曝露では、両エンジン排気で発現傾向が逆になっていた。対照エンジン排気では曝露期間による発現変動の大きな差異はあまりみられなかった。Distance 値からは、尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で発現傾向が他と異なっていることが認められた。

大脳では、対照エンジン排気の1、7日曝露、尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で、発現傾向の類似性がみられた。また、尿素 SCR エンジン排気の1日曝露は、他の試験群とは逆の発現傾向を示していた。

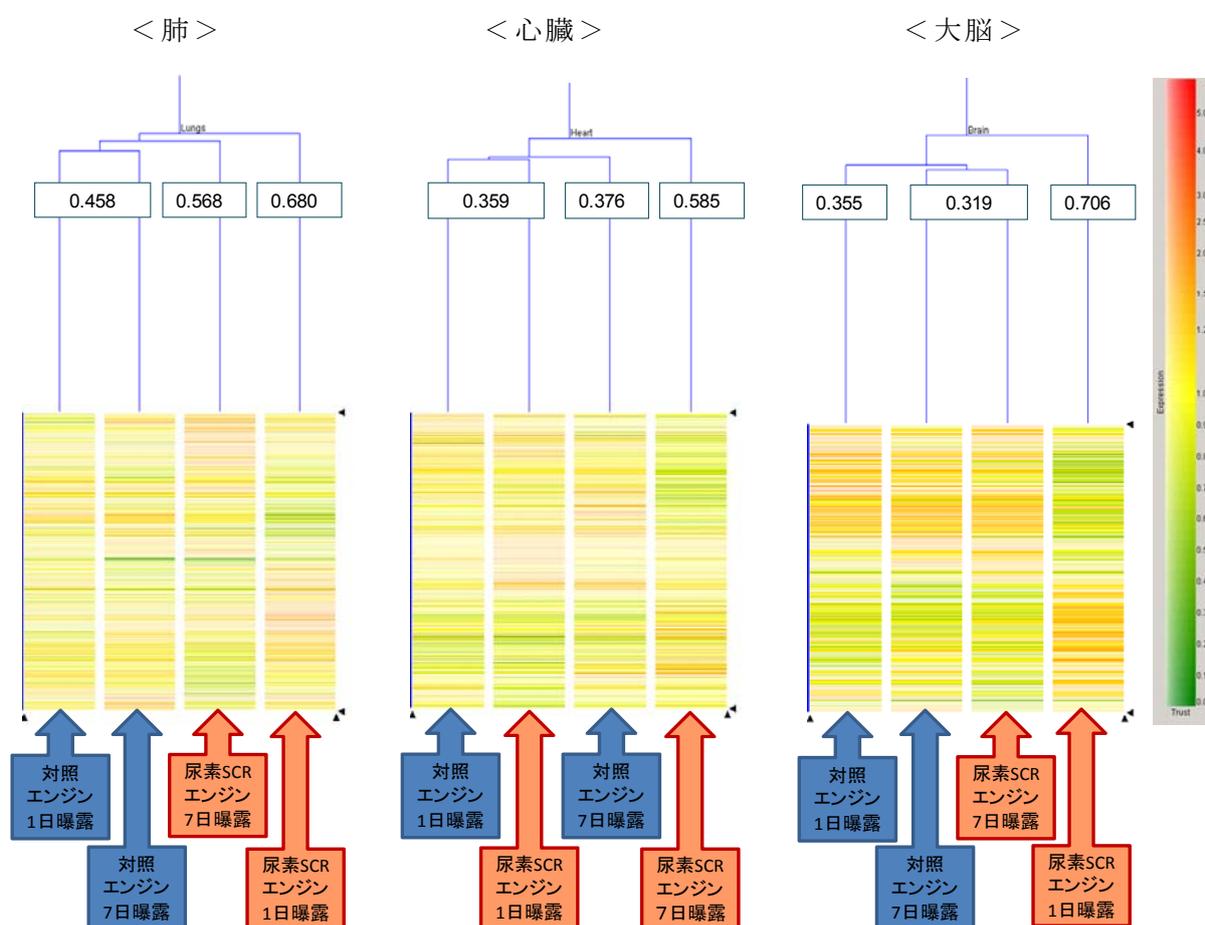


Fig. 3.3.2.39 ラット各臓器における遺伝子発現傾向 (Gene Tree)
 シード内の数値は Distance 値を示し

b) Gene Ontology

表 3.3.2.7～表 3.3.2.9 では、Gene Ontology (GO) で分類された遺伝子の発現量の SD を臓器ごとに示した。また、ばらつきが最も大きい試験群の SD 値を下線で示した。

表 3.3.2.7 は、肺の GO 分類を示した。酸化ストレス関連遺伝子分類中のほとんどや細胞成長や細胞分裂、細胞死に関わる遺伝子分類の SD 値が、特に尿素 SCR エンジン排気で高値を示した。酸化ストレスによる影響は細胞分裂にも影響を与えるため、それらの関連についても示唆された。

表 3.3.2.7 GO 分類されたラット肺の遺伝子発現量のばらつき

		尿素 SCR エンジン		対照エンジン	
		1 日曝露	7 日曝露	1 日曝露	7 日曝露
成長	細胞増殖	<u>0.35</u>	0.32	0.31	0.31
	細胞成長	<u>0.42</u>	0.38	0.26	0.29
細胞分裂	DNA 代謝	<u>0.43</u>	0.35	0.30	0.31
	転写	<u>0.41</u>	0.41	0.29	0.34
細胞傷害	外部刺激応答	0.34	<u>0.42</u>	0.31	0.31
	細胞死	<u>0.46</u>	0.44	0.28	0.31
酸化ストレス	ストレス応答	<u>0.38</u>	0.34	0.19	0.28
	アポトーシス	<u>0.46</u>	0.45	0.28	0.31
	グルタチオン代謝	0.41	0.48	<u>0.66</u>	0.21
	抗酸化活性	0.22	<u>0.50</u>	0.18	0.17
	ケトン体の合成と低下	<u>0.44</u>	0.33	0.18	0.23
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	<u>0.39</u>	0.39	0.31	0.32
細胞シグナル伝達	ステロイド生合成	0.27	0.37	0.23	<u>0.38</u>
	カルシウムシグナル経路	0.41	<u>0.46</u>	0.26	0.38
	MAPK シグナル経路	0.37	<u>0.40</u>	0.23	0.33
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	<u>0.47</u>	0.41	0.37	0.35
	TGFβ シグナル経路	0.51	<u>0.51</u>	0.30	0.30

表 3.3.2.8 は、心臓の GO 分類を示した。細胞増殖、グルタチオン代謝や抗酸化活性、ケトン体合成などの遺伝子分類では、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で SD 値が高い傾向にあった。細胞分裂や細胞傷害、ストレス応答、アポトーシス、カタラーゼ活性、細胞シグナル伝達系、炎症・アレルギー関連の遺伝子分類では、対照エンジン排気の 7 日曝露で SD 値が高い傾向にあった。

なお、MAPK シグナル経路関連の遺伝子分類では、尿素 SCR エンジン排気の 7 日曝露にて SD 値が他より顕著に高かった。この分類内で大きく変動していた遺伝子を調べたところ、similar to putative voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit (predicted) (Acc. No. XM_232320) と Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2 (Acc. No. BI292115) であり、それらの発現量は 15.76 および 15.56 と顕著な発現亢進であった。

表 3.3.2.8 GO 分類されたラット心臓の遺伝子発現量のばらつき

		尿素 SCR エンジン		対照エンジン	
		1 日曝露	7 日曝露	1 日曝露	7 日曝露
成長	細胞増殖	<u>0.36</u>	0.26	0.31	0.35
	細胞成長	0.36	0.26	0.32	<u>0.44</u>
細胞分裂	DNA 代謝	0.36	0.27	0.33	<u>0.37</u>
	転写	0.36	0.37	0.34	<u>0.49</u>
細胞傷害	外部刺激応答	0.41	0.29	0.39	<u>0.51</u>
	細胞死	0.34	0.31	0.29	<u>0.42</u>
酸化ストレス	ストレス応答	0.28	0.23	0.31	<u>0.32</u>
	アポトーシス	0.35	0.31	0.29	<u>0.43</u>
	グルタチオン代謝	<u>0.58</u>	0.35	0.45	0.53
	抗酸化活性	<u>0.26</u>	0.25	0.17	0.21
	ケトン体の合成と低下	<u>0.36</u>	0.28	0.24	0.31
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	0.36	0.27	0.32	<u>0.42</u>
細胞シグナル伝達	プロテインキナーゼ活性	0.37	0.26	0.33	<u>0.42</u>
	ステロイド生合成	0.53	0.30	0.26	<u>0.70</u>
	カルシウムシグナル経路	0.39	0.27	0.26	<u>0.48</u>
	MAPK シグナル経路	0.37	<u>1.21</u>	0.35	0.44
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	0.35	0.36	0.33	<u>0.43</u>
	TGFβ シグナル経路	0.47	0.28	0.36	<u>0.48</u>
	細胞接着分子 (CAMs)	0.43	0.29	0.27	<u>0.48</u>

表 3.3.2.9 に示した大脳では、ケトン体合成と低下やプロテインキナーゼ活性に関与する遺伝子分類を除くほとんどの遺伝子分類で、対照エンジン排気の SD 値が高い傾向にあった。特に、細胞成長、細胞傷害、ストレス応答、アポトーシス、グルタチオン代謝などに加え、神経変性疾患や嗅球伝達に関わる遺伝子分類においては、対照エンジン排気の 1 日曝露で SD 値がさらに高い傾向にあった。

表 3.3.2.9 GO 分類されたラット大脳の遺伝子発現量のばらつき

		尿素 SCR エンジン		対照エンジン	
		1 日曝露	7 日曝露	1 日曝露	7 日曝露
成長	細胞増殖	0.30	0.34	<u>0.43</u>	0.39
	細胞成長	0.26	0.32	<u>0.41</u>	0.37
細胞分裂	DNA 代謝	0.26	0.36	0.44	<u>0.45</u>
	転写	0.25	0.34	<u>0.44</u>	0.39
細胞傷害	外部刺激応答	0.29	0.37	<u>0.45</u>	0.37
	細胞死	0.31	0.34	<u>0.44</u>	0.43
酸化ストレス	ストレス応答	0.23	0.30	<u>0.33</u>	0.31
	アポトーシス	0.31	0.34	<u>0.45</u>	0.42
	グルタチオン代謝	0.24	0.31	<u>0.36</u>	0.35
	抗酸化活性	0.21	0.21	0.22	<u>0.25</u>
	ケトン体の合成と低下	0.30	<u>0.46</u>	0.33	0.23
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	0.36	0.32	<u>0.42</u>	0.38
細胞シグナル伝達	プロテインキナーゼ活性	<u>0.59</u>	0.34	0.45	0.38
	ステロイド生合成	0.22	0.29	<u>0.42</u>	0.41
	カルシウムシグナル経路	0.27	0.32	0.49	<u>0.49</u>
	MAPK シグナル経路	0.28	0.33	0.43	<u>0.53</u>
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	0.31	0.36	0.53	<u>0.53</u>
	TGFβ シグナル経路	0.28	0.31	<u>0.50</u>	0.38
神経	神経変性疾患	0.32	0.25	<u>0.38</u>	0.28
	嗅球伝達	0.28	0.31	<u>0.47</u>	0.29

c) 注目すべき遺伝子の発現変化

特に留意しておくべき遺伝子を臓器ごとにピックアップし、エンジン排気とその曝露期間による発現量の差異について検討した。結果を表 3.3.2.10～表 3.3.2.12 に示した。

表 3.3.2.10 に示す肺で特に重要と思われる遺伝子の中では、chemokine (C-C motif) ligand 11 (Eotaxin) (Acc. No. NM_019205) の遺伝子発現が対照エンジンの 1 日曝露で 2 倍以上に発現が亢進されたが、その他に、変動のみられた遺伝子はなかった。

また、表 3.3.2.11～表 3.3.2.12 に示す心臓や大脳で特に重要と思われる遺伝子の中では、特に変動のみられた遺伝子はなかった。

表 3.3.2.10 ラット肺で変動する可能性のある代表的な遺伝子の発現変化

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		1日曝露	7日曝露	1日曝露	7日曝露
NM_031055	matrix metalloproteinase 9	1.08	0.92	1.20	0.84
U65656	matrix metalloproteinase 2	1.07	0.88	1.00	0.76
NM_053819	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	1.31	1.26	1.04	1.29
NM_019205	chemokine (C-C motif) ligand 11	0.60	1.11	2.05	1.53
NM_031116	chemokine (C-C motif) ligand 5	1.16	1.07	1.30	1.20
NM_138880	interferon gamma	0.50	0.75	0.52	0.57
NM_012589	interleukin 6	0.83	1.05	0.85	1.30
NM_017329	surfactant, pulmonary-associated protein A1	0.89	0.80	1.02	0.95
NM_138842	surfactant associated protein B	0.85	0.72	0.71	0.81
BI295745	Surfactant associated protein C	0.82	0.84	1.19	0.99
NM_012878	surfactant associated protein D	0.62	0.44	0.66	0.61

表 3.3.2.11 ラット心臓で変動する可能性のある代表的な遺伝子の発現変化

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		1日曝露	7日曝露	1日曝露	7日曝露
NM_012589	interleukin 6	0.97	1.26	1.04	0.99
NM_012612	natriuretic peptide precursor type A	0.81	0.73	0.78	0.78
NM_031545	natriuretic peptide precursor type B	1.38	1.23	1.51	1.21
NM_030985	angiotensin II receptor, type 1 (AT1A)	0.86	1.02	0.86	0.84
AA926148	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	0.70	0.66	0.90	0.79
NM_012548	endothelin 1	1.20	1.17	1.57	1.36
NM_012550	endothelin receptor type A	0.85	0.83	1.15	1.05
NM_012922	caspase 3, apoptosis related cysteine protease	1.39	1.15	1.33	1.34

表 3.3.2.12 ラット大脳で変動する可能性のある代表的な遺伝子の発現変化

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		1日曝露	7日曝露	1日曝露	7日曝露
XM_227525	nerve growth factor, beta (mapped)	0.88	1.55	1.63	1.33
NM_012513	brain derived neurotrophic factor	0.66	0.82	0.79	0.84
NM_031073	neurotrophin 3	1.18	1.47	1.18	1.67
J05276	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	0.99	1.33	1.32	1.20
M64867	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	0.58	1.20	1.95	1.12
NM_031761	c-fos induced growth factor	1.26	0.69	1.12	0.95
NM_021835	Jun oncogene	1.48	1.31	0.89	1.13
AI059604	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	1.04	0.69	1.33	0.68
NM_012944	dopamine receptor D4	0.83	0.83	0.66	0.65

d) DNA マイクロアレイ解析まとめ

- 肺では、対照エンジン排気と比べて尿素 SCR エンジン排気での遺伝子発現変動が大きい

く、酸化ストレス関連の遺伝子の変動が認められた。

- 心臓では、対照エンジン排気の 7 日曝露での遺伝子発現変動が大きく、酸化ストレス関連をはじめ、代謝関連などの遺伝子発現変動が認められた。
- 大脳では、尿素 SCR エンジン排気と比べて対照エンジン排気で遺伝子発現変動が大きく、代謝に関連した遺伝子の変動が認められた。

遺伝子発現の変動傾向は、各臓器でリアルタイム PCR 解析と同様の傾向であり、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓および大脳に影響を与える可能性が示唆された。

5) 病理解析

(1) 呼吸器系の評価

a) 尿素 SCR エンジン排気

低、中、高濃度群の各試験群とも、清浄空気群と比較して、気管から細気管支、終末細気管支にかけての気道部の線毛細胞に線毛の短縮や脱落、あるいは非線毛細胞（杯細胞、クララ細胞）に杯細胞の増生や粘液産生の亢進、クララ細胞の膨隆などの変化を認めなかった。また、気道上皮下の線維化や炎症細胞浸潤も認めなかった。（**Fig. 3.3.2.40**、**Fig. 3.3.2.41**）。

肺胞部では肺胞構築は各試験群とも正常に保たれており、肺胞の過拡張や破壊など重篤な変化は認められなかった（**Fig. 3.3.2.40**、**Fig. 3.3.2.41**）。低濃度群、中濃度群では清浄空気群と同様に変化は認められなかった。一方、高濃度群では、II 型上皮細胞の増生を認める個体が増加し、また、肺胞腔内の肺胞マクロファージ（AM）⁷⁴の軽度な炭粉貪食を一部の個体に認めた（**Fig. 3.3.2.42**、**表 3.3.2.13**）。

⁷⁴ 肺胞マクロファージ[alveolar macrophage]：肺胞に存在するマクロファージ（大食細胞、Mφ）。II 型上皮細胞により産生された肺サーファクタントを分解・除去する。細胞内には蛋白質を分解する酵素があり、取り込んだ細菌やウイルスを消化し、無毒化する。多くは、最後には線毛エスカレーターで運ばれる。

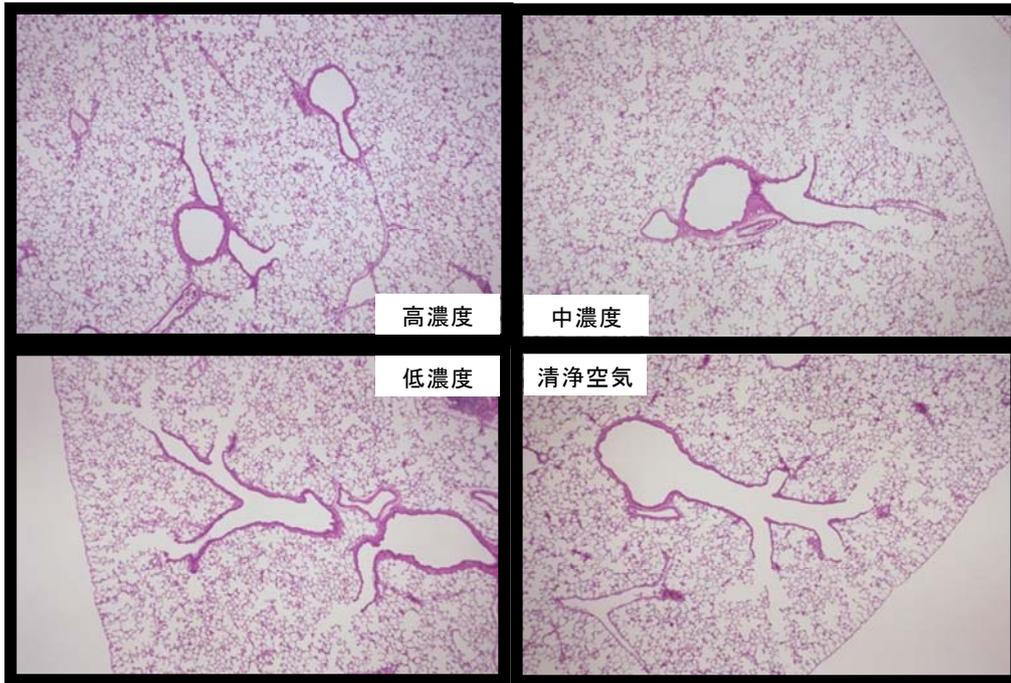


Fig. 3.3.2.40 ラット肺組織（尿素 SCR エンジン）（HE 染色、撮影倍率：10 倍）

各試験群とも肺胞構築に異常は認めない。

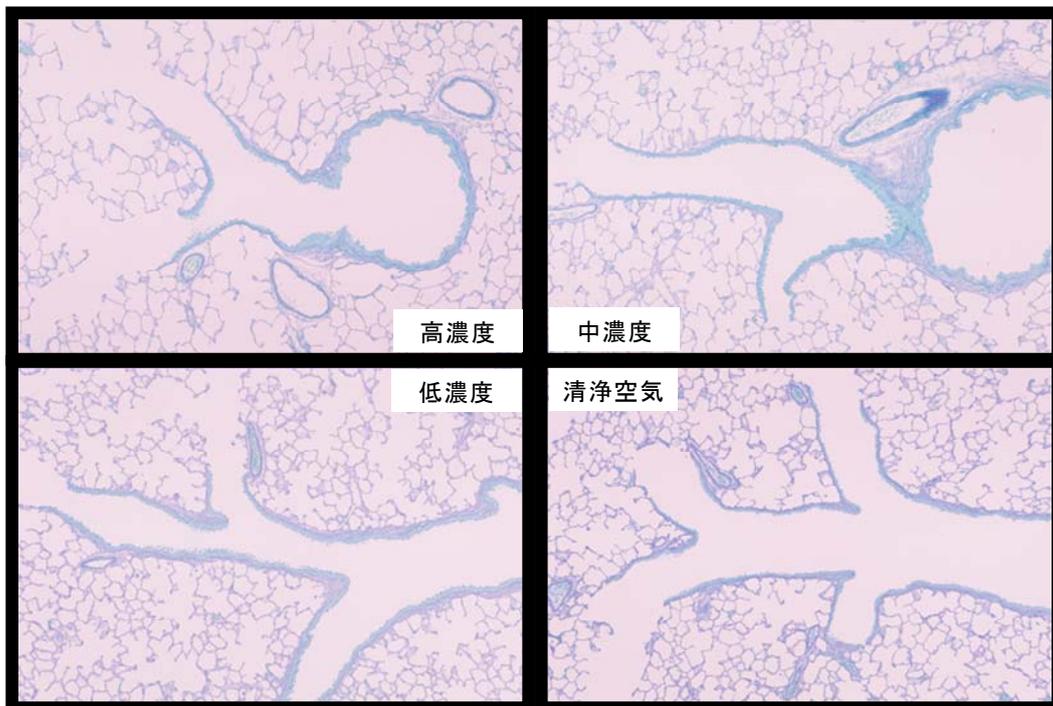


Fig. 3.3.2.41 ラット気道部（尿素 SCR エンジン）
（AB・PAS 染色、撮影倍率：25 倍）

各試験群とも気道の粘液産生に異常は認めない。

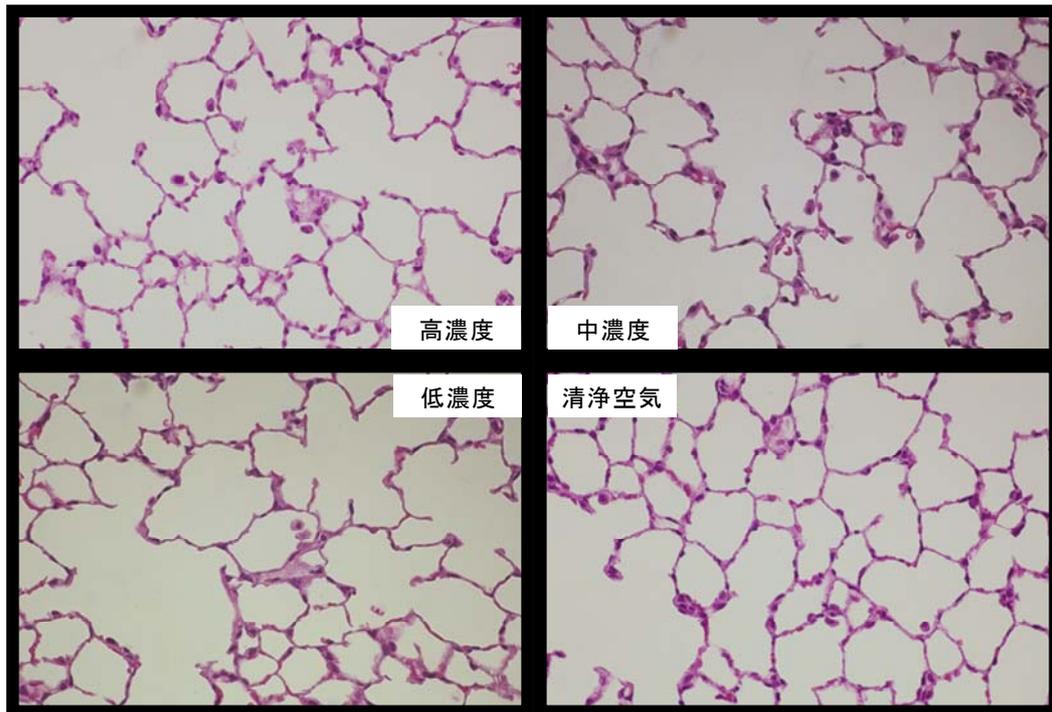


Fig. 3.3.2.42 ラット肺胞部（尿素 SCR エンジン）（HE 染色、撮影倍率：100 倍）

b) 対照エンジン排気

低、中、高濃度群の各試験群とも、清浄空気群と比較して、気管から細気管支、終末細気管支にかけての気道部の線毛細胞に線毛の短縮や脱落、あるいは非線毛細胞（杯細胞、クララ細胞）に杯細胞の増生や粘液産生の亢進、クララ細胞の膨隆などの変化や、気道上皮下の線維化や炎症細胞浸潤を認めなかった（**Fig. 3.3.2.43**、**Fig. 3.3.2.44**）。

