

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。

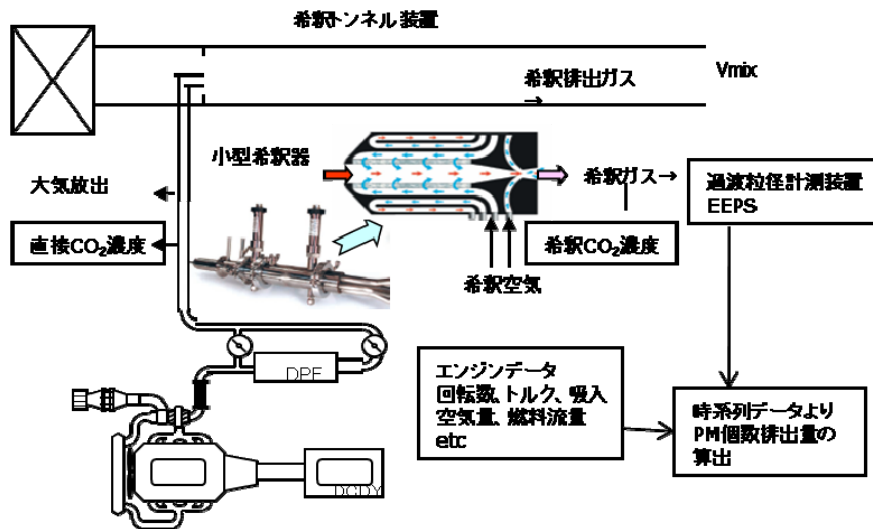


図 1.1.1 希釈トンネル装置と希釈器を用いたエンジン過渡排出 PM 個数濃度測定の流れ

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。

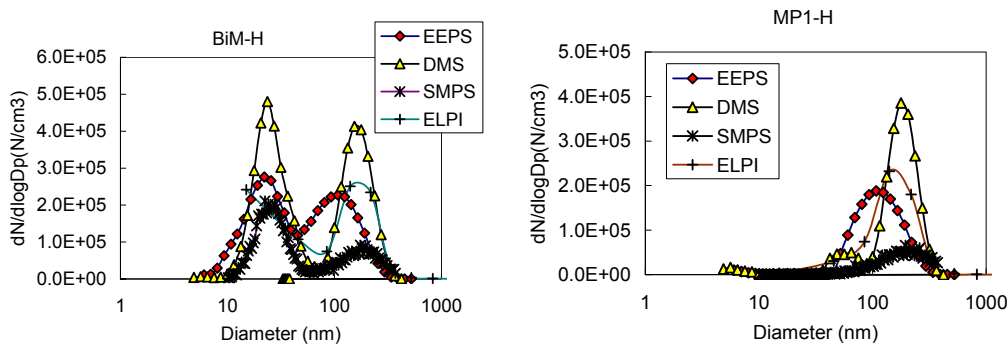


図 1.1.2 CAST 発生 PM の測定結果

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。

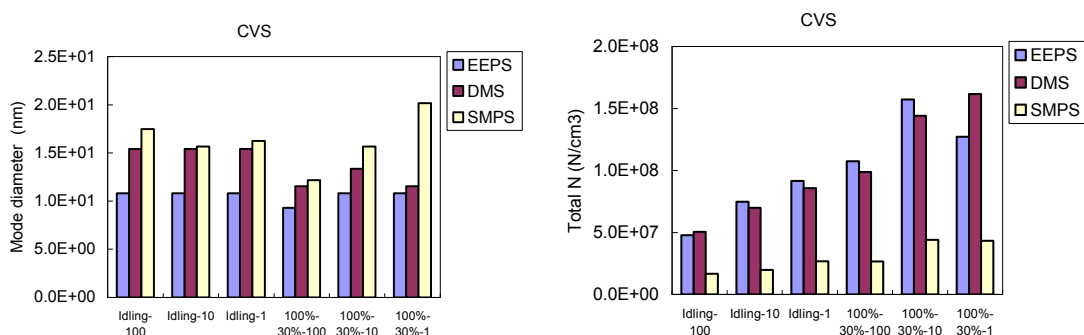


図 1. 1. 3 エンジン排出 PM の測定結果

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気中に放出した。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。

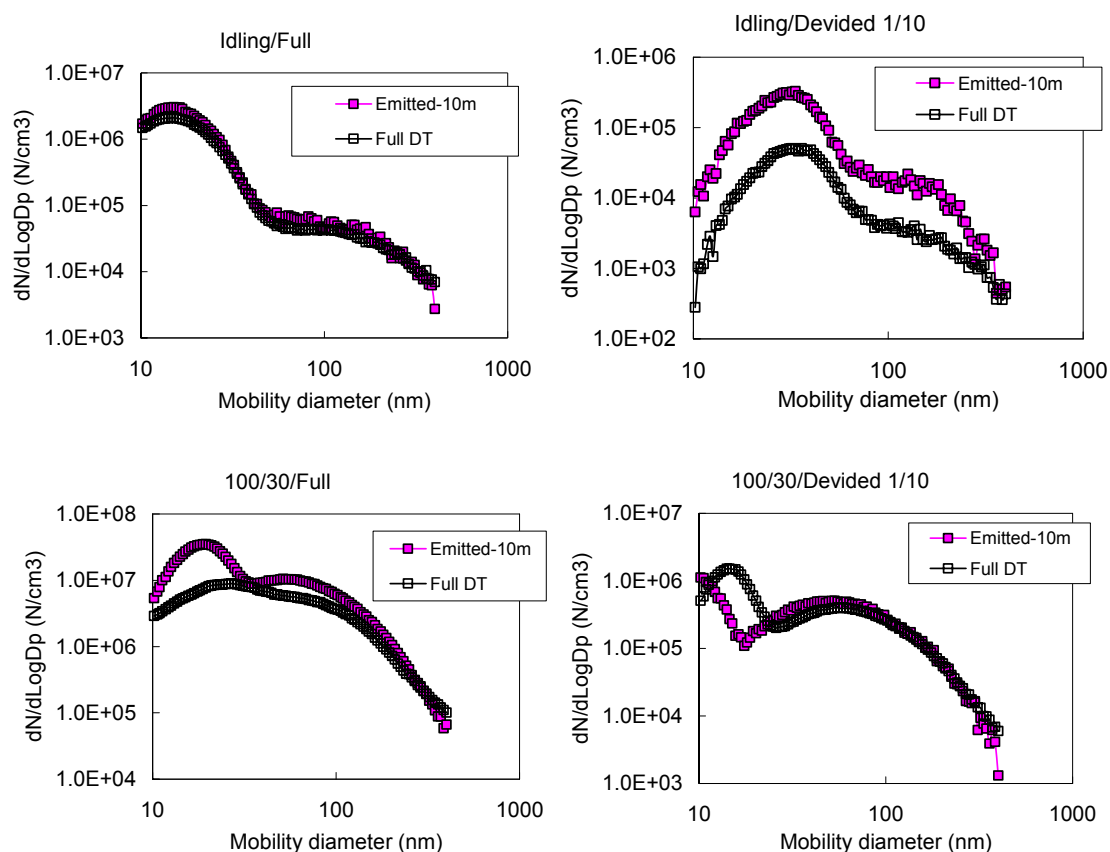


図 1.1.4 希釈トンネル全量導入と大気放出の個数濃度分布の比較

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。

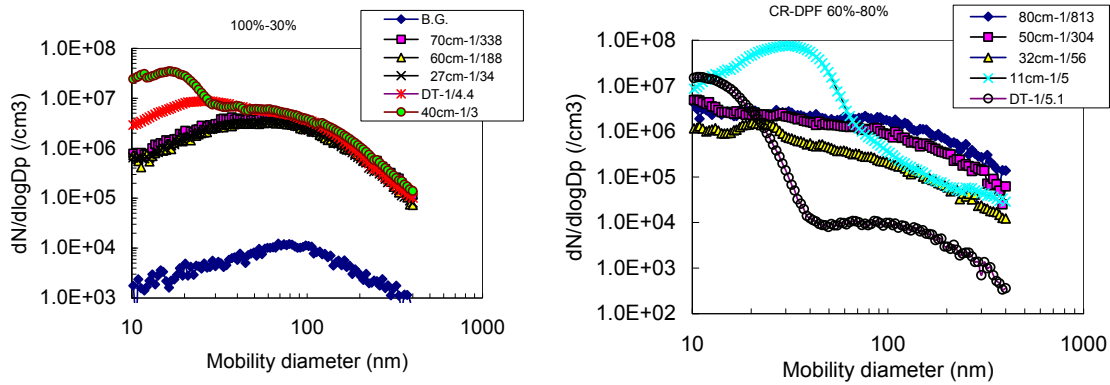


図 1.1.5 希釈トンネル全量導入と大気放出の個数濃度分布の比較

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。

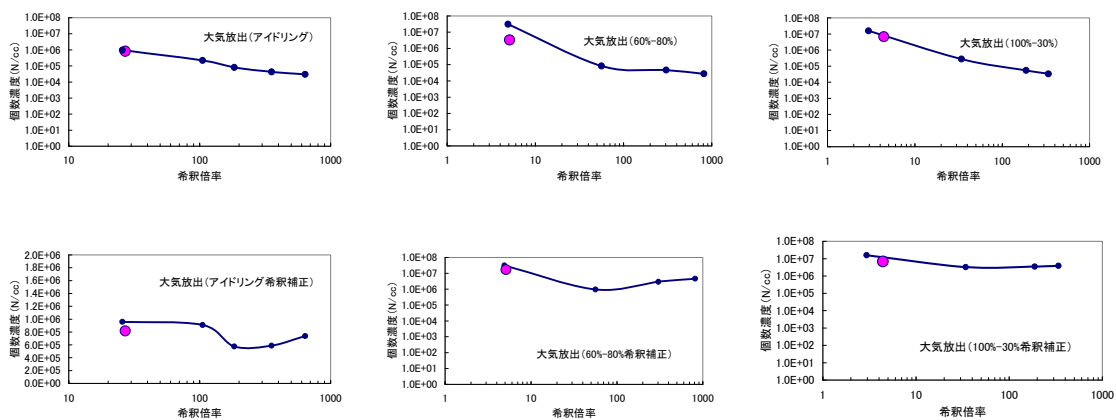


図 1.1.6 大気放出時の希釈倍率と個数濃度

(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。

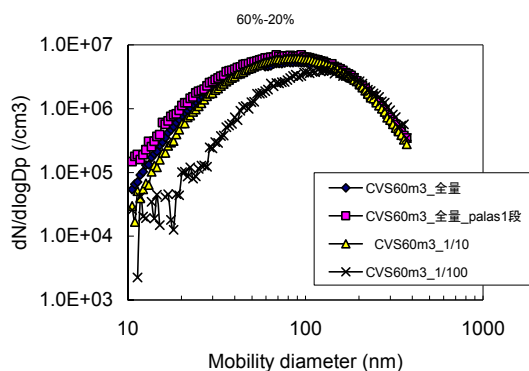


図 1.1.7 排出ガス分割導入時の粒径変化例

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。

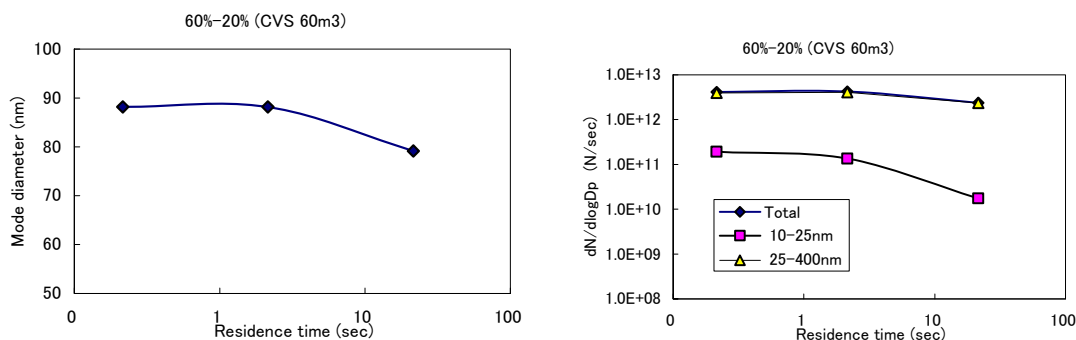


図 1.1.8 滞留時間とモード径および個数濃度

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。

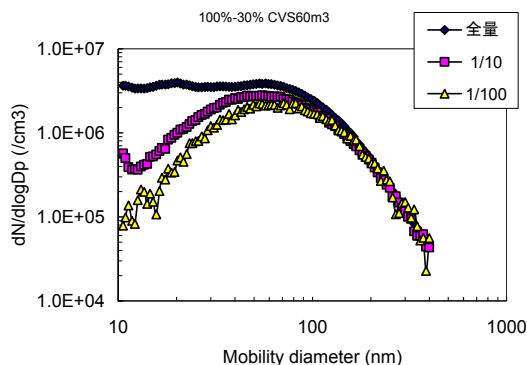


図 1.1.9 希釈トンネル内排出ガス全量導入時の個数分布
(PM 個数濃度のみ変化)

