

3. 尿素 SCR 排気の動物曝露評価（未規制物質評価）

3.1 緒言

3.1.1 背景

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.2 外部委員会の設置

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

本委員会は、下記のメンバーで構成した。

【WG委員】

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

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

3.2 試験方法

3.2.1 曝露設備、供試エンジン、燃料

3.2.1.1 曝露設備

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

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

表 3.2.1.1 エンジンダイナモメータと吸入試験装置の主な仕様

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

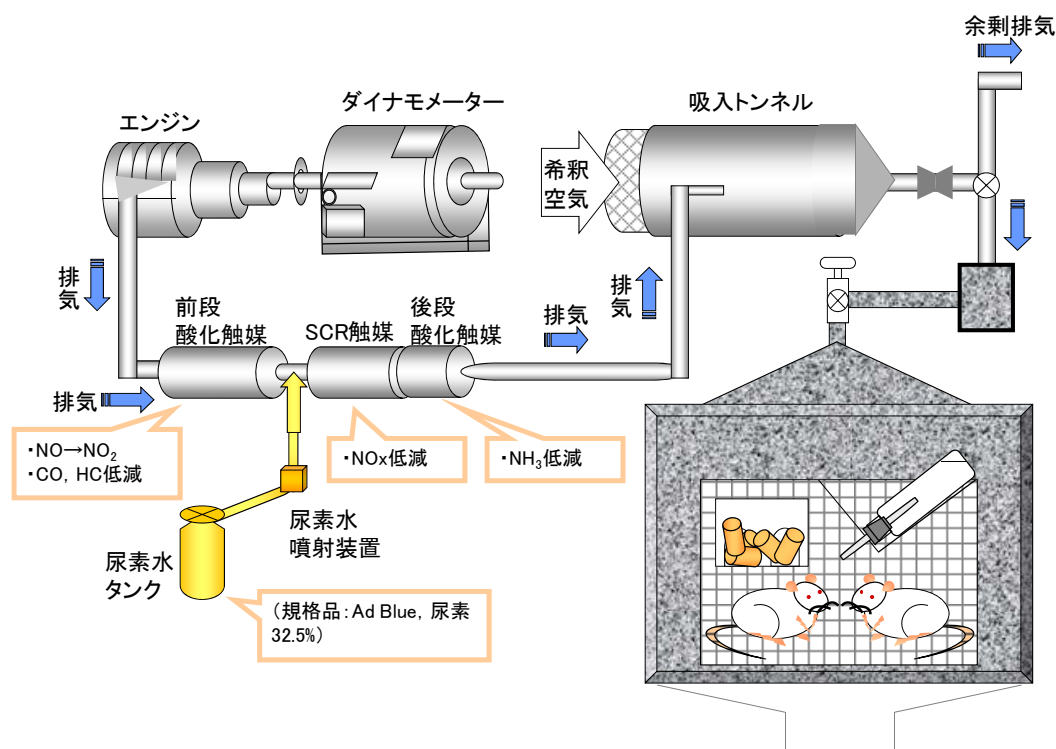


Fig. 3.2.1.1 実験小動物曝露試験装置の概略図

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

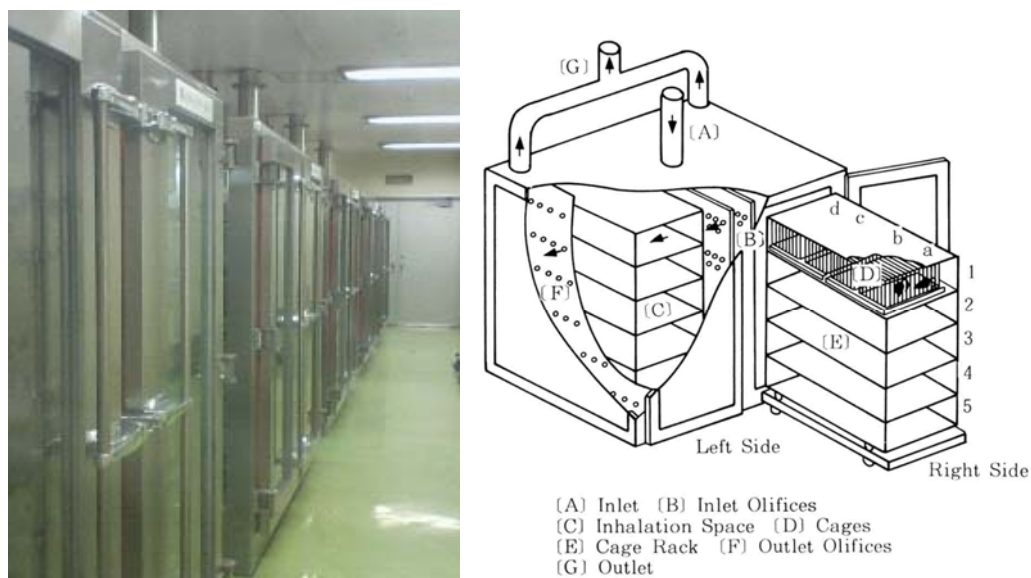


Fig. 3.2.1.2 試験に用いた動物曝露用チャンバー（概観と構造）

3.2.1.2 供試エンジン

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

表 3.2.1.2 供試エンジンの主要諸元

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

尿素 SCR エンジンシステムの模式図を **Fig. 3.2.1.3** に示す。このシステムは主に触媒と尿素水溶液の添加装置から構成される。尿素水溶液 (32.5%) は NO_x の還元剤として、SCR 触媒前の排気中に噴射され加水分解され NH₃ となる、この NH₃ が NO_x と反応して NO_x を無害な N₂ に変える。尿素 SCR システムにおいては、尿素水溶液を効果的に添加することが NO_x の浄化、NH₃ スリップの防止、尿素水溶液の消費量等の観点から重要である。

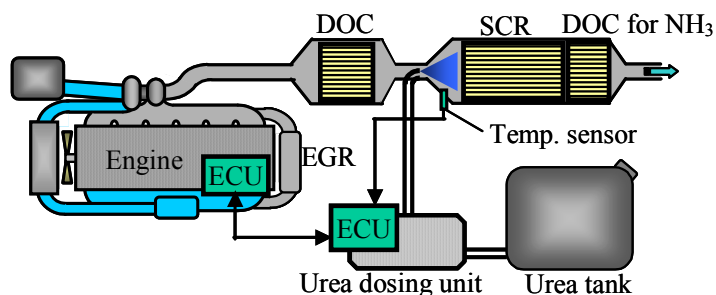


Fig. 3.2.1.3 尿素 SCR エンジンシステム

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

尿素 SCR システムによる排気浄化の工程は、以下の通りである。

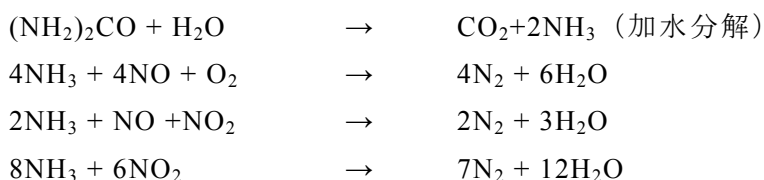
(1) 前段酸化触媒での反応

排気中の NO を酸化し、SCR 上でより低い温度で還元されやすい NO₂ に変換する。



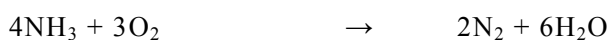
(2) SCR 触媒での反応

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



(3) 後段酸化触媒での反応

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



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

対して NO_x、PM とも大幅に低減した (Fig. 3.2.1.4)。

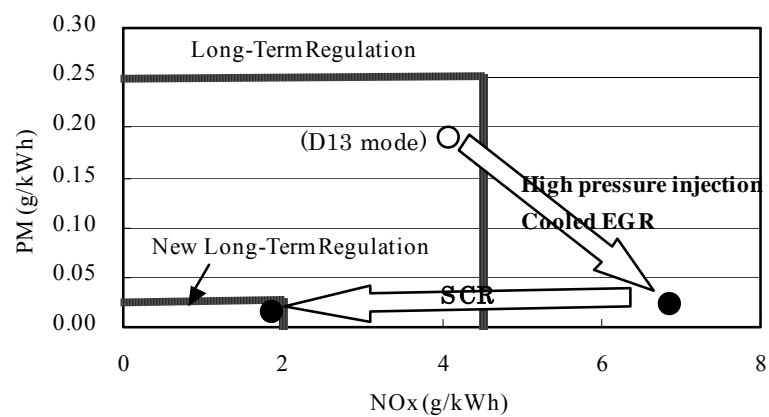


Fig. 3.2.1.4 尿素 SCR エンジンシステムの PM および NO_x 排出量の低減効果
出典：大型商用車用尿素 SCR システムの開発（第 1 報）、
自動車技術会学術講演会前刷集、No.108-04（2004）