肺胞部では、肺胞構築は各試験群とも正常に保たれており、肺胞の過拡張や破壊など重篤な変化は認められなかった（**Fig. 3.3.2.45**）。一方、中濃度以上の試験群では、II 型上皮細胞の増生や肺胞腔内へ粒子貪食のために浸潤した AM の粒子貪食や増生が認められ、低濃度群では肺胞部の変化は認められず、対照群と同様であった（**表 3.3.2.13**）。中濃度群では II 型上皮細胞の軽度な増生に加えて、肺胞腔内の AM の炭粉貪食が全個体に軽度に認められ、なかには中等度の貪食を示す個体もあった。高濃度群では、II 型上皮細胞の増生を軽度に認める個体が中濃度群と比較して増加し、AM の炭粉貪食に関しては、ディーゼルエンジン排気中の黒色粒子が AM の細胞内に明確にかつ多量に認められ、そのため AM のサイズが増大していた。また、一部の個体で AM の軽度な増生も認められた（**Fig. 3.3.2.45**）。

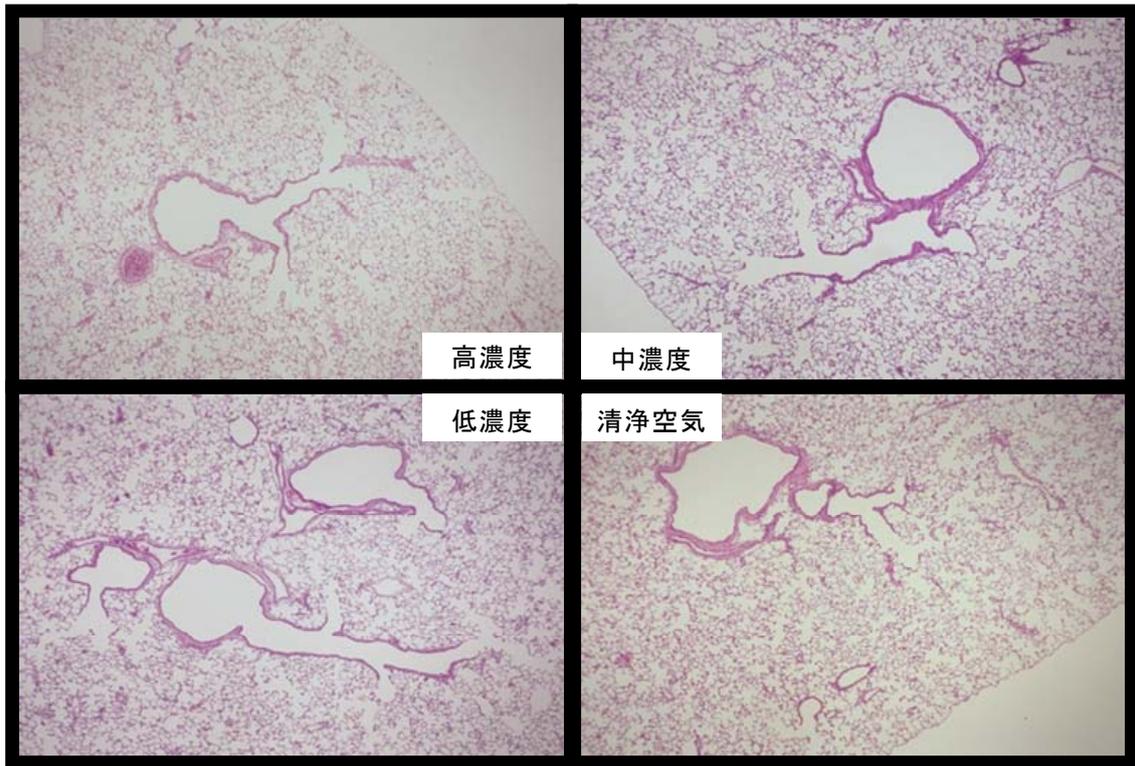


Fig. 3.3.2.43 ラット肺組織（対照エンジン）（HE 染色、撮影倍率：10 倍）

各試験群とも肺胞構築に異常は認めない。

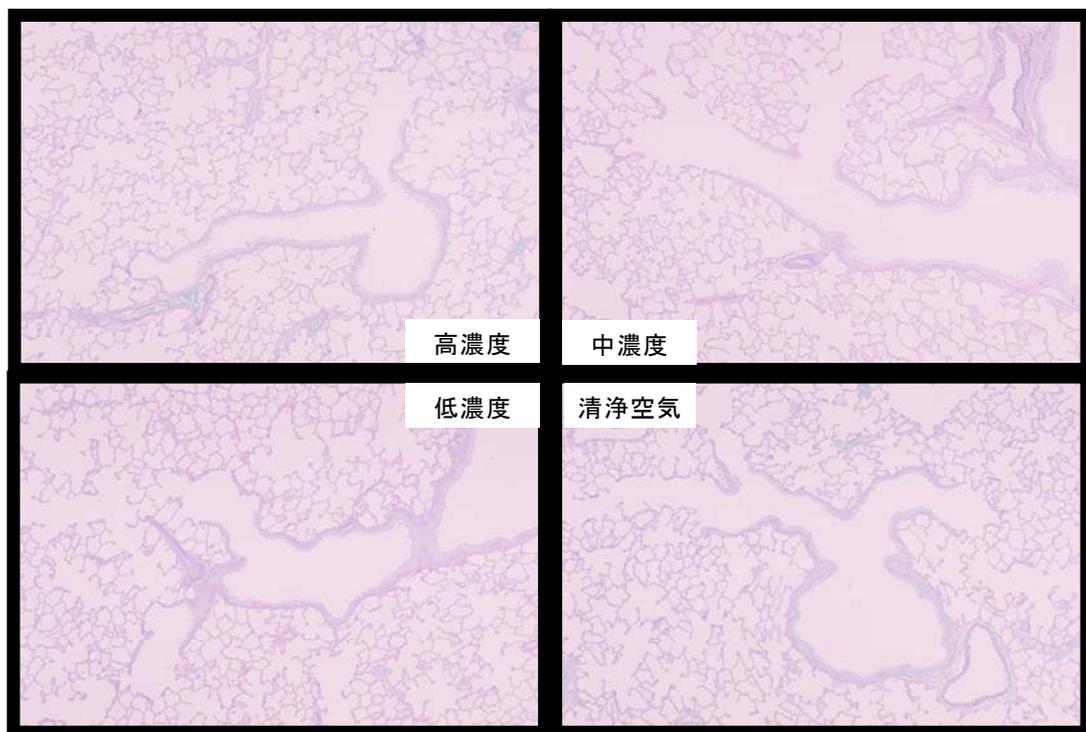


Fig. 3.3.2.44 ラット気道部（対照エンジン）（AB・PAS 染色、撮影倍率：25 倍）

各試験群とも気道の粘液産生に異常は認めない。

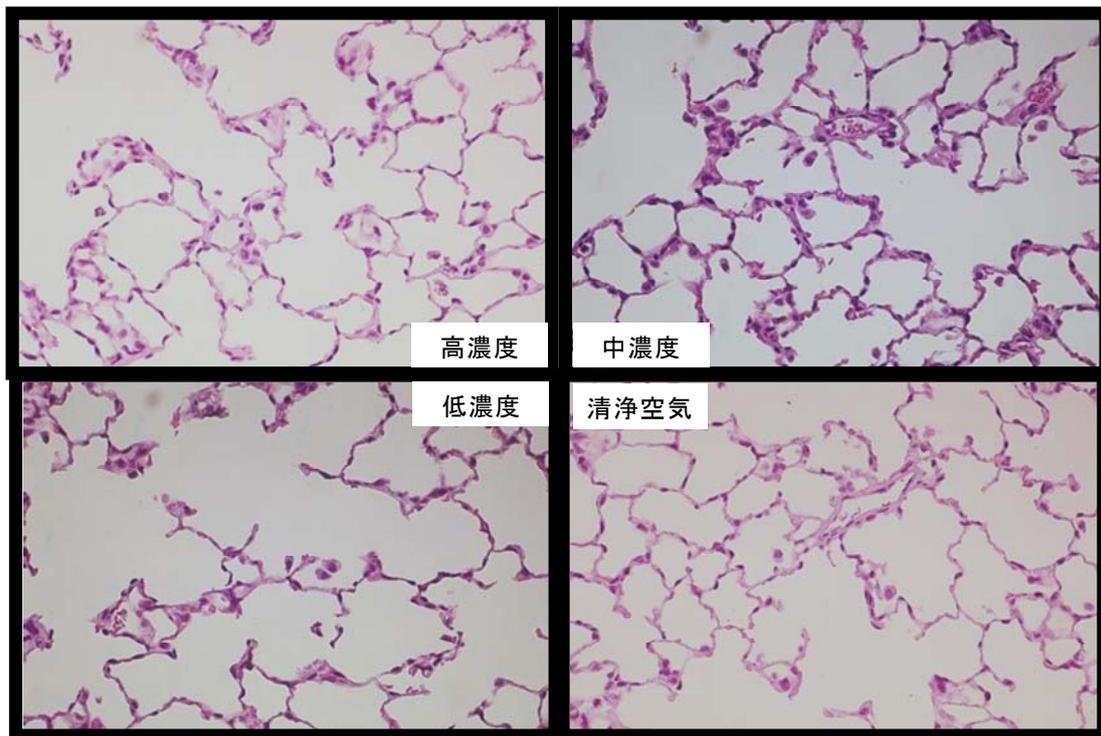


Fig. 3.3.2.45 ラット肺胞部（対照エンジン）（HE染色、撮影倍率：100倍）

表 3.3.2.13 ラット呼吸器の病理学的評価

	肺胞腔：肺胞マクロファージ		肺胞上皮：Ⅱ型上皮
	炭粉貪食	増生	増生
尿素SCRエンジン			
高濃度	—～＋ (5)～(1)	— (6)	—～＋ (3)～(3)
中濃度	— (6)	— (6)	— (6)
低濃度	— (6)	— (6)	— (6)
清浄空気	— (6)	— (6)	— (6)
対照エンジン			
高濃度	+++ (6)	—～＋ (5)～(1)	—～＋ (3)～(3)
中濃度	+～++ (5)～(1)	— (6)	—～＋ (5)～(1)
低濃度	— (6)	— (6)	— (6)
清浄空気	— (6)	— (6)	— (6)

高濃度群ではⅡ型上皮の増生や粒子貪食マクロファージが認められる。中濃度群は高濃度群より軽度であり、低濃度群は清浄空気群と同様である。

(2) 呼吸器系以外の臓器の評価

a) 尿素 SCR エンジン排気

清浄空気群を含む全ての試験群で、一部の個体に肝臓の胆管や小葉間周囲の炎症細胞浸潤 (Fig. 3.3.2.46)、腎臓の皮質に間質の線維化 (Fig. 3.3.2.47)、および心臓の右心室に炎症細胞浸潤が局所的あるいは散在性に軽度に認められた (Fig. 3.3.2.48、表 3.3.2.14)。

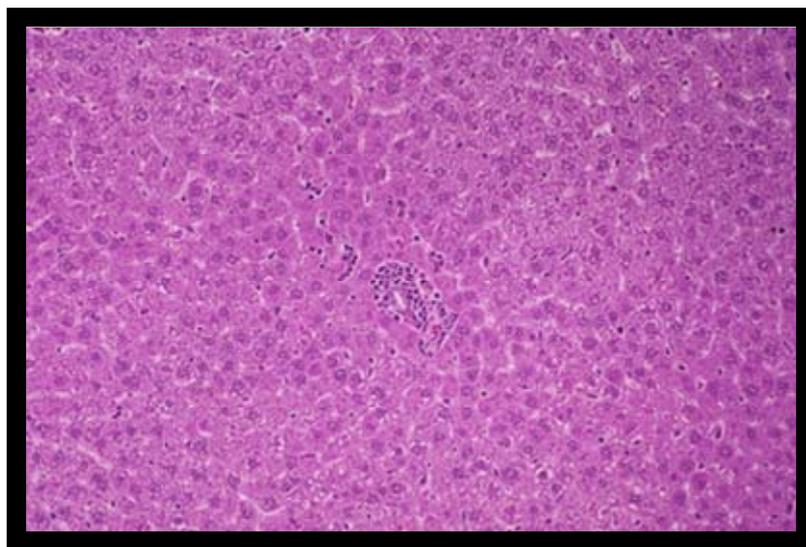


Fig. 3.3.2.46 ラット肝臓 (胆管周囲の炎症細胞浸潤、高濃度群)
(HE 染色、撮影倍率 : 50 倍)

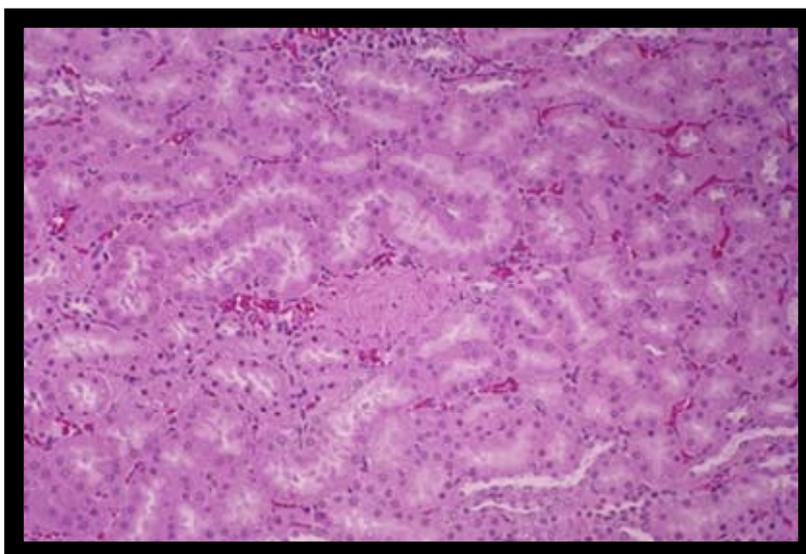


Fig. 3.3.2.47 ラット腎臓 (間質の線維化、清浄空気群)
(HE 染色、撮影倍率 : 50 倍)

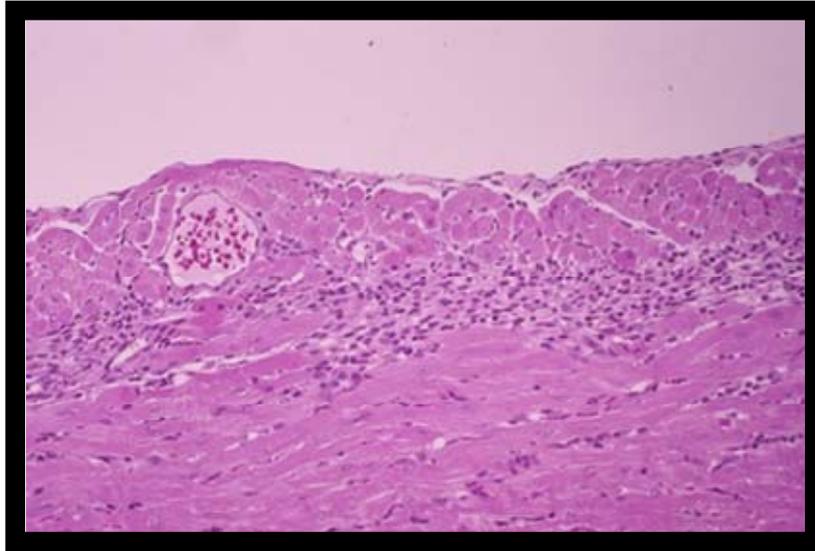


Fig. 3.3.2.48 ラット心臓（右心室の炎症細胞浸潤、高濃度群）
（HE 染色、撮影倍率：50 倍）

b) 対照エンジン排気

清浄空気群を含む全ての試験群で、尿素エンジン排気と同様に、一部の個体に肝臓の胆管や小葉間周囲の炎症細胞浸潤(**Fig. 3.3.2.49**)、腎臓の皮質に間質の線維化(**Fig. 3.3.2.50**)、および心臓の右心室に炎症細胞浸潤が局所的あるいは散在性に軽度に認められた (**Fig. 3.3.2.51**、表 3.3.2.14)。

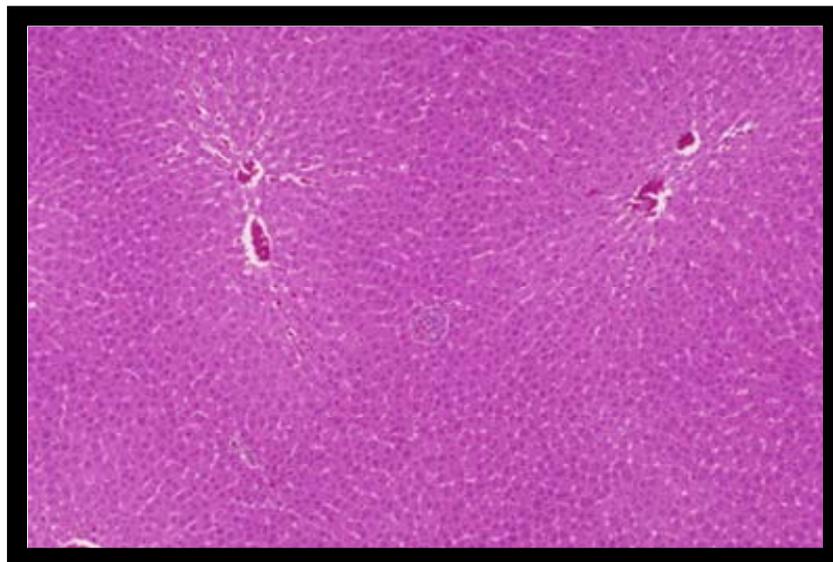


Fig. 3.3.2.49 ラット肝臓（胆管周囲の炎症細胞浸潤、清浄空気群）
（HE 染色、撮影倍率：25 倍）

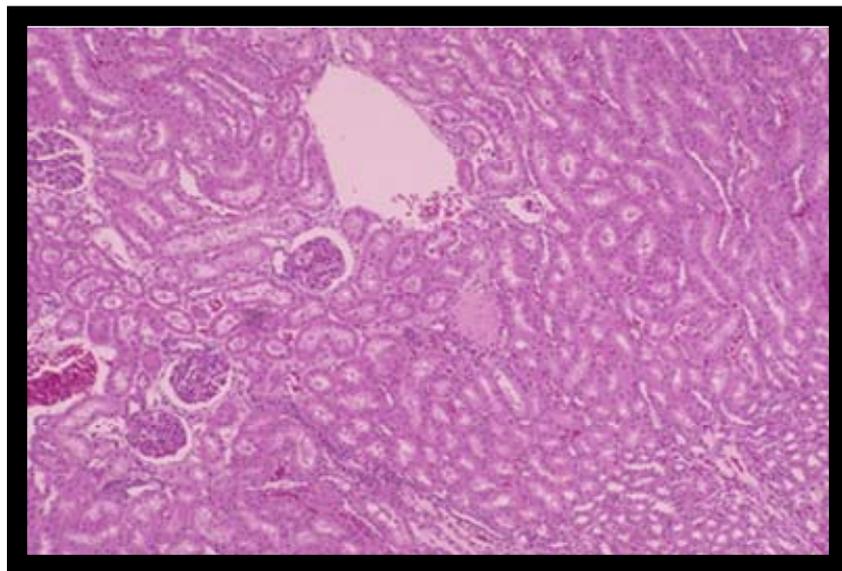


Fig. 3.3.2.50 ラット腎臓（間質の線維化、清浄空気群）
（HE 染色、撮影倍率：25 倍）

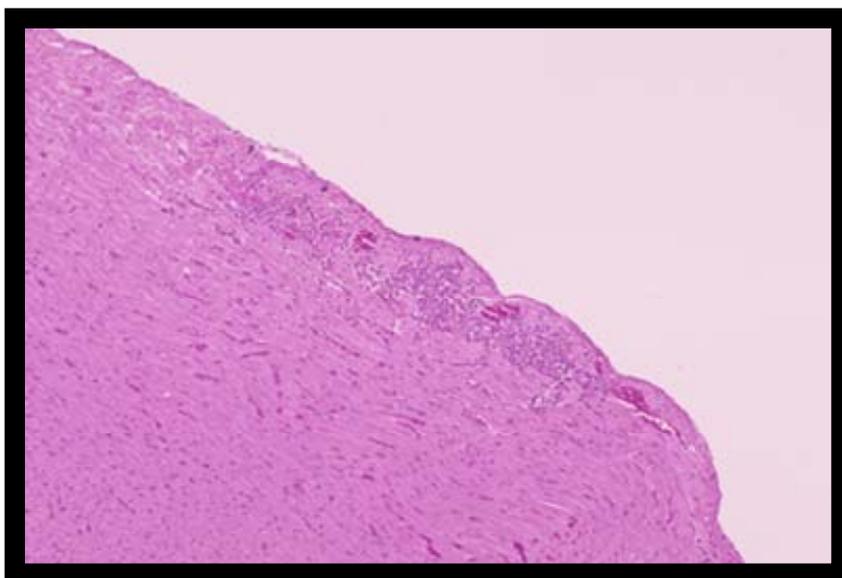


Fig. 3.3.2.51 ラット心臓（右心室の炎症細胞浸潤、低濃度群）
（HE 染色、撮影倍率：25 倍）

表 3.3.2.14 ラットの呼吸器以外の臓器の病理学的評価

	肝 臓	腎 臓	心 臓
	胆管周囲の細胞浸潤	間質の線維化	細胞浸潤
尿素SCRエンジン			
高濃度	0	0	1
中濃度	0	4	0
低濃度	0	2	0
清浄空気	2	2	0
対照エンジン			
高濃度	2	0	0
中濃度	0	4	0
低濃度	0	1	1
清浄空気	1	3	0