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。

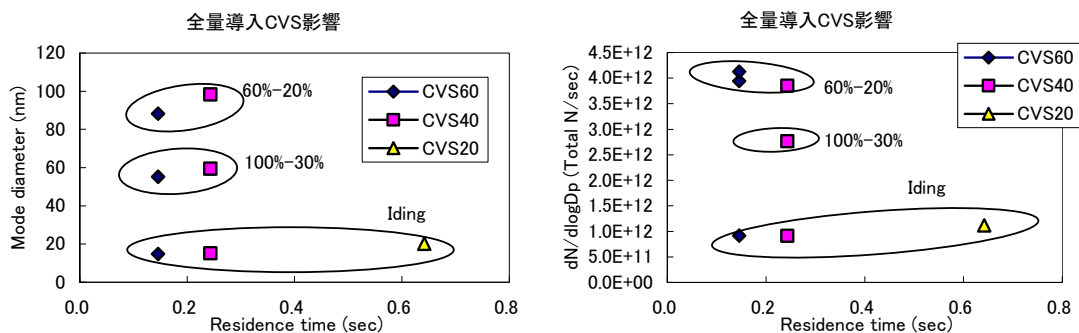


図 1.1.10 希釈トンネル流量（滞留時間）の影響

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。

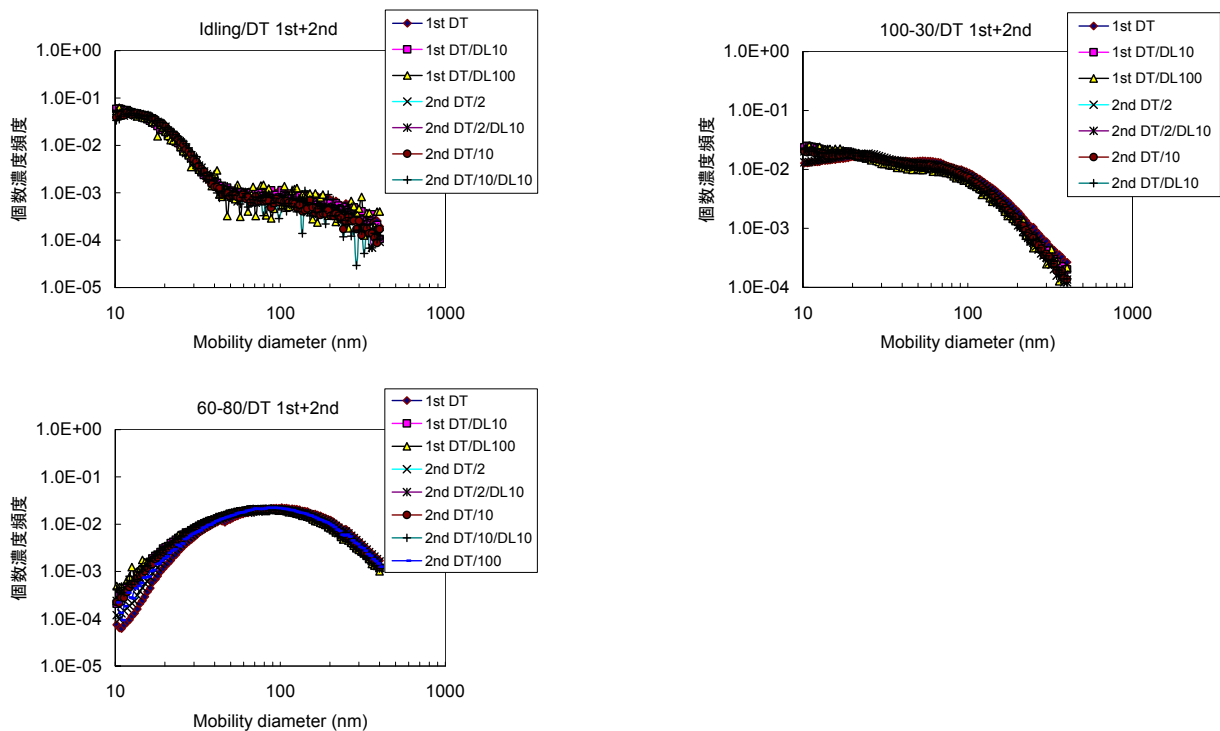


図 1. 1. 11 総個数値に対する各粒径の個数比率の比較

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。

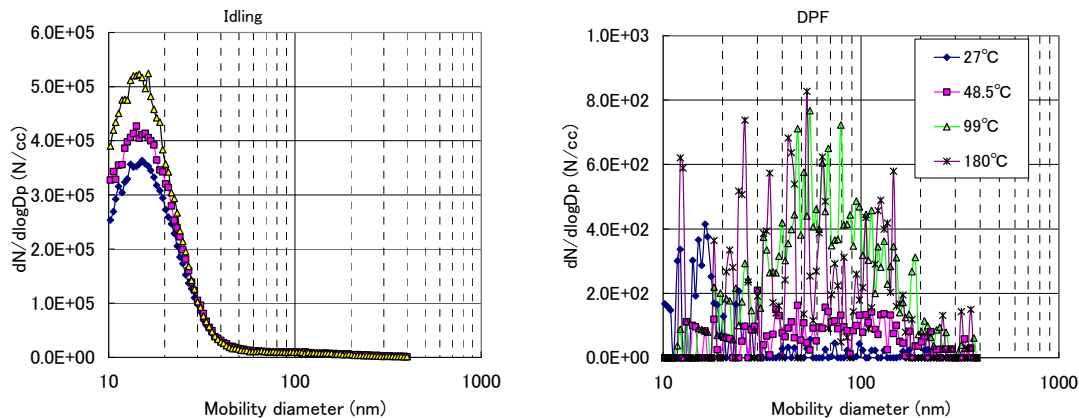


図 1.1.12 希釈トンネル内排出ガス導入時とその後の壁面個数濃度の変化

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。

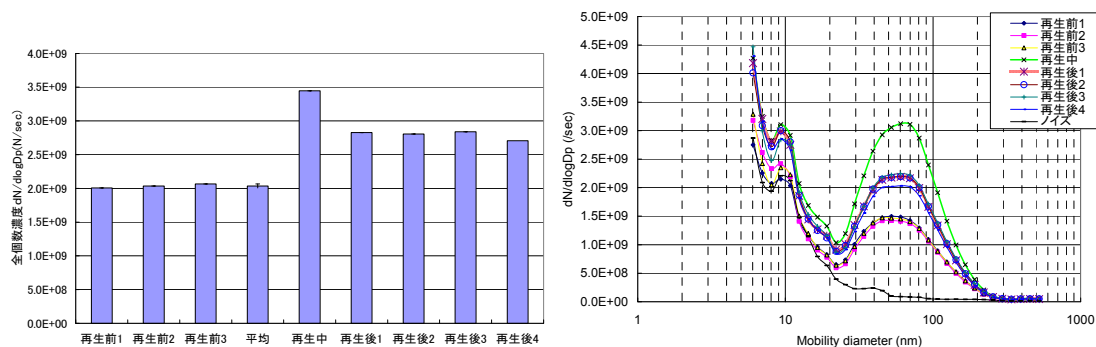


図 1.1.13 DPF 再生前後の PM 個数濃度

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。

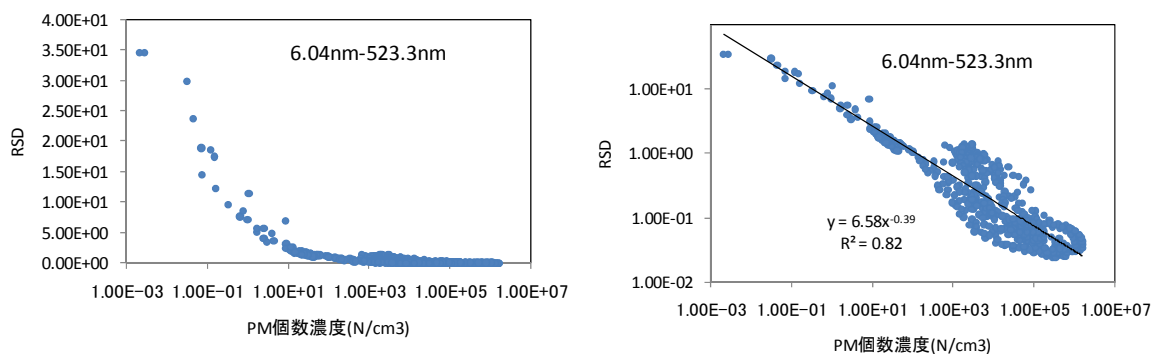


図 1.1.14 PM 個数濃度と RSD の関係（6.04 nm～523.3 nm の全個数）

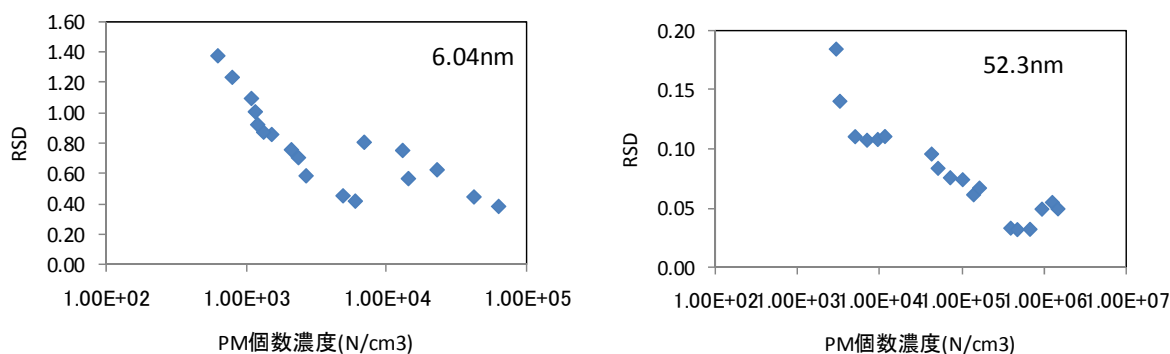


図 1.1.15 PM 個数濃度と RSD の関係（粒径別の全個数）

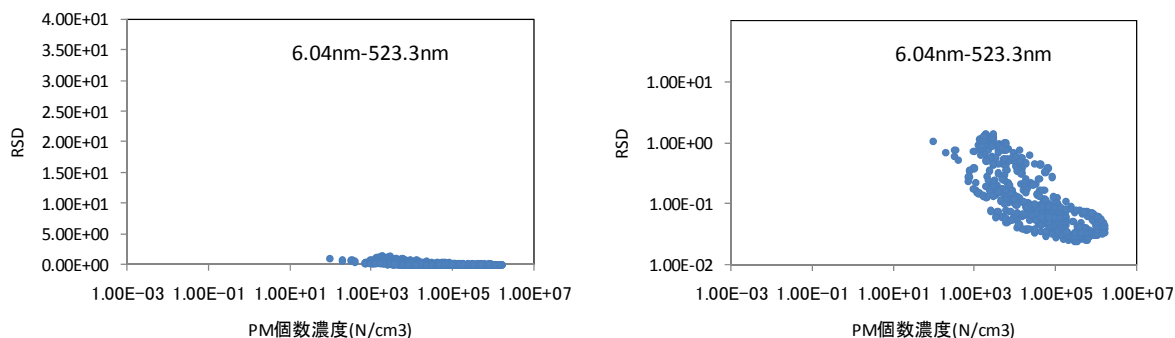


図 1.1.16 PM 個数濃度と RSD の関係
（6.04 nm～523.3 nm の全個数、ノイズレベル以下を除外）

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ー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、レーザー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。

レーザー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、パルスレーザーを用いる場合、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ー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う。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、レーザーを用いる場合、レーザー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、レーザー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う特徴がある。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、レーザー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。