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

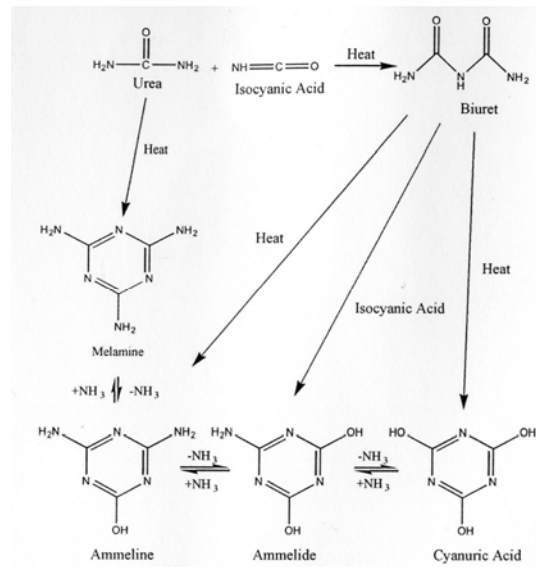


Fig. 3.2.1.5 尿素の熱分解生成物
(Ball, J.C., 2001)

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

3.2.1.3 燃料、潤滑油

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

尿素水は、市販品（32.5%，JIS K2247-1）を用いた。

エンジン潤滑油には、供試エンジン提供メーカー指定品を用いた。

表 3.2.1.3 燃料の性状

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

3.2.1.4 曝露条件の設定

1) エンジン運転条件

エンジン運転条件は、下記項目を選定根拠とした。

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

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

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

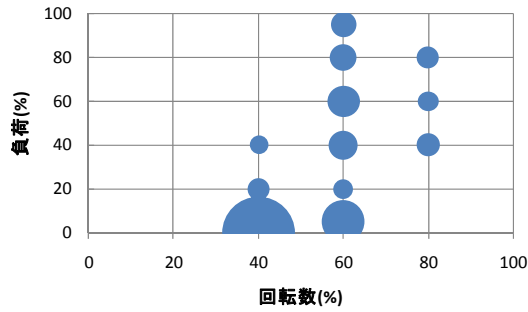


Fig. 3.2.1.6 D13 モード排気試験の重み係数
(排気温度 200℃以上では回転数 60%、負荷 60%の重み係数が最も大)

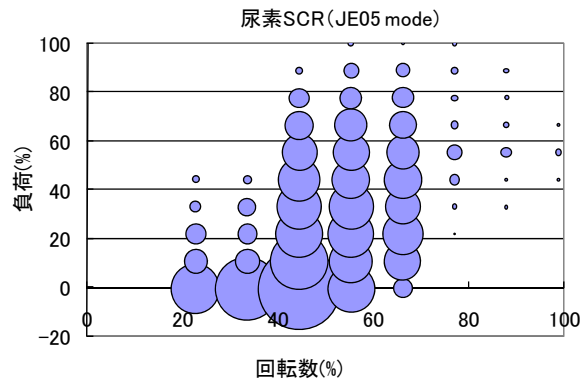


Fig. 3.2.1.7 JE05 モードのエンジン運転使用頻度
(アイドリングのみ 1/10)

2) 試験群

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

(1) 量・反応関係による検討（同一希釈系列）

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

(2) 尿素添加システムの有無による検討（エンジン排気比較系列）

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

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

3.2.1.5 モニタリング

曝露チャンバー内の流量、圧力、温度、湿度をモニタリングした。

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

1) 各曝露チャンバー（試験群）

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

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

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

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

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

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

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

2) 希釈トンネル

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

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

表 3.2.1.4 曝露チャンバーと希釈トンネルの測定項目概要

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

(1) エームス試験

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

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

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

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

(2) 酸化活性測定 (DTT アッセイ)

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

3.2.2 健康影響評価

3.2.2.1 ラット短期吸入曝露試験

1) 供試動物

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

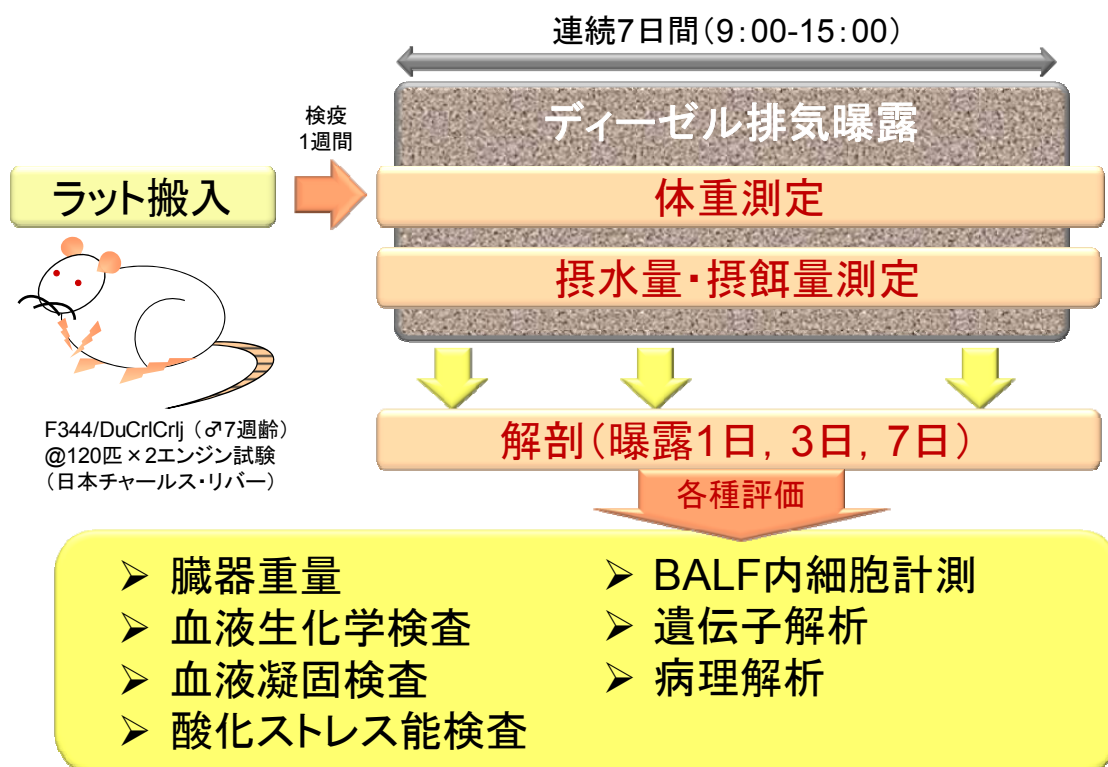


Fig. 3.2.2.1 計測項目および評価項目

2) 試験群と曝露期間

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

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

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

表 3.2.2.1 各試験群の目標曝露濃度（清浄空気群を除く）

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

3) 評価項目

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

また、細胞曝露試験により、排気の簡易スクリーニング評価を行った。この試験では、排気成分の濃度ではなく希釈比で評価するために、希釈比1/1の高濃度群と希釈比1/10の中濃度群の排気を用いた。入手可能で、かつ安全性の高い培養細胞株で、大気汚染研究や炎症に関連する研究（Huttunen et al., 2003 ; Fujii et al., 2003）で広く活用され、肺傷害に対し防御作用を示すヒト呼吸器系由来培養細胞A549を細胞曝露装置にセットし、清浄空気群から中濃度群、高濃度群の順で1時間ずつ曝露した。なお、A549³¹は、細胞バンクとして世界的に高い評価のある American Type Culture Collection（ATCC）より入手した。

²⁷ 酸化ストレス [Oxidative stress]: 体内で発生する活性酸素と、活性酸素を消去する抗酸化能のバランスが崩れることによって生じ、細胞機能障害や細胞死を引き起こす。

²⁸ 遺伝子解析 [gene analysis]: 遺伝子の発現量（タンパク質の合成量）について、その鋳型となる mRNA の発現量を解析する。

²⁹ リアルタイム PCR [Real Time-Polymerase Chain Reaction] 解析: リアルタイムに定量しながら酵素を用いて核酸増幅し、特定の配列の DNA 量を検出する方法。遺伝子の発現量を測定するためには、mRNA の情報を DNA に逆転写してから測定する。

³⁰ BALF [Bronchoalveolar Lavage Fluid]: 気管支肺胞洗浄液。BALF 内の白血球数やその分画を確認することで、炎症状態を把握できる。

³¹ ヒト呼吸器由来培養細胞（ヒト肺上皮細胞株 A549） [human lung alveolar carcinoma cells、 type II pneumocytes]: 大気汚染研究や炎症に関連する研究で活用されており、肺傷害に対し防御作用を示す II 型のヒト肺上皮細胞。