(3) 病理解析まとめ

- 清浄空気群を含む両エンジン排気の肺胞構築は正常に保たれており、また、気道部では粘液産生などの炎症性変化も認められなかった。
- 両エンジン排気による呼吸器の影響は、肺胞部での粒子貪食 AM や II 型上皮細胞の増生が認められた。尿素 SCR エンジン排気は、対照エンジン排気よりも影響が軽度であった。
- 両エンジン排気による呼吸器以外の臓器への病理学的影響は認められなかった。

尿素 SCR エンジン排気は、対照エンジン排気より呼吸器の病理学的影響が軽減されることが示唆された。

6) 小括

(1) 尿素 SCR エンジン排気

肺の病理学的影響は軽微であった。また、血液検査では酸化ストレスの影響も軽微であったが、応答機構が作用している可能性が示唆された。遺伝子解析では、リアルタイム PCR 解析により、特に肺で HO-1 や TNF α 遺伝子の発現量が増加したが、心臓や大脳では対照エンジン排気に比べて軽微な変化であった。また、DNA マイクロアレイ解析により、肺での酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が見られた。

(2) 対照エンジン排気

病理解析では、7日曝露で肺胞腔にマクロファージの炭粉貪食や肺胞 II 型上皮細胞の軽度な増生が用量依存性に増加した。臓器重量や BALF 中の好中球分画の増加は認められなかったが、リンパ球分画の軽微な増加傾向が認められた。血液検査では、酸化ストレスを示唆するような影響が見られた。遺伝子解析では、肺では 1日曝露で CYP1A1 遺伝子の発現量の増加が見られ、特に心臓と大脳で CYP1A1 や IL-1 β 、TNF α 遺伝子の発現量が増加し

た。

以上から、特に病理学的変化より、尿素 SCR エンジン排気は、対照エンジン排気よりも健康に対する影響が軽度であることが確認できた。また、遺伝子発現に強く影響の見られた臓器が両エンジン排気で異なったことから、両エンジン排気が生体に及ぼす影響に対する作用機序は、若干異なる可能性が示唆された。

3.3.2.3 ラット短期吸入曝露試験（エンジン排気比較系列）

1) 解剖時体重および臓器重量

エンジンシステム排気の比較データでは、生データと各エンジン排気試験での清浄空気群を1とした相対値を示した。なお、臓器重量については、同一希釈系列の結果と同様、ここでも絶対重量のみを示した。

(1) 体重、気管・肺重量、心臓および大脳重量

体重、気管・肺の重量は、成長に伴う増加が認められ、エンジン排気や曝露期間の違いによる影響は認められなかった（**Fig. 3.3.2.52**、**Fig. 3.3.2.53**）。

心臓重量では、エンジン排気や曝露期間の違いによる影響は認められなかった（**Fig. 3.3.2.54**）。

大脳重量では、尿素 SCR エンジン排気の3、7日曝露で、対照エンジン排気と比べて重量の増加を認めたが、相対値では影響がみられなかったため、エンジン排気による違いではなく解剖時の人為的影響によるものと推察された。（**Fig. 3.3.2.55**）。

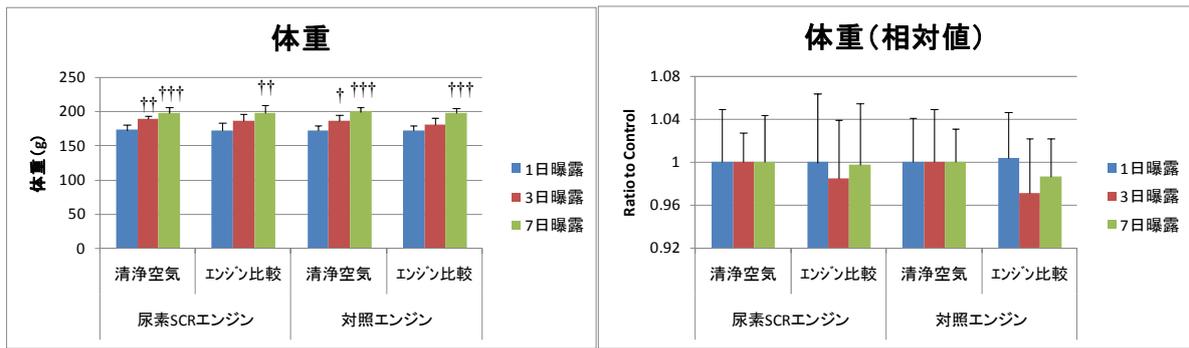


Fig. 3.3.2.52 解剖時のラット体重 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露)

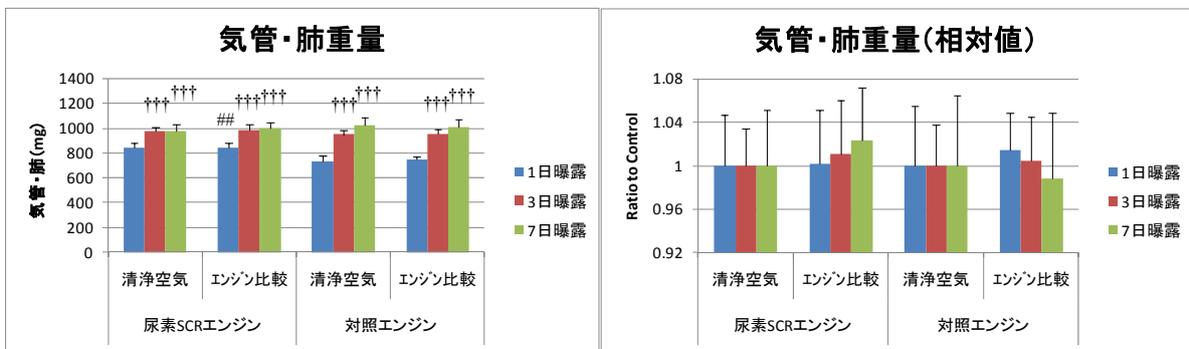


Fig. 3.3.2.53 ラット気管・肺重量 (n = 6)

(†††: P<0.001 vs. 1 日曝露, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

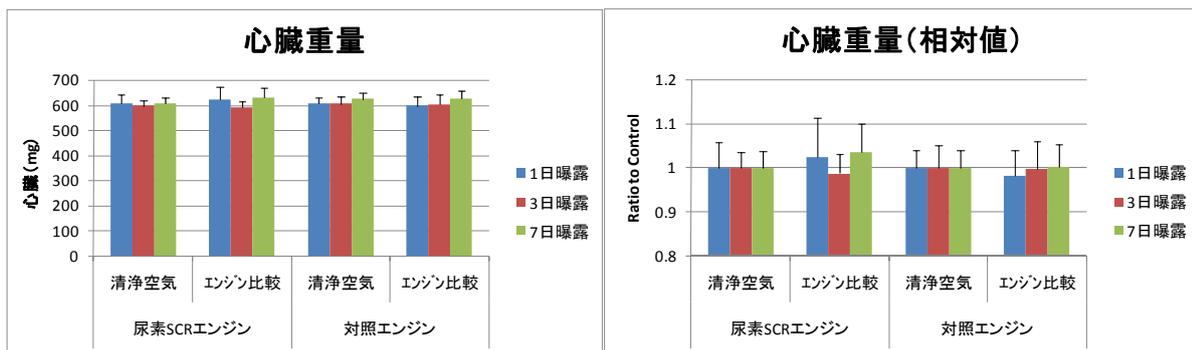


Fig. 3.3.2.54 ラット心臓重量 (n = 6)

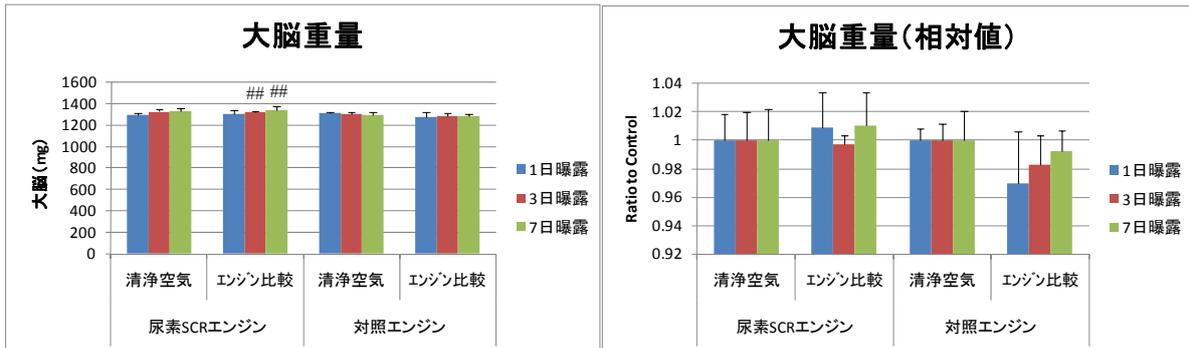


Fig. 3.3.2.55 ラット大脳重量 (n = 6)

(##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

(2) 肝臓重量

肝臓重量では、同一希釈系列 (Fig. 3.3.2.8) とは異なり、曝露による影響は見られなかった。対照エンジン排気では、3日曝露と比べて7日曝露で重量が有意に増加しているが、相対値では有意差が認められなかった。このことから、この影響は成長に伴う重量増加であり、曝露やエンジン排気の影響ではないと推察された (Fig. 3.3.2.56)。

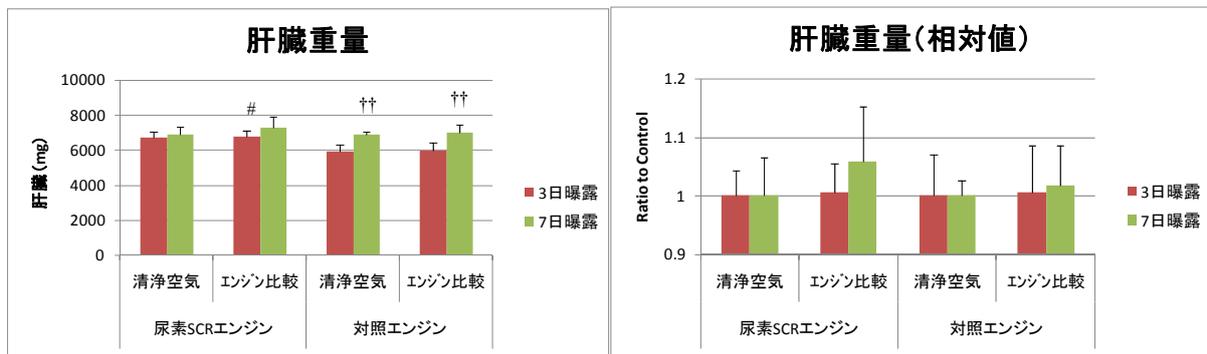


Fig. 3.3.2.56 ラット肝臓重量 (n = 6)

(††: P<0.01 vs. 1日曝露, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

(3) 小脳、腎臓、副腎、胸腺、脾臓および精巣重量

小脳重量では、尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で対照エンジン排気よりも重量が減少した。しかし、相対値では有意差が認められなかったことから、曝露やエンジン排気による影響ではないと推察された (Fig. 3.3.2.57)。

腎臓重量では、尿素 SCR エンジン排気の3日曝露で対照エンジンよりも重量が増加したが、相対値では有意差が認められなかったことから、曝露やエンジン排気による影響ではないと推察された (Fig. 3.3.2.58)。

副腎重量および脾臓重量では、曝露やエンジン排気による影響は認められなかった (Fig.

3.3.2.59、Fig. 3.3.2.60)。

胸腺重量では、重量に有意差は認められなかった。相対値では尿素 SCR エンジン排気の3日曝露で対照エンジン排気よりも有意に増加したが、これは対照エンジン排気の3日曝露で重量が減少傾向であったため、清浄空気群との相対値換算によりその差が明確になったことによると判断された (Fig. 3.3.2.61)。

精巣重量では、成長に伴う増加傾向が見られ、曝露やエンジン排気による影響は認められなかった (Fig. 3.3.2.62)。

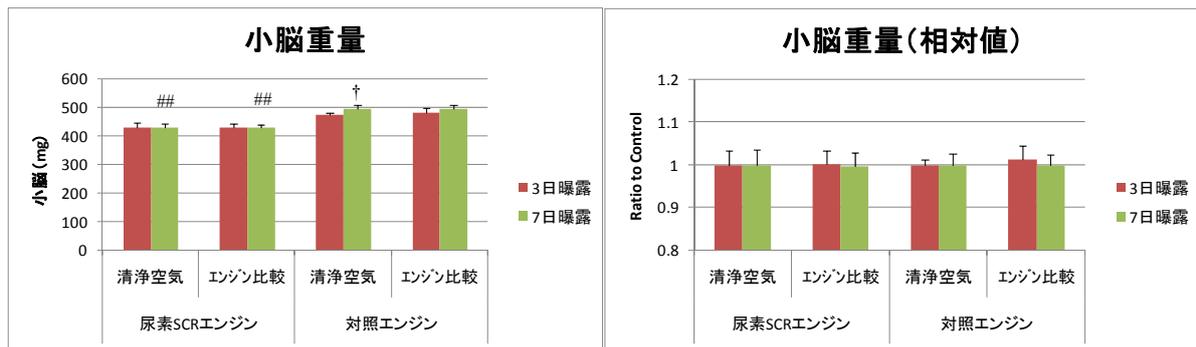


Fig. 3.3.2.57 ラット小脳重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

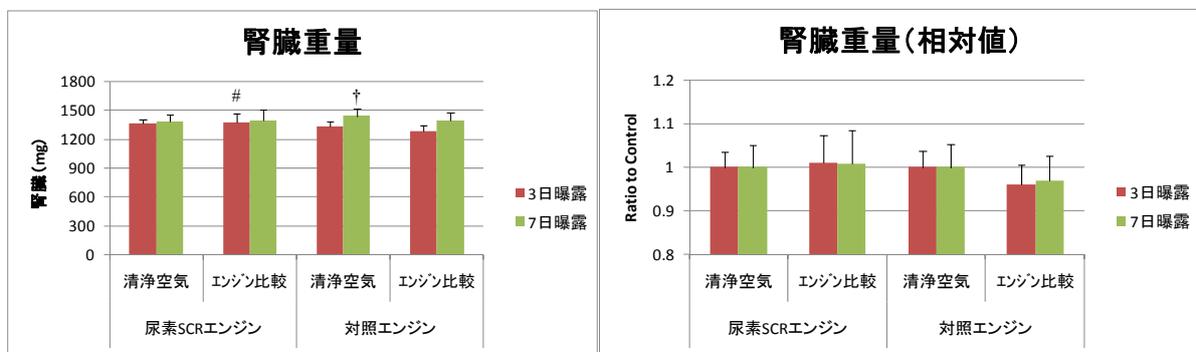


Fig. 3.3.2.58 ラット腎臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

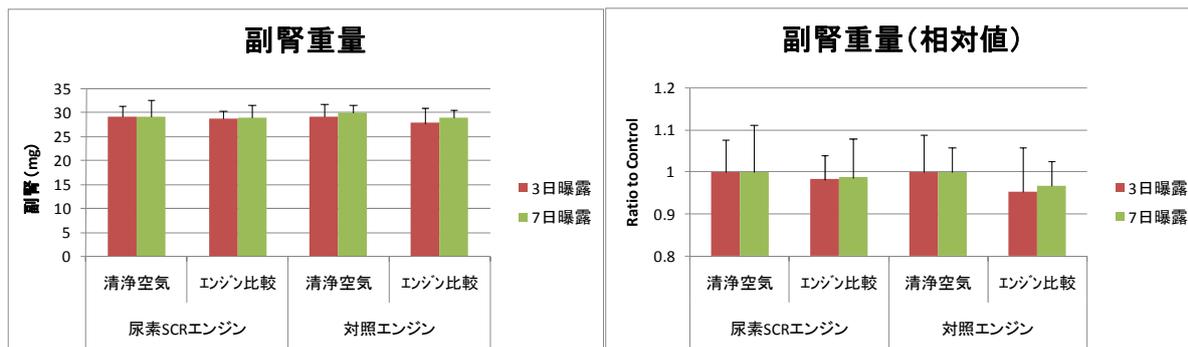


Fig. 3.3.2.59 ラット副腎重量 (n = 6)

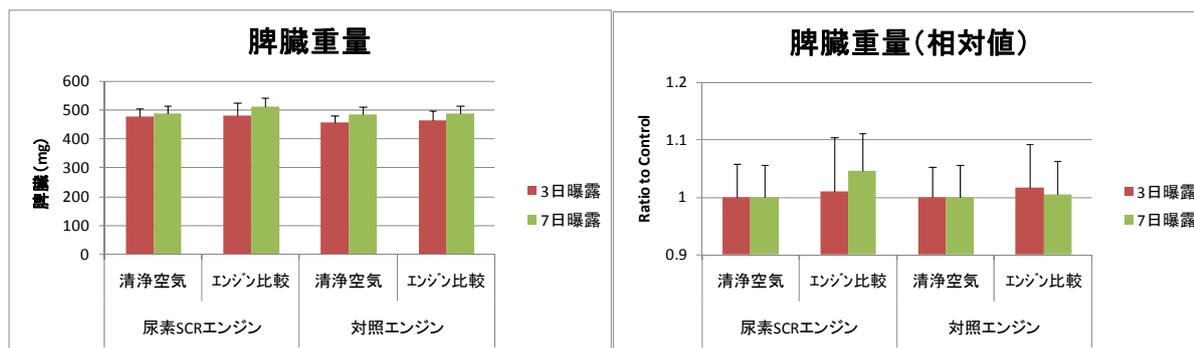


Fig. 3.3.2.60 ラット脾臓重量 (n = 6)

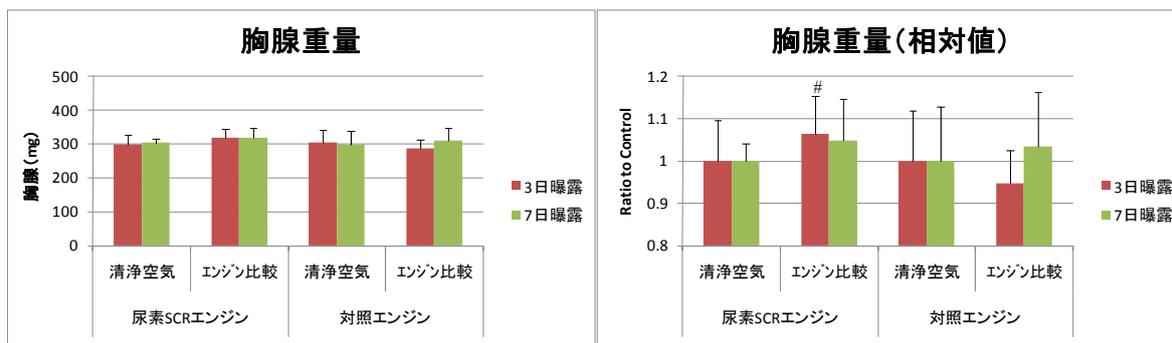


Fig. 3.3.2.61 ラット胸腺重量 (n = 6)

(#: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

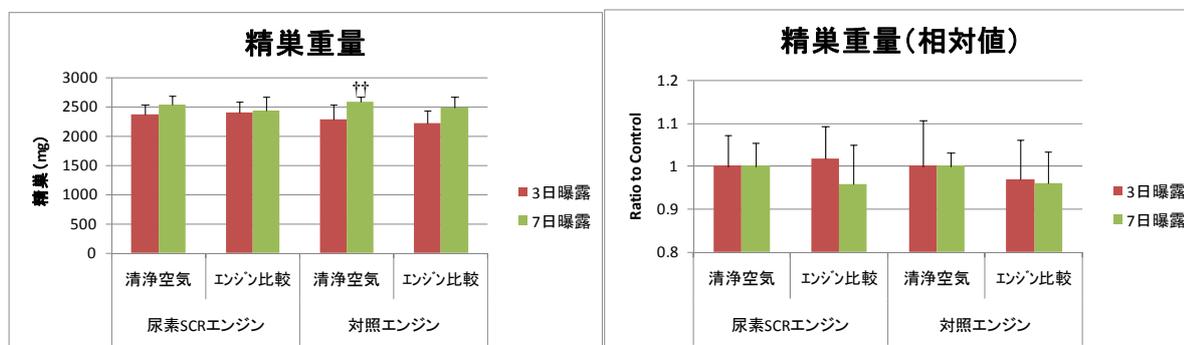


Fig. 3.3.2.62 ラット精巣重量 (n = 6)

(††: P<0.01 vs. 3日曝露)

(4) 解剖時体重および臓器重量のまとめ

- 体重、気管・肺、肝臓、精巣など一部の臓器において成長に伴う重量増加や、一部の臓器において差が認められたが、曝露やエンジン排気による影響とは考えがたく、両エンジン排気とも臓器重量への特異的変化は認めなかった。
- これらは、同一希釈系列で示した体重および臓器重量の結果よりも軽微な変化であった。

2) BALF 中炎症細胞数

BALF の回収率は、前述の表 3.3.2.2 に示したとおりである。

(1) BALF 中総細胞数

Fig. 3.3.2.63 に各試験群の BALF 中の総細胞数を示す。尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で BALF 総細胞数に減少が認められた。相対値では、計測細胞数と同様に尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で有意に減少し、7 日曝露との差が明確になった。

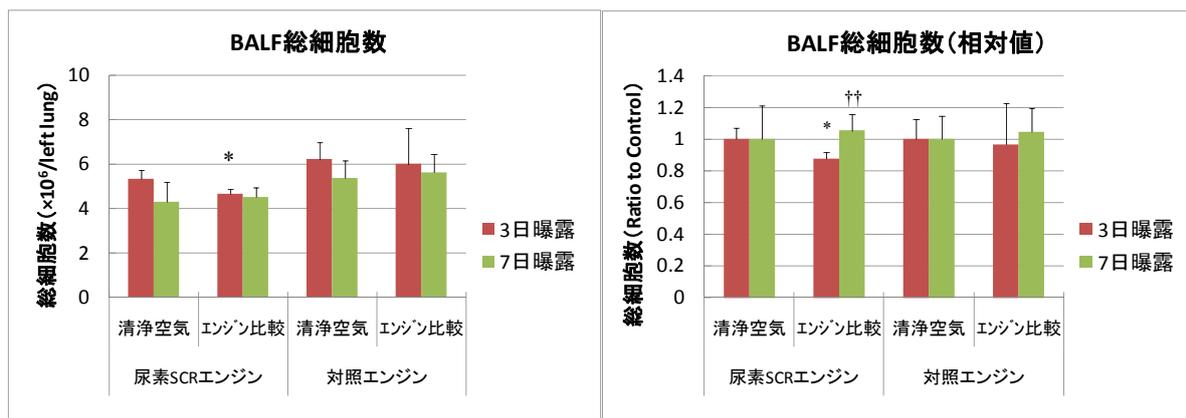


Fig. 3.3.2.63 ラット BALF 中総細胞数 (n = 5~6)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