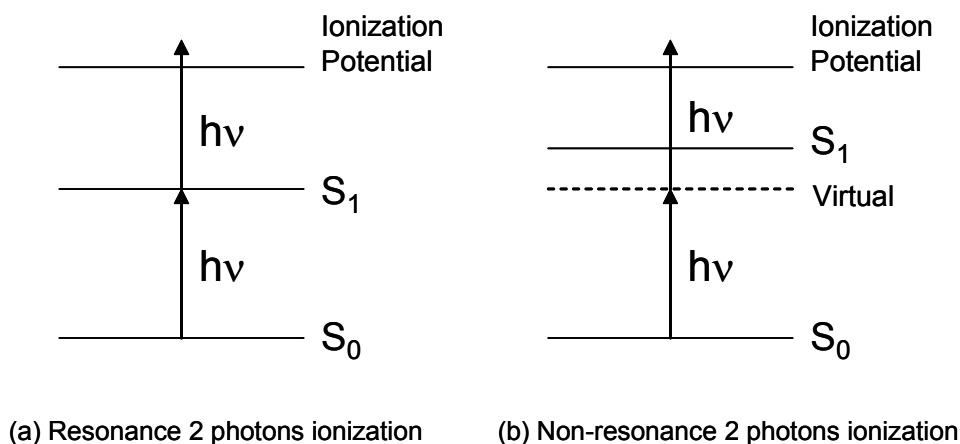


Fig. 1.2.1 2 光子イオン化過程

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。

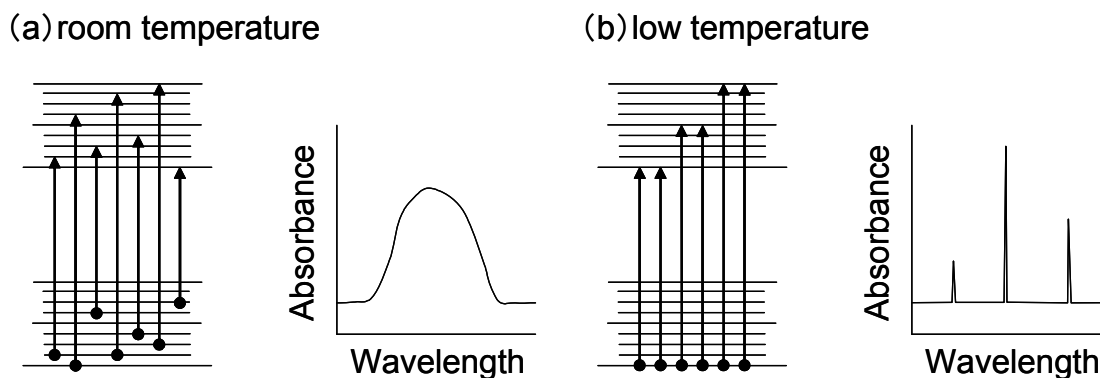


Fig. 1.2.2 分子温度と吸収スペクトルの関係

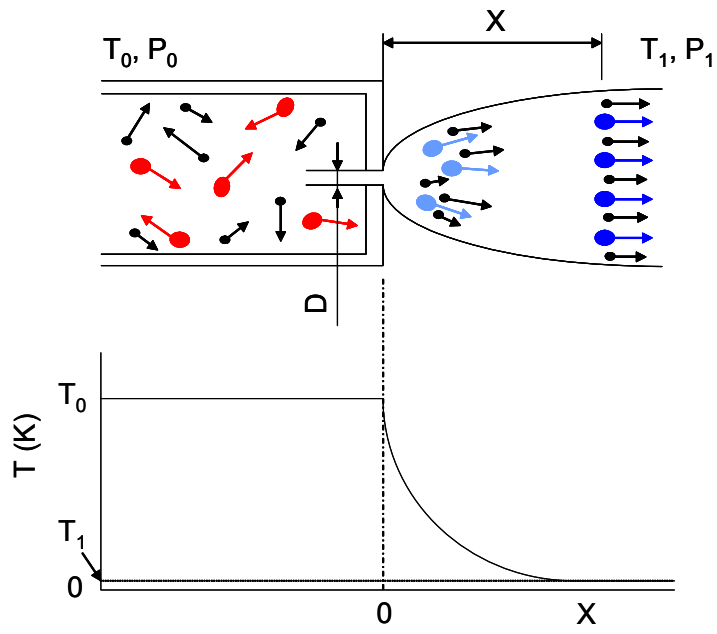


Fig. 1.2.3 超音速分子ジェットによる温度低下

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

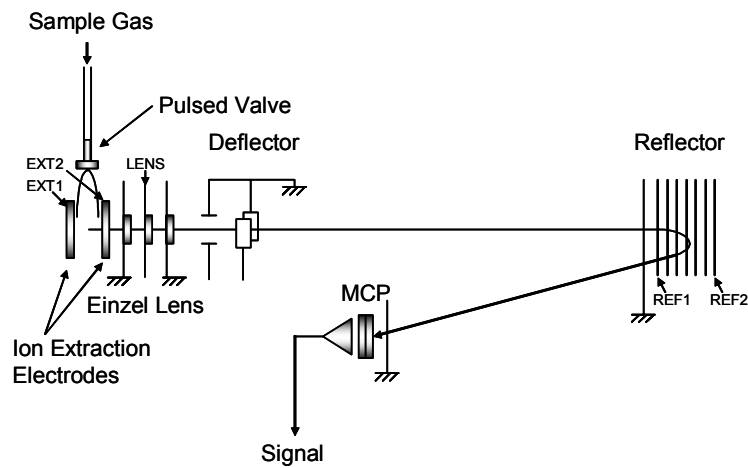


Fig.1.2.5 質量分析装置内部の構造図

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。

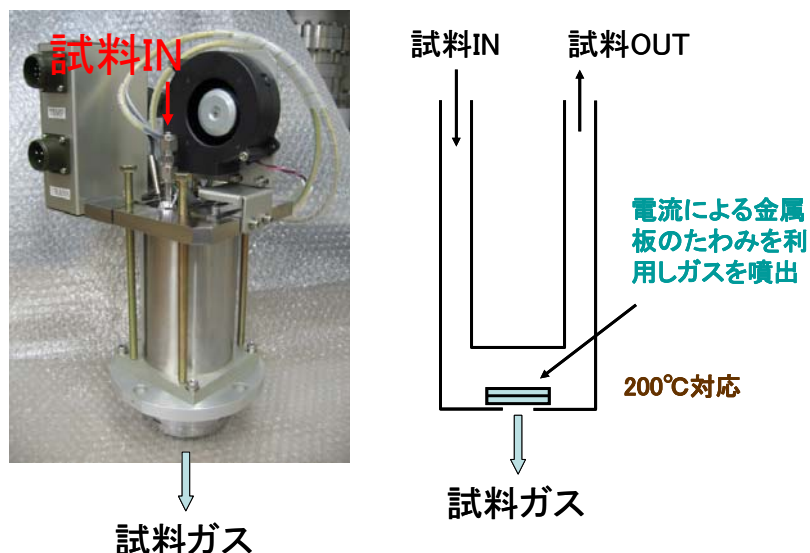


Fig.1.2.6 高温短パルスバルブの写真と内部構造

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。

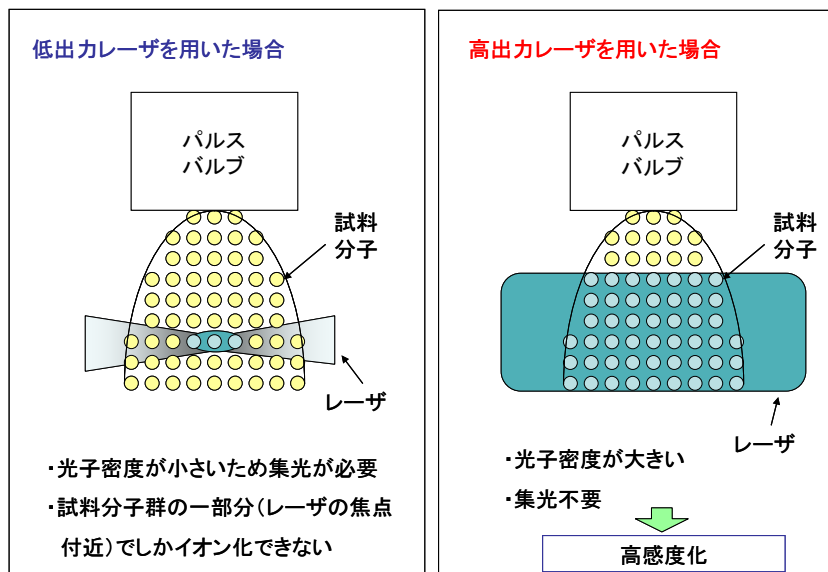


Fig.1.2.7 レーザエネルギーと照射方法

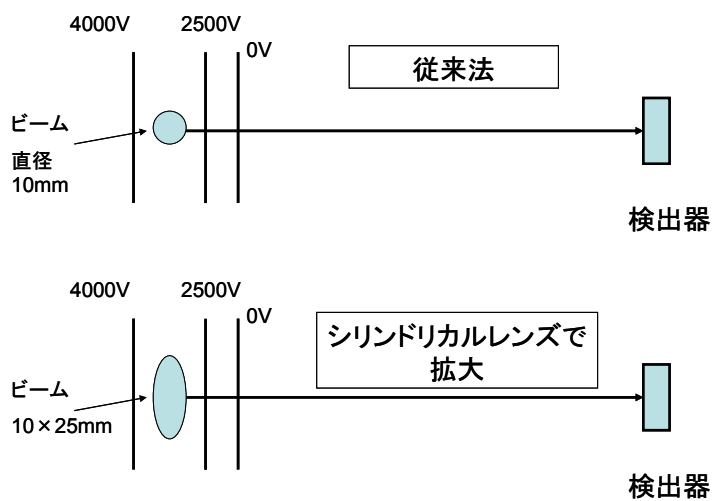


Fig. 1.2.8 シリンダリカルレンズを用いたレーザービームの拡大照射

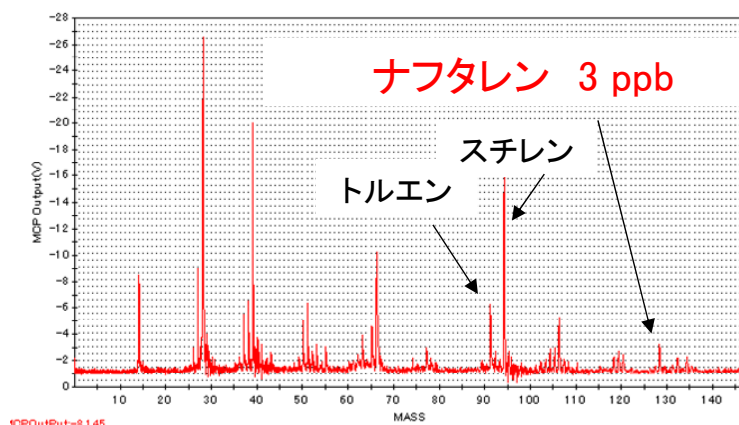


Fig.1.2.9 シリンドリカルレンズを用いたレーザービームの拡大照射による標準試料の質量スペクトル

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。

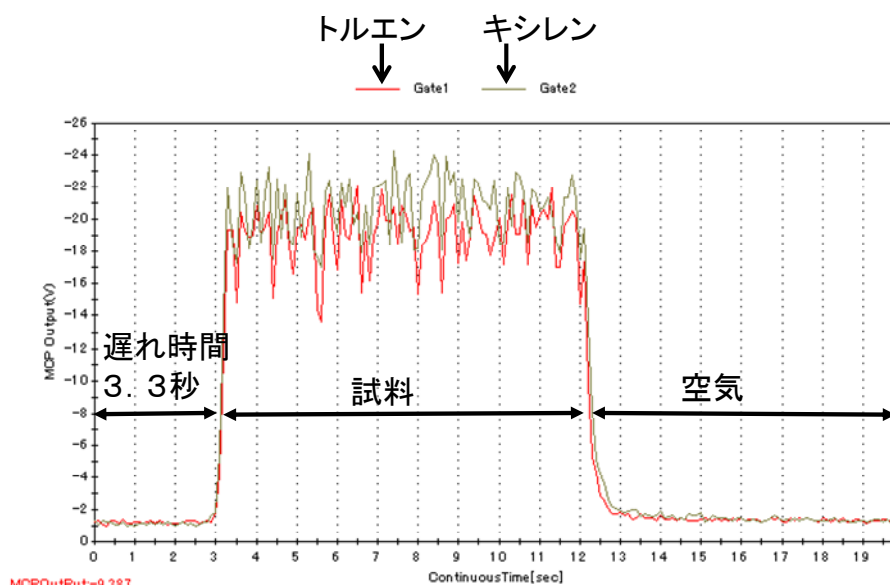


Fig. 1.2.11 模擬過渡計測（ヒートホース 45 m 使用による影響）

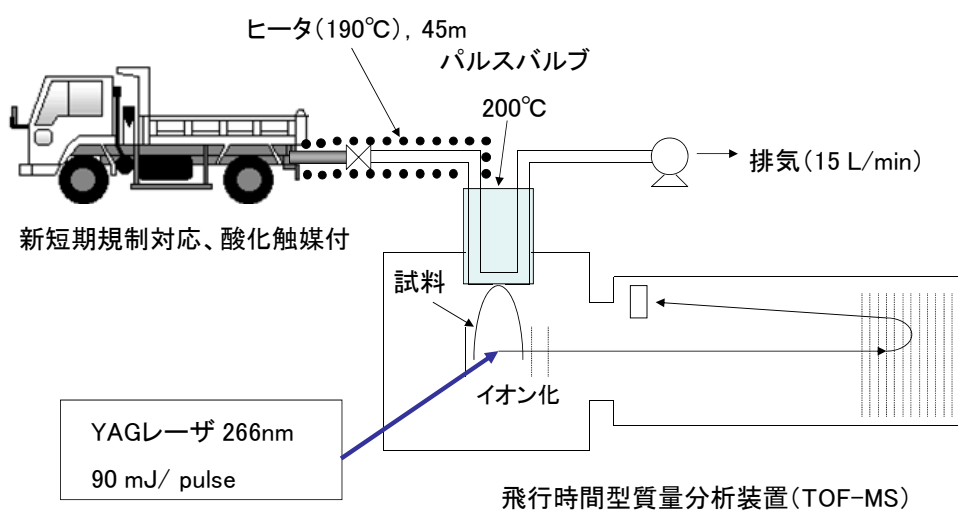


Fig. 1.2.12 実験装置図

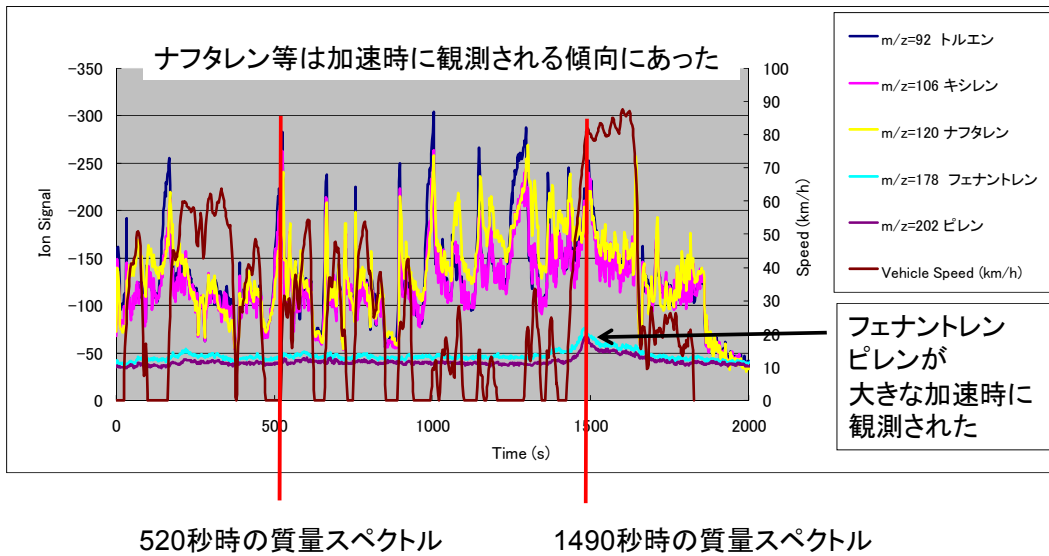


Fig. 1.2.13 ディーゼル車（新短期規制対応、酸化触媒付）排出ガス中芳香族成分の過渡計測

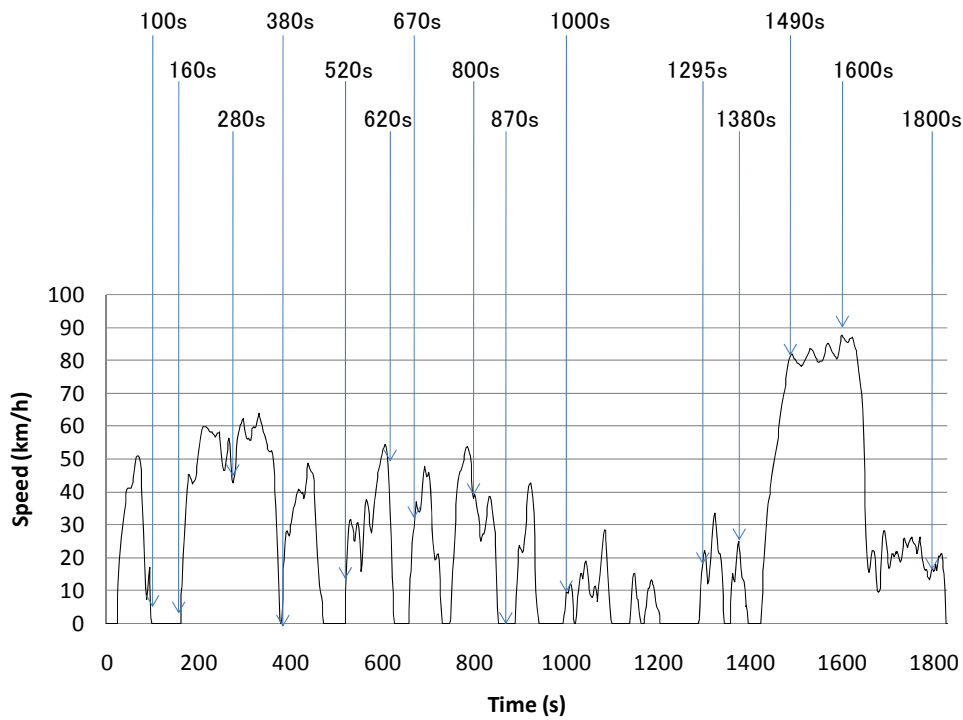


Fig. 1.2.14 JE05 モードと質量スペクトルの測定ポイント

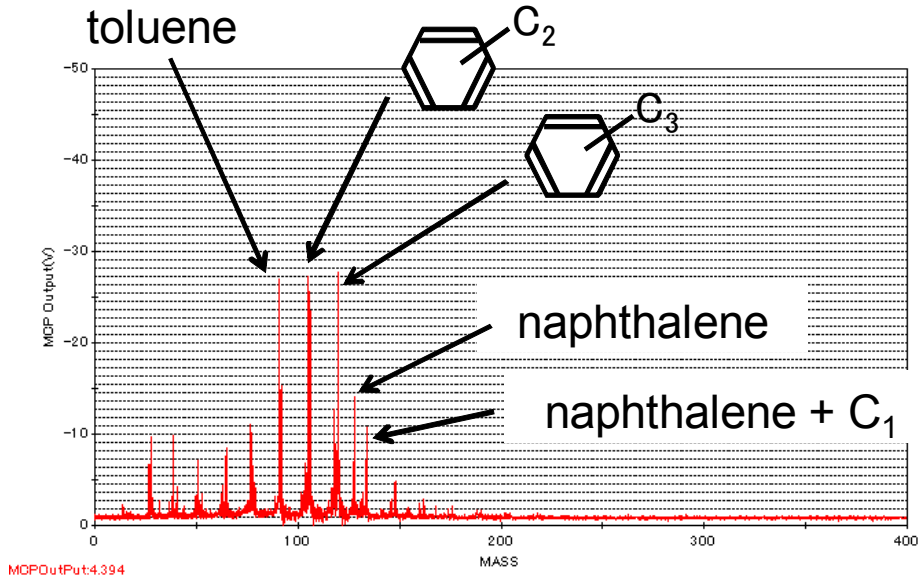


Fig. 1.2.15 JE05 モード開始 520 秒時の質量スペクトル

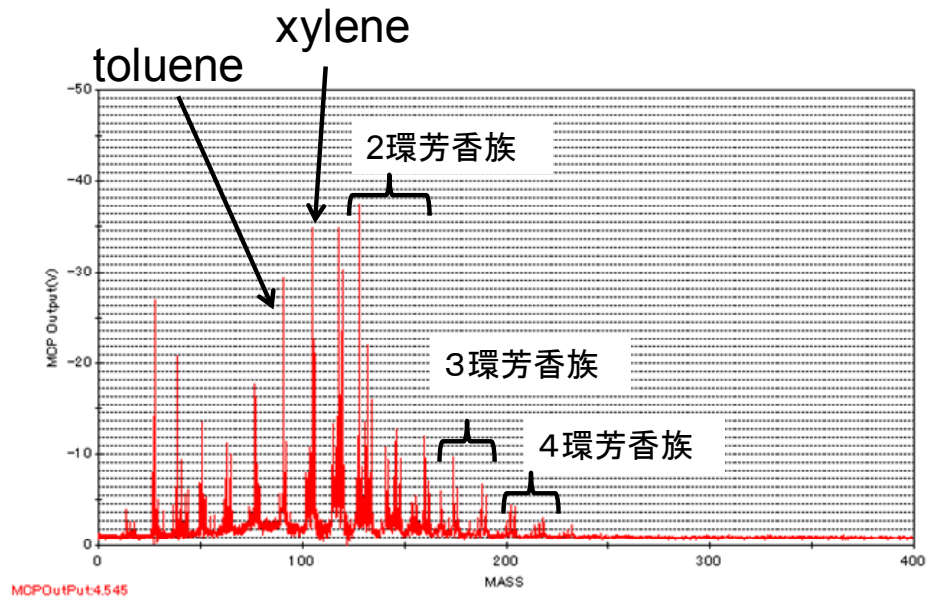


Fig. 1.2.16 JE05 モード開始 1490 秒時の質量スペクトル

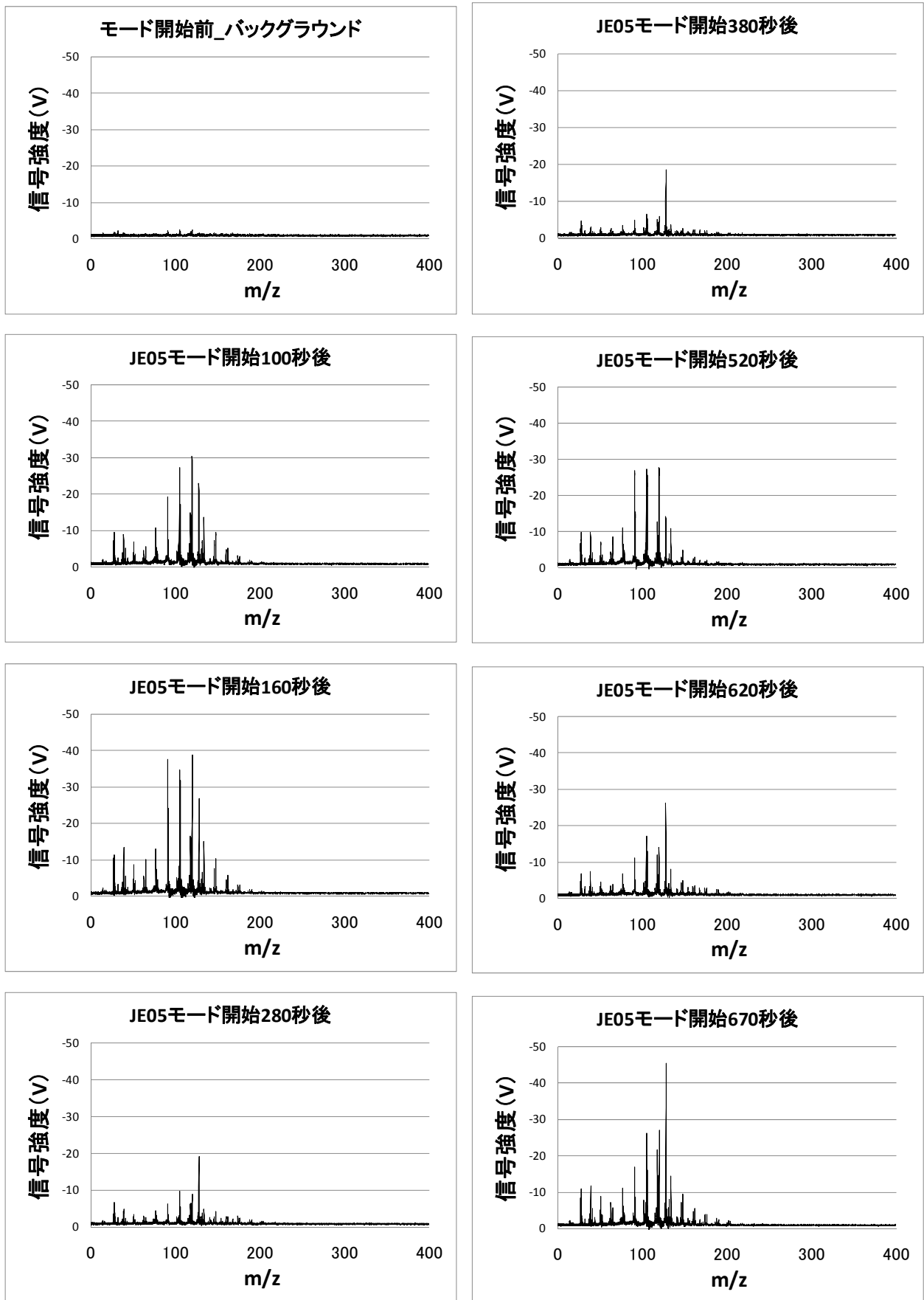


Fig. 1.2.17 予備試験車両（新短期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル

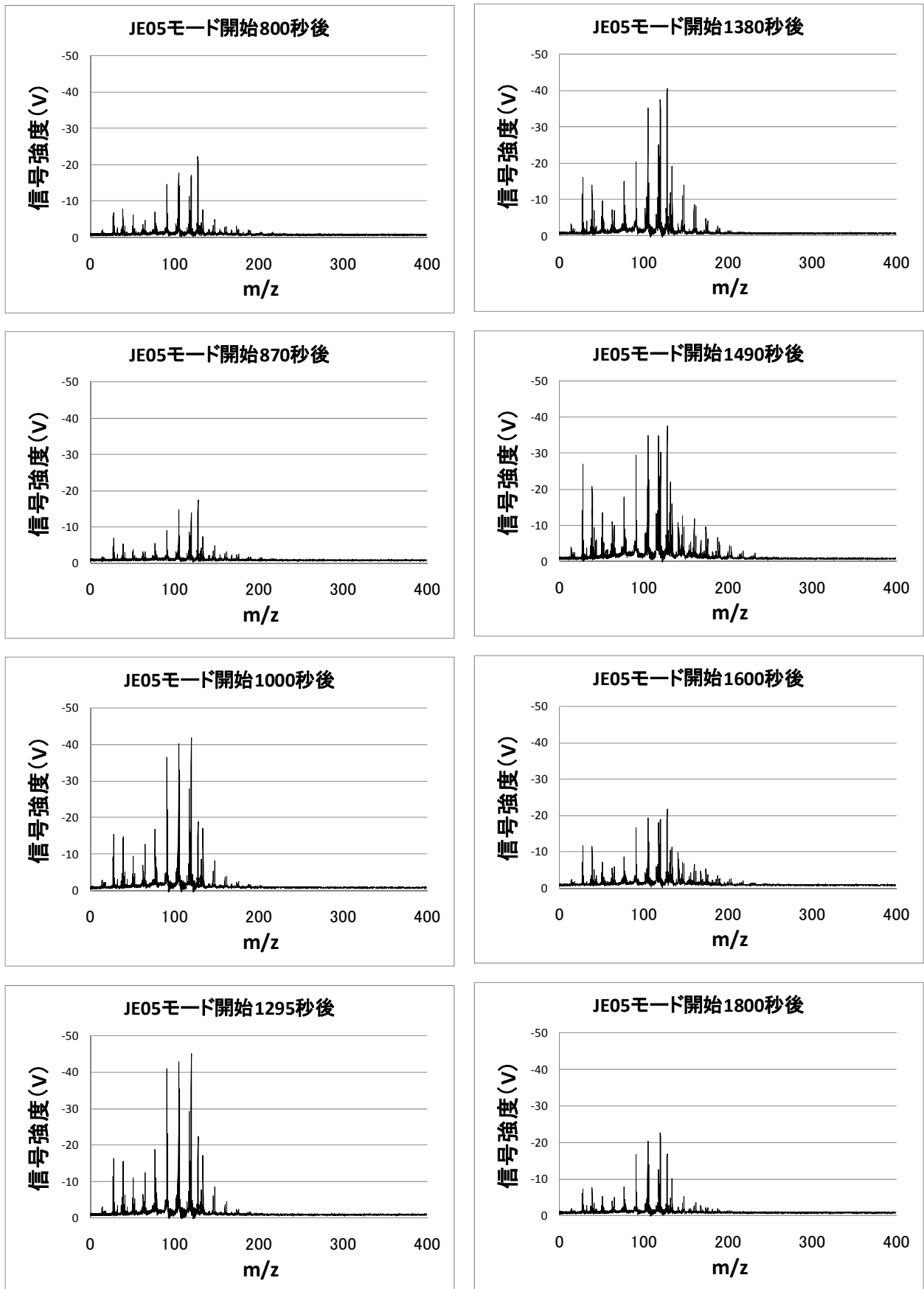


Fig. 1.2.18 予備試験車両（新短期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル

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

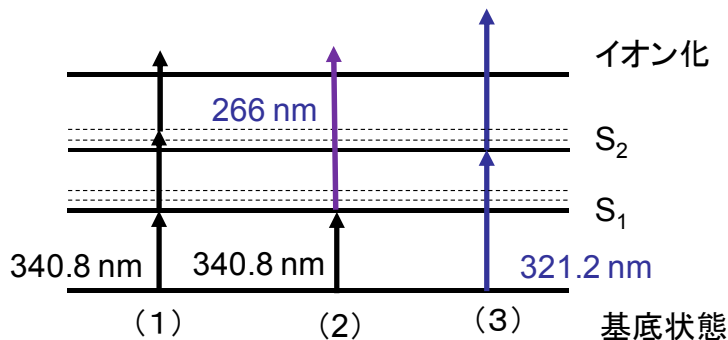


Fig. 1.2.19 ピレンのエネルギー準位

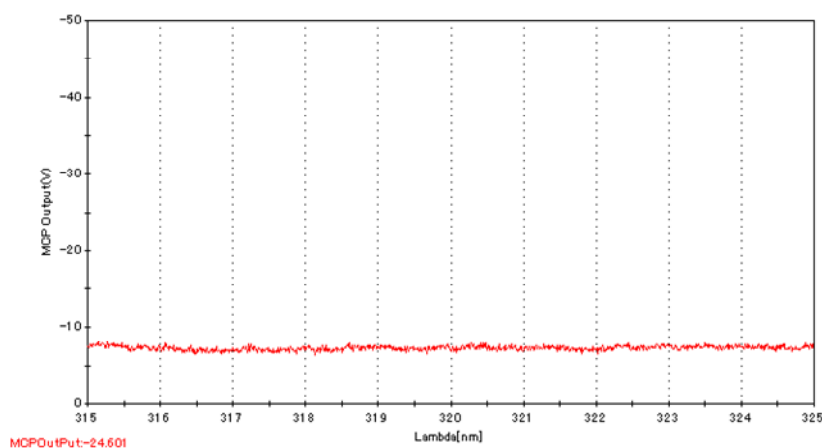


Fig. 1.2.20 ピレンの多光子イオン化スペクトル

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 1054cm^3 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