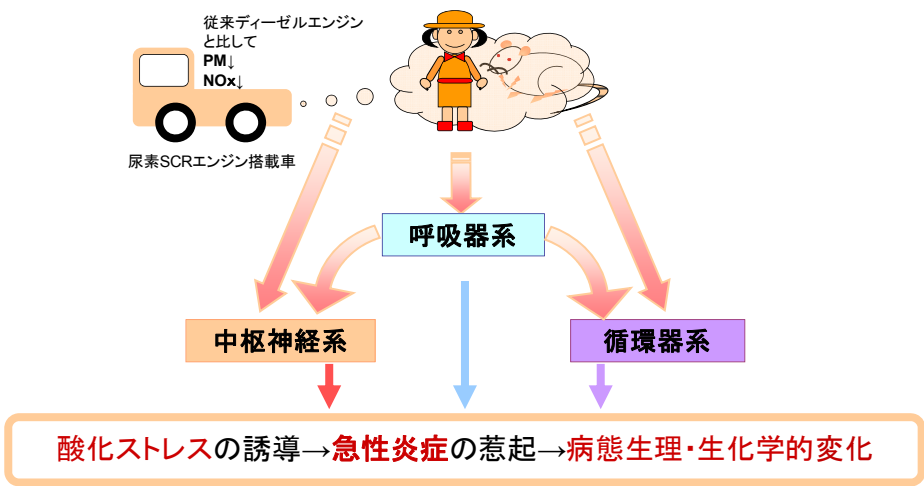


Fig. 3.2.2.2 尿素 SCR エンジン排気曝露による影響についての仮説

	酸化ストレス	炎症	病態生理・ 生化学的变化
呼吸器系 	遺伝子解析 : CYP1A1, HO-1	遺伝子解析 : IL-1 β , TNF α BALF (気管支肺胞洗浄液) : 細胞数, 細胞分画	血液生化学 : PO ₂ , PCO ₂ , pH 病理 (光顕) : 形態変化
循環器系 	遺伝子解析 : CYP1A1, HO-1 血液酸化ストレス : 8-OHdG, PAO	遺伝子解析 : IL-1 β , TNF α	血液生化学 : Na ⁺ , K ⁺ , BUN 病理 (光顕) : 形態変化
中枢神経系 	遺伝子解析 : CYP1A1, HO-1	遺伝子解析 : IL-1 β , TNF α	病理 (光顕) : 形態変化

Fig. 3.2.2.3 健康影響解析項目概覧

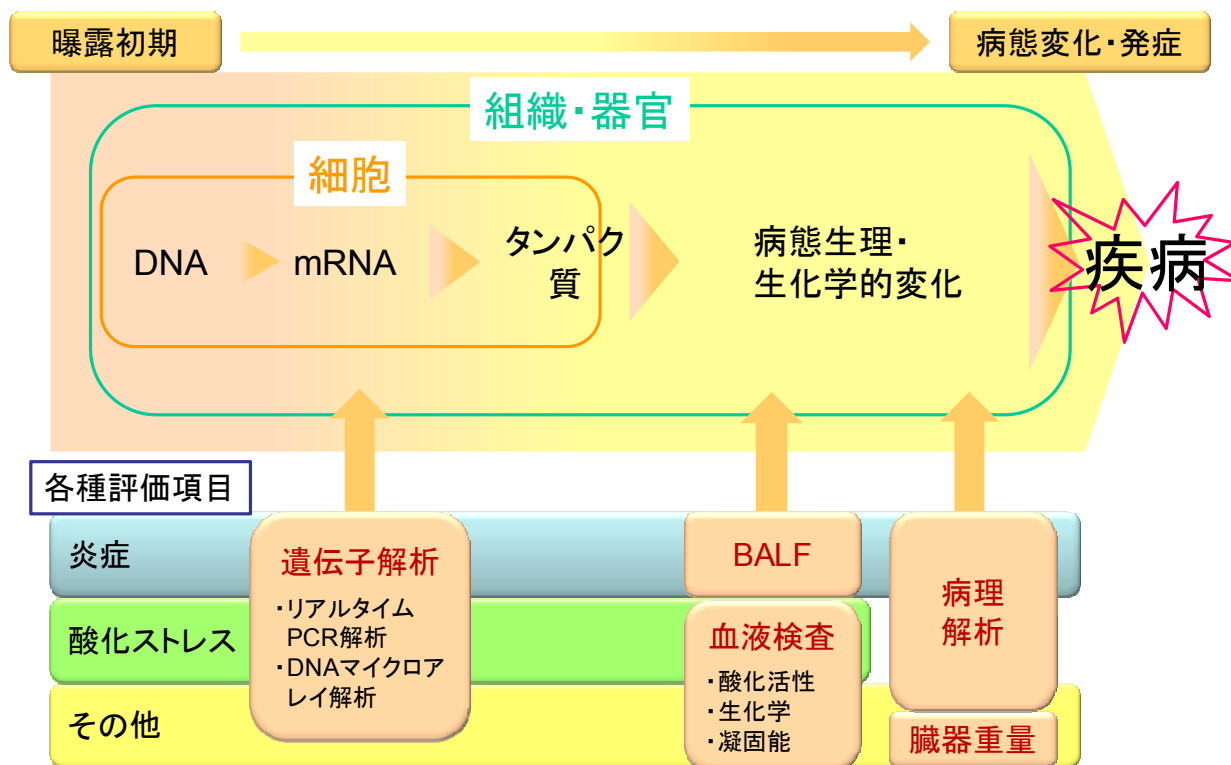


Fig. 3.2.2.4 吸入曝露試験評価のながれ

4) 動物解剖

各吸入曝露期間終了後、ラットを解剖した。試料採取スケジュールを表 3.2.2.2 に示した。1 日曝露動物の解剖は曝露終了後、3、7 日曝露動物は曝露終了翌日にサンプリングした。なお、7 日曝露動物は病理解析用に曝露終了後にサンプリングした。両エンジン排気とも、曝露の影響を考慮し、排気濃度の高い群から、高濃度群、中濃度群、低濃度群、エンジン比較群、清浄空気群の順で解剖した。

ラットにペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液、50 mg/mL、大日本製薬株式会社）を 1 匹あたり 15 mg 腹腔内投与し全身麻酔処置をした後、開胸し心採血（右心室）を行った。

摘出臓器は、1 日曝露では気管・肺、心臓、大脳のみ採取し、3、7 日曝露では気管・肺、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、大脳、小脳を採取した。各サンプリング手順を Fig. 3.2.2.5 に示した。

表 3.2.2.2 試料採取スケジュール

曝露期間(日)		1	2	3	4	5	6	7	(8)
解剖・サンプリング	サンプリング数	◎ 曝露直後			◎ 曝露翌日			◎ 曝露直後	◎ 曝露翌日
ラット吸入曝露試験									
体重・摂餌量・摂水量計測	~24	○	○	○	○	○	○	○	○
臓器重量	6	○			○				○
血液生化学検査		○			○				○
血液酸化ストレス		○			○				○
BALF採取					○				○
遺伝子解析		○			○				○
血液凝固検査	6							○	
病理解析								○	
細胞曝露試験									
細胞毒性試験	3		○						
遺伝子解析	3			○					

但し、計24匹/群、5群、120匹/エンジン試験。1日曝露は曝露直後、3および7日曝露は曝露翌日に解剖した。ペントバルビタールNa処置(ip)後、右心採血にて解剖に供した