(2) BALF 中細胞分画

細胞分画の結果は Fig. 3.3.2.16 で示したとおりである。

各細胞分画の変化を Fig. 3.3.2.64~Fig. 3.3.2.67 に示した。

Mφ 分画は、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で清浄空気群よりも有意に減少した。

好中球分画および好酸球分画は、どの試験群でも出現率がわずかであり、曝露やエンジン排気による影響はほとんど認められなかった。なお、好中球分画の相対値のグラフでは、3 日曝露の清浄空気群が 0%であったため、7 日曝露データのみを記載している。

リンパ球分画は、曝露やエンジン排気による影響が認められなかった。

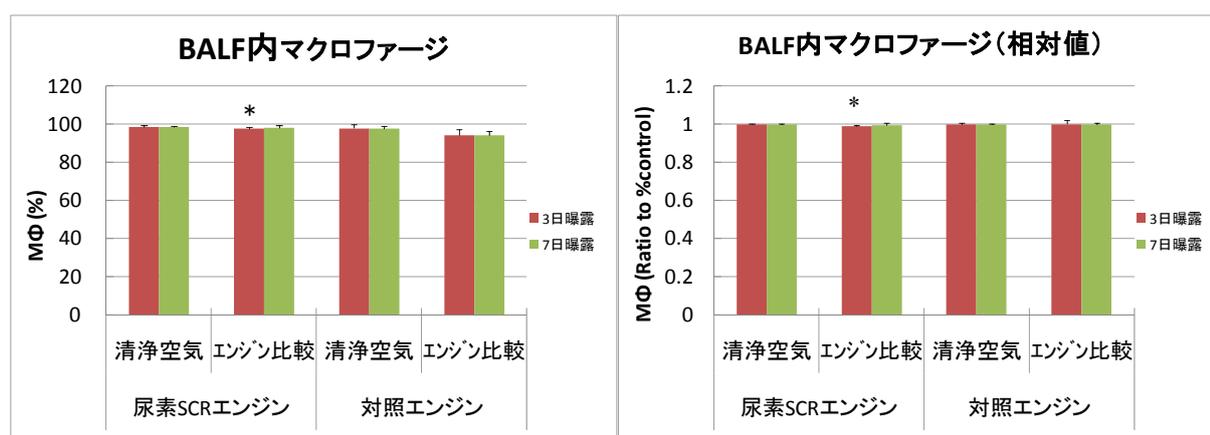


Fig. 3.3.2.64 BALF の Mφ 分画 (%) (n = 5~6)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群)

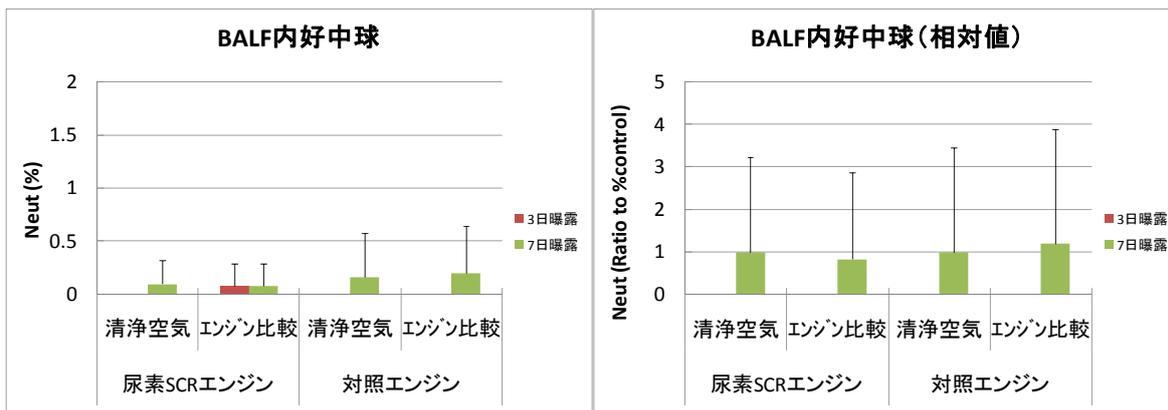


Fig. 3.3.2.65 BALF の好中球分画 (%) (n = 5~6)

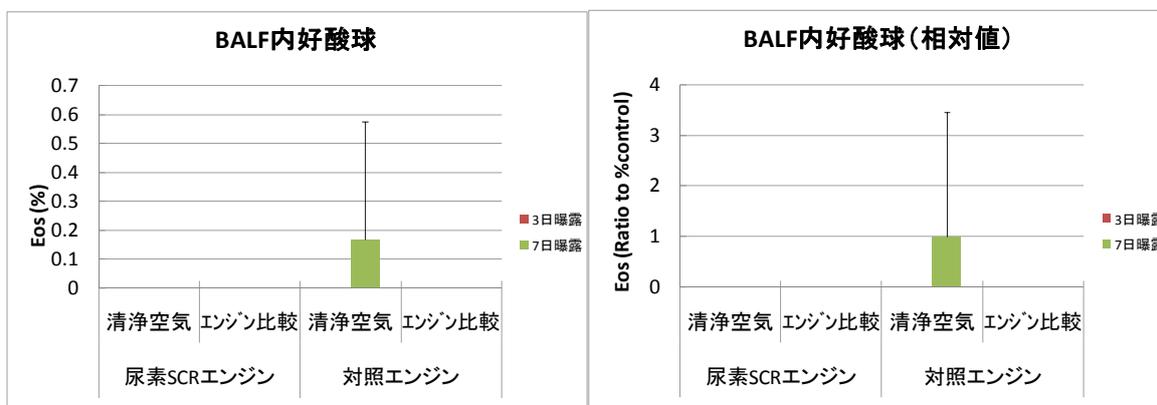


Fig. 3.3.2.66 BALF の好酸球分画 (%) (n = 5~6)

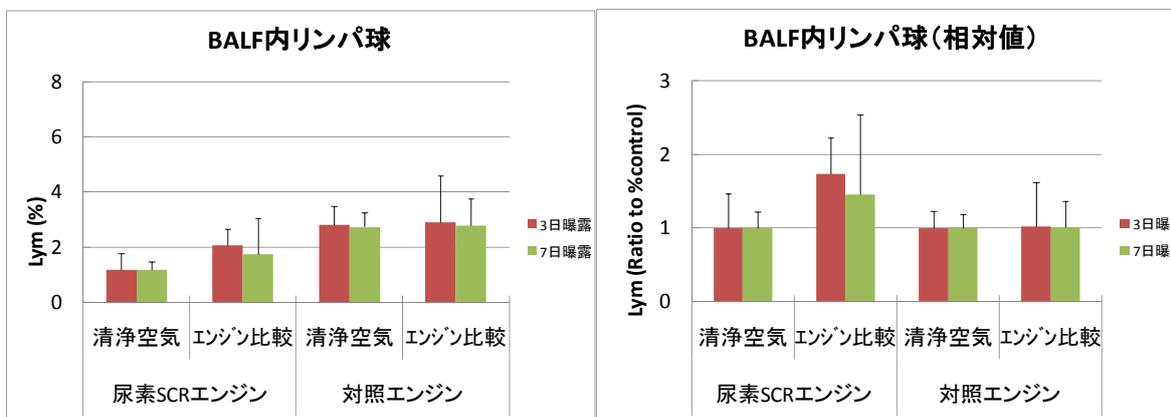


Fig. 3.3.2.67 BALF のリンパ球分画 (%) (n = 5~6)

(3) BALF 中炎症細胞数のまとめ

- 総細胞数は、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で減少が認められた。
- 尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で Mφ 分画は有意に減少したが、軽微な変化であったことから、曝露やエンジン排気による影響とはいえない。
- BALF 中の好中球分画、好酸球分画およびリンパ球分画では、影響はみられなかった。

3) 血液検査

(1) 血液生化学検査

結果の一覧を表 3.3.2.15 に示す。

K は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で、1 日曝露に比べて上昇傾向が認められた (Fig. 3.3.2.68)。

BUN は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で対照エンジン排気に比べて有意に上昇した (Fig. 3.3.2.69)。また、1 日曝露で清浄空気群と比べて有意に減少した。対照エンジン排気では特に影響は認められなかった。

エンジン排気中の尿素濃度は、尿素 SCR エンジン排気のエンジン比較群で $0.52 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、清浄空気群で $0.47 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、対照エンジン排気のエンジン比較群で $0.55 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、清浄空気群で $0.49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であったことから、同一希釈系列の結果と同様に、BUN の変化はエンジン排気中の尿素濃度に依存したものではないと考えられる。

Glu では、両エンジン排気の清浄空気群で曝露期間依存性に上昇が認められた (Fig. 3.3.2.70)。また、対照エンジン排気のエンジン比較群でも同様の傾向が認められた。

表 3.3.2.15 iSTAT によるラット血液生化学検査

1日曝露	尿素SCRエンジン				対照エンジン			
	n	清浄空気	n	エンジン比較	n	清浄空気	n	エンジン比較
pH	6	7.342	6	7.360	6	7.385	6	7.360
pCO ₂ (mmHg)	6	53.38	6	52.52	6	48.82	6	51.50
pO ₂ (mmHg)	6	14.3	6	12.3	6	15.0	6	11.0
BEecf (mmol/L)	6	3.0	6	4.2 *	6	4.0	6	3.7
HCO ₃ (mmol/L)	6	28.85	6	29.58 *	6	29.10	6	29.05
TCO ₂ (mmol/L)	6	30.7	6	31.2	6	30.5	6	30.7
sO ₂ (%)	6	16.7	6	13.5	6	19.3	6	10.8
Hct (%PCV)	6	41.7	6	41.3	6	42.0	6	41.8
Hb (g/dL)	6	14.2	6	14.1	6	14.3	6	14.2
Na (mmol/L)	6	140.2	6	140.3 ##	6	138.2	6	137.7
K (mmol/L)	6	3.4	6	3.4 ##	6	3.8	6	3.9
Cl (mmol/L)	6	103.3	6	102.5	5	103.2	6	103.0
iCa (mmol/L)	6	1.388	6	1.388	6	1.383	6	1.398
BUN (mg/dL)	6	13.3	6	11.2 *	5	11.8	6	11.0
Glu (mg/dL)	6	154.8	6	171.3	5	158.4	6	169.0
3日曝露	n	清浄空気	n	エンジン比較	n	清浄空気	n	エンジン比較
pH	4	7.391 †††	1	7.413	3	7.380	4	7.384
pCO ₂ (mmHg)	4	50.9	1	51.10	3	48.5	4	48.63
pO ₂ (mmHg)	4	14.5	1	15.0	3	15.0	4	19.0 †
BEecf (mmol/L)	4	6.0 ††	1	8.0 ††	3	3.7	4	4.0
HCO ₃ (mmol/L)	4	30.9 †	1	32.60 †	3	28.7	4	29.03
TCO ₂ (mmol/L)	4	32.5 †	1	34.0 †	3	30.0	4	30.5
sO ₂ (%)	4	19.5	1	19.0	3	19.7	4	28.8 †
Hct (%PCV)	6	43.3	5	43.4	4	45.3 †††	5	45.0 †
Hb (g/dL)	6	14.7333	5	14.8	4	15.4 †††	5	15.3 †
Na (mmol/L)	6	138.7 †	5	138.4 †	4	141.3 †††	5	139.8 *
K (mmol/L)	6	4.07 †††	5	4.08 †††	4	4.05	5	4.10
Cl (mmol/L)	6	101.8 †	5	102.4	4	102.8	5	103.2
iCa (mmol/L)	4	1.41	1	1.40	3	1.40	4	1.41
BUN (mg/dL)	6	13.7	5	14.0 ††.#	4	12.3	5	12.4
Glu (mg/dL)	6	180.8 ††	5	186.6 #	4	167.0	5	181.2 *
7日曝露	n	清浄空気	n	エンジン比較	n	清浄空気	n	エンジン比較
pH	6	7.398 †††	6	7.393	3	7.320	3	7.390
pCO ₂ (mmHg)	6	49.9 †	6	52.15 #	3	62.4 †	3	48.90
pO ₂ (mmHg)	6	17.7	6	14.7	2	12.0	3	13.3
BEecf (mmol/L)	6	5.8 ††	6	6.8 †††	3	5.7	3	4.7
HCO ₃ (mmol/L)	6	30.7 ††	6	31.73 ††	3	31.9 ††	3	29.67
TCO ₂ (mmol/L)	6	32.2 †	6	33.3 ††	3	33.7 ††	3	31.0
sO ₂ (%)	6	26.2	6	18.2	2	13.5	3	16.3
Hct (%PCV)	6	44.2 ††	5	43.4	4	44.5 ††	6	44.8 †
Hb (g/dL)	6	15 ††	5	14.8	4	15.125 ††	6	15.3
Na (mmol/L)	6	139.8	5	138.4	4	140.0 †	6	139.7
K (mmol/L)	6	3.95 †††	5	4.18 †††	4	4.08	6	3.88
Cl (mmol/L)	6	102.7	5	102.4	4	101.8	6	101.8 †
iCa (mmol/L)	6	1.35 †	6	1.37	3	1.40	3	1.38
BUN (mg/dL)	6	13.2	5	15.2 †††.#	4	12.8	6	12.8 †
Glu (mg/dL)	6	189.2 ††	5	184.4 #	4	185.0 ††	6	188.2 †

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01, ###: P<0.001 vs. 対照エンジン排気

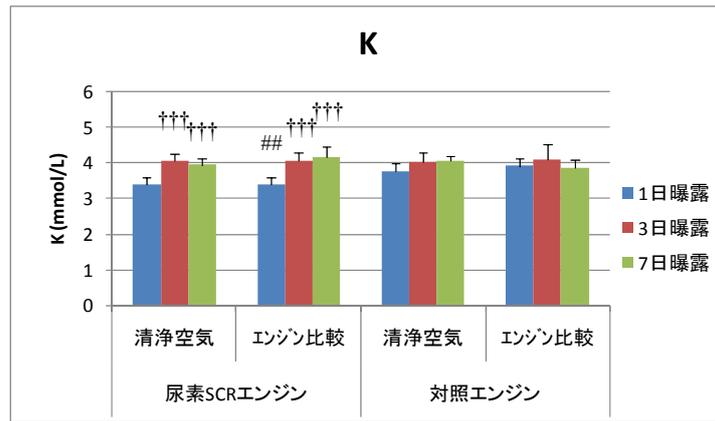


Fig. 3.3.2.68 ラット血液 K (n = 4~6)

(†††: P<0.001 vs. 1 日曝露, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

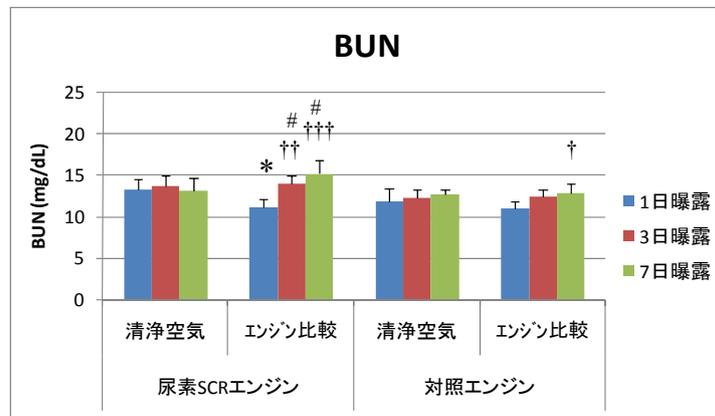


Fig. 3.3.2.69 ラット血液 BUN (n = 4~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露, #: P<0.05 vs. 対照エン

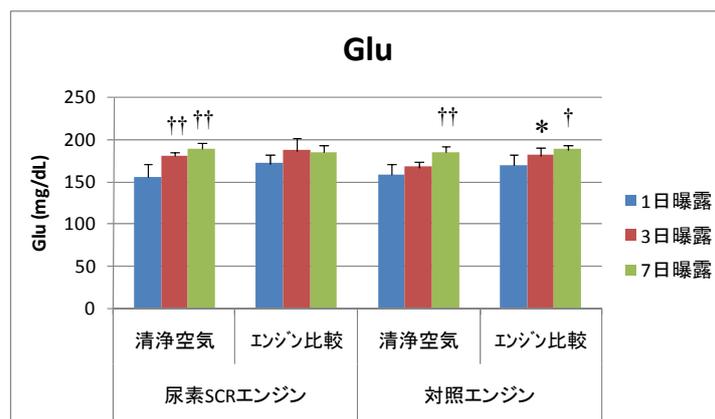


Fig. 3.3.2.70 ラット血液 Glu (n = 4~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

(2) 酸化ストレス能検査

酸化ストレス損傷マーカーである 8-OHdG と抗酸化能を示す PAO を **Fig. 3.3.2.71** に、さらに曝露期間ごとにまとめ直したものを **Fig. 3.3.2.71-2** に示した。

8-OHdG は、両エンジン排気とも清浄空気群よりも低値を示しているため、酸化ストレスによる影響を受けていないことが示唆された。また、PAO は対照エンジン排気の 7 日曝露で有意に減少したが、酸化ストレス応答を示唆するまでには至らなかった。

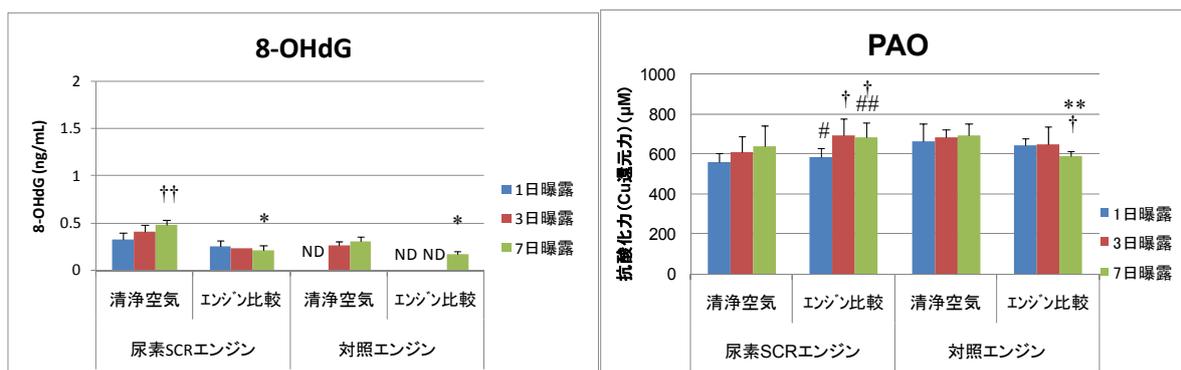


Fig. 3.3.2.71 酸化ストレス応答 (n = 2~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

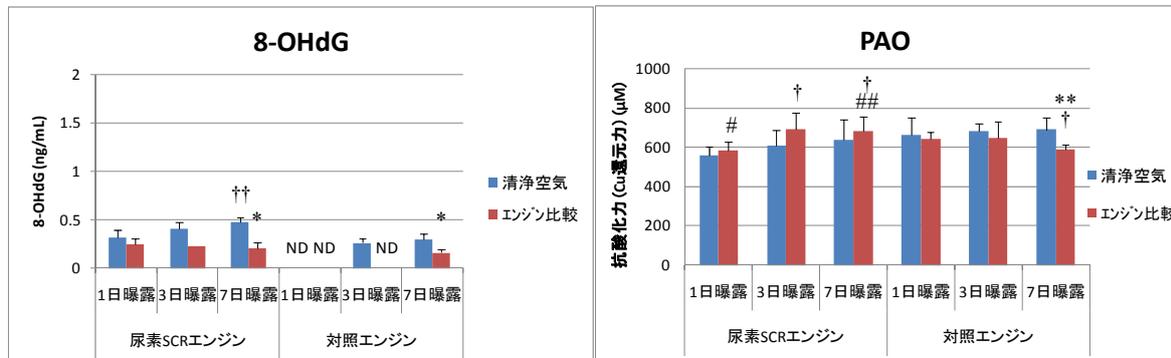


Fig. 3.3.2.71-2 酸化ストレス応答 (曝露期間ごと) (**Fig. 3.3.2.71** を改変) (n = 2~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

(3) 血液検査のまとめ

- 生化学検査では、尿素 SCR エンジン排気で BUN が上昇した。
- 酸化ストレスへの影響では、活性酸素による損傷が認められないことが推測された。なお、この反応は同一希釈系列の結果よりも軽微であった。

4) 遺伝子解析

(1) リアルタイム PCR 解析

a) 肺の遺伝子発現量

肺の遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.72 に示した。なお、Fig. 3.3.2.72-2 は、Fig. 3.3.2.72 を曝露期間でまとめ直した。

CYP1A1 遺伝子は、両エンジン排気とも発現量に影響はみられなかった。

HO-1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露により発現量が増加したが、これは対照エンジン排気と比べても増加していた。

IL-1β 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で対照エンジン排気よりも発現量が増加した。

TNFα 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で、対照エンジン排気の 1 日曝露で、それぞれ清浄空気群よりも発現量が増加した。