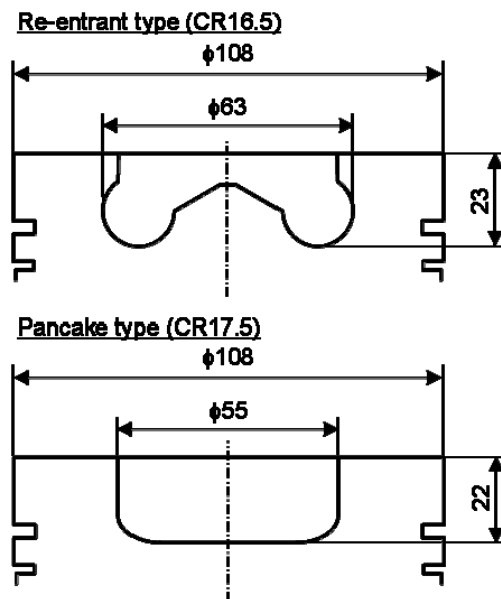


Fig. 1.3.1 Combustion chamber

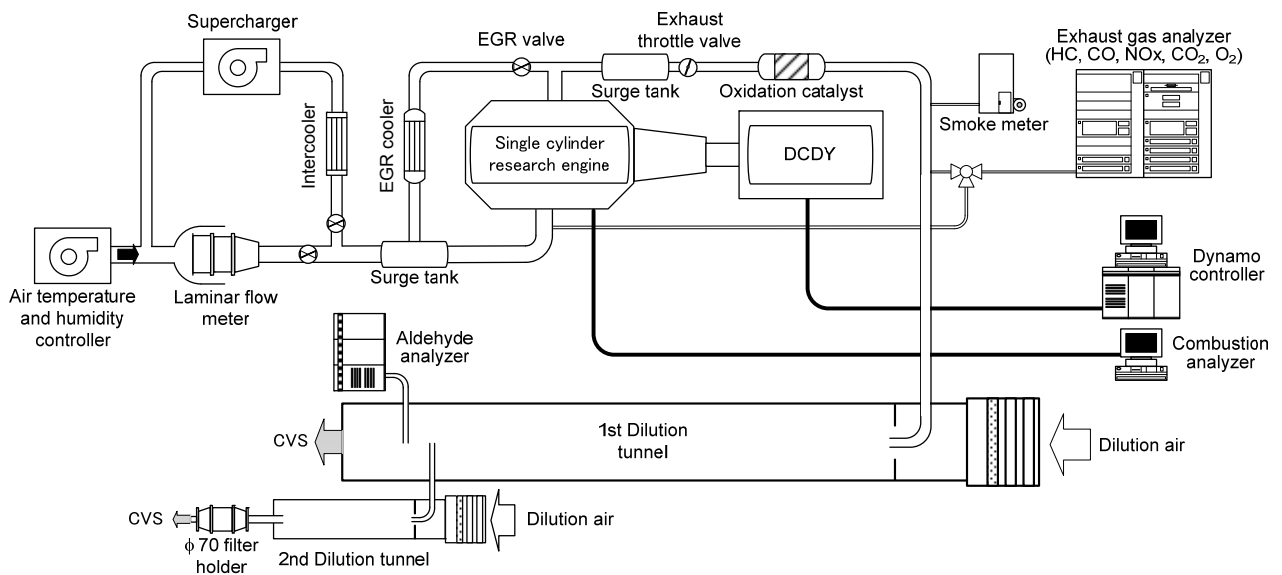


Fig.1.3.2 Schematic diagram of experiment apparatus

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。


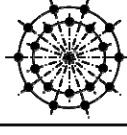
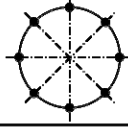
Table1.3.2. Regulated emissions measuring equipment

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。

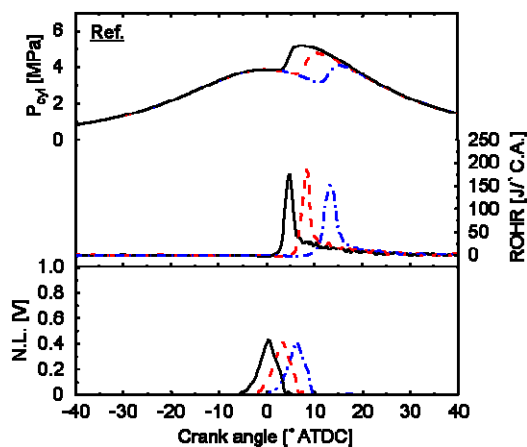


Fig.1.3.3 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (Ref., $\lambda = 4.6$)

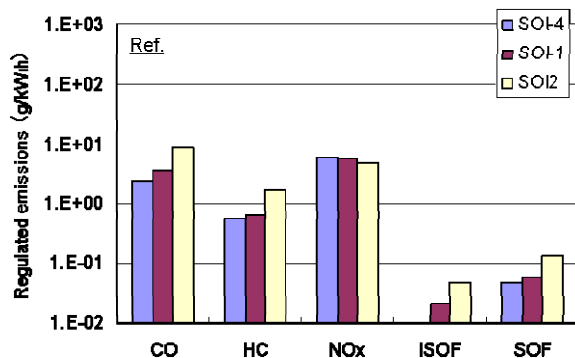


Fig.1.3.4 Effect of SOI timing on engine emissions (Ref., $\lambda = 4.6$)

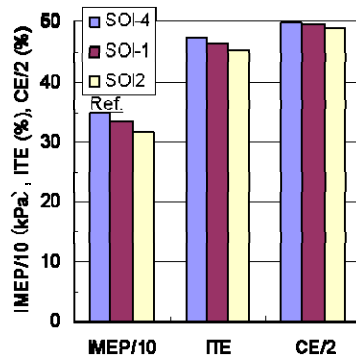


Fig.1.3.5 Effect of SOI timing on engine performance (Ref., $\lambda = 4.6$)

(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。

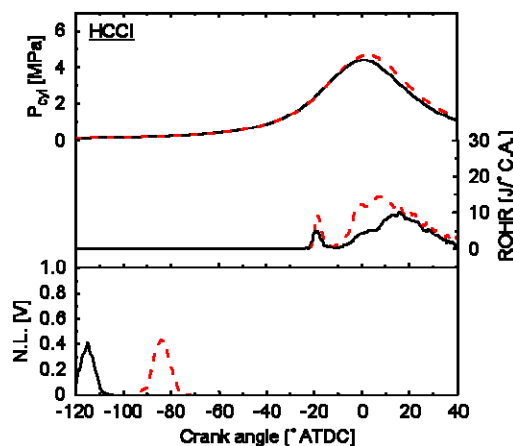


Fig.1.3.6 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (HCCI, $\lambda = 4.6, 5.8$)

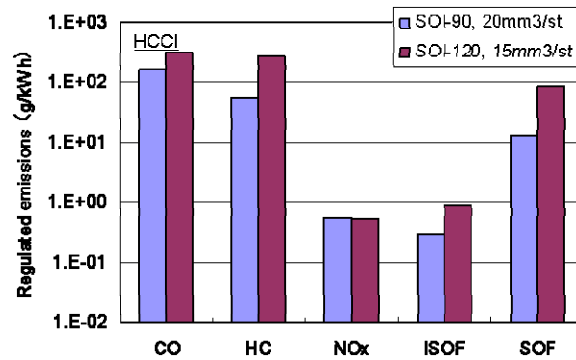


Fig.1.3.7 Effect of SOI timing on engine emissions (HCCI, $\lambda = 4.6, 5.8$)

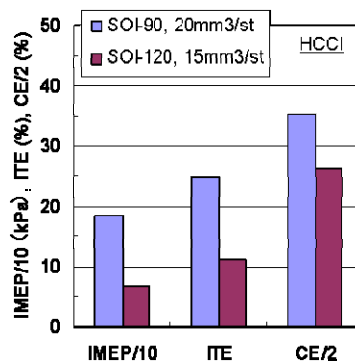


Fig.1.3.8 Effect of SOI timing on engine performance (HCCI, $\lambda = 4.6, 5.8$)

(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、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。

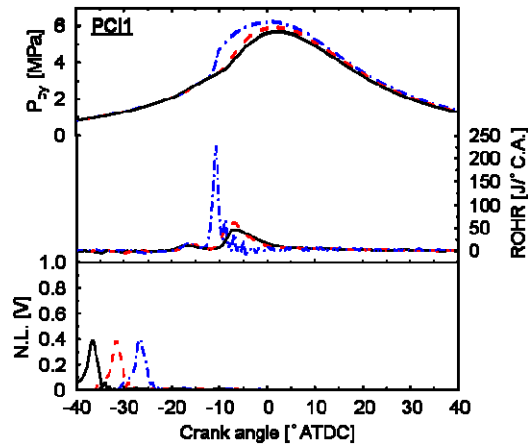


Fig.1.3.9 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (PCI1, $\lambda = 2.8$)

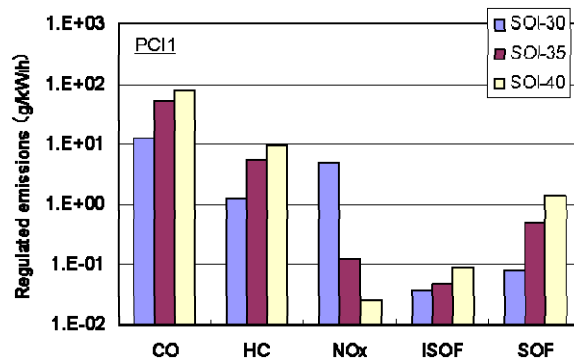


Fig.1.3.10 Effect of SOI timing on engine emissions (PCI1, $\lambda = 2.8$)

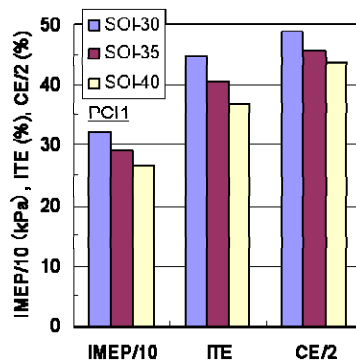


Fig.1.3.11 Effect of SOI timing on engine performance (PCI1, $\lambda = 2.8$)

(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。

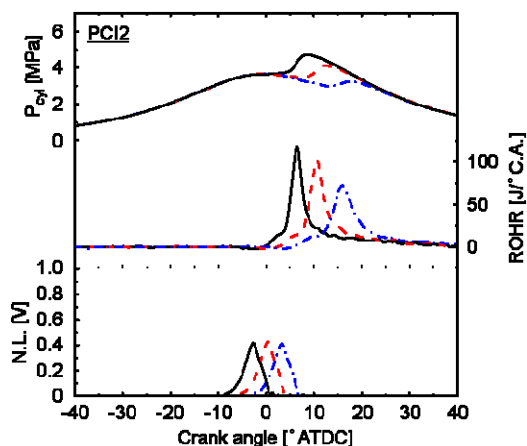


Fig.1.3.12 Effect of SOI timing on cylinder pressure and heat release rate (PCI2, $\lambda = 1.9$)

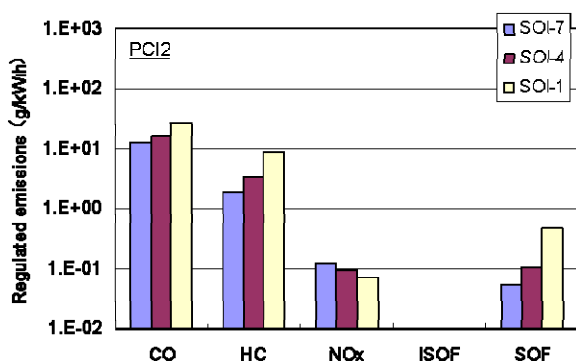


Fig.1.3.13 Effect of SOI timing on engine emissions (PCI2, $\lambda = 1.9$)

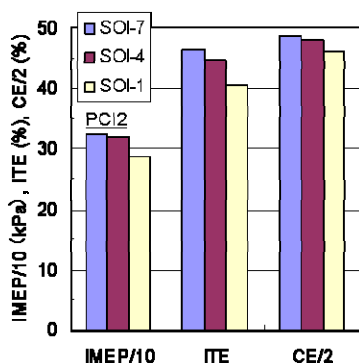


Fig.1.3.14 Effect of SOI timing on engine performance (PCI2, $\lambda = 1.9$)

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。

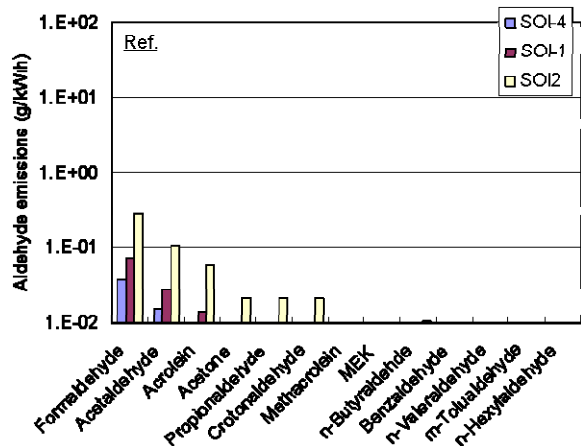


Fig.1.3.15 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (Ref.)

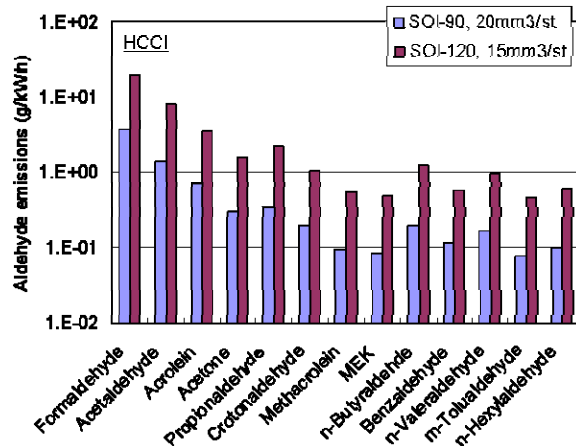


Fig.1.3.16 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (HCCI)

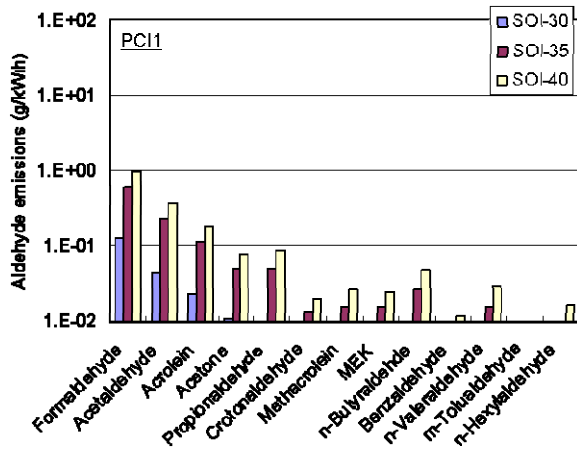


Fig.1.3.17 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (PCI1)

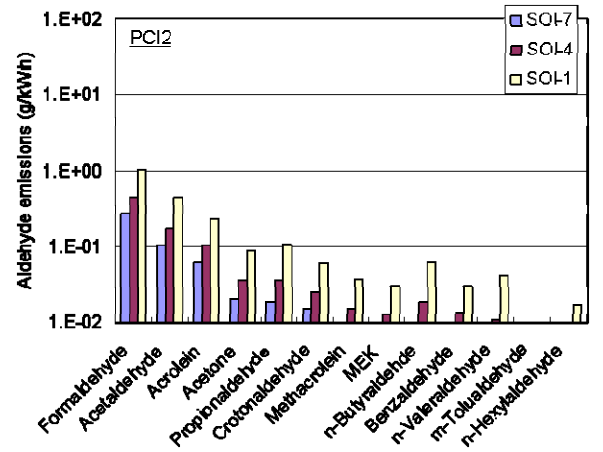


Fig.1.3.18 Effect of SOI timing on aldehyde emissions (PCI2)

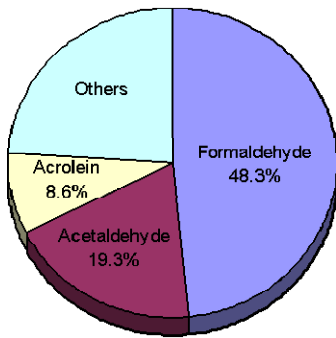


Fig.1.3.19 Main aldehyde emissions (HCCI, SOI-120)

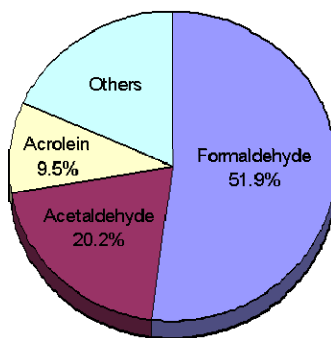


Fig.1.3.20 Main aldehyde emissions (PCI1, SOI-40)

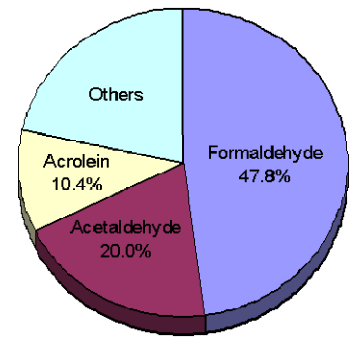


Fig.1.3.21 Main aldehyde emissions (PCI2, SOI-1)

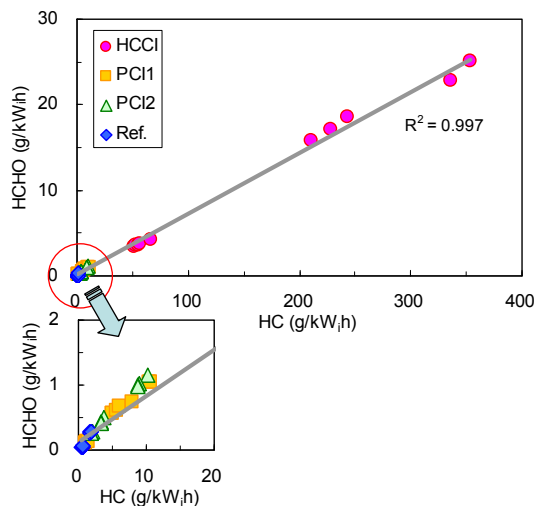


Fig.1.3.21 Effect of HC emissions on formaldehyde emissions

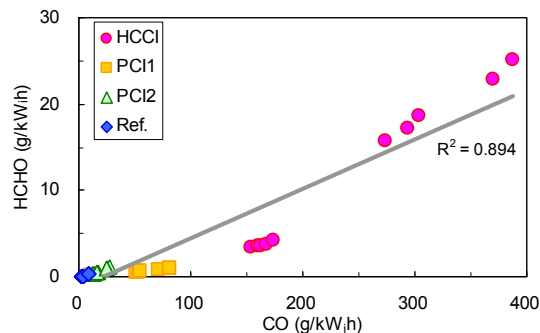


Fig.1.3.22 Effect of CO emissions on formaldehyde emissions

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易いものと推測される。

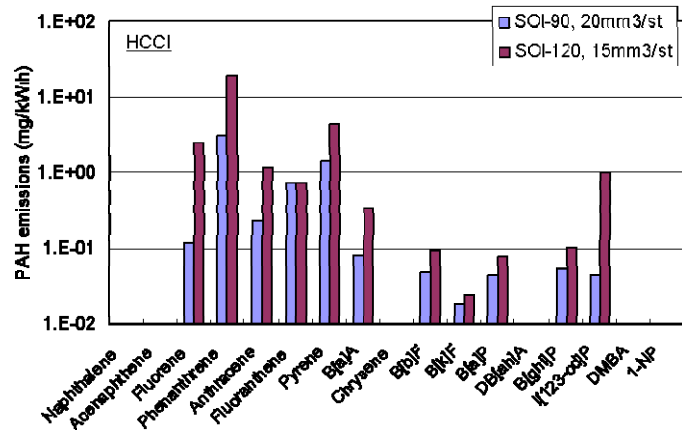


Fig.1.3.23 Effect of SOI timing on PAHs emissions (HCCI)