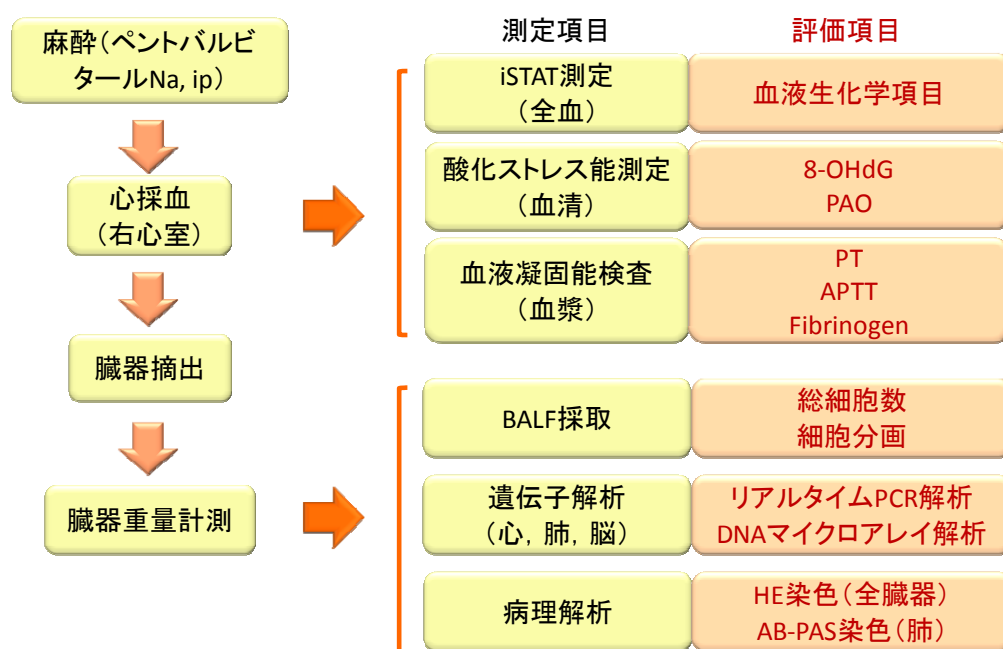


Fig. 3.2.2.5 各種サンプリングフロー

5) BALF 採取

3、7日曝露ではBALF³²採取を行い、気道および肺内の炎症を評価した (Fig. 3.2.2.6)。

³² BALF[Bronchoalveolar Lavage Fluid]:気管支肺胞洗浄液。

ラットの気管・肺を摘出し、重量計測後、気管にカテーテルを挿入した。右肺前葉は遺伝子解析に使用するため、右主気管支肺門部を結紮し BAL 液が混入しないようにした。甲状腺下部より、カテーテル（アトム静脈カテーテル節付 5Fr.、Cat.No. 44405、アトムメディカル株式会社）を気管内に挿入し、調整しておいた BAL 液（9.6 g/L PBS³³, 1 g/L BSA³⁴, 18.6 mg/L EDTA 2Na³⁵）1.5 ml を 4 回出し入れし、それを 3 回繰り返して、気管・肺を洗浄し回収した。

採取した BALF を 4°C、1000 rpm で 10 分間遠心し上清を採取した。また、沈査（上清を含む 500 μL）のうち、50 μL を Türk 150 μL と混和し、細胞数を Bürker-Türk 血球計算盤で測定し、下記の式で総細胞数を計算した。

$$4 \text{ 視野平均計測数} \times 10 \text{ (深さ)} \times \text{希釈倍率} = \text{細胞数 (}/\mu\text{L)}$$

一方、沈査のうち 100 μL を BAL 液 300 μL と混和し、その溶液 100 μL と BAL 液 100 μL をサイトスピンした。風乾後、ディフクイック（Diff-Quik、国際試薬株式会社）染色³⁶して細胞を 200 個計測し、細胞分画（マクロファージ（Mφ）、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球）を算出した。

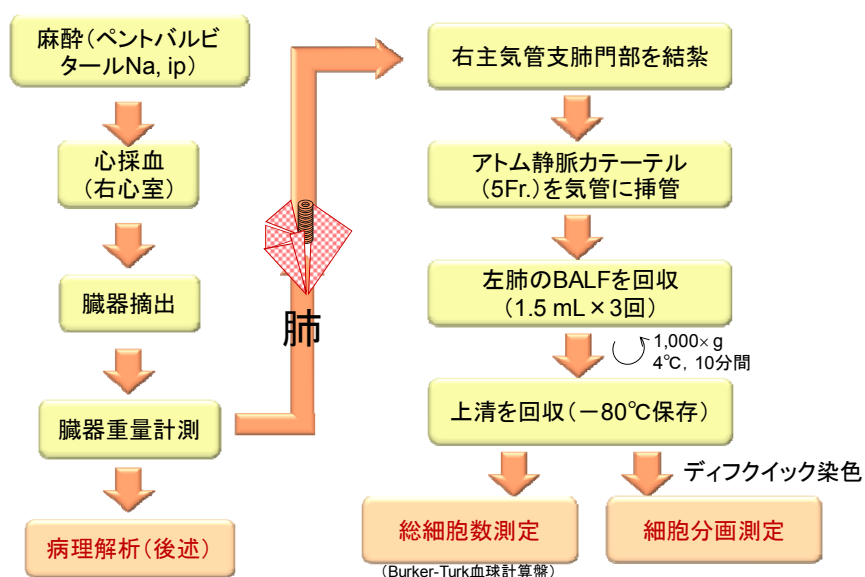


Fig. 3.2.2.6 BALF 採取フロー

³³ PBS [Phosphate-Buffered Salines]: リン酸緩衝液。生体内で普遍的に見出されるイオンで構成されるため、等張になるように調製されている。

³⁴ BSA [Bovine Serum Albumin]: 酵素を安定化するが、それ自身は酵素の性質には影響しない。

³⁵ EDTA 2Na [Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate]: エチレンジアミン四酢酸。抗凝固作用や保存効果がある。

³⁶ ディフクイック染色: 迅速な鑑別用血液染色液。

6) 血液検査

(1) 血液生化学検査

血液生化学検査は、1、3、7日曝露したラットの血液（全血）を用いた。アイ・スタットカートリッジEG7+、6+およびCrea（扶桑薬品工業株式会社）に全血を適量滴下し、汎用血液ガス分析装置（アイ・スタットアナライザー300F、扶桑薬品工業株式会社）を用いて下記の生化学検査項目を測定した（Fig. 3.2.2.7、表 3.2.2.3）。

アイ・スタットカートリッジEG7+は、Na（ナトリウム）、K（カリウム）、iCa（イオン化カルシウム）、Hct（ヘマトクリット）、pH、pCO₂（炭酸ガス分圧）およびpO₂（酸素分圧）の測定値、およびHgb（ヘモグロビン）、HCO₃（重炭酸）、TCO₂（総炭酸ガス）、BE（ベークエクセス）およびsO₂（酸素飽和度）の計算値。

アイ・スタットカートリッジ6+は、Glu（ブドウ糖）、BUN（尿素窒素）、Na、K、Cl（クロール）およびHctの測定値、およびHgbの計算値。

アイ・スタットカートリッジCreaは、Crea（クレアチニン）の測定値。

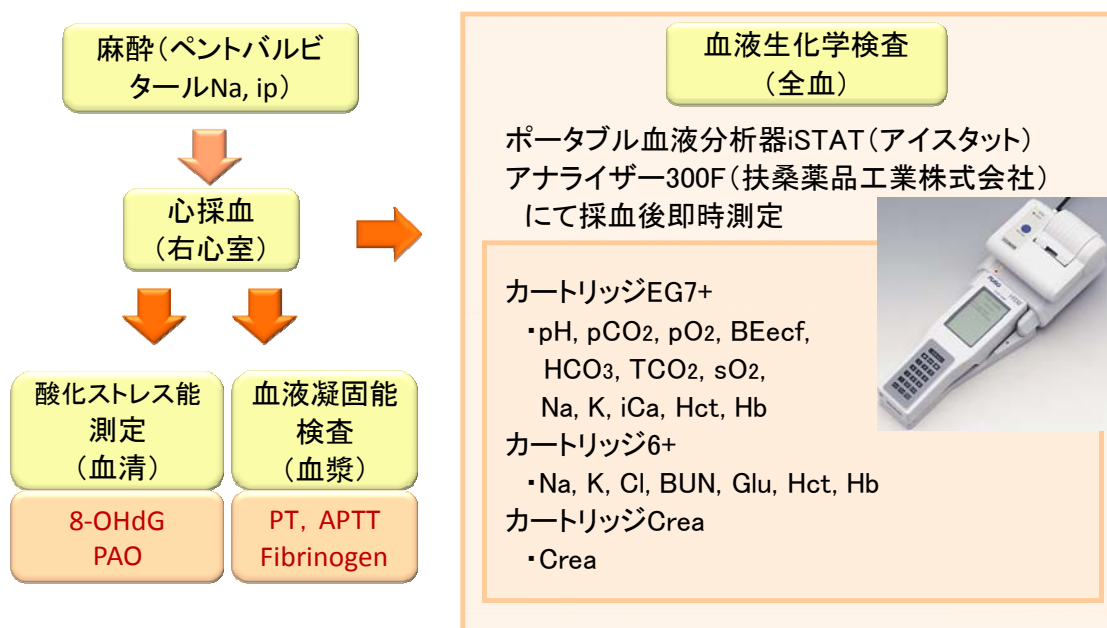


Fig. 3.2.2.7 血液生化学検査フロー

表 3.2.2.3 血液生化学検査項目一覧

検査項目	英名	和名	単位
pH	potential hydrogen, power of hydrogen	水素イオン指数	-
pCO ₂	carbon dioxide tension	炭酸ガス分圧	mmHg
pO ₂	oxygen tension	酸素分圧	mmHg
BEecf	base excess	ベークエクセス	mmol/L
HCO ₃	bicarbonate	重炭酸	mmol/L
TCO ₂	bicarbonate, total CO ₂	総炭酸ガス	mmol/L
sO ₂	oxygen saturation	酸素飽和度	%
Hct	hematocrit	ヘマトクリット	%PCV
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン	g/dL
Na	sodium	ナトリウム	mmol/L
K	potassium	カリウム	mmol/L
Cl	chlorine	クロール	mmol/L
iCa	calcium	イオン化カルシウム	mmol/L
BUN	blood urea nitrogen	尿素窒素	mg/dL
Crea	creatinine	クレアチニン	mg/dL
Glu	glucose	ブドウ糖	mg/dL