肺における遺伝子発現量は、CYP1A1 遺伝子を除いて、尿素 SCR エンジン排気で発現量が増加する傾向が認められた。

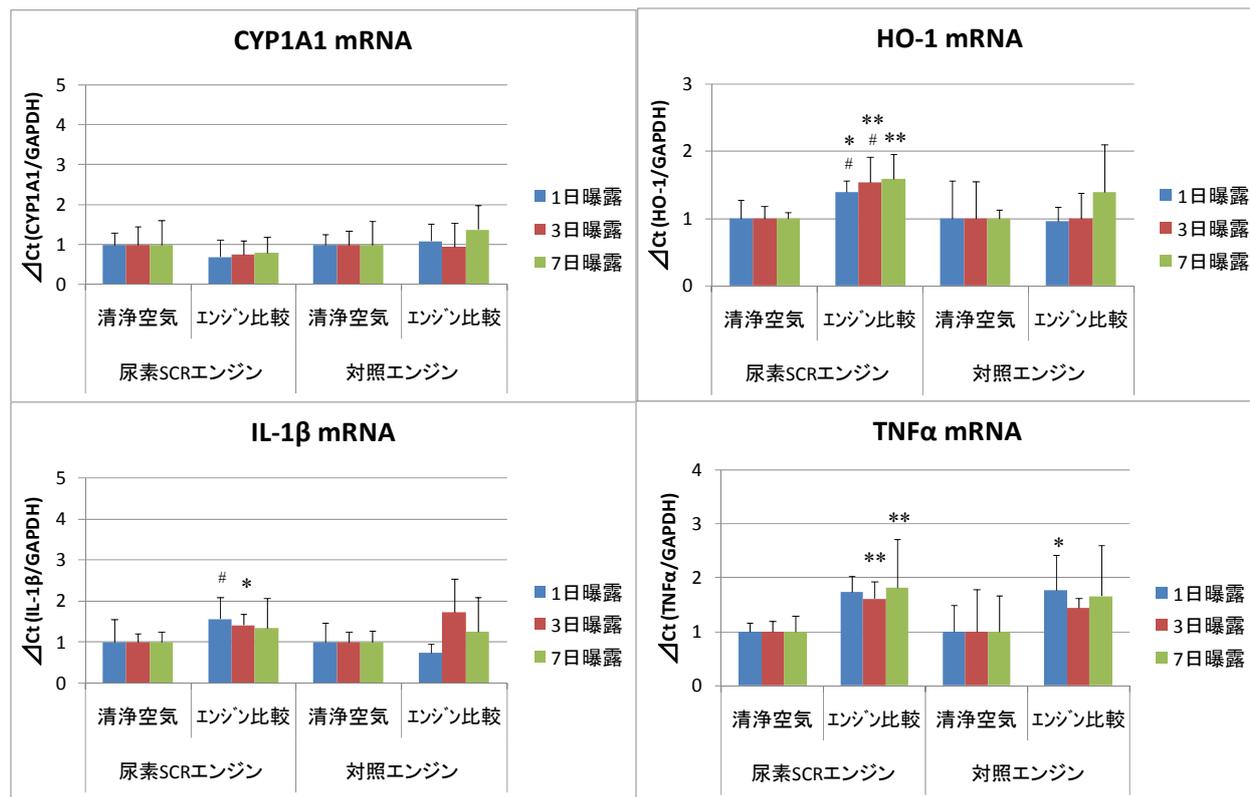


Fig. 3.3.2.72 肺の遺伝子発現量 (n = 6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

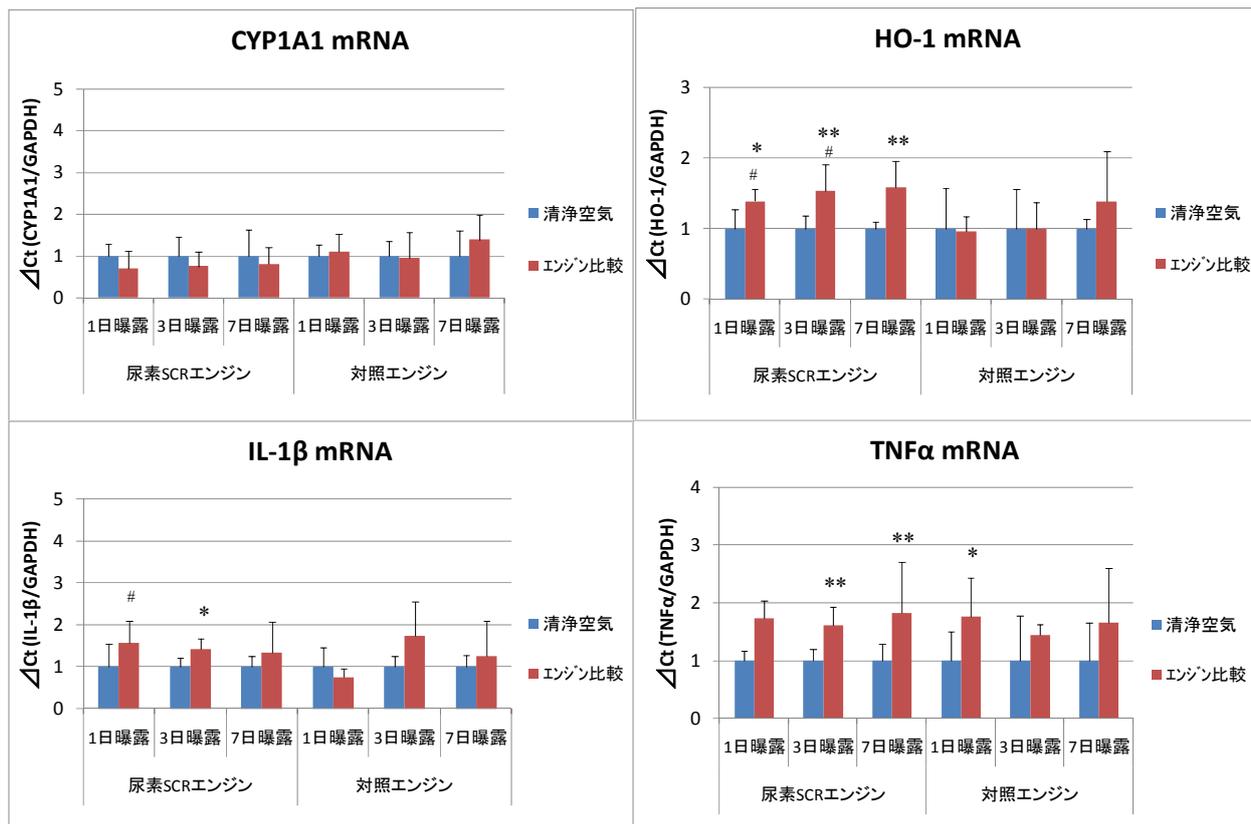


Fig. 3.3.2.72-2 肺の遺伝子発現量（曝露期間ごと）（Fig. 3.3.2.72 を改変）（n = 6）

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

b) 心臓の遺伝子発現量

心臓の遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.73 に示した。なお、Fig. 3.3.2.73-2 は、Fig. 3.3.2.73 を曝露期間でまとめ直した。

CYP1A1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で、対照エンジン排気に比べて発現量が低下した。対照エンジン排気の 1 日曝露では、清浄空気群よりも発現量が増加した。

HO-1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で発現量が減少した。対照エンジン排気の 7 日曝露で発現量が増加した。

IL-1 β 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で清浄空気群および対照エンジン排気のエンジン比較群と比べて発現量が増加した。

TNF α 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気では発現量への影響が認められなかったが、対照エンジン排気の 3、7 日曝露で発現量の増加傾向が認められた。

心臓における遺伝子発現量は、尿素 SCR エンジン排気は IL-1 β 遺伝子が 1 日曝露で有意に増加したものの、特に影響はほとんど認められなかった。しかし、対照エンジン排気では、曝露後半で発現量の増加傾向が認められた。

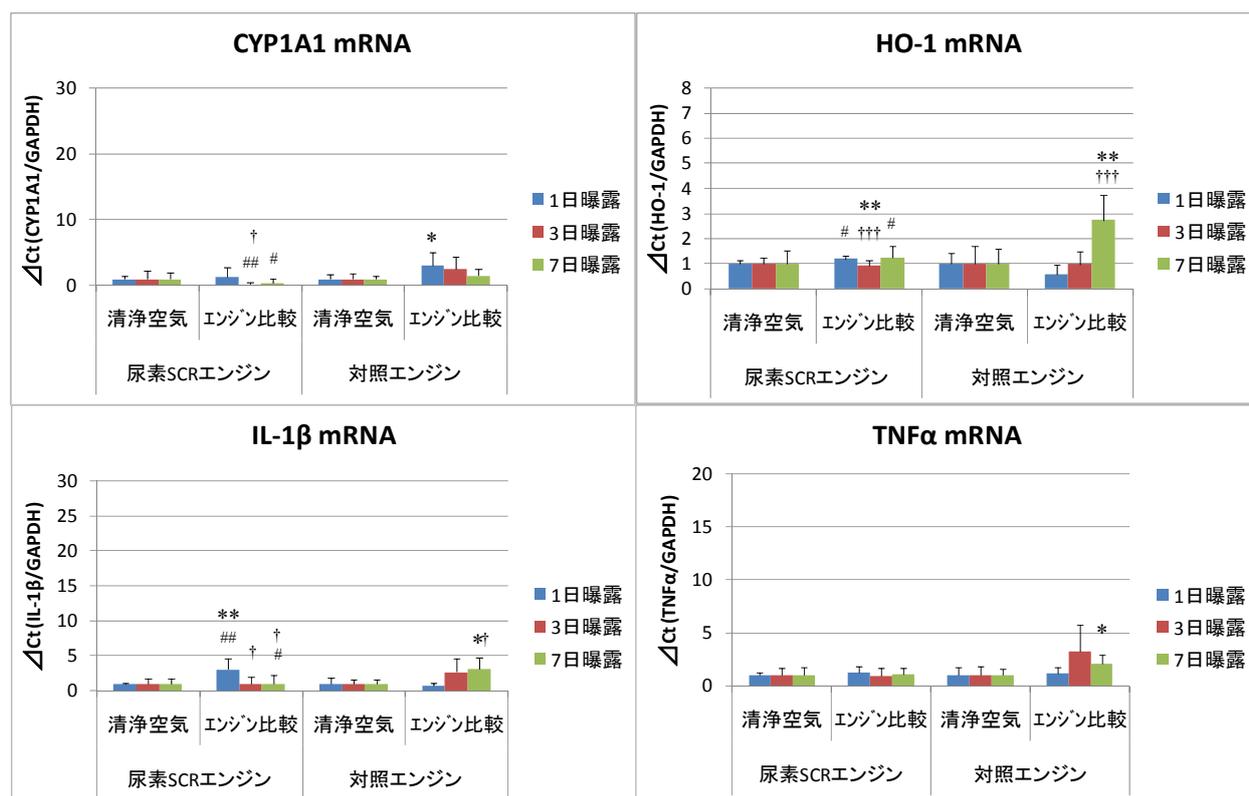


Fig. 3.3.2.73 心臓の遺伝子発現量 (n = 5~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

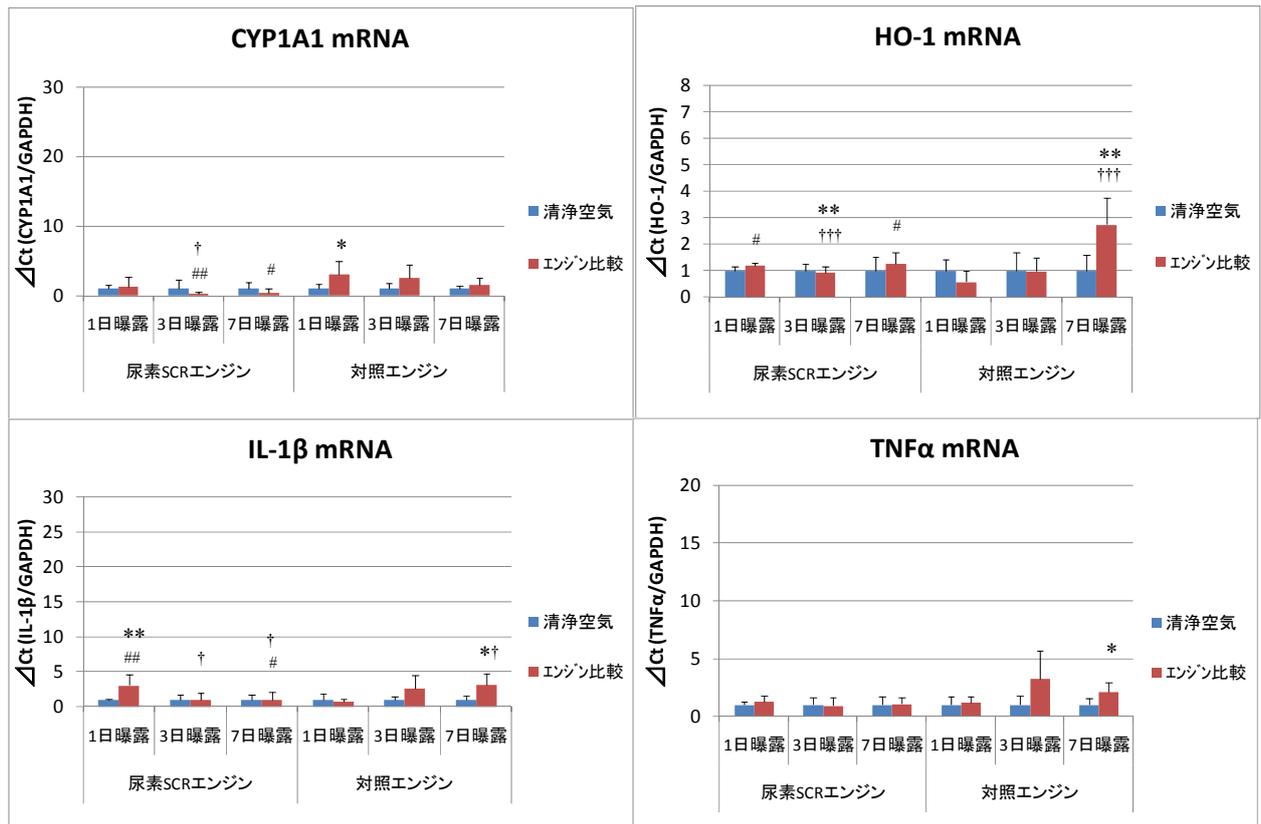


Fig. 3.3.2.73-2 心臓の遺伝子発現量（曝露期間ごと）

（Fig. 3.3.2.73 を改変）（n = 5～6）

（*： P<0.05, **： P<0.01 vs. 清浄空気群, †： P<0.05, †††： P<0.001 vs. 1日曝露, #： P<0.05, ##： P<0.01 vs. 対照エンジン排気）

c) 大脳遺伝子発現量

大脳遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.74 に示した。なお、Fig. 3.3.2.74-2 に、Fig. 3.3.2.74 を曝露期間でまとめ直した。

CYP1A1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で、清浄空気群と比べて発現量が低下した。また、対照エンジン排気の 1 日曝露では、清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。

HO-1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露による影響は認められなかった。対照エンジン排気の 7 日曝露では発現量が減少した。

IL-1 β 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露による影響は認められなかった。対照エンジン排気の 1 日曝露では発現量が増加した。

TNF α 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露による影響は認められなかった。対照エンジン排気の 1 日曝露では発現量が増加した。

大脳遺伝子発現量は、尿素 SCR エンジン排気で影響があまり認められなかったが、対照エンジン排気では 1 日曝露では発現量の増加傾向が認められた。

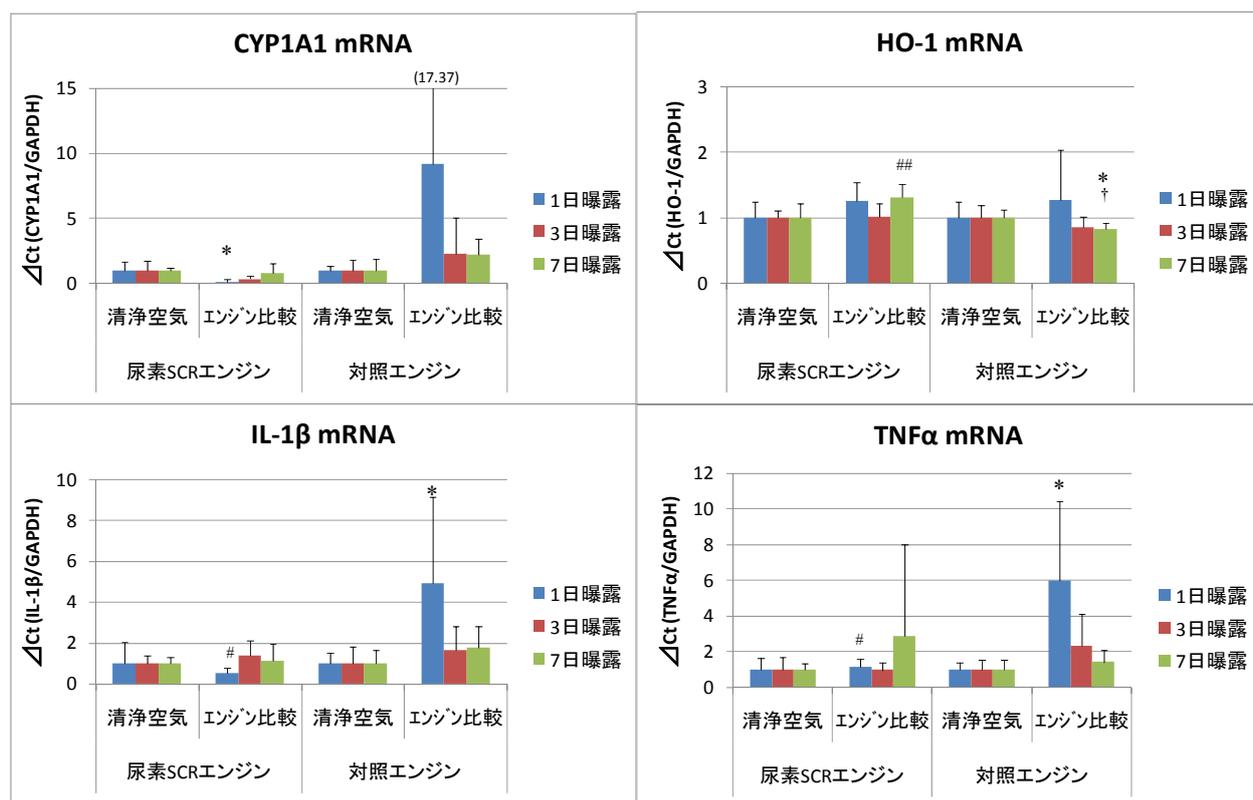


Fig. 3.3.2.74 大脳遺伝子発現量 (n = 3~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

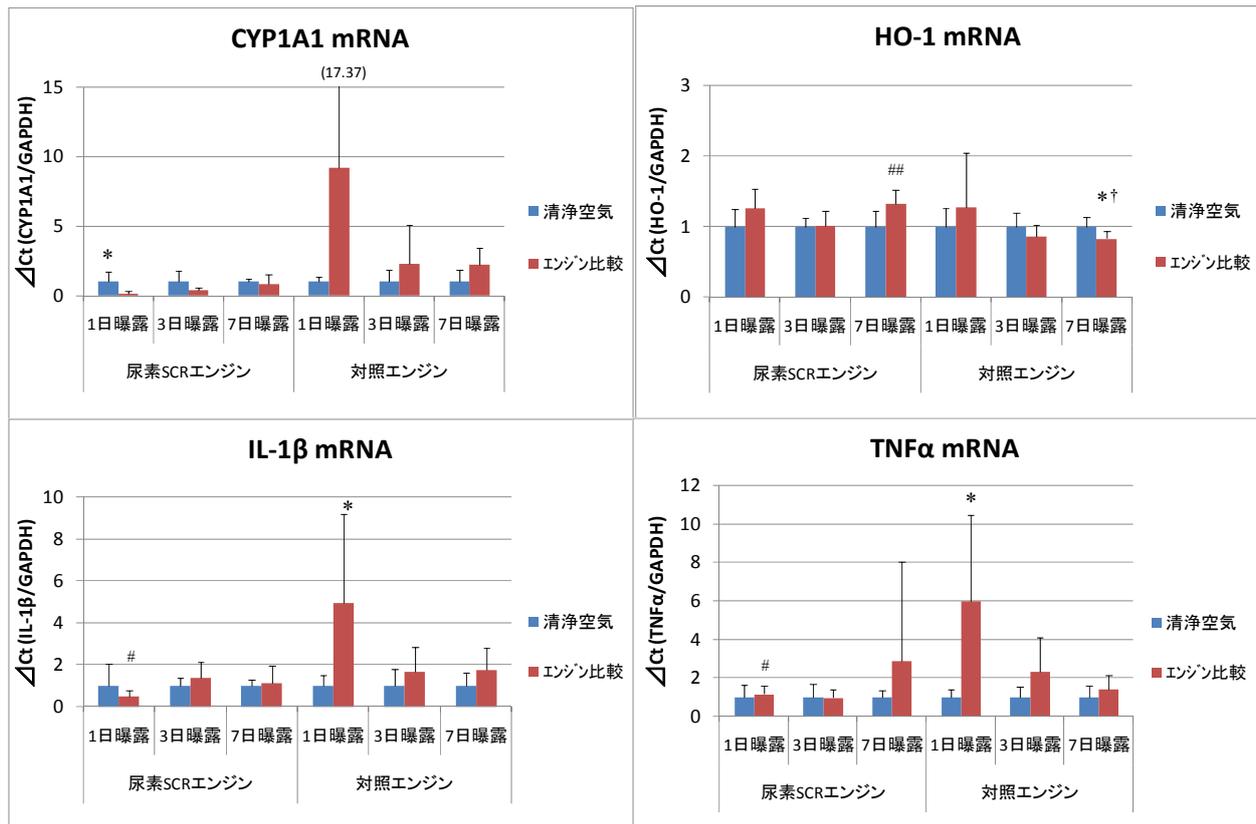


Fig. 3.3.2.74-2 大脳の遺伝子発現量（曝露期間ごと）

(Fig. 3.3.2.74 を改変) (n = 3~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

d) リアルタイム PCR 解析まとめ

- 肺では、尿素 SCR エンジン排気で HO-1、IL-1β および TNFα 遺伝子の発現量が増加していたため、酸化ストレスや炎症に影響を与えていることが示唆された。
- 心臓では、尿素 SCR エンジン排気は特に影響がほとんど認められず、対照エンジン排気では、特に検討した全ての遺伝子の発現が増加傾向を示した。これらは、対照エンジン排気中の PM 濃度による影響である可能性が示唆された。
- 大脳では、尿素 SCR エンジン排気は特に影響がほとんど認められず、対照エンジン排気の 1 日曝露で CYP1A1、IL-1β および TNFα 遺伝子の発現量が増加していたため、PAH による反応や炎症に影響を与えていることが示唆された。
- CYP1A1 遺伝子は、対照エンジン排気で発現が増加する傾向があり、心臓および脳に共通していた。ただし、これらの影響は、同一希釈系列の結果よりも軽微なものであった。

同一希釈系列の結果と同様に、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓、大脳に影響を及ぼす傾向が示唆された。

(2) DNA マイクロアレイ解析

尿素 SCR エンジン排気での各臓器の遺伝子発現量の結果を表 3.3.2.16 に示した。なお、この発現量は、対照エンジン排気での各臓器の遺伝子発現量で標準化させたものである。全体の変動幅を示す SD 値は 3 臓器中、大脳が最も高く 0.59 であり、肺では 0.51、心臓は 0.49 であった。

また、2 倍以上あるいは 0.5 倍以下の発現変動がみられた遺伝子数は、SD 値の大きかった大脳で最も多く、一番小さかったのは心臓であり、SD 値の大きさと同じ順であった。