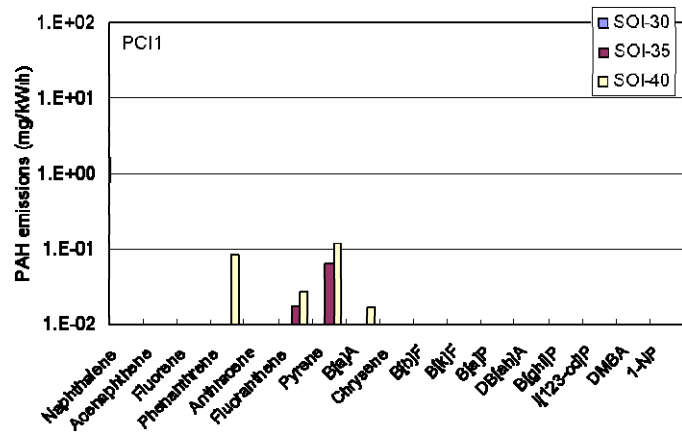


Fig.1.3.24 Effect of SOI timing on PAHs emissions (PCI1)

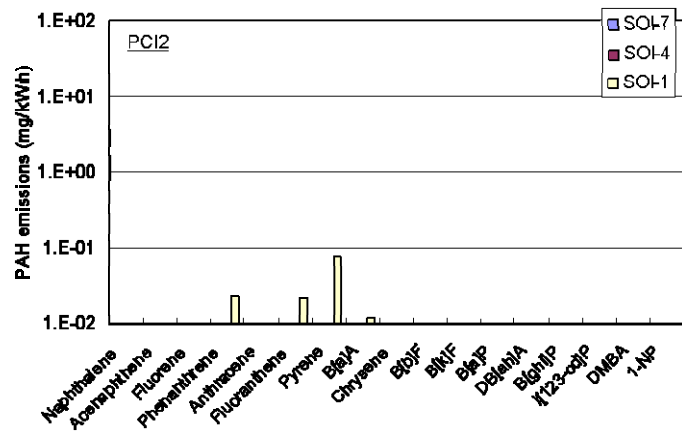


Fig.1.3.25 Effect of SOI timing on PAHs emissions (PCI2)

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 NO_x 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/kW_ih) 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。

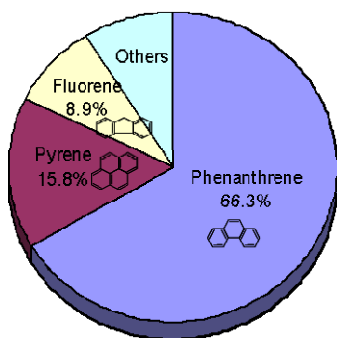


Fig.1.3.26 Main PAHs emissions (HCCI, SOI-120)

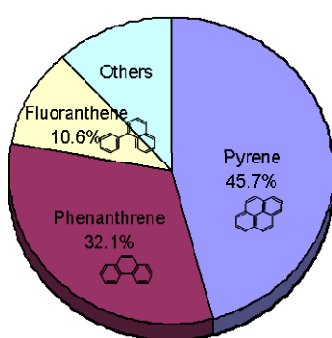


Fig.1.3.27 Main PAHs emissions (PCI1, SOI-40)

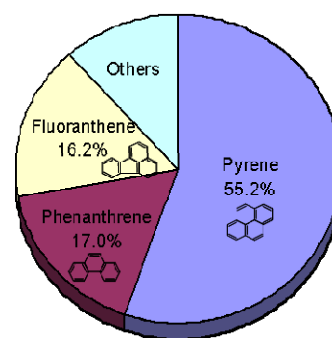


Fig.1.3.28 Main PAHs emissions (PCI2, SOI-1)

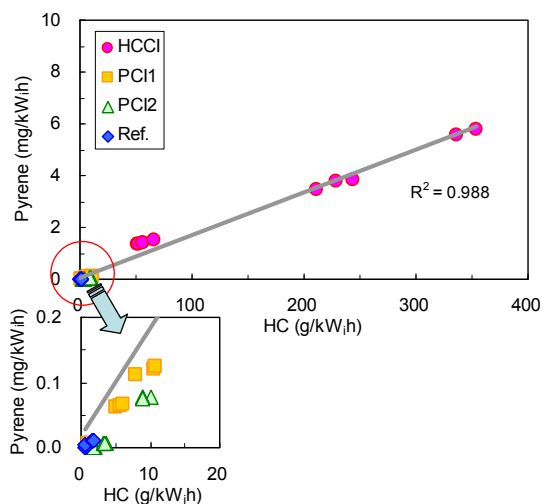


Fig.1.3.29 Effect of HC emissions on pyrene emissions

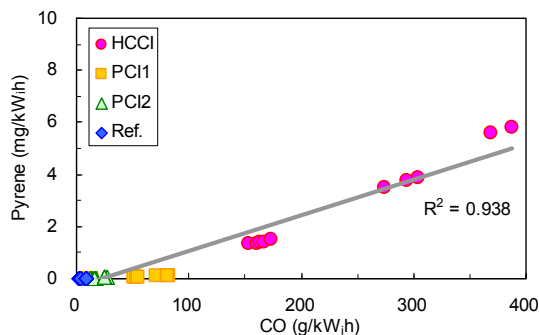


Fig.1.3.20 Effect of CO emissions on pyrene emissions

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℃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。

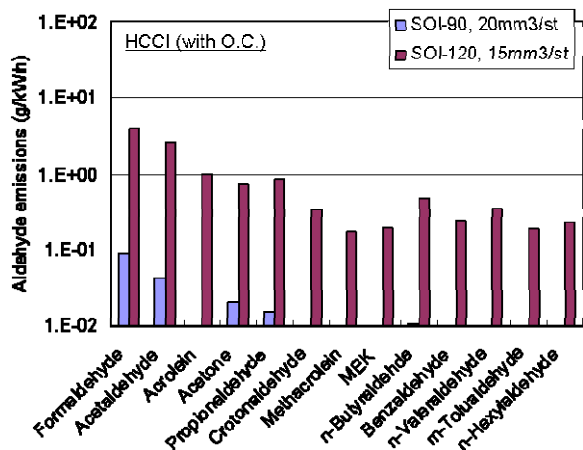


Fig.1.3.31 Aldehyde emissions with oxidation catalyst (HCCI)

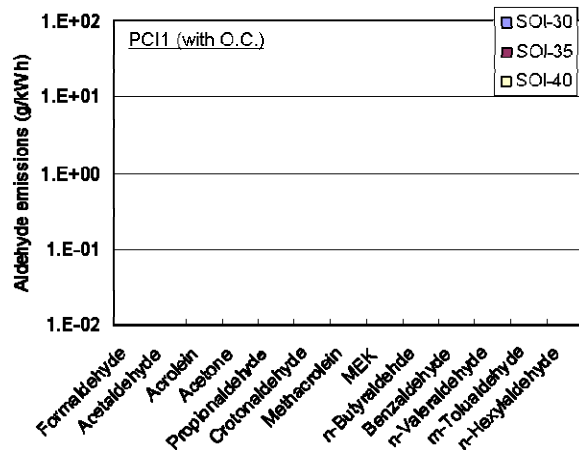


Fig.1.3.32 Aldehyde emissions with oxidation catalyst (PCI1)

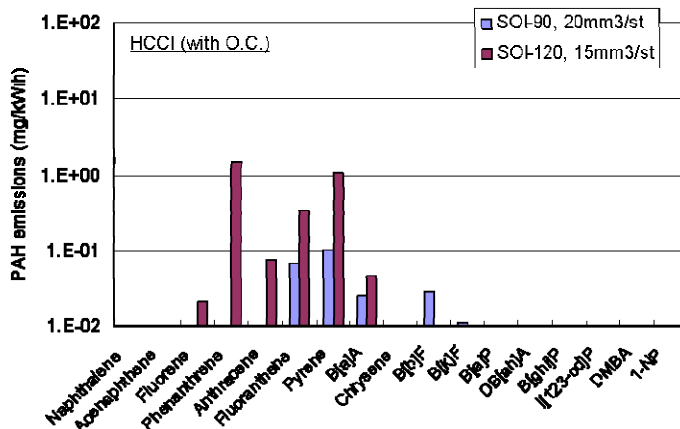


Fig.1.3.33 PAHs emissions with oxidation catalyst (HCCI)

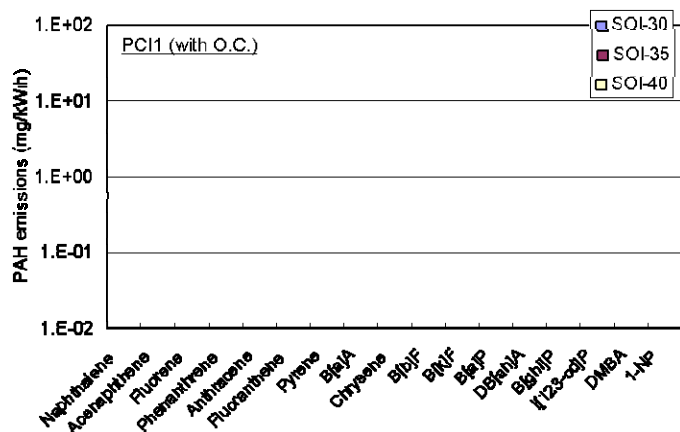


Fig.1.3.34 PAHs emissions with oxidation catalyst (PCI1)

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/kWh 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。

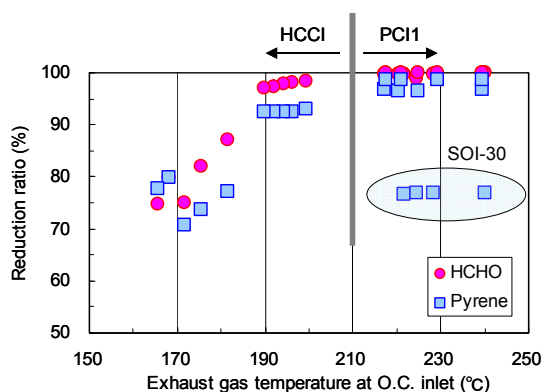


Fig.1.3.35 Effect of exhaust gas temperature on aldehyde and PAHs emissions with oxidation catalyst

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。

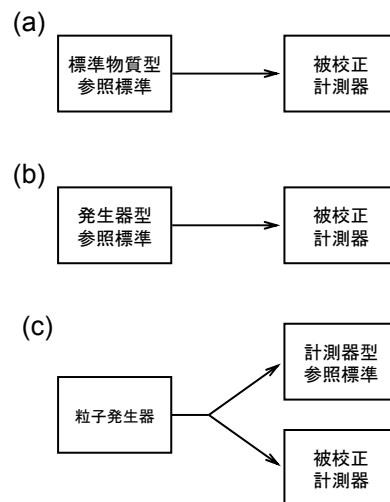


図 1-4-1-3-1 気中粒子数濃度測定器用標準の3つの形態

(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。

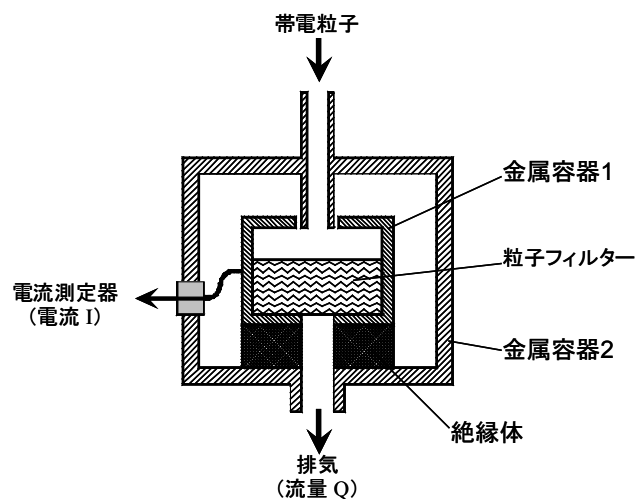


図 1-4-1-3-2 AE ファラデーカップ部の概略

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

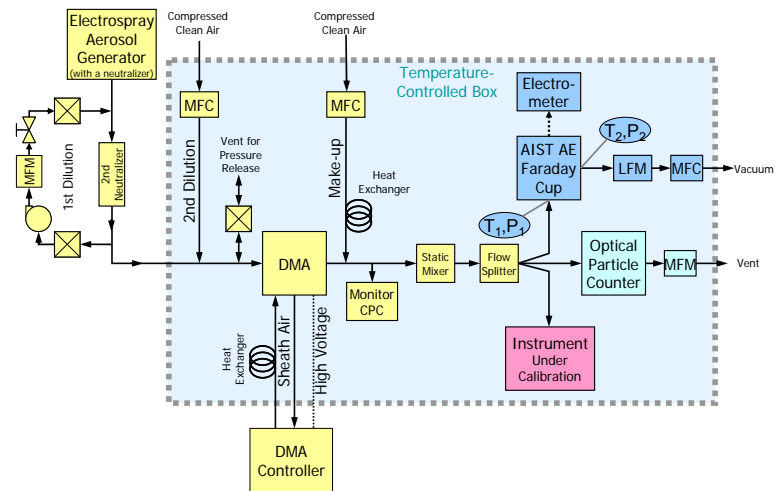


図 1-4-1-3-4 校正システム概略構成

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。

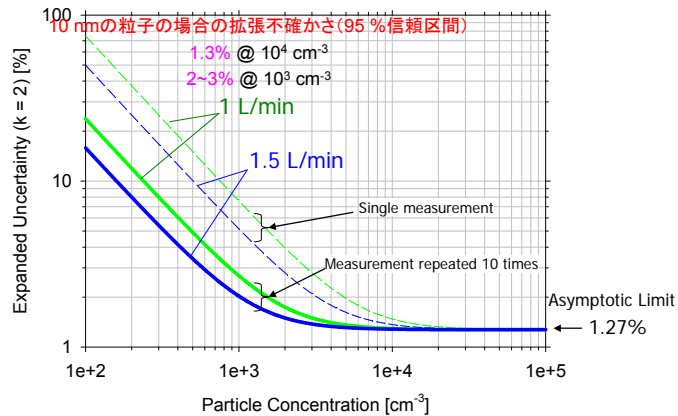


図 1-4-1-3-5 開発システムの不確かさ

(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。

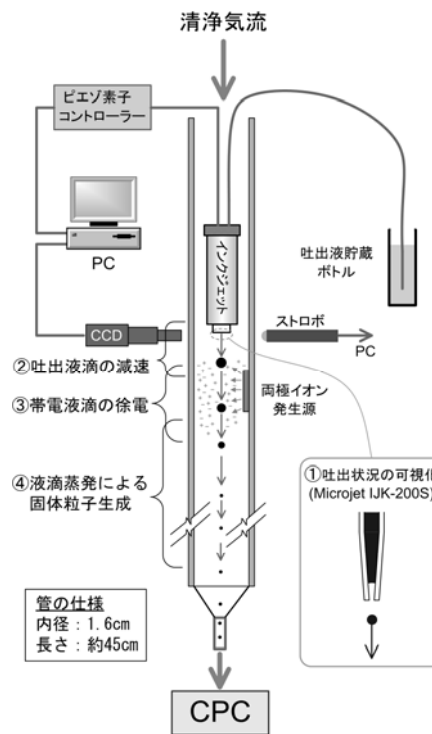


図 1-4-1-3-6 インクジェット式エアロゾル発生器の概要図

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。

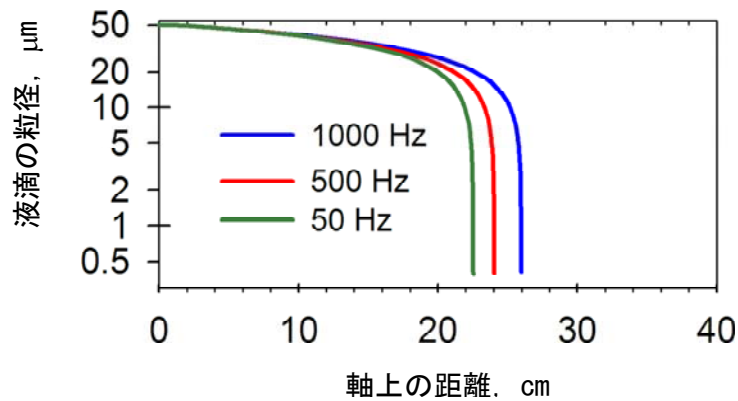


図 1-4-1-3-7 インクジェットノズルより吐出された液滴の蒸発による粒径の変化
(清浄気流温度 22° C)

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。

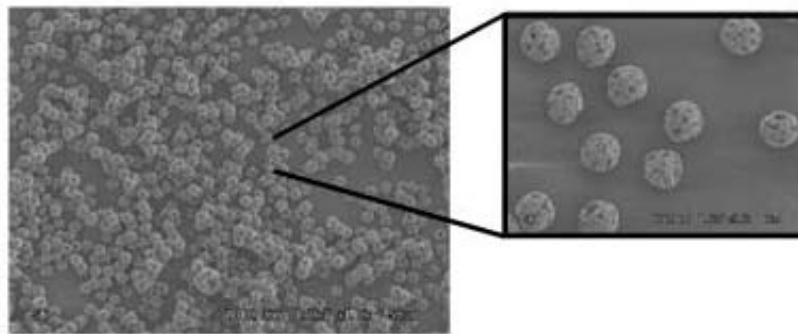


図 1-4-1-3-8 インクジェット式エアロゾル発生器で発生させた NaCl 粒子

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。

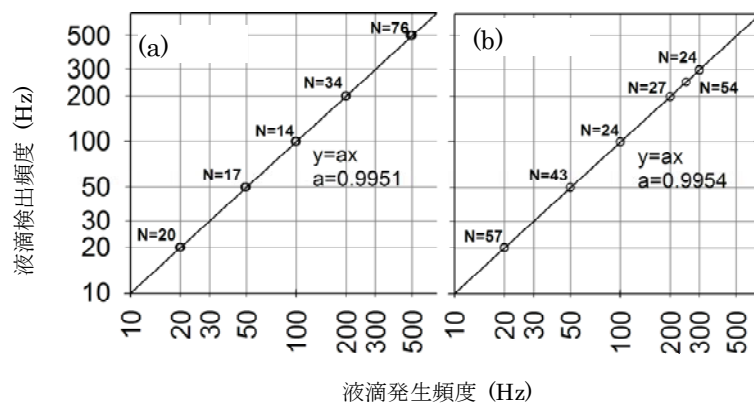


図 1-4-1-3-9 インクジェット式エアロゾル発生器の液滴発生

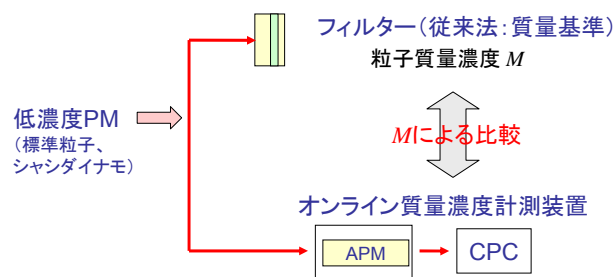
以上、ディーゼル排ガス中の粒子数濃度をモニタリングする目的で使用される CPC の正常動作を、現場にて日常的に行うための発生器型の粒子数濃度標準が実現可能であることを実験により実証するとともにインクジェットより吐出された個々の液滴が、発生器出口にて単分散性の高いエアロゾル粒子として生成されるインクジェット式エアロゾル発生器を開発した。以上の成果を基に、今後は実用器の開発と気中粒子数濃度の国家一次標準器への測定トレーサビリティの確立を目指す。