(2) 血液凝固能検査

血液凝固³⁷能検査には、7日曝露の病理解析用ラットの血漿を用いた (Fig. 3.2.2.8)。採血後、クエン酸ナトリウム³⁸と血液が1:9になるように、3.13%クエン酸ナトリウム溶液に血液を加え、血漿を分離した。全自動血液凝固線溶測定装置 STA Compact (ロシュ社)を用いた粘度変化検知方式により、血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT³⁹)、プロトロンビン時間 (PT⁴⁰)、フィブリノーゲン量を測定した。

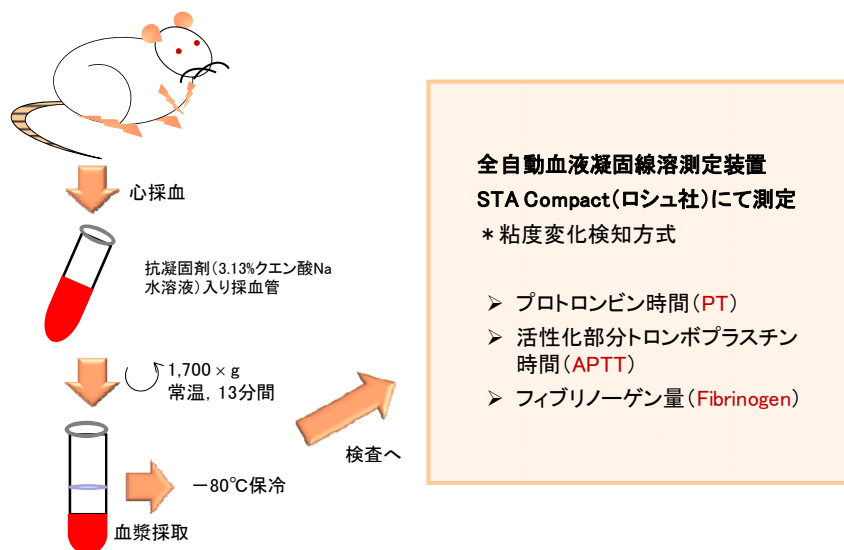


Fig. 3.2.2.8 血液凝固能検査フロー

³⁷ 凝固：フィブリノーゲンがトロンビンの作用によって フィブリンに変化する現象。

³⁸ クエン酸ナトリウム：血液抗凝固剤。血液中に遊離している Ca²⁺がクエン酸カルシウムとなって除去され、凝固が進行しない。

³⁹ APTT [Activated Partial Thromboplastin Time]：第 XII、XI 因子（内因系）、高分子キヌノゲン、プレカリクレインを十分に活性化して、第 IX、VIII 因子（内因系）と共通凝固系を見る検査。

⁴⁰ PT [Prothrombin Time]：第 VII 因子（外因系）と共通凝固系の因子を見る検査。

(3) 酸化ストレス能検査

酸化ストレス⁴¹能検査では、1、3、7日曝露したラットの血清を用いた。

採血後、血液をプレイン真空採血管（真空採血システム・ベネジェクト II、VP-P070K30、テルモ株式会社）に入れ、遠心後、血清を得た。

酸化ストレス能測定には、酸化的損傷の指標としてディーゼル排気影響によく用いられている 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)⁴² (Valavanidis et al., 2005) および全般的な抗酸化能として Potential Anti Oxidant (PAO)⁴³を用いた。なお、測定レンジ範囲外の数値については、検出されないデータ (Not Detected: ND) として解析からは除外した。

⁴¹ **酸化ストレス** [Oxidative stress]: 体内で発生する活性酸素と、活性酸素を消去する抗酸化能のバランスが崩れることによって生じ、膜脂質、DNA、蛋白質などの生体高分子に修飾や障害を与え細胞機能障害や細胞死を引き起こす。的確な評価には生体内における活性酸素（損傷レベル）と抗酸化能の両面を測定する必要がある。

⁴² **8-OHdG** [8-hydroxy-2'-deoxyguanosine]: 遺伝子 DNA が修復される過程で細胞外に排出され、さらに血液を経て尿中に排泄される。また、比較的安定な物質で、生体内で代謝や分解されることなく尿中に速やかに排泄されることから、活性酸素による生体損傷を鋭敏に反映する優れたバイオマーカーとされている。

⁴³ **PAO** [Potential Anti Oxidant]: 尿酸を利用して、水溶性、脂溶性の抗酸化物質を幅広く検出することで抗酸化能（還元能）を評価。

a) 酸化的損傷 (8-OHdG) の測定

「高感度 8-OHdG Check ELISA」(Cat.No. KOG-HS10/E, 測定レンジ: 0.125~10 ng/mL, 日本老化制御研究所) キットを用いて、血清中の 8-OHdG を測定した。測定方法は、キット添付のプロトコールに従った。添加回収試験で回収率を確認した後、特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA⁴⁴を行い、マイクロプレートリーダー (Model 680、日本バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)) を用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。なお、血清はマイクロコン (Microcon Ultracel YM-10, Cat.No. 42407, MILLIPORE) を用いた限外濾過法⁴⁵で遠心し、その濾液をサンプルとした。

b) 抗酸化能 (PAO) の測定

抗酸化能測定キット「PAO」(Cat.No. KPA-050, 測定レンジ: 21.9~4378 μmol/L (reduction power), 日本老化制御研究所) を用いて、血清中の抗酸化力の評価を行った。キット添付のプロトコールに従って血清を処置し、マイクロプレートリーダーで波長 490 nm の吸光度を測定した。サンプルの吸光度から検量線により尿酸相当濃度 (mmol/L) を算出し、さらに下式にて銅イオンに対する還元力を計算した。

$$\text{Cu 還元力 } (\mu\text{M}) = \text{尿酸 } (1 \text{ mM}) \times 2189$$

7) 遺伝子解析

生体内での反応を解析するには血液検査や病理解析などの方法があるが、病態生理・生化学的变化として発現する前の変化は、目的遺伝子の発現変動により捉えることが可能である。ほとんどの遺伝子⁴⁶はタンパク質をコードしており、一部の例外を除きセントラルドグマ⁴⁷に従って転写、翻訳が行われる (Fig. 3.2.2.9)。そのため、遺伝子の発現量 (タンパク質の合成量) は、その鋳型となる mRNA⁴⁸ の発現量を見ることで、ある程度の定量化が可能となる。

⁴⁴ **ELISA** [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay]: 試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられる方法。

⁴⁵ **限外濾過法**: 限外濾過膜 (細孔径が 1 nm から 100 nm (0.1 μm) の範囲の多孔質膜) による膜分離。

⁴⁶ **遺伝子** [gene]: 生体の DNA の一部分で、一つのタンパク質の情報を持つ DNA の部分。遺伝子が翻訳されてタンパク質が作られる。細胞分裂の際には DNA が複製され、同じ遺伝子を持つ 2 つの細胞ができる。遺伝子は次の世代にも受け継がれる。

⁴⁷ **セントラルドグマ** [Central dogma]: フランシス・クリックが 1958 年に提唱した分子生物学の概念。遺伝情報は DNA → (複製) → DNA → (転写) → RNA → (翻訳) → タンパク質の順に伝達されると主張するもの。

⁴⁸ **mRNA** [messenger ribonucleic acid]: 伝令 RNA。蛋白質に翻訳され得る塩基配列情報と構造を持った RNA。DNA からコピーした遺伝情報を担っており、その遺伝情報は、特定のアミノ酸に対応するコドンと呼ばれる 3 塩基配列になっている。