表 3.3.2.16 各臓器における発現量のばらつき (SD) と発現変動した数

曝露群	検討エンジン排気群 /標準エンジン排気群	曝露期間	肺			心臓			大脳		
			SD	≥2.0	≤0.5	SD	≥2.0	≤0.5	SD	≥2.0	≤0.5
エンジン比較群	尿素SCRエンジン/対照エンジン	7日	0.51	1583	583	0.49	1429	337	0.59	1964	810

a) Gene Ontology

表 3.3.2.17 に、GO で分類された対照エンジン排気に対する尿素 SCR エンジン排気の変動した遺伝子の発現量のばらつきを臓器ごとに示した。また、ばらつきが最も大きい臓器の SD 値を下線で示した。

肺では、細胞死、アポトーシス、細胞接着因子 (CAMs) 分類での SD 値が大きかった。

心臓では、グルタチオン代謝、炎症・アレルギー関連の分類での SD 値が大きかった。

大脳では、成長関連、細胞分裂関連、細胞傷害関連、ストレス応答、抗酸化活性、薬物代謝関連、プロテインキナーゼ活性、炎症・アレルギー関連の分類で SD 値が大きく、肺や心臓よりも SD 値が大きいものが多かった。

表 3.3.2.17 GO 分類された遺伝子の発現量のばらつき (7日曝露)

		肺	心臓	大脳
成長	細胞増殖	0.34	0.40	<u>0.41</u>
	細胞成長	0.40	0.44	<u>0.60</u>
細胞分裂	DNA 代謝	0.46	0.35	<u>0.52</u>
	転写	0.42	0.43	<u>0.52</u>
細胞傷害	外部刺激応答	0.30	0.39	<u>0.47</u>
	細胞死	<u>0.51</u>	0.36	0.48
酸化ストレス	ストレス応答	0.31	0.36	<u>0.40</u>
	アポトーシス	<u>0.50</u>	0.36	0.47
	グルタチオン代謝	0.39	<u>0.72</u>	0.62
	抗酸化活性	0.21	0.48	<u>0.69</u>
	ケトン体の合成と低下	<u>0.26</u>	0.18	0.26
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	0.38	0.38	<u>0.49</u>
細胞シグナル伝達	プロテインキナーゼ活性	0.41	0.38	<u>0.55</u>
	ステロイド生合成	0.18	<u>0.37</u>	0.19
	カルシウムシグナル経路	0.43	<u>0.45</u>	0.45
	MAPK シグナル経路	0.40	0.41	<u>0.43</u>
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	0.48	0.44	<u>0.58</u>
	TGFβ シグナル経路	0.28	<u>0.57</u>	0.51
	細胞接着分子 (CAMs)	<u>0.65</u>	0.47	0.42
神経	神経変性疾患	-	-	0.47
	嗅球伝達	-	-	0.27

b) 遺伝子発現量ランキング

表 3.3.2.18 は、対照エンジン排気と比較して尿素 SCR エンジン排気で強く発現した遺伝子上位 10 位を挙げた。Gene Bank No.や Gene Name が未決定のものが多かったが、特に、肺では炎症関連の遺伝子、心臓では細胞骨格に関連する遺伝子、大脳では癌・代謝酵素関連の遺伝子などの発現亢進が確認された。

一方、表 3.3.2.19 は、尿素 SCR エンジン排気と比較して対照エンジン排気で強く発現した遺伝子上位 10 位を挙げた。表 3.3.2.18 と同様に、Gene Bank No.や Gene Name が未決定のものが多かったが、肺では未解明の遺伝子、心臓では免疫関連の遺伝子、大脳では代謝関連の遺伝子などの発現亢進が確認された。

表 3.3.2.18 尿素 SCR エンジン排気で強く発現した遺伝子（上位 10 位）（7 日曝露）
（対照エンジン排気と比較して）

	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
肺	AA963848	Similar to RIKEN cDNA 4930579G22 (predicted)	8.97
		Q6FIL1 (Q6FIL1) Strain CBS138 chromosome M complete sequence, partial (9%) [TC540833]	8.00
	NM_001001799	transmembrane protein 35	7.93
		Q26195 (Q26195) Pva1 protein, partial (10%) [TC540959]	7.78
	BG663446	Transcribed locus	7.68
			7.66
	XM_343113	Tnf receptor-associated factor 3 (predicted)	7.53
	BG670091	RNA binding motif protein 14	7.09
	XM_578222	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to mKIAA3013 protein (LOC502723), mRNA [XM_578222]	7.04
		Q8BU53 (Q8BU53) Mus musculus 2 days pregnant adult female oviduct cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E230038K10 product:procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-	6.80
心臓	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
			9.28
	NM_001000727	olfactory receptor 1551 (predicted)	9.11
	BF403977	Transcribed locus	8.58
		MLC1_MOUSE (Q8VHK5) Membrane protein MLC1, partial (26%) [TC554741]	7.95
	NM_024346	stathmin-like 3	7.82
	NM_017342	surfactant associated protein C	7.52
	AW142860	Transcribed locus	7.47
		Q8R4C3 (Q8R4C3) Csr1, partial (43%) [TC523252]	7.22
		Q7PG24 (Q7PG24) ENSANGP00000023115, partial (14%) [TC559109]	7.19
NM_012526	chromogranin B	6.93	
大脳	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
	NM_017342	surfactant associated protein C	25.93
	AW142467	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1	11.75
	NM_017144	troponin I type 3 (cardiac)	10.49
			10.09
	AI555513	UI-R-C2p-qw-f-09-0-UI.s1 UI-R-C2p Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C2p-qw-f-09-0-UI 3', mRNA	10.02
	NM_022665	Alkaline phosphatase 1, intestinal, defined by SSR	9.65
	CO397681	AGENCOURT_27538120 NIH_MGC_254 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7312253 5', mRNA	9.10
	NM_031545	natriuretic peptide precursor type B	8.77
	CR475266	Transcribed locus	8.39
XM_226200	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3 (predicted)	7.74	

表 3.3.2.19 対照エンジン排気で強く発現した遺伝子（上位 10 位）（7 日曝露）
（尿素 SCR エンジン排気と比較して）

	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression	
肺	AA944419	EST199918 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMAG94 3' end, mRNA	14.28	
	BE113435	Ras responsive element binding protein 1 (predicted)	7.03	
	BE109496	Transcribed locus, moderately similar to XP_240481.3 PREDICTED: similar to M-protein [Rattus	5.55	
	BE108930	Transcribed locus	4.98	
	NM_001012193	retinol dehydrogenase 11	4.54	
	NM_053810	synaptosomal-associated protein 29	4.24	
	XM_346919	PREDICTED: Rattus norvegicus LOC360791 (predicted) (LOC360791), mRNA [XM_346919]	4.01	
	XM_232613	carboxypeptidase A6 (predicted)	3.74	
	XM_222928	Rattus norvegicus similar to choroideremia-like protein (LOC289266), mRNA [XM_222928]	3.62	
	XM_342113	Rattus norvegicus similar to Periodic tryptophan protein 2 homolog (LOC361820), mRNA [XM_342113]	3.57	
	心臓	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
		NM_053951	mcf.2 transforming sequence-like	12.72
		BM986458	Linker of T-cell receptor pathways	8.68
		XM_340958	immunoglobulin superfamily, member 4 (predicted)	4.77
XM_575596		similar to Rho-GTPase-activating protein 25 (predicted)	4.76	
XM_218601		E2F transcription factor 8	4.42	
XM_218487		similar to Gene model 1082 (predicted)	4.14	
AF037200		Rattus norvegicus zinc finger transcription factor REST protein mRNA, type A 5'UTR.	3.47	
CO396892		Transcribed locus	3.24	
AI556299		UI-R-C2p-rk-d-06-0-UI.s1 UI-R-C2p Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C2p-rk-d-06-0-UI 3', mRNA	3.21	
XM_345875		Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 1700011A15 (RGD1305207), mRNA.	3.20	
大脳		GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
		XM_225368	activator of basal transcription 1	11.80
		XM_345596	Eph receptor A2 (predicted)	9.34
	NM_199082	secreted and transmembrane 1	7.72	
	NM_001004284	zinc finger, MYND domain-containing 10	6.23	
	NM_001012118	odd-skipped related 2 (Drosophila)	5.63	
	NM_012532	ceruloplasmin	5.50	
	NM_173151	phosphate cytidyltransferase 1, choline, beta isoform	4.84	
	XM_222019	similar to RIKEN cDNA 9430031J16 (predicted)	4.27	
	AW252650	Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	4.05	
	XM_341115	lactase	3.95	

c) DNA マイクロアレイ解析まとめ

- 肺では、尿素 SCR エンジン排気で、特に酸化ストレス関連の遺伝子の変動が認められた。
- 心臓では、対照エンジン排気の 7 日曝露で、酸化ストレス関連をはじめ、代謝関連などの遺伝子発現変動が認められた。
- 大脳では、対照エンジン排気で、代謝に関連した遺伝子の変動が認められた。
- 遺伝子発現の変動傾向は、各臓器でリアルタイム PCR 解析と同様の傾向であった。リアルタイム PCR 解析と同様に、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓、大脳に影響を及ぼす可能性が示唆された。

5) 病理解析

(1) 呼吸器系の評価

両エンジン排気とも気管から終末細気管支に至る気道部および肺胞構築に変化は認められなかった。さらに、清浄空気群と比較して、気道部の線毛細胞、非線毛細胞（杯細胞、クララ細胞）に線毛の短縮、脱落あるいは杯細胞の増生や粘液産生の亢進、クララ細胞の膨隆などの変化や、気道上皮下の線維化や炎症細胞浸潤を認めなかった（Fig. 3.3.2.75、Fig. 3.3.2.76）。

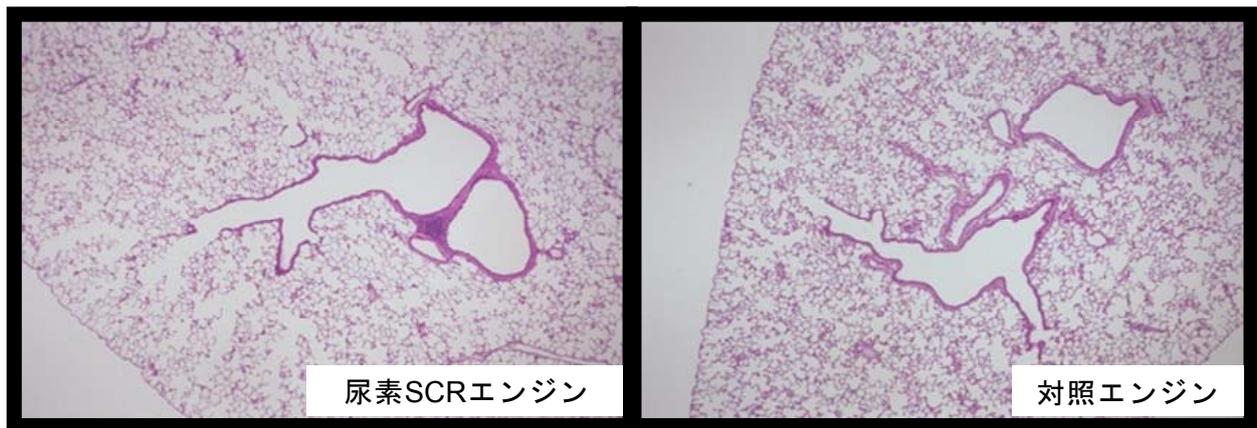


Fig. 3.3.2.75 エンジン比較群の肺組織（HE 染色、撮影倍率：10 倍）

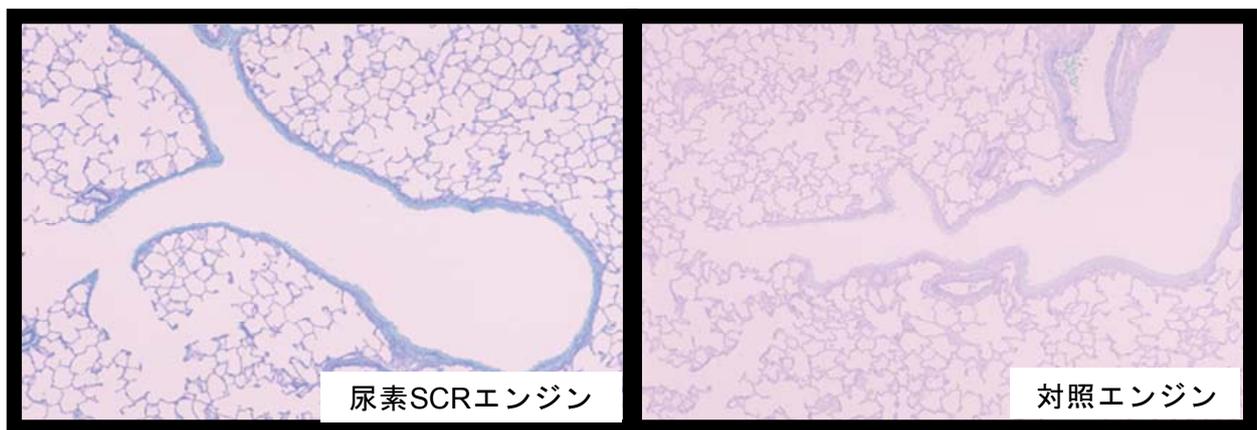


Fig. 3.3.2.76 エンジン比較群の気道部（AB・PAS 染色、撮影倍率：25 倍）

各試験群とも気道の粘液産生に異常は認めない。

両エンジン比較群は PM および NO₂ はほぼ同程度の濃度であるが、肺胞部では対照エンジン排気で II 型上皮細胞の軽微な増生を一部の個体で認めた (**Fig. 3.3.2.77**、**表 3.3.2.20**)。

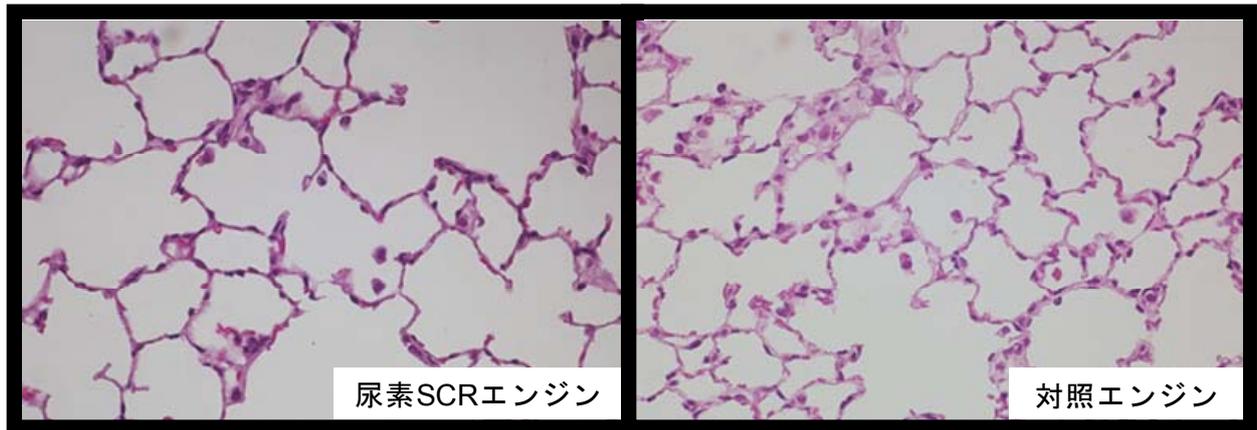


Fig. 3.3.2.77 エンジン比較群の肺胞部（HE 染色、撮影倍率：100 倍）

対照エンジン排気では II 型上皮細胞の軽度な増生を認める。

表 3.3.2.20 各エンジン排気の呼吸器の病理学的評価

	肺胞腔：肺泡マクロファージ		肺胞上皮：II 型上皮
	炭粉貪食	増生	増生
尿素SCRエンジン			
清浄空気	—	—	—
	(6)	(6)	(6)
エンジン比較	—	—	—
	(6)	(6)	(6)
対照エンジン			
清浄空気	—	—	—
	(6)	(6)	(6)
エンジン比較	—	—	—～+
	(6)	(6)	(4)～(2)

(2) 呼吸器系以外の臓器の評価

清浄空気群を含む全ての試験群で、一部の個体に肝臓の胆管や小葉間周囲の炎症細胞浸潤、腎臓の皮質に間質の線維化、および心臓の右心室に炎症細胞浸潤が局所的あるいは散在性に軽度に認められた（表 3.3.2.21）。両エンジン排気による影響の違いは認められなかった。

表 3.3.2.21 各エンジン排気の呼吸器以外の臓器の変化

	肝 臓	腎 臓	心 臓
	胆管周囲の細胞浸潤	間質の線維化	細胞浸潤
尿素SCRエンジン			
清浄空気	2	2	0
エンジン比較	1	3	1
対照エンジン			
清浄空気	1	3	0
エンジン比較	0	4	0

(3) 病理解析まとめ

- 尿素 SCR エンジン排気は呼吸器系やそれ以外の臓器に対する病理学的な変化は認められなかった。
- 対照エンジン排気では、肺胞 II 型上皮細胞の増生が認められたが、軽微な変化であった。

これらのことから、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気に比べて影響は軽微であり、同一希釈系列の結果よりも軽度であった。

6) 小括

(1) 尿素 SCR エンジン排気

肺への病理学的影響は認められなかった。3日曝露で、BALF中の総細胞数の減少がみられ、リンパ球の増加が認められたが、軽微な変化であった。遺伝子解析での HO-1、IL-1 β や TNF α の遺伝子発現量は肺で増加したが、心臓や大脳では軽微あるいは低下した。

(2) 対照エンジン排気

病理解析では、対照エンジン排気で肺胞 II 型上皮細胞の軽度な増生が認められた。BALF中の炎症細胞数や分画に変化は認められなかった。遺伝子解析では、肺で TNF α の発現量の増加傾向がみられ、心臓や大脳で CYP1A1 や IL-1 β 、TNF α の遺伝子発現量の変化が認められた。

尿素 SCR エンジン排気の肺組織は影響が認められなかったが、対照エンジン排気では軽微な影響が認められた。一方、尿素 SCR エンジン排気で肺の遺伝子発現量に影響がみられたが、尿素由来生成物はほぼ同濃度であったため、尿素 SCR エンジン排気のどの成分が関与しているかは特定できなかった。

3.3.2.4 培養細胞曝露試験

1) 細胞毒性試験

Fig. 3.3.2.78 に、A549 細胞の細胞生存率を示した。両エンジン排気とも希釈比を変えても、細胞生存率は大きく変化せず、エンジン排気による細胞毒性は認められなかった。

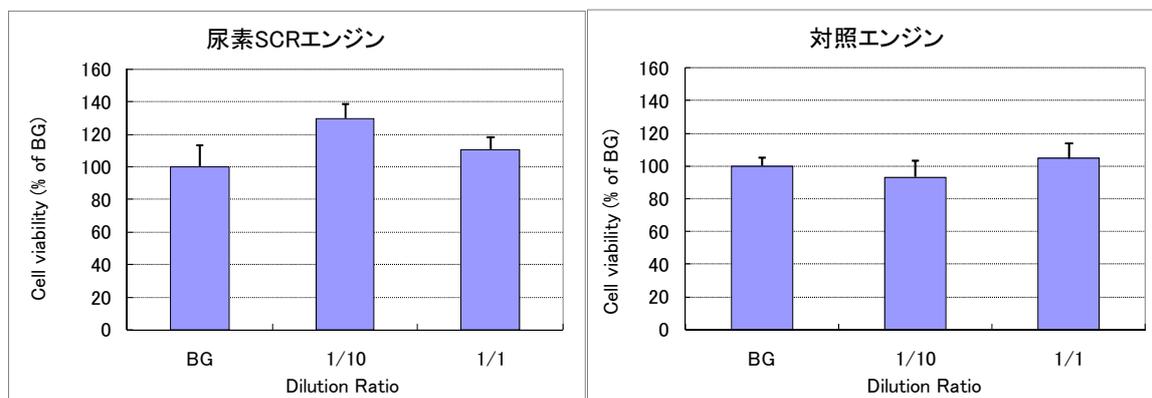


Fig. 3.3.2.78 ディーゼルエンジン排気曝露された A549 細胞に対する細胞生存率 (細胞毒性試験) (n = 3)

2) 遺伝子解析 (リアルタイム PCR 解析)

Fig. 3.3.2.79 に A549 細胞の遺伝子発現量の変化を示した。両エンジン排気で検討遺伝子に対する発現量に有意差は認められなかったが、対照エンジン排気で HO-1 遺伝子発現量の増加傾向がみられた。

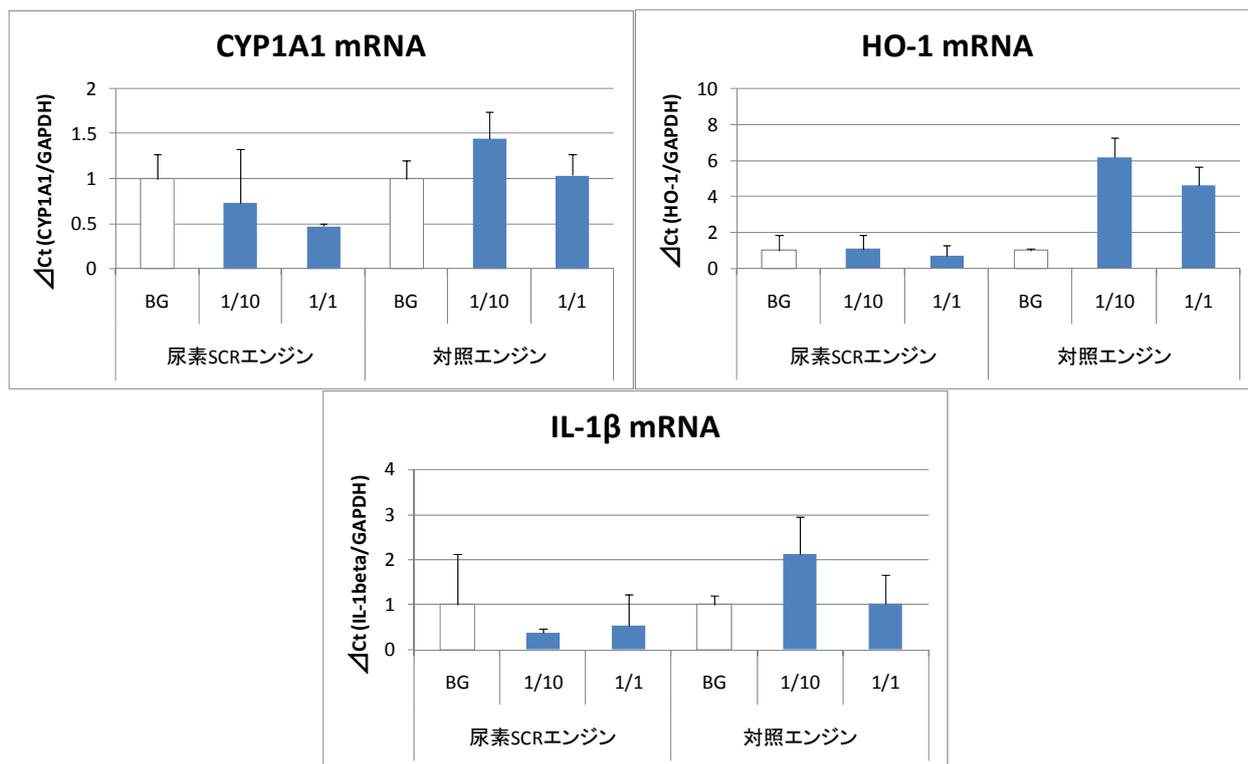


Fig. 3.3.2.79 ディーゼルエンジン排気曝露された A549 細胞の各検討遺伝子発現量 (リアルタイム PCR 解析) (n = 2~3)