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。

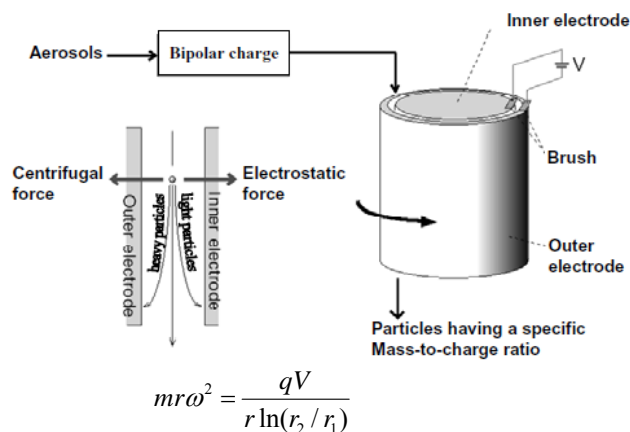


図 1-4-1-3-11 APM の概略構成

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。

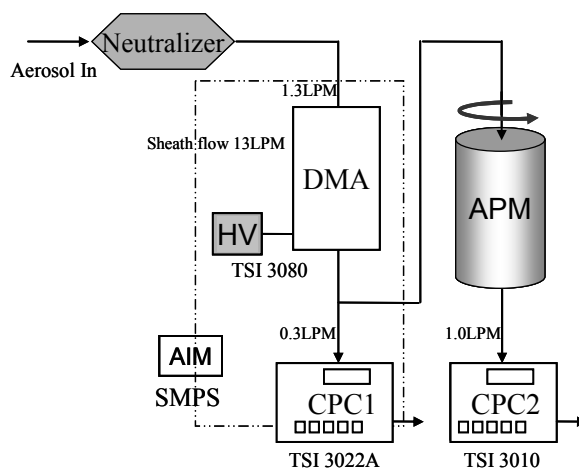


図 1-4-1-3-12 DMA-APM 法のシステム構成

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。

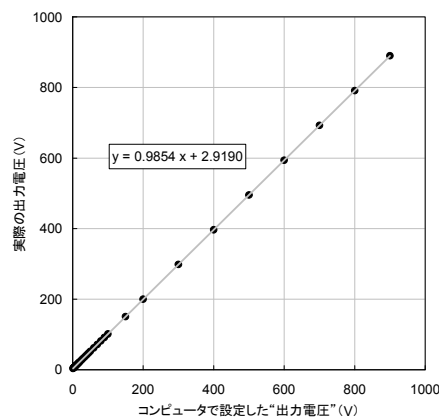


図 1-4-1-3-13 電圧補正式導出のための電圧校正と回帰分析の結果

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。

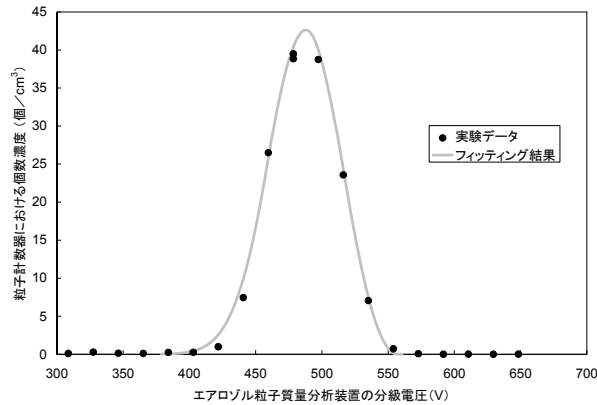


図 1-4-1-3-14 粒径 500 nm のポリスチレン標準粒子の場合での、実験で得られたスペクトルとフィッティング計算により得られたスペクトル曲線の比較

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。

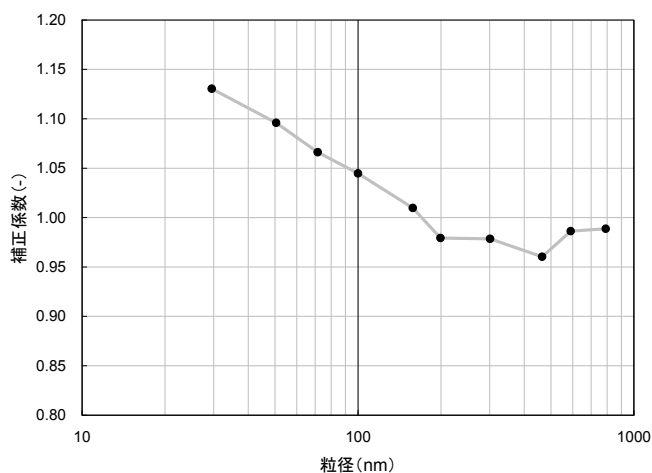


図 1-4-1-3-15 本プロジェクトで用いるエアロゾル粒子質量分析装置の粒径ごとの補正係数

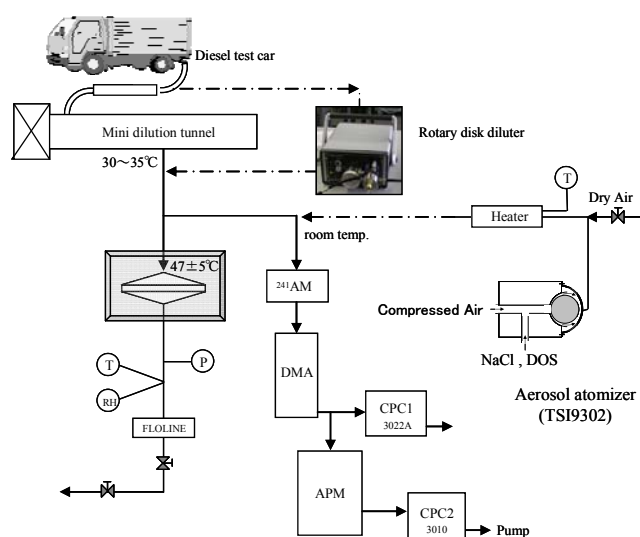


図 1-4-1-3-16 実験装置のセットアップ

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・ダイリュージ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。

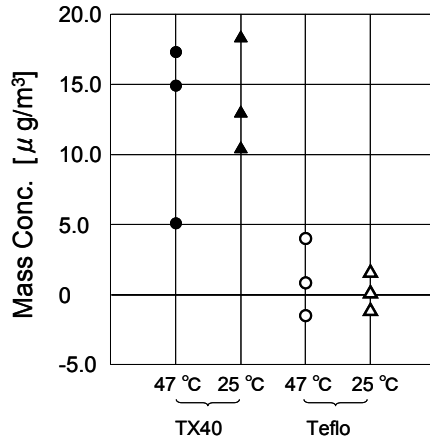


図 1-4-1-3-17 トンネルバックグラウンド

(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。

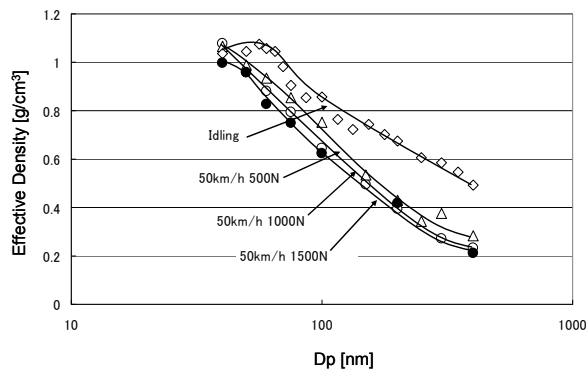


図 1-4-1-3-18 DEP の有効密度測定結果

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。

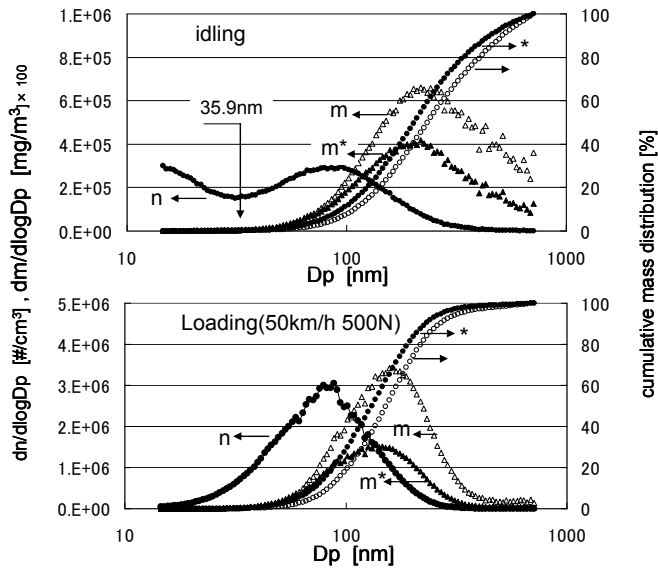


図 1-4-1-3-19 質量濃度分布と累積相対濃度

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。

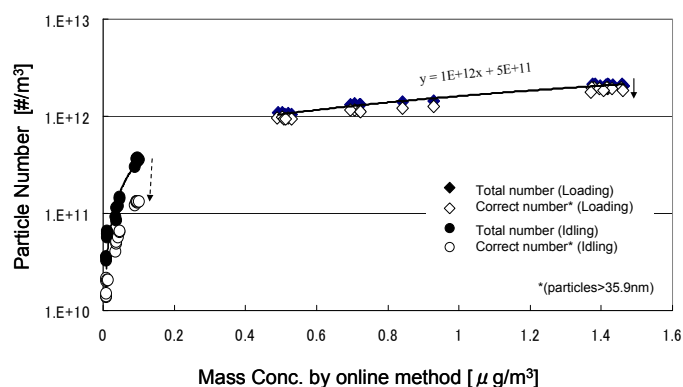


図 1-4-1-3-20 質量濃度と個数濃度の相関

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。

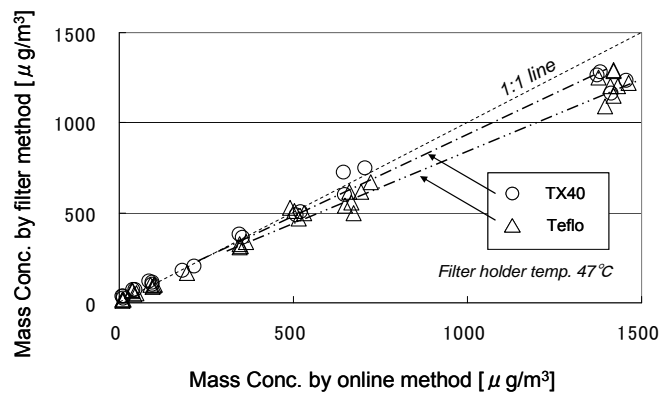


図 1-4-1-3-21 比較測定結果（フィルター温度 47°C）

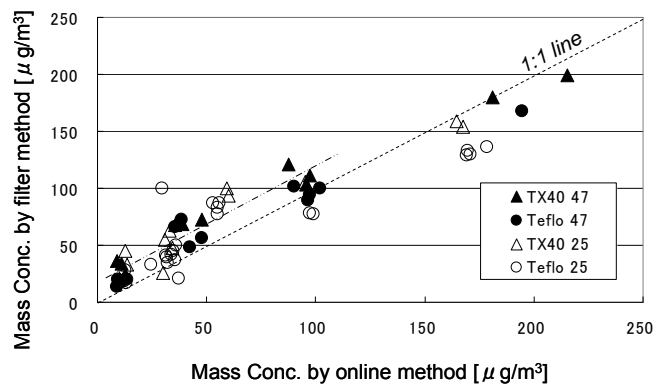


図 1-4-1-3-22 比較測定結果（アイドリング）

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。

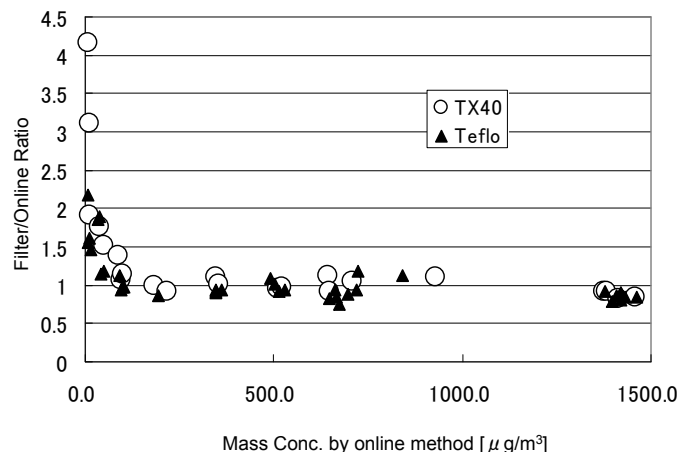


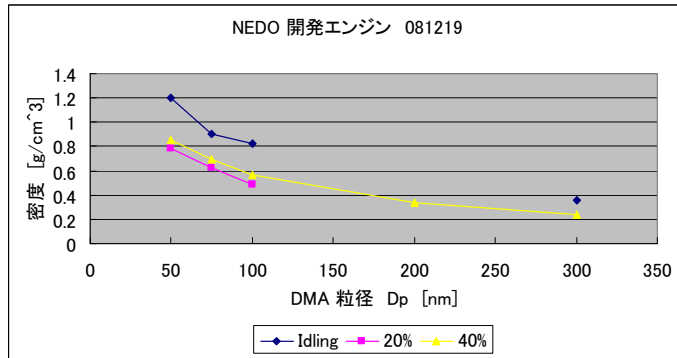
図 1-4-1-3-23 オンライン法とフィルター法の相対誤差

(iv) 最終評価結果

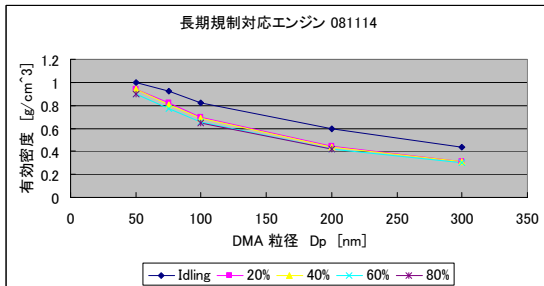
これまでに構築した上記評価技術（オンライン質量濃度計測システム）を本 NEDO プロジェクト開発エンジンの最終評価試験に適用し、有効密度、質量濃度等の値を計測した。図 1-4-1-3-24(a), (b), (c)は NEDO 開発エンジンの有効密度を、比較のために同型式の長期規制対応エンジン及び新長期規制対応エンジンを参照エンジンとしてそれぞれ結果を示したものである。個々には若干の値の相違が見られるものの定性的にはほぼ同様の傾向を示しており、アイドリング時に若干高い有

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。

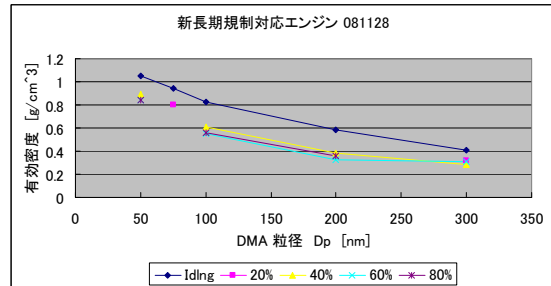
また、図 1-4-1-3-25 はこのときのオンライン法とフィルター法で測定したときの質量濃度の比較測定結果である。長期規制対応エンジンや新長期規制対応エンジンなど比較的濃度が高めの場合には両者の測定結果に良好な相関が見られるものの、NEDO 開発エンジンのように排出微粒子濃度が極めて低くなってきた場合にはその相関性は崩れ、フィルター法の測定限界以下の濃度となっていることが確認された。また、同エンジンでも比較的負荷の高い運転で排出濃度が高めの場合にはオンライン法での測定が可能であるものの、アイドリングや極低負荷時のように排出濃度が極めて低くなってくると、オンライン法によっても正確な測定が困難な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

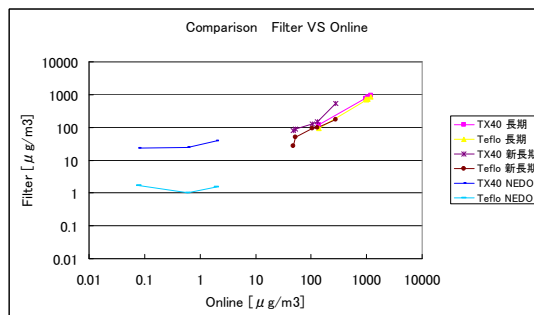


図 1-4-1-3-25 オンライン法とフィルター法による質量濃度

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。

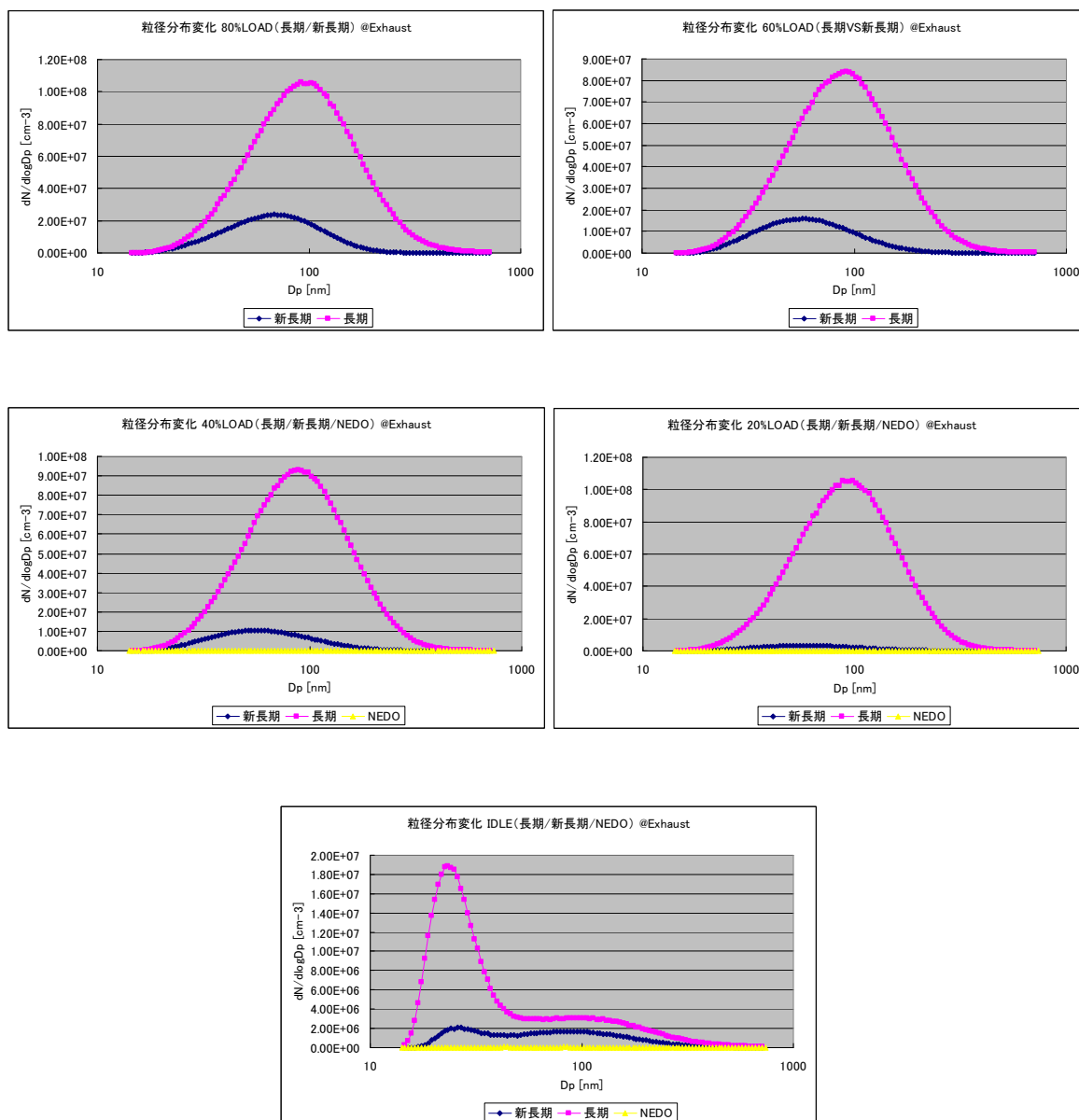


図 1-4-1-3-26 SMPS で測定した粒径分布変化の結果例

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、個数濃度測定の校正・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。