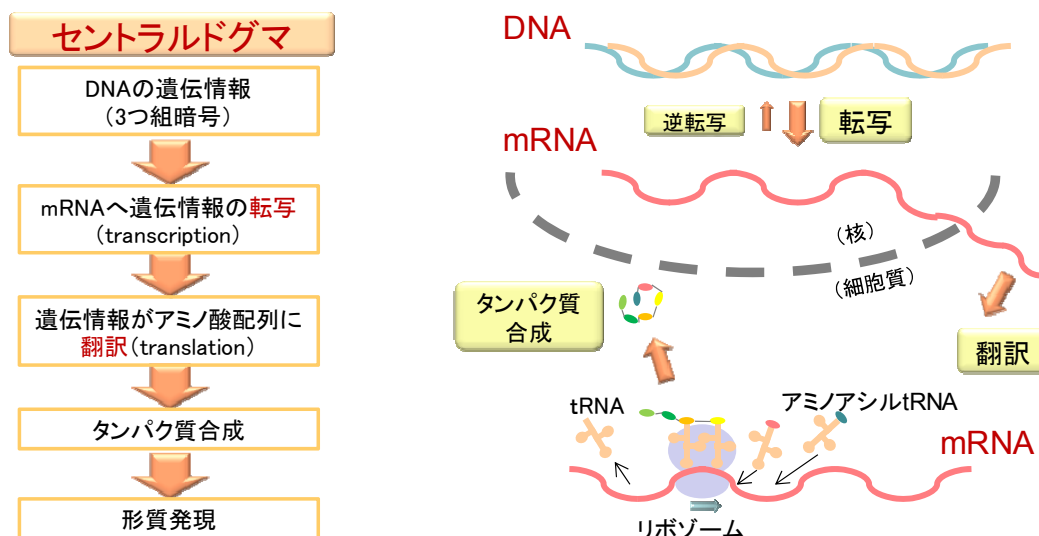


Fig. 3.2.2.9 遺伝情報の流れ

ここでは、JARIで頻用しているリアルタイムPCR法とDNAマイクロアレイ法を用いて、遺伝子発現量を解析した（表 3.2.2.4）。

リアルタイムPCR解析は、増幅させた検討遺伝子の立ち上がりサイクル数（Cycle Threshold:Ct値）を求めて、内部標準遺伝子と比較する方法で解析した。一方、DNAマイクロアレイ解析は、細胞や組織から抽出したmRNAからcDNAを合成し、蛍光色素で標識したものとハイブリダイズさせることで、発現変動している遺伝子を蛍光強度により検出し、網羅的に定性評価した。

遺伝子解析は、1日、3日、7日曝露したラットの気管・肺、心臓、大脳での遺伝子発現を解析した（Fig. 3.2.2.10）。遺伝子解析用の採取部位は、肺が右肺前葉、心臓が左心室壁（冠状動脈の回旋枝付近）とした。また、大脳は、右側の脳皮質を3等分に前頭断したうち中央部の側頭葉（およびArea 6）とした。

表 3.2.2.4 リアルタイムPCR解析とDNAマイクロアレイ解析の特徴

リアルタイムPCR解析		DNAマイクロアレイ解析
定量的	評価	定性的
リアルタイムPCRでは、PCR増幅産物をリアルタイムでモニタリングし指数関数的増幅領域で定量を行う	概念	複数の遺伝子を同時に、網羅的に解析
PCR産物の増幅速度は、蛍光色素の蛍光強度によって検出	検出方法	mRNAを抽出し、逆転写によって合成したcDNAをそれぞれ異なる蛍光色素(Cy3(緑)、Cy5(赤))で標識することにより、競合的にハイブリダイゼーションさせ検出
1遺伝子	解析遺伝子数	搭載遺伝子数(4万など)

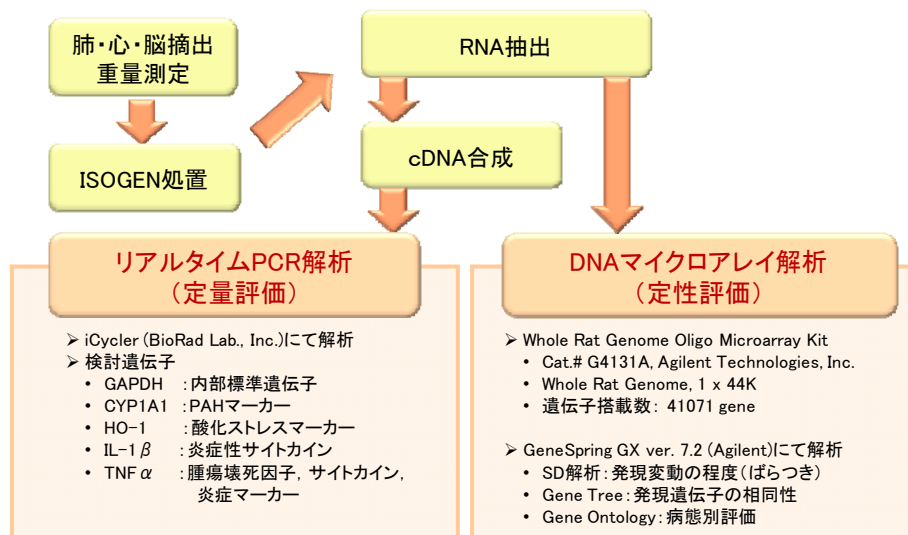


Fig. 3.2.2.10 遺伝子解析概要

(1) RNA 抽出

RNA 抽出用試薬 ISOGEN (Cat.No. 311-02501、株式会社ニッポンジーン) 記載マニュアルに従って、各臓器サンプルを total RNA 抽出した。臓器をホモジネートし、クロロホルムおよびイソプロピルアルコールで処置後、アルコールを除き、風乾させた。その後、DEPC⁴⁹処理水を加え、分光光度計により 260 nm と 280 nm の OD⁵⁰値を測定し、RNA 量を計算した。

(2) cDNA 合成

逆転写酵素キット (SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Cat. No. 18080-051, Invitrogen) を用い、キット内に添付されたマニュアルに従って、total RNA を cDNA に合成した。

(3) リアルタイム PCR 解析

QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR kit (Cat.# 204143, QIAGEN) を使用し、キット添付のプロトコールに従って解析した。96 wellプレート (PCR-96-RT, BM Bio) にサンプルおよびPCR反応試薬(表3.2.2.5)をアプライした。10X External Well Factor Solution (BioRad Laboratories, Inc.) で CCDカメラの補正を行った (Well Factor Plate (External) 法) 後、iCycler IQリアルタイムPCR解析システムMC (No. 170-8740MC, BioRad Laboratories, Inc.) で、遺伝子の発現量を定量的に解析した (表3.2.2.6)。最後に、Melt CurveからPCR産物が単一なものであることを確認し、単一でなかったときにはデータを除外した。なお、サンプル解析は2本組みアッセイで行った。

⁴⁹ DEPC [Diethylpyrocarbonate]: DEPC で処理することにより RNase を不可逆的に失活させる。

⁵⁰ OD [Optical Density]: 光学密度。一般的には吸光度と呼ばれる。

表 3.2.2.5 リアルタイム PCR 解析に用いる Master Mix

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

表 3.2.2.6 Well Factor Plate 法による PCR 増幅サイクル

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

評価した標的遺伝子とその遺伝子を増幅させるために必要な Primer の配列を表 3.2.2.7 に示した。検討した標的遺伝子は、Cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1)⁵¹、Heme oxygenase-1 (HO-1)⁵²、Interleukin-1 beta (IL-1β)⁵³そして Tumor necrosis factor alpha (TNFα)⁵⁴とした。

CYP1A1 は、DEP 中の多環芳香族炭化水素 (PAH) の曝露マーカーとして知られている (Baulig et al., 2003 ; Vogel et al., 2005)。

⁵¹ **CYP1A1** [Cytochrome P450 1A1]: PAH により発現誘導する酵素の一つで、酵素のシトクロム P-450 遺伝子 1A1 のタンパク質をコードする。

⁵² **HO-1** [Heme oxygenase-1]: ヘム (酸化促進剤、Mφ から TNFα を分泌させる) を、ビリベルジン (強力な抗酸化作用) と、一酸化炭素 (抗炎症作用、抗アポトーシス作用) と遊離鉄 (ROS 生成を触媒するが、分解反応時にフェリチンに取り込まれる) に分解する酵素。

⁵³ **IL-1β** [Interleukin-1 beta]: B 細胞を増殖させ、抗体産生を増強させる。単球、Mφ に作用して、TNFα、IL-1、IL-6、IL-8 の産生を誘導するなどの作用がある。

⁵⁴ **TNFα** [Tumor necrosis factor alpha]: Mφ、好中球の活性化により微小血栓形成作用がある。また、腫瘍細胞を障害 (抗腫瘍効果) したり、炎症を起した細胞のアポトーシスを誘発したりする作用がある。

HO-1 は、酸化ストレスマーカーであり、酸化ストレスから細胞を保護する生体防御機構の一つとして、重要な酵素である（高橋ら、2007；Li et al., 2002）。

IL-1 β は炎症マーカーであり（Pacheco et al., 2001）、単球・M ϕ 、リンパ球（B細胞）、内皮細胞、ケラチノサイトなどから産生され、急性期反応を誘導する。

TNF α は腫瘍壊死因子、サイトカイン、炎症マーカーであり（Le Prieur et al., 2000）、M ϕ 、好中球、線維芽細胞、リンパ球（T細胞）、肥満細胞、NK細胞で産生される。

以上の検討遺伝子は、DE および DEP の曝露により発現変動が確認されている。なお、内部標準遺伝子⁵⁵として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を用い、発現量のサンプル間格差を補正した