3) 小括

動物曝露チャンバー内に給気されている排気を、培養細胞曝露装置を用いてヒトの呼吸器系由来細胞に曝露した。その結果、細胞毒性試験では、両エンジン排気とも細胞生存に影響を及ぼさなかった。また、遺伝子解析では、両エンジン排気とも検討遺伝子の発現量に有意差を認めなかったが、対照エンジン排気で HO-1 遺伝子の発現量の増加傾向がみられた。

以上より、対照エンジン排気は、ヒト呼吸器系由来細胞に酸化ストレスを与える傾向があることが示唆された。

3.4 考察

本調査は、開発された次世代低公害車の排気が、既存の排気と比べ健康面に対する改善効果がみられることを、あるいは少なくとも増悪しないことを確認することが目的であった。そこで、尿素 SCR エンジン（新長期規制対応エンジン）システムおよび長期規制対応エンジンシステムからの排気を実験小動物にそれぞれ短期間吸入曝露し、第一標的臓器である呼吸器への健康影響を中心に比較評価を行い、エンジンシステムの改良による排気の影響への軽減効果を調査した。

健康影響評価では、ラットを用いた短期吸入曝露試験とヒト呼吸器系由来培養細胞を用

いた細胞曝露試験を実施した。ラットの短期吸入曝露試験では、各エンジンシステムからの排気の影響を量・反応関係で検討する試験と、尿素添加システムの有無による排気の影響の違いを検討する試験を設定して尿素 SCR エンジンシステム排気の低減効果を調査した。

3.4.1 曝露濃度レベルについて

本調査で試験した尿素 SCR エンジン排気および対照エンジン排気について、同一希釈系列のうち、影響の検出しやすい高濃度群で PM 濃度、NO₂ 濃度や他の成分濃度はどのようなレベルであったか、大気環境基準値（環境省ホームページ）や環境省等が公表している全国の平成 18 年度大気環境濃度（環境省ホームページ）などと比較して考察した。

PM 濃度は、対照エンジン排気の高濃度群では、環境基準値（1 時間値の 1 日平均値が 0.10 mg/m³ 以下であり、かつ 1 時間値が 0.20 mg/m³ 以下）の 0.1 mg/m³ の 10 倍を目標濃度に設定した。また、尿素 SCR エンジン排気では、対照エンジン排気と同様の希釈倍率に設定した。このような環境基準値よりも 1 桁高値の設定は、吸入毒性試験を量・反応関係で評価する際の最高濃度設定の目安となるであろう。また、両エンジン排気の同一希釈倍率の設定は、市場で走行する車両のエンジンシステムのみが置き換わった場合を想定することができ、両エンジン排気の全体の影響を単純に比較することができる。高濃度群の PM 濃度は、尿素 SCR エンジン排気で約 0.04 mg/m³ となったが、この濃度は SPM として環境基準値以下であり、大気環境濃度レベルである。

PM 個数濃度と粒径については、尿素 SCR エンジン排気の個数濃度は約 1.4×10⁵ 個/cc であり、対照エンジン排気（10⁶ 個/cc）に比して一桁近く低値であった。10⁵ 個/cc は沿道で観察される濃度レベルである。また、尿素 SCR エンジン排気のモード径は 50 nm 前後であり、対照エンジン排気（80～90 nm）に比較して粒径は小さい。これは、尿素 SCR エンジンでは燃料の高圧噴射により燃焼改善を伴うことで PM の微細化が発生するため、粒径が異なった可能性が考えられる。対照エンジン排気のモード径は、低濃度から高濃度になるに従い、約 80 nm から 90 nm に若干大きくなる傾向があった。これは PM 個数濃度に依存してみられたことから、PM の凝集によるものと思われた。現在、自動車排気中の PM 個数濃度や数十 nm の PM 粒径の違いと健康影響についての定量的な評価結果は見当たらない。

NO₂ 濃度は、PM と同様に、対照エンジン排気の高濃度群で環境基準値（1 時間値の 1 日平均値が 0.04 ppm から 0.06 ppm のゾーン内又はそれ以下）の 10 倍を目標としたが、平均濃度 0.3 ppm と若干至らなかった。希釈倍率を下げて、さらに高濃度に設定することは可能であったが、動物飼育環境上の制約から 0.3 ppm 以上の高濃度にすることは困難であった。対照エンジン排気と同一の希釈倍率とした尿素 SCR エンジン排気の NO₂ 濃度は 0.78 ppm であり、対照エンジン排気の約 2.5 倍であったが、これは許容濃度（ACGIH, TLV-TWA, 3 ppm）以下であった。しかし、NO₂ 濃度が尿素 SCR エンジン排気で増加した理由については、尿素 SCR エンジンシステムが酸化触媒を装着していることで NO₂ 排出が対照エンジン排気よりも増加した可能性が考えられる。

NO 濃度は、尿素 SCR エンジン排気で約 3.4 ppm、対照エンジン排気で 12.8 ppm であっ

た。これらは、いずれも許容濃度（ACGIH, TLV-TWA, 25 ppm）以下であった。

CO濃度は、高濃度群で、尿素 SCR エンジン排気 0.5 ppm、対照エンジン排気 7.3 ppm であったが、これは環境基準値（1時間値の1日平均値 10 ppm 以下かつ1時間値の8時間平均値が 20 ppm 以下）以下であった。さらに、環境濃度は 0.6～0.8 ppm であることから、尿素 SCR エンジン排気は環境濃度レベル、対照エンジン排気は環境濃度の 10 倍程度であったといえる。

SO₂濃度は、高濃度群で両エンジン排気とも環境基準値（1時間値の1日平均値 0.04 ppm 以下かつ1時間値 0.1 ppm 以下）以下であり、対照エンジン排気は環境濃度（3～4 ppb）レベル程度であった。

ベンゼン濃度は、尿素 SCR エンジン排気で環境基準値（1年平均値 0.003 mg/m³ 以下）以下、対照エンジン排気では環境基準値の 3 倍程度の濃度であった。

1,3-ブタジエン濃度は、尿素 SCR エンジン排気で検出限界以下、対照エンジン排気では環境基準指針値（年平均値 2.5 µg/m³）以下であった。

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド濃度は、現在のところ大気環境基準値や指針値の設定はない。大気環境濃度は、ホルムアルデヒドが 3.3 µg/m³、アセトアルデヒドが 2.8 µg/m³ であるため、尿素 SCR エンジン排気ではいずれも大気環境濃度以下、対照エンジン排気ではホルムアルデヒドは大気環境濃度の 10 倍程度、アセトアルデヒドは 2 倍程度の濃度であった。シックハウスに関する室内濃度指針値（ホルムアルデヒド：0.08 ppm、アセトアルデヒド：0.03 ppm）と比較すると、尿素 SCR エンジン排気では両アルデヒドとも指針値以下、対照エンジン排気ではアセトアルデヒドが室内指針値を超えた。

BaP濃度は、現在のところ大気環境基準値や指針値の設定はない。大気環境濃度は、0.35 ng/m³ であり、尿素 SCR エンジン排気ではいずれも大気環境濃度以下であった。

NH₃濃度は、測定された 0.05 ppm は臭気感知（5 ppm～）の 1/100 であり、眼や鼻、咽喉の粘膜の刺激濃度（400 ppm～）や許容濃度（25 ppm）に対しては極めて低値である。

尿素濃度は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で 1 回目に 14.9 µg/m³、2 回目に 1.1 µg/m³ が検出された。今回、他の成分には特異的な変化は見られなかったため、2 回の平均値を用いて約 8 µg/m³ の濃度とした。1 回目の尿素測定値が 2 回目より高値を示した理由としては、試験開始前に濃度設定のため尿素 SCR エンジンを用いた予備試験を実施したときに、排気中の尿素が配管途中に付着していた可能性が考えられた。尿素的融点は 133～135℃ であり、吸入トンネルの入口温度の 181℃ より低い。尿素は常圧下で 160℃ にて分解するといわれており、仮に曝露中に尿素が排出されたとしても SCR 触媒出口温度 360℃ であるため、触媒で分解、酸化されるものと考えられる。

また、清浄空気群でも低濃度ではあるが尿素が検出されているが、清浄空気群は高性能フィルタと活性炭フィルタで濾過した空気を供給しており、曝露装置の清浄空気の供給系や測定のためのサンプリング用配管もエンジン排気の系とは独立している。そのため、清浄空気群で検出された尿素は、尿素 SCR エンジン排気由来というよりは、実験動物に由来したものか、あるいは大気常在成分の可能性が考えられる。

シアン濃度は検出限界（2.5 ppm）以下であった。これは、シアン化水素の許容濃度 5 mg/m³（約 4 ppm）以下であった。

一方、エンジン排気比較系列では、PM 濃度および NO₂ 濃度で差がみられたが、わずか

であった。また、その他の微量成分濃度は、尿素 SCR エンジン排気が対照エンジン排気よりも低値であった。これは排気後処理装置（酸化触媒）の効果と考えられる。本系列の試験は、尿素添加の影響を検出する目的であるが、両エンジン排気で尿素由来成分濃度に差異はなかった。

以上の結果から、尿素 SCR エンジン排気中で測定対象とした多くの微量成分濃度は、環境基準値ないし指針値以下であり、現状の大気環境濃度を悪化する濃度レベルにはないものと思われる。しかし、NO₂濃度は対照エンジン排気よりも尿素 SCR エンジン排気で高濃度であったこと、また、PM 個数濃度と粒径は両エンジン排気で差異が見られたことから、今後、これらの複合影響を明らかにするためには、更なる調査が必要であると考えられる。

3.4.2 同一希釈系列（量・反応関係による検討）

両エンジンシステムの排気全体を評価するために、同一希釈系列による試験群を設定し、量・反応関係について検討した。

両エンジン排気とも、曝露期間中の体重や摂餌量、摂水量の変動は認められなかった。また、7日間の曝露期間中で1,3および7日曝露時に解剖し、臓器重量を測定したところ、一部の臓器で成長による増加がみられたが、曝露濃度および曝露期間による影響はほとんど認められなかった。体重および臓器重量に特記すべき影響が認められなかったのは、従来のエンジン排気と比べ本試験での長期および新長期規制対応エンジンの排気での濃度が極めて低く、また、短期間の曝露であったことによるものと考えられた。

両エンジン排気の第一標的臓器である呼吸器への形態学的影響は、本実験条件下では1日6時間、7日間の曝露のため極めて軽度であった。しかし、PM濃度が0.04 mg/m³程度の曝露であれば、明らかに光顕レベルの観察で粒子吸入により動員されたAMの増加と粒子貪食が亢進されていることが認められた。ディーゼルエンジン排気の長期間曝露ではPM濃度が0.1 mg/m³でも粒子貪食AMが光顕、電顕観察で確認されている（加藤ら、1992）。本試験の病理観察は光顕のみであったが、0.1 mg/m³以下のPM濃度での肺内粒子沈着およびAMによる粒子貪食が短期間の曝露で起こっているのかどうか、さらに高濃度排気での吸入粒子の体内動態などを明らかにするためには、電顕レベルでの確認が必要となるだろう。しかし、高濃度群においても呼吸器組織への直接的な影響は認められておらず、また、好中球や肥満細胞などの炎症を惹起する炎症細胞の動員もみられないことから、呼吸器への影響は吸入粒子のAMによる貪食の域に留まっているものと思われる。

気管・肺のBALF中の炎症細胞は、尿素 SCR エンジン排気では曝露濃度による影響はみられなかったが、3日曝露より7日曝露で総細胞数の減少傾向が認められた。また、対照エンジン排気では、高濃度群の3日曝露で清浄空気群よりも総細胞数の有意な減少が認められた。粒子などにより肺内で何らかの炎症反応が起きているのであれば、白血球が肺内に動員され、BALF中の総細胞数が増加する（Noritake et al., 2007; Li et al., 2007）。一方、外部刺激により肺胞壁にAM接着が起こったことによりBALF中の細胞数が減少したという報告（Hirano, 1997）があるが、BALFの回収率では曝露濃度による差は認められなかった。しかし、総細胞数が減少傾向であることから、肺胞への細胞接着により細胞数が減少した可能性がある。一方、病理解析では程度の差はあるものの、両エンジン排気で用量依

存性に AM 数の増加が認められていることから結果は一致していない。しかし、どの影響も軽微であることから、それらの点を明らかにするためには、より詳細な検討が必要なのかもしれない。

血液生化学検査では、尿素 SCR エンジンの尿素との関連から、特に BUN が注目された。BUN は、両エンジン排気とも 1 日曝露では試験群で低下がみられ、3、7 日曝露では逆に上昇した。また、エンジン排気中の尿素濃度は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群を除き、測定時期のほとんどで同程度であり、また尿素 SCR エンジン排気の高濃度群は清浄空気群の約 17 倍の濃度であった。しかし、両エンジン排気の高濃度群と BUN はほぼ同値であったことから、エンジン排気中の尿素はラット血液中の BUN に影響を与えている可能性は低いと考えられた。また、ラットは暗期 (19:00-7:00) で食餌を含めた各種行動が活発になること、1 日曝露と 3、7 日曝露では解剖時間が異なること、解剖順は曝露濃度の影響を考慮して高濃度群から実施したことから、BUN の変化には食餌が反映されている可能性が示唆された。ただし、酸化ストレス状況下で BUN が上昇するという報告があること (Yu and Yao, 2008; Tenorio-Velázquez et al., 2005) から、DE および DEP 中の酸化ストレスにより影響を与えている可能性も否定できない。これらのメカニズムを解明するためには、今後の詳細な検討が必要であると考えられた。

また、Glu では、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群と対照エンジン排気の高濃度群で有意な上昇が認められた。しかし、解剖時期および解剖順序による上昇傾向が考えられることから、BUN と同様、食餌性の影響である可能性が示唆された。

K では、特に尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で期間依存性に上昇している。これは BUN の変化と類似しており何らかの関連がある可能性が示唆されるが、対照エンジン排気ではこのような類似性がみられないことから、尿素 SCR エンジン排気特有の物質による可能性もあり、そのメカニズム解明が必要と考える。その他、pH や pO₂ や pCO₂ などの血液ガス成分は、ペントバルビタールナトリウムで深麻酔処置したこと、右心室からの採血であったことにより、参考データに留めることにした。

血液凝固能検査では、どの測定項目も有意な差は認められなかった。しかし、対照エンジン排気の高濃度群で APTT の短縮傾向およびフィブリノーゲンの増加傾向が認められた。DE あるいは DEP により血液凝固能が亢進するという報告があり (Inoue et al., 2006; ディーゼル排気と循環器疾患)、本試験の結果を裏付けるものである。しかし、十分なサンプル数が確保できなかったことから、両エンジン排気に対する健康影響の差異をより明確化するためには、さらなる解析が必要であろう。

8-OHdG は、酸化ストレスを受けると増加すると考えられているが、尿素 SCR エンジンと対照エンジン排気の高濃度群への影響は、特に中濃度と高濃度では異なっていた。即ち、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で、8-OHdG が低濃度群の 7 日曝露、中、高濃度群の全ての曝露期間で有意に低下あるいは検出限界以下であったのに対し、対照エンジン排気では、高濃度の 3 日と 7 日曝露を除き増加していた。一方、PAO は、対照エンジン排気では、曝露濃度や期間からみても、有意な変化はみられるものの特徴的な差はみられなかったが、尿素 SCR エンジン排気では、低濃度群の 7 日曝露、中、高濃度群の全ての曝露期間で有意に上昇あるいは上昇傾向を示した。尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で 8-OHdG の増加が抑制されたのは PAO の増加によるものと推測された。このことは、尿素 SCR エンジン排気と対照エン

ジン排気の酸化ストレスを起こす物質が相違していることが示唆され、おそらく、酸化ストレスの相対的強度は、尿素SCRエンジン排気の方が強く、8-OHdGの増加を起こす前あるいは増加したことにより、生体の防御機構が働いてPAOが増加し、8-OHdGの増加が抑制されたのではないかと推測された。対照エンジン排気では、PAOの増加を引き起こすほど酸化ストレスが強くないので、尿素SCRエンジン排気に比し8-OHdGの増加がみられたのではないかと推測された。このことは、肺のHO-1の遺伝子発現量が、尿素SCRエンジン排気では濃度依存性の増加傾向がみられたのに対し、対照エンジン排気では曝露濃度や期間からみても差がみられなかったことから支持されることが示唆される。しかし、対照エンジン排気の高濃度群の1日曝露では、8-OHdGが本試験中の最大値を示し、さらに排気中のPMが高濃度群で0.1 mg/m³であったことから、対照エンジン排気による8-OHdGの上昇は、粒子に付着した酸化ストレス物質によるものであるという可能性も示唆される。さらに、DTTアッセイによるSOFの酸化活性が尿素SCRエンジン排気よりも対照エンジン排気で強かったことは、尿素SCRエンジン排気に比べ対照エンジン排気の方が絶対値レベルでも活性酸素による損傷が大きいことを示しており、この影響の差異については原因物質の違いによるものと推察できる。また、ナノ粒子を多く含むディーゼル排気曝露（100 µg/m³、5時間/日、5日間）により生じた酸化ストレスは、マウスのレドックス⁷⁵環境に異常をきたさなかったという報告（古山ら、2008）があることから、原因物質の違いだけではなく、曝露期間による影響を含めた更なる検討が必要と考えられる。

リアルタイム PCR 解析での肺の遺伝子は、対照エンジン排気よりも尿素 SCR エンジン排気で発現が亢進する傾向がみられた。なお、CYP1A1 遺伝子では尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で発現が亢進する傾向がみられ、対照エンジン排気の1日曝露で発現量が有意に増加した。これらの変化が粒子に付着している PAH によるものであれば、エンジンの種類あるいは PM 濃度により作用機序あるいは発現期間に差異がある可能性が高い。しかし、本試験中で最も PM 濃度が高い対照エンジン排気の高濃度群にて、発現量に差が認められなかったことから、他の要因による可能性が考えられた。また、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で、HO-1 や TNFα 遺伝子の発現量が増加した。酸化促進剤であるヘムが存在すると HO-1 が誘導され、またヘムは Mφ から TNFα を分泌させることが知られている（高橋ら、2007）。これらは酸化ストレスで発現増加する遺伝子であることから、8-OHdG および PAO の酸化ストレス応答機構と同様の傾向が示唆された。また、DNA マイクロアレイ解析では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも発現量のばらつきが大きく、さらに変動する遺伝子数が多かった。特に、細胞分裂やアポトーシスに関する遺伝子の変動が大きかった。量的および定性的な遺伝子解析から、肺では対照エンジン排気よりも尿素 SCR エンジン排気で遺伝子発現変動が大きいことがわかった。

尿素 SCR エンジン排気で肺の遺伝子変動が大きかった理由について、排気成分から考察すると、尿素 SCR エンジン排気中の NO₂、N₂O および尿素的平均濃度は、対照エンジン排気よりも高値で、NO₂ は尿素 SCR エンジン排気で 0.78 ppm、対照エンジン排気で 0.31 ppm、N₂O は尿素 SCR エンジン排気で 3.50 ppm、対照エンジン排気で 0.32 ppm、尿素は尿素 SCR エンジン排気で 7.98 ppm、対照エンジン排気で 0.49 ppm であった。NO₂ や N₂O について

⁷⁵ レドックス[Redox : Reduction/Oxidation] : 生体内での酸化還元反応の制御機構。レドックス反応は単なる酸化ストレス、ROS (reactive oxygen species) の中和だけでなく、細胞内のシグナル伝達の重要な役割を持つことが判明している。

は種々の報告があり、NO₂は10 ppmの急性吸入曝露でラット肺を損傷させる（Hochscheid et al., 2005）。本試験においては、尿素 SCR エンジン排気でのNO₂濃度は、日本の大気汚染に係る環境基準値（環境省・大気汚染に関わる環境基準）の約130～200倍と非常に高濃度であるため、肺に影響を与えている可能性が考えられる。また、自動車エンジン排気中にも検出されているN₂O（Toyoda et al., 2008）は、地球温暖化ガスとして問題視されている（Xu et al., 2007）だけではなく、ニューロパチーを引き起こすこと（Brodsky et al., 1981）や職業曝露による自然流産のリスクを増加させること（Rowland et al., 1995）が報告されている。一方、N₂Oはもともと安定性のある物質であり、さらに米国で定められている環境濃度50 ppmよりも本試験では低濃度であるため、影響を与えている因子とは言い難い。また、尿素による報告については、先に述べたように生体への影響はあまり報告されていない。以上のことから、肺の遺伝子発現に変動を与えているのはNO₂による影響の可能性が示唆される。

心臓のリアルタイムPCR解析は、尿素 SCR エンジン排気の1日曝露でCYP1A1、IL-1βおよびTNFα遺伝子の発現量を増加させる傾向があった。しかし、対照エンジン排気では、検討遺伝子の全てにおいて、発現量の顕著な増加を示した。対照エンジン排気は、エンジン排気成分の中で、先に述べたNO₂、N₂O、尿素以外は尿素 SCR エンジン排気よりも高濃度であった。DEおよびDEPで発現亢進がみられる遺伝子をリアルタイムPCR解析で検討したが、ほとんどの遺伝子の発現亢進が認められたため、排気成分中で高濃度である粒子による影響が示唆された。DNAマイクロアレイ解析では、発現量のばらつきは両エンジン排気で同程度であったが、発現変動がみられた遺伝子数は、尿素 SCR エンジン排気で7日曝露より1日曝露で、対照エンジン排気では1日曝露より7日曝露で多かった。尿素 SCR エンジン排気では、GO解析でMAPKシグナル経路分類内の2遺伝子が顕著な発現亢進をしていたため、これらの遺伝子変動については今後リアルタイムPCR解析で定量的に評価する必要があると思われた。また、対照エンジン排気では、7日曝露でアポトーシスや細胞傷害などに関連した遺伝子の発現変動がみられている。これらも粒子による影響の可能性が示唆された。