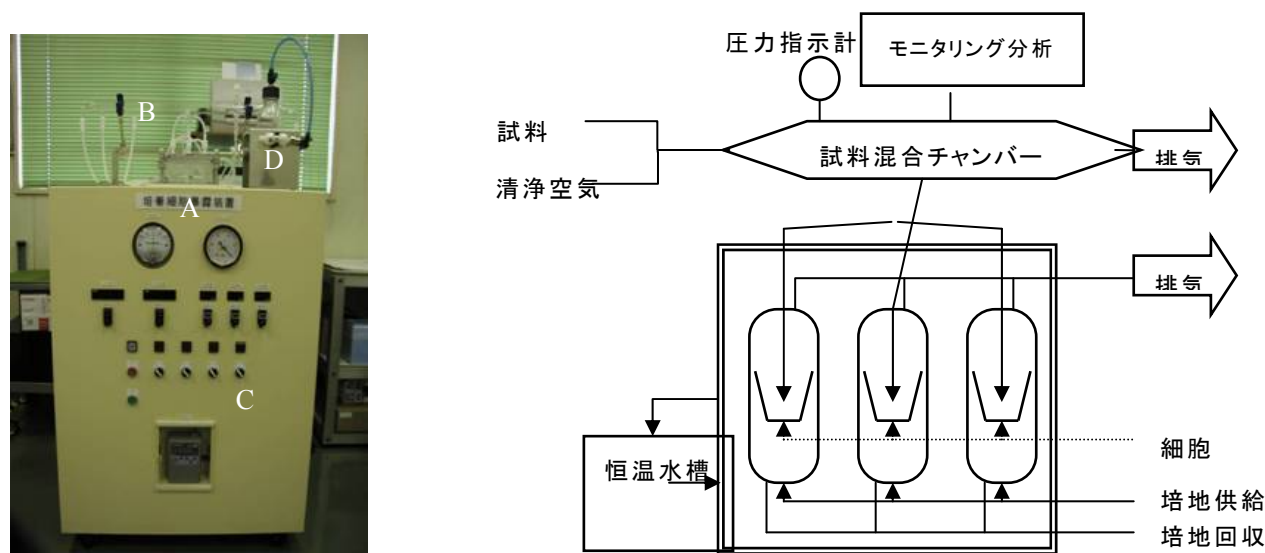


Fig. 2.1.1 培養細胞曝露装置全景と細胞曝露モジュールの模式図

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。

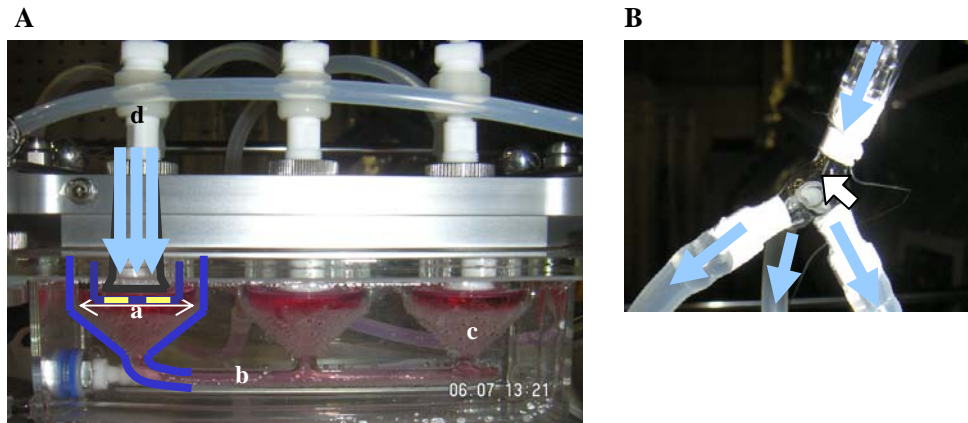


Fig. 2.1.1.1 細胞曝露モジュール (A) および曝露チューブの温度センサ (B ; 白矢印)
 (a) Insert 装着部、(b) 培地供給管、(c) ホルダ、(d) ガス噴出口。青矢印はガスの流れを示す。

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% CO_2 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。

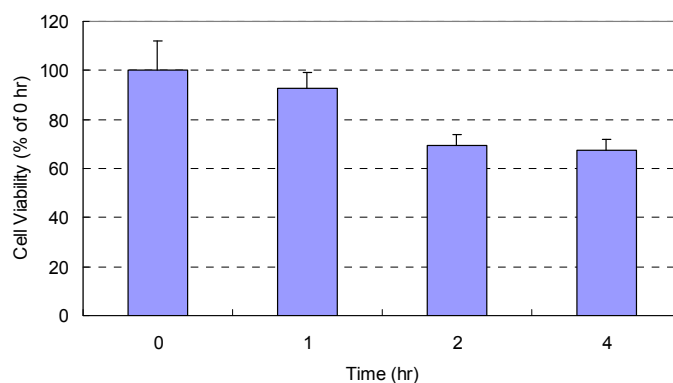


Fig. 2.1.1.2 A549 細胞を用いた CULTEX 装置曝露時間の検討
平均値±標準偏差で示す (n=3)。

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。

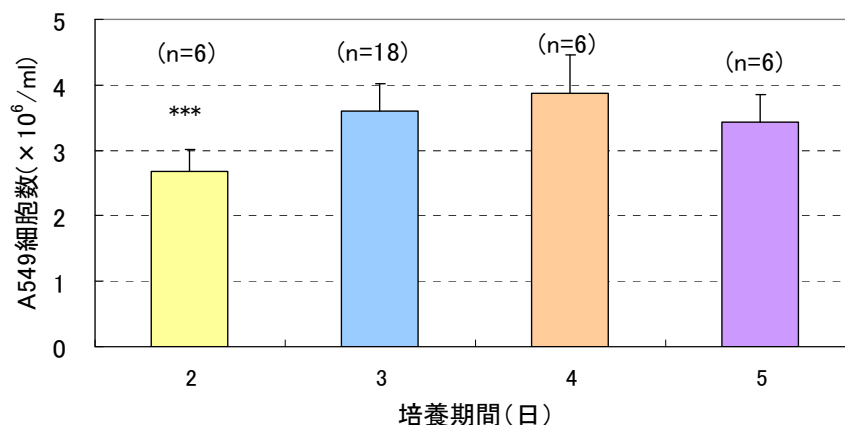


Fig. 2.1.2.1 培養期間の違いによる細胞数の変動

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ブラタイプ ; 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、 $\pm 1,000$ 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での圧力である。

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 μ l の 2-mercaptoethanol (2-ME) を添加した溶液) 350 μ l/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 μ l/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 μ l のサンプルを添加した。
- (4) 8,000 \times 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 μ l/tube の Buffer RW1 を添加し、8,000 \times 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 μ l の DNase I stock solution を 70 μ l の Buffer RDD に添加し、転倒混和して得られた DNase I stock solution mix を 80 μ l 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 μ l/tube の Buffer RW1 を添加し、8,000 \times 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 μ l/tube を添加し、8,000 \times 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。

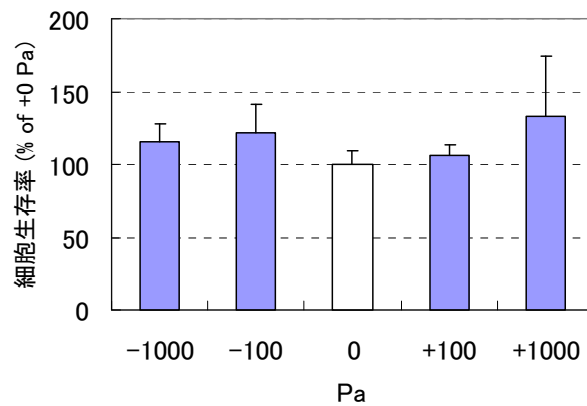


Fig. 2.1.3.1 純空気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の圧力変動
大気圧 (0 Pa) を 100% とし、平均値±標準偏差で示す (n=9)。

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。

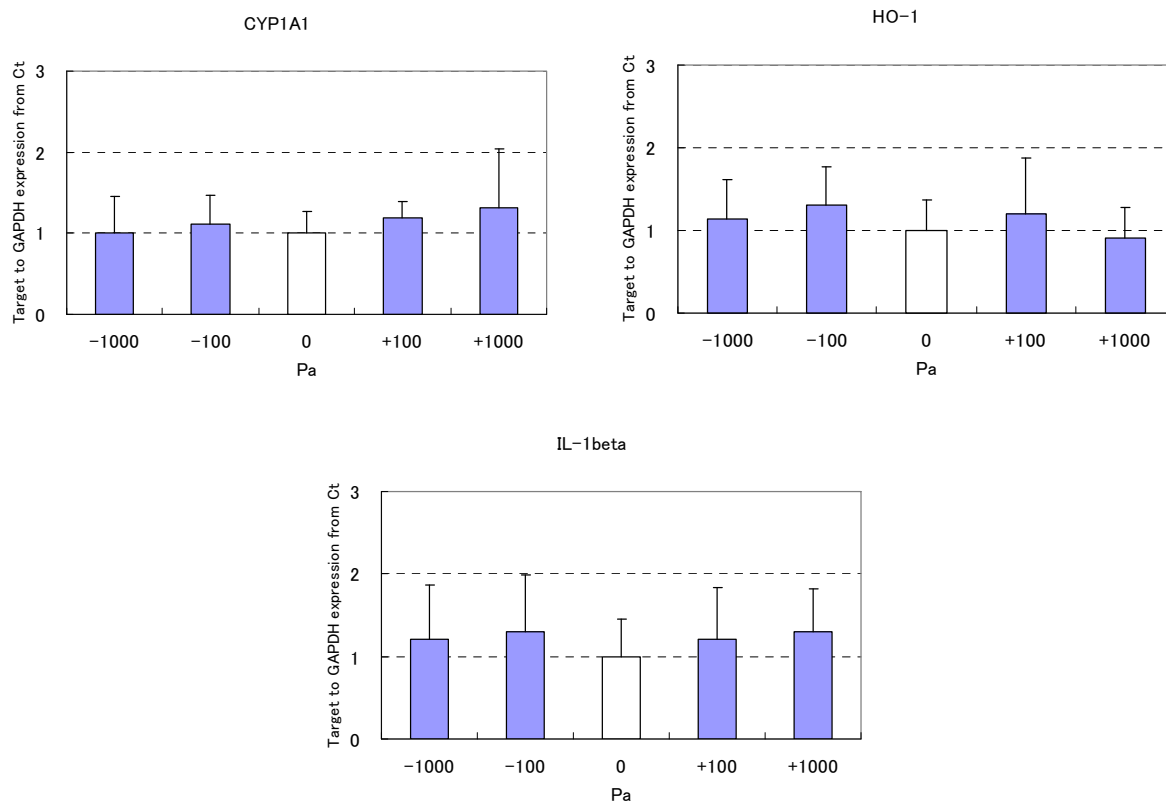


Fig. 2.1.3.2 純空気曝露した A549 細胞の遺伝子発現（リアルタイム PCR 解析）

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 $\mu\text{l}/\text{tube}$ の MMLV RT と、0.5 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 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 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、0.1 M DTT を 6 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、NTP Mix を 8 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、50% PEG (polyethylene glycol) を 6.4 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、RNaseOUT を 0.5 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、Inorganic Pyrophosphatase を 0.6 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 、0.8 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 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 $\mu\text{l}/\text{tube}$ の nuclease free-water を加え、全量 100 $\mu\text{l}/\text{tube}$ にした後、キット内の Buffer RLT を 350 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 加え、完全に攪拌した。

[2] エタノール (純度 96-100%) を 250 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 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 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 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 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 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 $\mu\text{l}/\text{tube}$ 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。

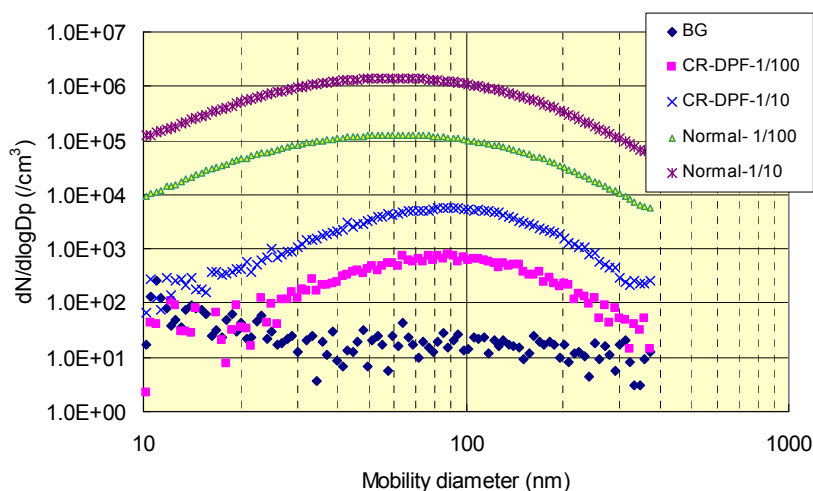


Fig. 2.1.4.1 各希釈条件の粒子個数分布
データは日間平均値で示した (n=2~8)。

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、ノーマ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)。

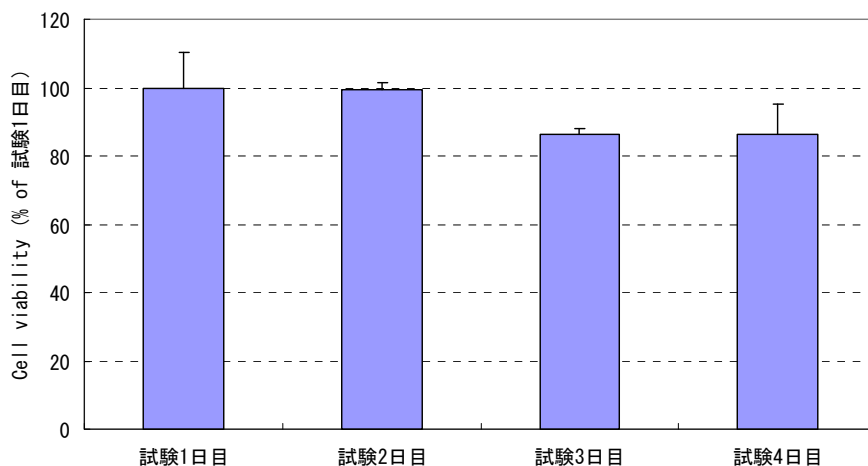


Fig. 2.1.4.2 BG を曝露したときの A549 細胞の細胞生存率
第 1 日目を 100% とし、平均値 \pm 標準偏差で示す (n=3)。

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。

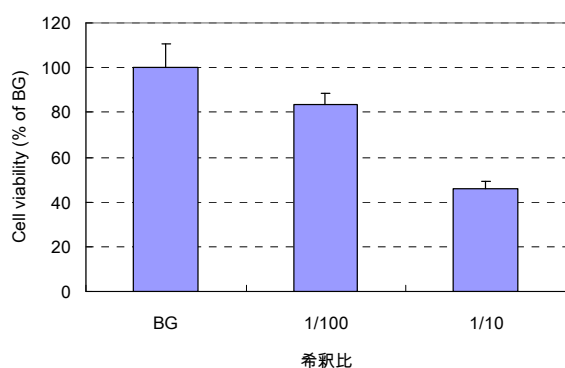
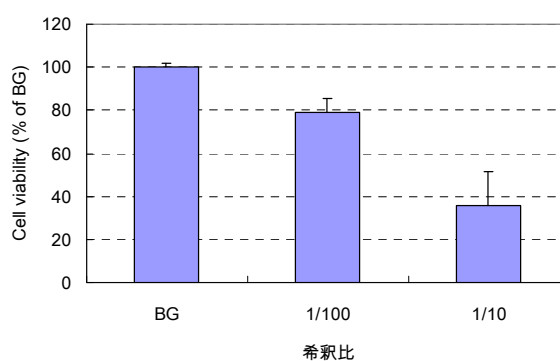
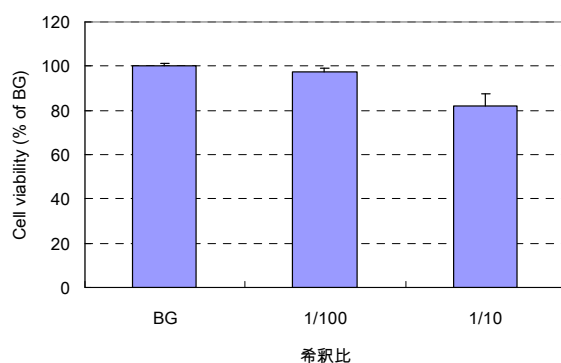
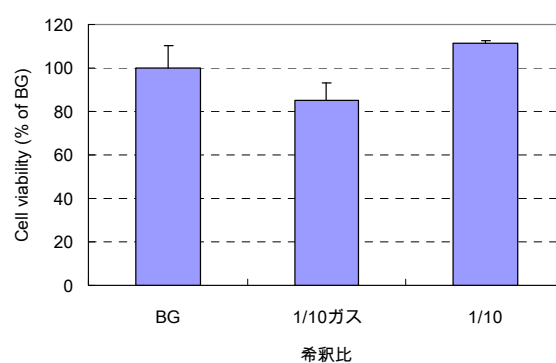
(A) PM poor, NO₂ rich(B) PM rich, NO₂ rich(C) PM rich, NO₂ poor(D) PM rich, NO₂ poor