表 3.2.2.7 ラット標的遺伝子とその Primer の配列

	Primer	Sequence	mer
GAPDH	Sense	5'- CAGTCAAGGCTGAGAATGG	-3' 19
	Antisense	5'- CGACATACTCAGCACCAGC	-3' 19
CYP1A1	Sense	5'- TGTGTATGGATTCCCAGCCTTC	-3' 22
	Antisense	5'- TGGACTCTTCAGACCTTTGGGA	-3' 22
HO-1	Sense	5'- AGAGTTTCCGCCTCCAACCA	-3' 20
	Antisense	5'- CGGGACTGGGCTAGTTCAGG	-3' 20
IL-1 β	Sense	5'- CTCACAGCAGCATCTCGACAA	-3' 21
	Antisense	5'- GCTCCACGGGCAAGACATAG	-3' 20
TNF α	Sense	5'- GACAAGGCTGCCCCGACTAT	-3' 20
	Antisense	5'- CAAGGGCTCTTGATGGCGGA	-3' 20

標的遺伝子の発現比較は、清浄空気群の発現量を 1 として発現比率を算出し、増幅が指数関数的に起こり一定の増幅産物量になるサイクル数（threshold Cycle: C_T 値⁵⁶）で評価した。

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

遺伝子発現比率（対 GAPDH）： $2^{-\Delta C_T}$

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

⁵⁵ 内部標準遺伝子：相対定量解析を行う際、サンプル間の定量値を補正するための遺伝子。

⁵⁶ Ct [Threshold cycle]値：リアルタイム PCR 法を用いた解析で、一定の増幅産物量になるサイクル数のこと。本来、リアルタイム PCR では、任意の PCR プロダクトを得るのに要した PCR サイクル数から標的遺伝子のテンプレート量（発現量）を計測するが、ターゲット遺伝子間および内部標準との増幅効率がほぼ等しいことを前提にした比較 Ct 法（ $\Delta\Delta C_T$ 法）では各サンプルを段階希釈し内部標準遺伝子を含む各標的遺伝子に対する検量線を作成する必要がない。

(4) DNA マイクロアレイ解析

DNA⁵⁷マイクロアレイ解析⁵⁸法により、現在、ほぼ全てのヒトやラットの遺伝子発現解析が可能であり、その簡便性や精度の高さからあらゆる疾患を対象とした毒性評価への応用が期待できるようになっている。これまでの JARI の試験経験より、搭載遺伝子数の多さや感度の高さからオリゴ DNA マイクロアレイを選定した。

複数の遺伝子を網羅的に定性解析する方法で、コントロールサンプルと比べて遺伝子発現量の変化が見られる遺伝子について、蛍光強度の増減と色調の変化の形で検出した (2 色法)。

同一希釈系列の臓器サンプルは、1 日曝露、7 日曝露した高濃度群を被験物質とし、それぞれの清浄空気群を標準化物質とした。また、エンジン排気比較系列の臓器サンプルでは、7 日曝露したエンジン比較群を比較するため、尿素 SCR エンジン排気を被験物質とし、対照エンジン排気を標準化物質とした。

抽出した total RNA を RNA6000 Nano LabChip[®] Kit (No.5065-4776, Agilent Technologies) を用いて、マイクロチップ型電気泳動装置 (Agilent 2100 bioanalyzer, Agilent Technologies) にて品質を確認した。抽出した total RNA を Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (No. 5184-3523, Agilent Technologies) のプロトコールに従って、cDNA を合成し、cyanine 3-CTP (Cy3-) / cyanine 5-CTP (Cy5-) 標識 cRNA⁵⁹を調製 (ただし、Cy3-は標準化群、Cy5-は検討群)、さらに、前述の RNeasy Mini Kit を用いて、cRNA を精製し、再度品質を確認した。Agilent In situ Hybridization kit-plus (No. 5184-3568, Agilent Technologies) を用いて、ハイブリダイゼーション⁶⁰溶液を作成し、Whole Rat Genome Oligo Microarray Kit (No. G4131A-60510, Agilent Technologies, Inc.) を用いて cRNA を Hybridize した。17 時間後、ハイブリダイゼーションチャンバーから Oligo microarray を取り出し洗浄した。洗浄したオリゴ cDNA マイクロアレイは、Micro Array Scanner (No. G2505B, Agilent Technologies, Inc.) を用いて緑色波長 532 nm、赤色波長 633 nm で読み込み、Feature Extraction 9.5 で数値化を行った。画像解析ソフト Gene Spring GX ver. 7.3.1 (Agilent Technologies, Inc.) を用いて各遺伝子の発現量を解析した。さらに、遺伝子発現に関する各評価の計算は Microsoft Excel XP (Microsoft) を用いた。

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

⁵⁷ DNA [Deoxyribo Nucleic Acid] (デオキシリボ核酸) : アデニン(A)・チミン(T)・グアニン(G)・シトシン(C)の 4 つの塩基、デオキシリボース (五炭糖)、リン酸から成り立つ構成単位 (ヌクレオチド) をもつ。ヌクレオチド同士が結合して鎖を作る。2 本のヌクレオチド鎖が、互いに、塩基を中心側に向けて水素結合でつながる。ヌクレオチド鎖は、糖分子の構造に基づく方向性を持っているが、2 本が結合する時には常に逆向きに (反平行に) 結合することが知られている。これにより二重螺旋構造が形成される。

⁵⁸ DNA マイクロアレイ解析 [DNA microarray analysis] : 1 回の試験で膨大な量の遺伝子発現データを得ることができる技術。細胞や組織から抽出した mRNA から cDNA を合成して蛍光色素で標識したものとハイブリダイズさせることで、発現変動している遺伝子を蛍光強度により検出して、網羅的に解析することが可能。

⁵⁹ cRNA [complementary RNA] : mRNA に相補的な塩基配列からなる RNA。

⁶⁰ ハイブリダイゼーション [hybridization] : 相補的な配列をもつ DNA は互いに結合する。短い合成 DNA 配列に蛍光色素などのプローブを標識してハイブリダイズ (複製) させることによって相補的な遺伝子配列の有無を知ることが出来る。

さらに、標準偏差 (Standard Deviation; SD)、Gene Tree⁶¹、Gene Ontology⁶²による解析も行った。SDによる解析は、検出可能な全ての搭載遺伝子を対象に、標準化した発現量の変動の程度を示すためにSDを「ばらつき」として評価した。Gene Treeによる解析では、カラーバーにより各試験群間での発現傾向 (赤が発現亢進、緑が発現抑制) を視覚的に判断し、発現遺伝子の相同性を評価した。また、Distanceで示した数値は発現傾向の類似性を示しており、数値が近いほど発現傾向が似ていることを示す。また、Gene Ontologyによる解析では、項目に関連した遺伝子の大まかな発現変動をとらえるため、各病態生理・生化学的変化別に分類された遺伝子の変動傾向を確認した。

8) 病理解析

病理学的評価は、第一標的臓器である呼吸器 (気管、肺) を中心に、大脳、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、副腎、精巣、胸腺、腸管 (空腸、回腸、結腸) に関して、光学顕微鏡 (光顕) による観察により行った (Fig. 3.2.2.11)。光顕標本作製は、常法により、各臓器をホルマリン浸漬固定後水洗し、アルコール系列による脱水、クロロホルムによる置換を経て、パラフィン包埋によりパラフィンプロックを作製した。なお、肺は解剖時にホルマリンを気管内より注入固定後に処置した。パラフィンプロックは約2~5 μmで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE⁶³) 染色を施し光顕観察に供した。なお、呼吸器はHE染色に加え、炎症による粘液産生を評価するためPAS・アルシアン青 (AB-PAS⁶⁴) 染色も施した。

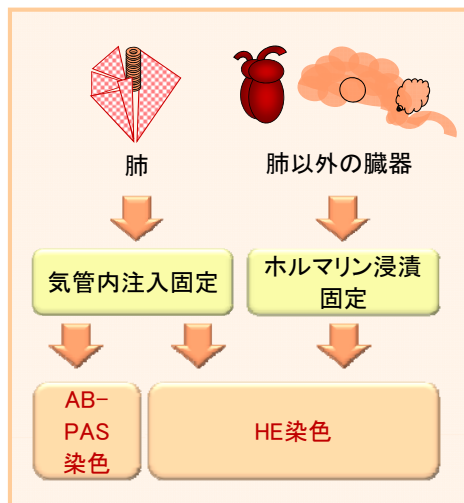


Fig. 3.2.2.11 病理解析フロー

⁶¹ **Gene Tree** : 遺伝子系統樹。それらの種の持つある遺伝子同士の系統関係を示すもの。

⁶² **Gene Ontology** : 遺伝子産物 (転写産物とタンパク質産物) に機能アノテーションを行うための用語集 (GO term) とその用語間の関係 (Ontology) を定義したもの。アノテーションとは、遺伝子のデータベースに遺伝子の属性を登録すること。