大脳のリアルタイムPCR解析では、尿素 SCR エンジン排気は検討遺伝子の発現変動がほとんど認められなかったが、対照エンジン排気ではCYP1A1とIL-1β、TNFα遺伝子で発現量の増加が認められた。CYP1A1遺伝子の発現亢進により大脳にPAHの存在が、また、IL-1βおよびTNFα遺伝子の発現亢進により炎症が示唆されるが、HO-1遺伝子が低濃度群で若干の発現増加がみられたのみで、酸化ストレスにはあまり大きく影響していないことが認められた。また、DNAマイクロアレイ解析においても、尿素 SCR エンジン排気で発現量のばらつきは対照エンジン排気に比べて小さく、対照エンジン排気の1日曝露ではアポトーシスや細胞傷害に関連した遺伝子の発現変動が大きかった。

このように、遺伝子発現の傾向は、定量評価が目的のリアルタイムPCR解析と定性評価が目的のDNAマイクロアレイ解析でも同様の傾向があることが示され、第一標的臓器である肺は尿素 SCR エンジン排気で、心臓や大脳では対照エンジン排気で影響を及ぼす可能性が示唆された。このことは、エンジン排気中のNO₂が肺に、PMが大脳や心臓に強く影響を与えたと考えられた。

以上の評価結果を総括すると、肺では、組織形態学的な変化を評価する病理解析による

と、両エンジン排気の影響は本実験条件下では全体的に軽度であった。しかし、粒子貪食 AM や肺胞 II 型上皮細胞の増生が、対照エンジン排気の高濃度群ほど強くみられることから、これらの変化は PM 濃度に依存したものと考えられた。一方、遺伝子解析では、尿素 SCR エンジン排気で発現量の増加が認められたことから、PM 濃度に依存した影響というよりは NO₂ 濃度に影響を受けた可能性が高いと考えられた。さらに、尿素 SCR エンジン排気で、8-OHdG は一時的に増加した後、抗酸化作用により抑制されていた可能性が示唆された。しかし、8-OHdG は対照エンジン排気で最も高値であったことから、NO₂ 濃度の酸化作用もさることながら PM に付着している酸化物質による酸化作用の方に影響を受けやすい可能性や、両エンジン排気で影響の受け方が異なる可能性も考えられた。これらのことから、尿素 SCR エンジン排気では、Mφ に依存した HO-1 および TNFα 遺伝子の発現の変動や 8-OHdG や PAO の酸化ストレス応答機構は、NO₂ により引き起こされている可能性が示唆され、また、対照エンジン排気で観察された 8-OHdG の高値や AM および肺胞 II 型上皮細胞の増生は、PM に依存した変化である可能性が示唆された。しかし、尿素 SCR エンジン排気による肺への影響は、対照エンジン排気と比較して遺伝子解析のみ大きく、病態生理・生化学的結果では小さかった。

一方、心臓や大脳の病理解析では、両エンジン排気とも清浄空気群と比較して差は認められなかった。しかし、両臓器とも対照エンジン排気の方が遺伝子の発現変動が大きく、特に心臓では対照エンジン排気の影響が強くていているため、生理学的な影響を及ぼす可能性が考えられる。大脳では、特に対照エンジン排気で遺伝子の発現量の亢進が認められており、病理解析の結果とは必ずしも結びつかなかった。しかし、PM あるいはその抽出物が血液や嗅球を介して大脳に移行している (Oberdörster et al., 2004) 可能性も考えられることから、今後の検討が必要と思われる。本実験条件下での尿素 SCR エンジン排気による心臓および大脳への影響は、対照エンジン排気と比較して遺伝子解析への影響や病態生理・生化学的变化は小さく、著明な病理学的変化をもたらすほどではなかった。しかし、長期的な曝露が大脳や心臓へどのような影響を及ぼすかについては今後の課題である。

以上より、同一希釈系列による尿素 SCR エンジン排気あるいは対照エンジン排気の第一標的臓器である呼吸器への影響比較から、尿素 SCR エンジンシステムの NO_x 低減効果が大きい同一運転条件下であれば、尿素 SCR エンジン排気の方が概して影響は軽度であることが示された。

しかし、8-OHdG と PAO の推移や肺の HO-1 への影響からみると、尿素 SCR エンジン排気の方が酸化ストレスが強いのではないかという懸念も残り、長期間曝露を行うと尿素 SCR エンジン排気で、より強い形態学的変化を起こす可能性は否定できないと思われる。

3.4.3 エンジン排気比較系列 (尿素添加システムの有無による検討)

尿素添加システムの有無によるエンジン排気に対する影響を検討するために、両エンジンシステムの排気成分中の PM 濃度および NO₂ 濃度を同一に設定して、その排気に対する健康影響を評価した。ただし、それぞれのエンジン排気の排気成分は、尿素 SCR エンジン排気で PM 0.019 mg/m³ および NO₂ 0.40 ppm、対照エンジン排気で PM 0.032 mg/m³ および NO₂ 0.32 ppm であり、差は PM 0.013 mg/m³ および NO₂ 0.08 ppm であったため、目標の性

状とは若干異なった。

両エンジン排気とも、曝露期間中の体重や摂餌量、摂水量の変動は認められなかった。また、体重および臓器重量についても、特に曝露による影響はみられなかった。

また、病理解析においては、両エンジン排気で粒子吸入による AM と粒子貪食が認められなかった。排気性状は、PM 個数濃度は尿素 SCR エンジン排気で 7.1×10^4 個/cc、対照エンジン排気で 3.6×10^4 個/cc で、また、平均粒径は尿素 SCR エンジン排気で 48.8 nm、対照エンジン排気で 80.2 nm であり、これは尿素 SCR エンジン排気の方が対照エンジン排気よりも、小さい粒子が多く存在していることを示していた。このような粒子は、光顕レベルでは検出不可能であるため、これらを明らかにするためには今後電顕での詳細な解析が必要となる。一方、対照エンジン排気では II 型肺胞上皮細胞の増生が軽微に認められている。前述のように、排気成分中の PM 濃度および NO_2 濃度の差が 0.013 mg/m^3 および NO_2 0.08 ppm であったことから、その若干の差による影響である可能性が考えられる。しかし、これらの変化は軽微であり、懸念された尿素 SCR エンジン排気に特有な尿素関連燃焼生成物による健康影響も認められなかった。

BALF 中の炎症細胞については、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で総細胞数の減少がみられたが、それは 7 日曝露と同レベルであった。さらに、他の分画成分では差がみられなかったことから、曝露による影響はないものと考えられた。これらは病理解析の結果とほぼ一致していた。

血液生化学検査では、尿素 SCR エンジンの関連から BUN が注目された。BUN は、両エンジン排気とも 1 日曝露では試験群で低下がみられ、3、7 日曝露では逆に上昇傾向がみられた。これは同一希釈系列と同様の傾向である。また、エンジン排気中の尿素が尿素 SCR エンジン排気のエンジン比較群で $0.52 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ 、清浄空気群で $0.47 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ 、対照エンジン排気のエンジン比較群で $0.55 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ 、清浄空気群で $0.62 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ であった。両エンジン排気ともエンジン比較群と清浄空気群で同程度の尿素濃度であったことから、エンジン排気中の尿素が血液中の BUN に影響を与えている可能性は低いと考えられた。

Glu では、両エンジン排気にて曝露期間依存性の増加傾向が認められている。これは、同一希釈系列と同様に、解剖時間の差異による食餌性の影響である可能性が示唆された。また、K は、尿素 SCR エンジン排気で、同一希釈系列の結果よりもより強く、BUN の変化と類似していた。これは対照エンジン排気ではそのような類似性がみられないことから、尿素 SCR エンジン排気に特有な成分による可能性も考えられる。

酸化ストレスの評価では、8-OHdG と PAO で軽微な変動はみられたものの、同一希釈系列でみられていたような酸化損傷は認められず、両エンジン排気とも酸化ストレスによる影響を引き起こしていないことが示唆された。

肺での遺伝子発現は、リアルタイム PCR 解析にて、尿素 SCR エンジン排気で CYP1A1、IL-1 β 、TNF α 遺伝子の発現量の増加がみられている。特に、CYP1A1、IL-1 β 遺伝子は対照エンジン排気では発現量への影響が認められなかったこと、そして、DNA マイクロアレイ解析では、尿素 SCR エンジン排気の 7 日曝露で炎症関連遺伝子の発現増加がみられたことから、肺への影響は尿素 SCR エンジン排気特有の物質による可能性が考えられた。

心臓の遺伝子発現は、リアルタイム PCR 解析で、尿素 SCR エンジン排気ではほとんどの検討遺伝子で発現に大きな影響がみられなかったが、対照エンジン排気では、CYP1A1

遺伝子は 1 日曝露で、HO-1、IL-1 β および TNF α 遺伝子は 7 日曝露で有意な発現量の増加が認められた。この変化の差は、PM 濃度や NO₂ 濃度が両エンジン排気で差があったことに起因している可能性がある。しかし、酸化ストレスへの影響は対照エンジン排気では特に認められなかったことから、応答機構にタイムラグがある可能性も考えられ、その作用機序を解明するために詳細な検討が必要と思われた。

大脳のリアルタイム PCR 解析では、心臓と同様に尿素 SCR エンジン排気ではほとんどの検討遺伝子で発現に影響はほとんど見られず、対照エンジン排気の 1 日曝露で全ての検討遺伝子が有意な発現量の増加を認めた。これについても、対照エンジン排気中の PM 濃度による影響が考えられるが、心臓の発現傾向とは異なり、発現亢進があった曝露初期以外は発現量の差がみられなくなっている。これは、大脳が曝露初期にのみ影響を受けやすいのか、あるいは、曝露後半に別の遺伝子の変動が起こるのかについて検討する必要があると考えられた。また、DNA マイクロアレイ解析では、尿素 SCR エンジン排気の 7 日曝露で、癌や代謝酵素に関連する遺伝子の発現量の増加を確認している。一方、対照エンジン排気の 7 日曝露では、代謝酵素に関連する遺伝子の発現量の増加が確認されている。

これらのことから、第一標的臓器である肺は尿素 SCR エンジン排気で、心臓や大脳では対照エンジン排気で影響が強くみられたことが確認できた。リアルタイム PCR 解析と DNA マイクロアレイ解析では、エンジン排気比較系列による検討でも同一希釈系列の結果と同様な遺伝子発現の傾向であることが認められた。特に肺では、尿素 SCR エンジン排気で影響が認められたことから、それが尿素関連燃焼生成物による可能性も考えられるが、詳細は不明である。

前述のように、本試験では尿素 SCR エンジン排気あるいは対照エンジン排気の PM 濃度および NO₂ 濃度を同一に設定したが、エンジン排気中の尿素由来生成物はほぼ同濃度であったため、尿素添加に対する差異は確認できなかった。しかし、尿素 SCR エンジンシステムからの排気成分は平均粒径が小さく個数濃度が多かったこと、また、アルデヒド類などの微量成分濃度に違いがみられたことから、影響の違いはその他の排気成分の違いによる可能性も否定できない。しかし、これらの影響を与えた排気成分の特定はできなかった。さらに、尿素由来生成物の二次産物あるいは未知の物質の影響も懸念され、さらなる詳細な検討が必要と思われる。

なお、エンジン排気比較系列での影響は、同一希釈系列に比べて弱く、その程度もわずかの差であったことから、短期吸入曝露では尿素由来生成物などの尿素 SCR エンジン排気独自の排気成分よりも、PM や NO₂ が生体に与える影響が大きいことが示唆された。

3.4.4 培養細胞曝露試験

ラットの吸入曝露試験の条件下で、培養細胞曝露装置を用いてヒト呼吸器系由来細胞を曝露した。細胞毒性試験では、両エンジン排気ともに細胞生存率に影響を与えなかった。また、リアルタイム PCR 解析の発現遺伝子に差は認められなかった。しかし、対照エンジン排気で検討した CYP1A1、HO-1 および IL-1 β 遺伝子の発現量の増加傾向が認められた。特に HO-1 遺伝子はその傾向が強かった。このことから、尿素 SCR エンジン排気はヒト呼吸器系由来細胞に対して影響が認められなかったが、対照エンジン排気では特に酸化スト

レスを与える傾向があることが示唆された。

この結果は、ラット吸入曝露試験の結果と類似するものと考えられ、培養細胞を用いた排気曝露は簡易スクリーニング評価として有用であることが確認できた。

3.4.5 まとめ

尿素 SCR エンジン排気あるいは対照エンジン排気による呼吸器を中心とした影響の比較から、本試験条件下では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気と比較して健康への影響が軽度であることが示された。

3.5 今後の課題

本研究を通して、以下のような課題が考えられる。

本実験条件下において、尿素 SCR エンジン排気中の高濃度群の NO₂ 濃度は対照エンジン排気よりも約 2 倍高く、また、尿素由来生成物やその二次生成物、あるいは未知の物質に対する影響評価を行っておらず、それらに対する懸念もある。また、短期間での影響は検出されなかったものの長期間にわたる影響も懸念される。

1) 本研究結果から示された課題

- ・ 尿素 SCR エンジン排気で影響の見られた評価項目に対する詳細な検討
(肺の HO-1 および TNF α 発現量、DNA マイクロアレイ解析など)
- ・ 遺伝子解析と病態生理・生化学的変化との関連性

2) 長期曝露による、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を含めた慢性影響などの評価

- ・ 短期曝露では捉えることのできなかつた生体変化

3) より現実に近い曝露環境を考慮したエンジン運転条件下での評価

- ・ 過渡モード (都市内実走行モードの反映など)

以上のことから、排気成分に変化をもたらす新たな技術の導入に際しては、より詳細な化学成分分析と健康影響評価を行い、その安全性を確認することが望まれる。

3.6 総括

本調査の目的は、開発される次世代低公害車の排気が、既存の排気と比べ健康に対する改善効果がみられることを、あるいは少なくとも増悪しないことを確認することであった。

そこで、尿素 SCR エンジン排気および長期規制対応エンジン (対照エンジン) 排気を実験小動物 (ラット) にそれぞれ短期間吸入曝露し、第一標的臓器である呼吸器への健康影

響を中心に比較評価を行い、エンジンシステムの改良による排気の影響への軽減効果を確認した。評価項目は、体重、臓器重量、BALF（総細胞数、細胞分画）、血液検査（生化学検査、凝固能検査、酸化ストレス能）、遺伝子解析（リアルタイム PCR 解析、DNA マイクロアレイ解析）、病理解析（光顕）とした。

また、ラットに吸入曝露したエンジン排気と同様の排気をヒト呼吸器系由来細胞に曝露して、*in vitro* 評価試験（細胞毒性試験および遺伝子解析）で評価した。

【ラット短期（急性）吸入曝露試験】

- ・ 同一希釈系列（量・反応関係による検討）では、各エンジンシステムからの排気の影響を量・反応関係で評価した。尿素 SCR エンジン排気の肺組織内炭粉貪食マクロファージや II 型上皮細胞の増生、BALF 中リンパ球や血中酸化ストレスマーカーの軽微な変化が認められたが、対照エンジン排気での変化が大きかった。しかし、肺の遺伝子解析ではそれらを反映する結果は得られなかった。
- ・ エンジン排気比較系列（尿素添加システムの有無による検討）では、PM 濃度および NO₂ 濃度を同一にしてその影響を評価した。尿素 SCR エンジン排気で肺組織の影響は認められなかったが、対照エンジン排気では軽微な影響が認められた。一方、尿素 SCR エンジン排気で肺の遺伝子発現量に影響がみられたが、尿素 SCR エンジン排気のどの成分が関与しているかは特定できなかった。

【ヒト呼吸器系由来培養細胞を用いた細胞曝露試験】

- ・ 対照エンジン排気により酸化ストレス影響を示唆する傾向が認められ、それは吸入曝露試験の結果と類似するものと考えられた。

本試験条件下では、尿素 SCR エンジン排気が健康に及ぼす影響は、従来のディーゼルエンジン（長期規制対応エンジン）排気と比べて概ね軽減されていると判断できる。

ただし、本短期（急性）曝露試験の結果から、長期間曝露の影響を予測することは出来ない（影響の質と量共に変化する可能性がある）ことに留意する必要があることを付記しておく。

3.7 謝辞

本調査を遂行するにあたり、試験計画から結果審議まで多岐にわたり、御指導御鞭撻いただきました健康影響調査 WG 委員の諸先生方に深謝申し上げます。

3.8 References

Ball JC. A toxicological evaluation of potential thermal degradation products of urea. SAE 2001-01-3621.

Baulig A, Garlatti M, Bonvallet V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A.

Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust

- particles in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285(3):L671-L679, 2003.
- Brodsky JB, Cohen EN, Brown BW Jr, Wu ML, Witcher CE. Exposure to nitrous oxide and neurologic disease among dental professionals. *Anesth. Analg.* 60(5):297-301, 1981.
- Fujii T, Hogg JC, Keicho N, Vincent R, Van Eeden SF, Hayashi S. Adenoviral E1A modulates inflammatory mediator expression by lung epithelial cells exposed to PM10. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284(2):L290-L297, 2003.
- Gross KB. Pulmonary function testing of animals chronically exposed to diluted diesel exhaust. *J. Appl. Toxicol.* 1(2):116-123, 1981.
- Health Effects Institute Coordinating Research Council. The Advanced Collaborative Emissions Study (ACES), Project plan for emission characterization and health effects assessment. May: 1-63, 2004.
- Hirano S. Quantitative time-course profiles of bronchoalveolar lavage cells following intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice. *Ind. Health.* 35(3):353-358, 1997.
- Huttunen K, Hyvarinen A, Nevalainen A, Komulainen H, Hirvonen MR. Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ. Health Perspect.* 111(1):85-92, 2003.
- Inoue K, Takano H, Sakurai M, Oda T, Tamura H, Yanagisawa R, Shimada A, Yoshikawa T. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances coagulatory disturbance with endothelial damage and systemic inflammation related to lung inflammation. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 231(10):1626-1632, 2006.
- Ishinishi N, Kuwabara N, Nagase S, Suzuki T, Ishiwata S, Kohno T. Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty diesel engines on F344 rats. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 13:329-348, 1986.
- Le Prieur E, Vaz E, Bion A, Dionnet F, Morin JP. Toxicity of diesel engine exhausts in an in vitro model of lung slices in biphasic organotypic culture: induction of a proinflammatory and apoptotic response. *Arch. Toxicol.* 74(8):460-466, 2000.
- Li C, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G, Taya K. Anti-androgenic activity of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *Eur. J. Pharmacol.* 543(1-3):194-199, 2006.
- Li QY, Huang SG, Wan HY, Wu HC, Zhou T, Li M, Deng WW. Effect of smoking cessation on airway inflammation of rats with chronic bronchitis. *Chin. Med. J. (Engl).* 120(17): 1511-1516, 2007.
- Hochscheid R, Schuchmann U, Kotte E, Kranz S, Heinrichs S, Müller B. NO₂-induced acute and chronic lung injury cause imbalance of glutathione metabolism in type II pneumocytes. *Med. Sci. Monit.* 11(8):BR273-279, 2005.
- Noritake S, Ogawa K, Suzuki G, Ozawa K, Ikeda T. Pulmonary inflammation in brown Norway rats: possible association of environmental particles in the animal room environment. *Exp. Anim.* 56(5): 319-327, 2007.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of

- inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* 16(6-7):437-445, 2004.
- Pacheco KA, Tarkowski M, Sterritt C, Negri J, Rosenwasser LJ, Borish L. The influence of diesel exhaust particles on mononuclear phagocytic cell-derived cytokines: IL-10, TGF-beta and IL-1 beta. *Clin. Exp. Immunol.* 126(3):374-383, 2001.
- Rowland AS, Baird DD, Shore DL, Weinberg CR, Savitz DA, Wilcox AJ. Nitrous oxide and spontaneous abortion in female dental assistants. *Am. J. Epidemiol.* 141(6):531-538, 1995.
- Tenorio-Velázquez VM, Barrera D, Franco M, Tapia E, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J. Hypothyroidism attenuates protein tyrosine nitration, oxidative stress and renal damage induced by ischemia and reperfusion: effect unrelated to antioxidant enzymes activities. *BMC Nephrol.* Nov 7(6) 12, 2005.
- Toyoda S, Yamamoto SI, Arai S, Nara H, Yoshida N, Kashiwakura K, Akiyama KI. Isotopomeric characterization of N₂O produced, consumed, and emitted by automobiles. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 22(5):603-612, 2008.
- Tsukue N, Toda N, Tsubone H, Sagai M, Jin WZ, Watanabe G, Taya K, Birumachi J, Suzuki AK. Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 63(2):115-126, 2001.
- Valavanidis A, Vlahoyianni T, Fiotakis K. Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radic Res.* 39(10):1071-1081, 2005.
- Vogel CF, Sciullo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N, Matsumura F. Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ. Health Perspect.* 113(11):1536-1541, 2005.
- Xu S, Hao X, Stanford K, McAllister TA, Larney FJ, Wang J. Greenhouse gas emissions during co-composting of calf mortalities with manure. *J. Environ. Qual.* 36(6):1914-1919, 2007.
- Yu JB, Yao SL. Protective effects of hemin pretreatment combined with ulinastatin on septic shock in rats. *Chin. Med. J. (Engl).* 121(1): 49-55, 2008.
- 加藤温中、京野洋子、桑原紀之。ディーゼル排気長期吸入後のラット肺の電顕観察－非腫瘍性病変について－。日本胸部疾患学会雑誌 30(2):238-247, 1992.
- 環境省ホームページ：「大気汚染に関わる環境基準」。 <http://www.env.go.jp/kijun/taiki.html>
- 環境省ホームページ：「平成 18 年度地方公共団体等における有害大気汚染物質モニタリング調査結果について」。 http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/mon_h18/index.html
- 環境省ホームページ：「局地的大気汚染の健康影響に関する疫学調査－そら (SORA) プロジェクター」。 <http://www.env.go.jp/chemi/sora/index.html>
- 環境省ホームページ：「環境保健サーベイランス調査」。
<http://www.env.go.jp/chemi/survey/index.html>
- 厚生労働省ホームページ：「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会 中間報告書－第 8 回～第 9 回のまとめについて」。
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/02/h0208-3.html>
- 財団法人日本自動車研究所：「ディーゼル排気と循環器疾患－疾患モデル動物の吸入曝露実

験一」。2005年。

高橋 徹、清水裕子、井上一由、森松博史、榎田佳奈、大森恵美子、赤木玲子、森田 潔。
酸化ストレスに対するヘムオキシゲナーゼ-1の臓器保護的役割。日薬理誌 (Folia
Pharmacol. Jpn.) 130(4):252-256, 2007.

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO):「平成15年度調査報告書 高
効率クリーンエネルギー自動車の研究開発 成果報告書」。平成16年3月。

日産ディーゼル工業株式会社ホームページ。 <http://www.nissandiesel.co.jp/>

日本チャールス・リバー株式会社ホームページ:「近交系ラットF344/DuCrI CrIj (Fischer)」。
<http://www.crj.co.jp/service/product/domestic06.html>

Fischerラット研究会編:「フィッシャーラット」。1996年。

古山 昭子、藤谷 雄二、平野靖史郎。ナノ粒子を多く含むディーゼル排気曝露による酸
化ストレス誘導。第49回大気環境学会年会 講演要旨集 p.529、2008年。