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。

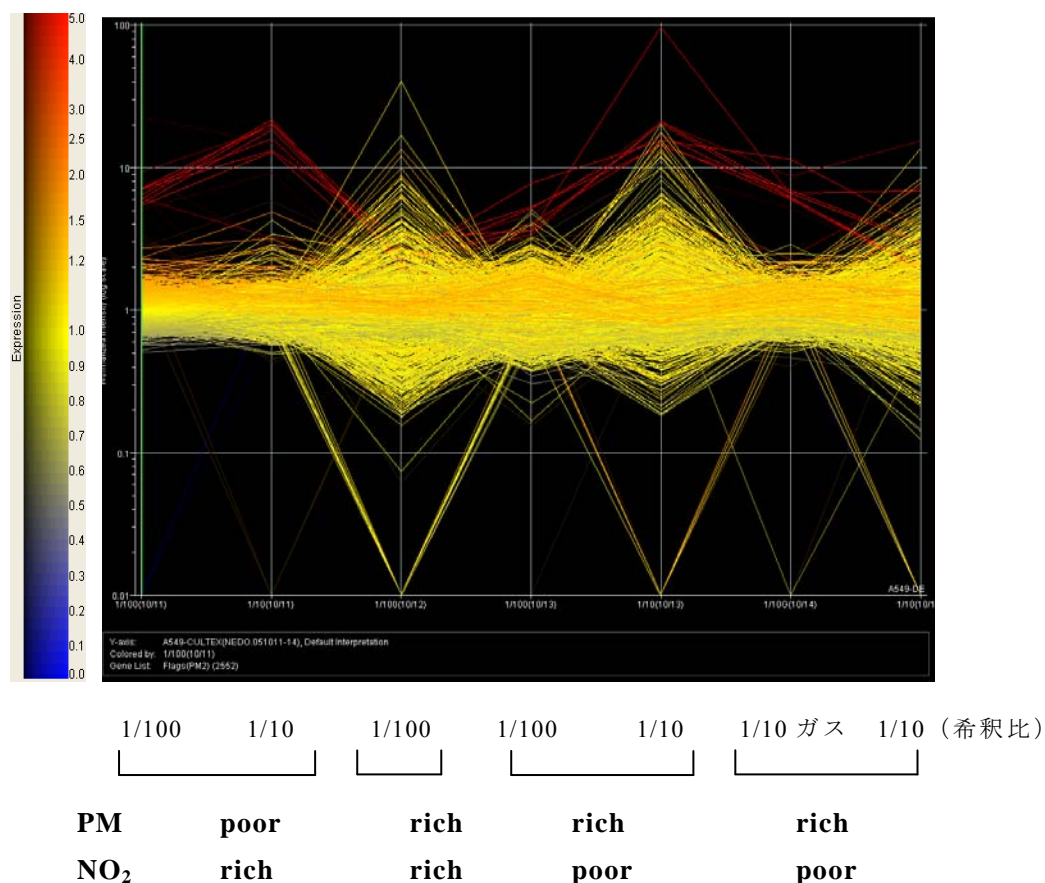


Fig. 2.1.4.4 ディーゼル排気曝露された A549 細胞の遺伝子発現変化 (マイクロアレイ解析)

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, mRNA
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大きくなく、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。

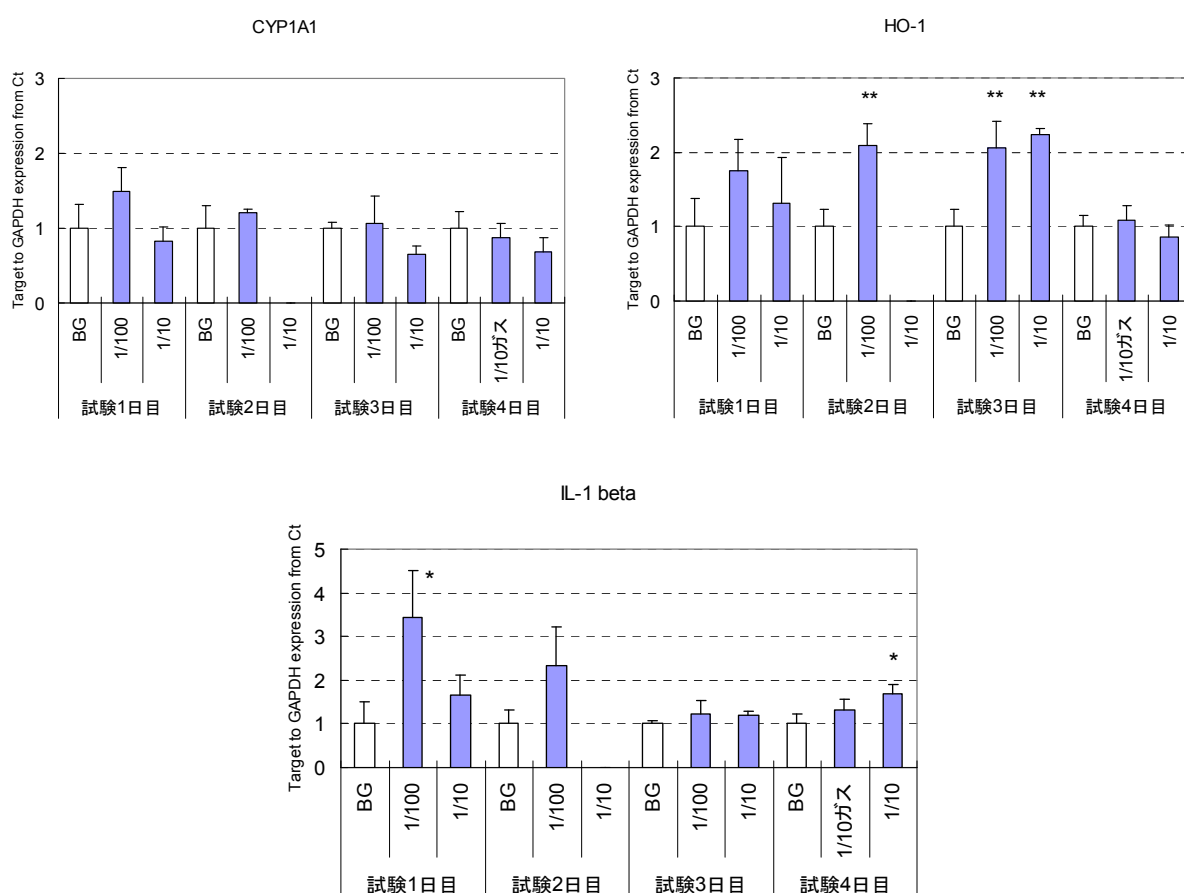


Fig. 2.1.4.5 リアルタイム PCR 解析による A549 細胞の遺伝子発現変動
横軸の数字は希釈比。平均値±標準偏差で示す (n=3)。(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. BG)

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) CYP1A1 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	0.944	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。

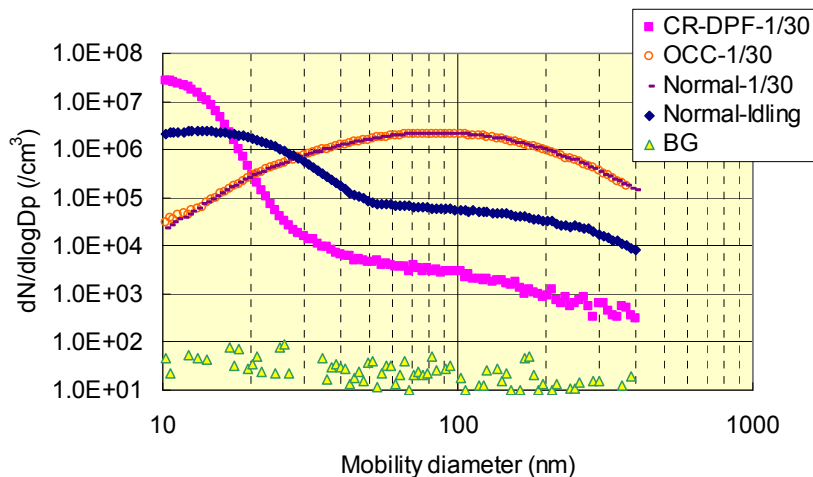


Fig. 2.1.5.1 各希釈条件の粒子個数分布
データは日間平均値で示した (n=1~3)。

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。

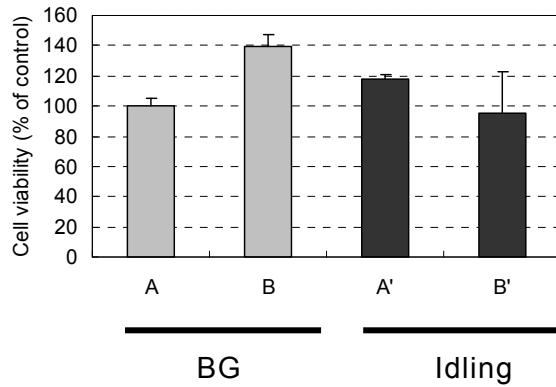
2.1.5.4 小活

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。

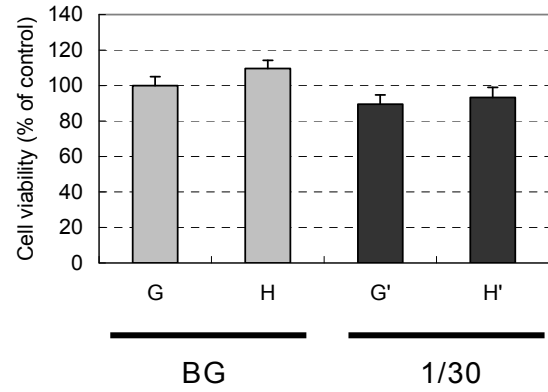
細胞毒性試験は 2 日に分けて試験し、そのうちの 1 日については 2 回試験を行い、計 3 回の試験評価で日内および日間の影響を検討した。その結果、日内では細胞の生存率に大きな影響は認められないことが分った。また、日間では多少の差は生じるものの、ほとんど影響のない範囲であったため、実験の良好な再現性が確認できたが、今後、細胞毒性試験で評価していくためには、同日内で評価することが望ましいと判断した。

ピーク粒径 10 nm

Normal-Idling

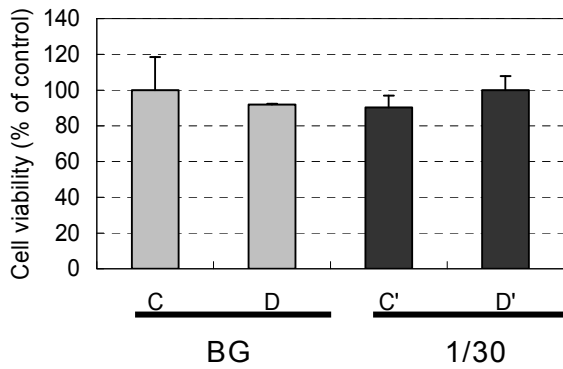


CR-DPF-1/30



ピーク粒径 80 nm

Normal-1/30



OCC-1/30

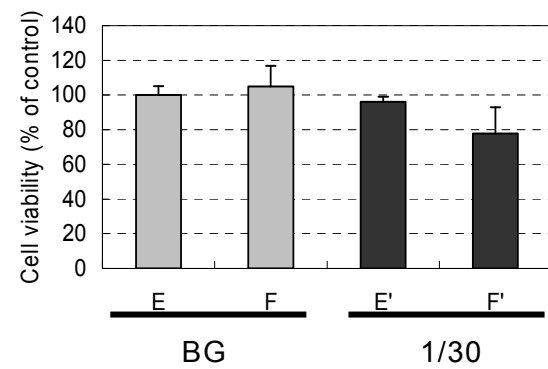


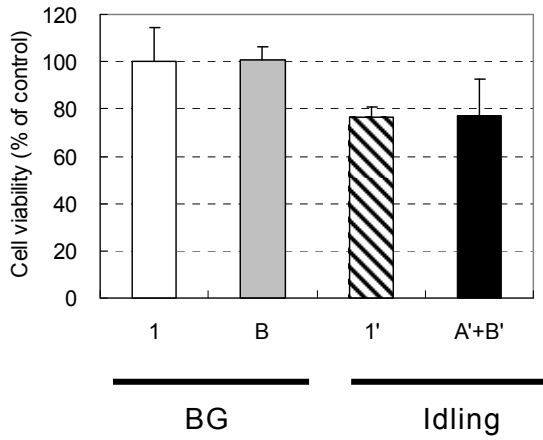
Fig. 2.1.5.2 ディーゼル排気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の日内変動比較

A~F 群は BG 群、A'~F'群は曝露群。

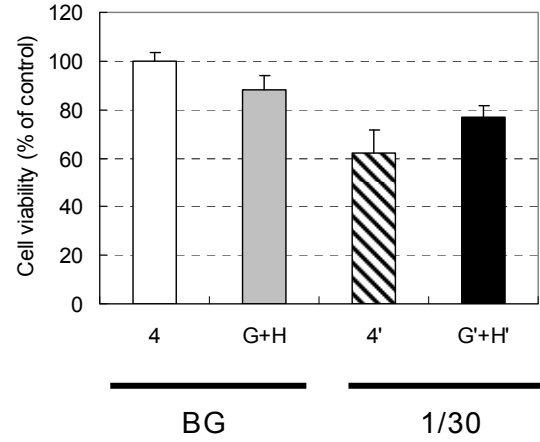
初回 BG (A、C、G、E 群) を 100% とし、平均値±標準偏差で示す (n=3)。

ピーク粒径 10 nm

Normal-Idling

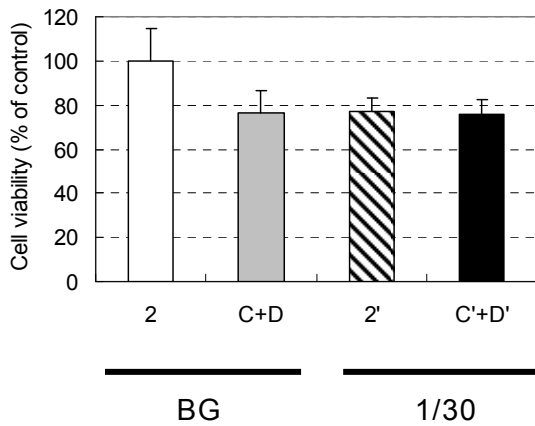


CR-DPF-1/30



ピーク粒径 80 nm

Normal-1/30



OCC-1/30

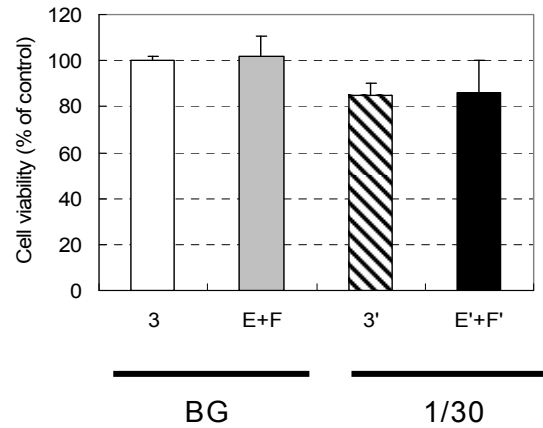
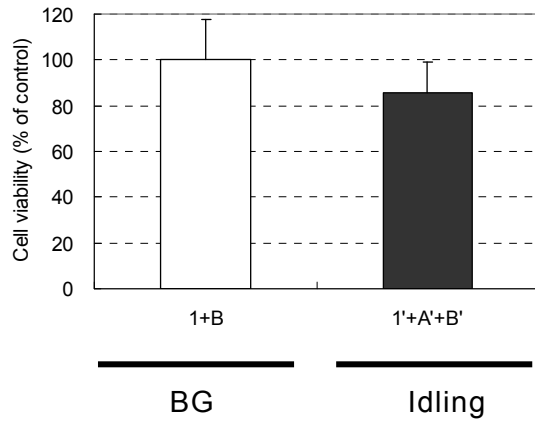


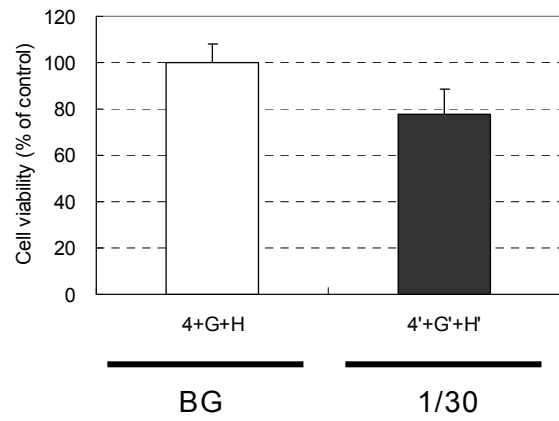
Fig. 2.1.5.3 ディーゼル排気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の日間変動比較
 1~4 群および A~F 群は BG 群、1'~4'群および A'~F'群は曝露群。
 初回 BG (1~4 群) を 100%とし、平均値±標準偏差で示す (n=3~6)。

ピーク粒径 10 nm

Normal-Idling

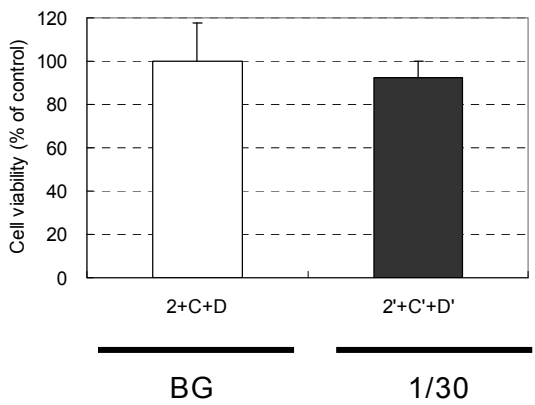


CR-DPF-1/30



ピーク粒径 80 nm

Normal-1/30



OCC-1/30

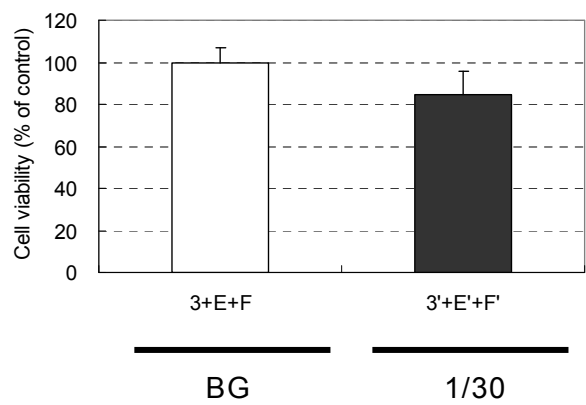


Fig. 2.1.5.4 ディーゼル排気を曝露した A549 細胞の細胞生存率の群間変動比較
1~4 群および A~F 群は BG 群、1'~4'群および A'~F'群は曝露群。
BG を 100% とし、平均値±標準偏差で示す (n=6~9)。

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。