⁶³ **HE** [Hematoxylin-Eosin] : 病理組織の最も一般的な染色法。ヘマトキシリンは核・リボソーム等を青紫色 (好塩基性) に、エオジンは細胞質・線維・赤血球を赤色 (好酸性) に染色する。

⁶⁴ **AB-PAS** [Alcian Blue-Periodic Acid-Schiff] : シッフ試薬で中性ムコ多糖類を赤色に、アルシアン青で酸性ムコ多糖類を青色に染色する。気道の多列線毛上皮上に形成される杯細胞中の粘液産生が確認できる。

9) 統計解析

データは、平均値±標準偏差で示した。また、独立 2 標本間では、ANOVA (analysis of variance) の F 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.05$) には Student の t 検定を、認められなかったときには Wilcoxon 検定を行った。また、多群比較では、Bartlett 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.1$) には Dunnett 多重比較検定を、有意差が認められなかったときは Steel 検定を行った。 $P < 0.05$ で有意差ありとした。清浄空気群との比較は*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 、***: $P < 0.001$ で、1 日曝露(1日曝露データをサンプリングしていないものは3日曝露)との比較は†: $P < 0.05$ 、††: $P < 0.01$ 、†††: $P < 0.001$ で、そして、尿素 SCR エンジン排気と対照エンジン排気の比較は#: $P < 0.05$ 、##: $P < 0.01$ 、###: $P < 0.001$ で示した。

3.2.2.2 培養細胞曝露試験

1) 試験概要

細胞はヒト呼吸器系由来細胞 A549 (Cat.No. CCL-185, ATCC) を用い、曝露試験時に 7.0×10^6 cells/2 mL/insert になるように細胞濃度を調整した。曝露による影響を希釈比 (CO_2 ベース比) で比較するため、試験群には高濃度群 (1/1)、中濃度群 (1/10)、清浄空気群を用いた。細胞毒性試験⁶⁵および CYP1A1、HO-1、IL-1 β を標的遺伝子としたリアルタイム PCR 解析を実施し評価した。

2) 培養細胞曝露

曝露は、CULTEX^{®66}を用いた培養細胞曝露装置を用いた。培地⁶⁷は、D-MEM/F-12 (No.1320-033, Invitrogen) 500 mlに硫酸ゲンタマイシン⁶⁸ (抗生物質, No.G1522, SIGMA) 500 μ lと牛血清 (No. AQC23532, HyClone) 50 mlを添加したものを使用した。A549細胞は目標数濃度を 3.5×10^6 cells/mlになるように試験の3~5日前にinsert (FALCON[™] Cell Culture Inserts, Cat. No. [35]3090, Becton Dickinson Labware) 内へ2 ml播種し、37°C、5% CO_2 でインキュベートした。試験開始直前に、insertより培地を除去し、培養細胞曝露装置上段に設置した細胞曝露モジュールにinsertを設置し、37°Cの恒温槽で保温した無血清培地に浸るようにした。設置完了後、曝露流量を8.3 cc/minに設定し、動物曝露チャンバー内に給気されている排気をモジュール内に通して曝露を開始した (Fig. 3.2.2.12)。清浄空気群、中濃度群、高濃度群の順で1時間ずつ実施した。曝露終了後、速やかに2 mlの培地をinsert内に添加し37°C、5% CO_2 で再インキュベートした。

⁶⁵ 細胞毒性試験 [Cytotoxicity test]: 体内に存在する各細胞の機能や構造に作用する毒性を確認、評価するための試験。細胞の生存率に及ぼす影響を、毒性の強弱比較することで判定する。

⁶⁶ CULTEX[®]: 窒素酸化物や硫黄酸化物などのガス状物質をはじめ、ディーゼル排気や煙草の煙を培養細胞に曝露させる装置。

⁶⁷ 培地: 微生物や生物組織を培養するとき、その生育する素材となって、必要な栄養素などの供給源となるもの。

⁶⁸ 硫酸ゲンタマイシン: アミノグリコシド系抗生物質。グラム陰性菌、ブドウ球菌、レンサ菌などのタンパク合成を阻害することで、殺菌的に作用する。

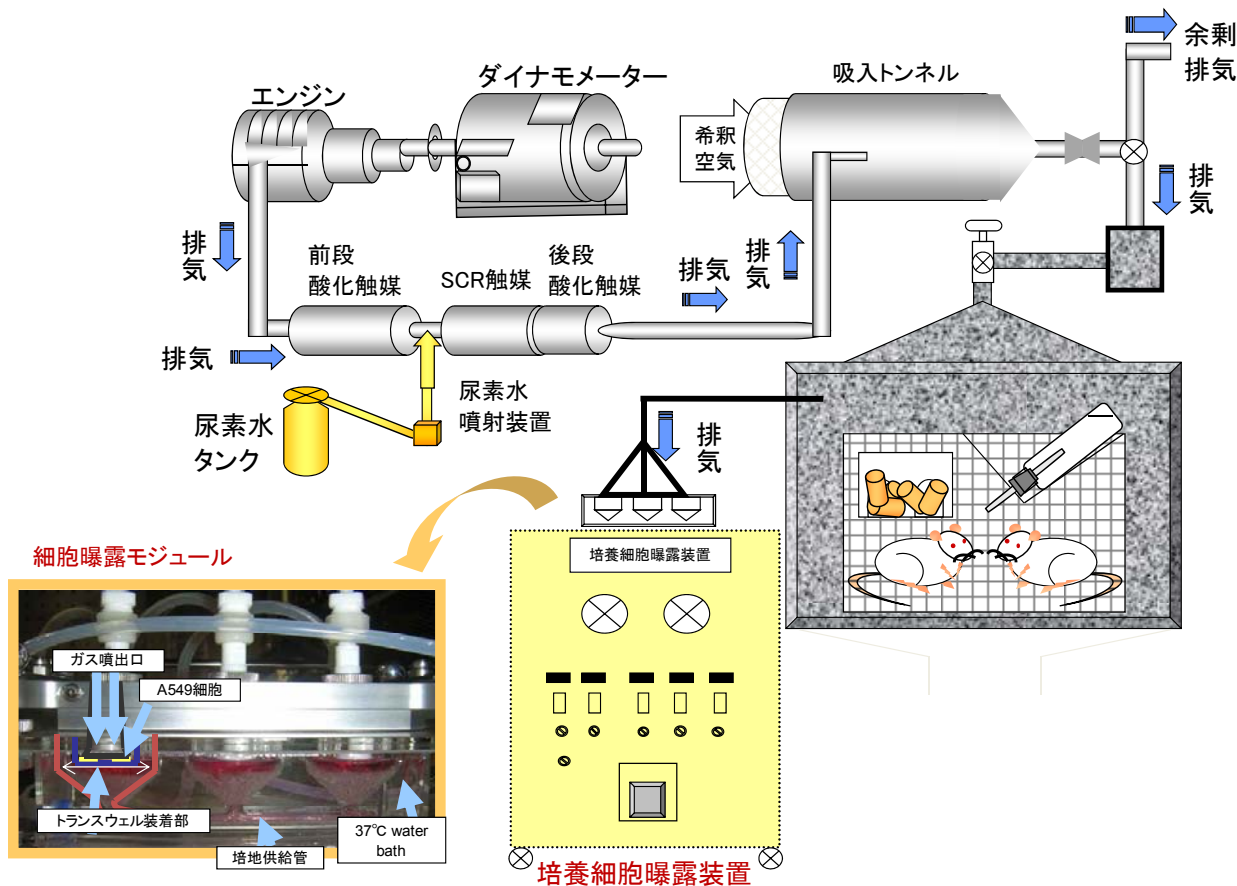


Fig. 3.2.2.12 培養細胞曝露装置概略図

3) 細胞毒性試験

曝露終了 22 時間後に、insert 内に細胞毒性測定用試薬 WST-8⁶⁹ (Cell Counting Kit-8, (株) 同仁化学研究所) を 50 μ l ずつ添加した。2 時間の静置後、100 μ l の吸光度 (450 nm) をプレートリーダー (Model680 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc.) で測定し細胞生存率を算出した。本試験は、2 本組みアッセイで行った。

4) 遺伝子解析 (リアルタイム PCR 解析)

3. 2. 2. 1 の 7) に示した方法に準じて、リアルタイム PCR 解析を行った。ただし、A549 細胞株はヒト由来細胞であるため、プライマーはヒト用を使用した (表 3.2.2.8)。

⁶⁹ WST-8 [Water Soluble Tetrazolium salts]: 細胞毒性測定用試薬。高感度水溶性ホルマザンを生成する新規テトラゾリウム塩。発色基質として利用したもの。

表 3.2.2.8 ヒト標的遺伝子とその Primer の配列

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

5) 統計処理

値はすべて平均値 \pm 標準偏差で示した。

細胞毒性試験については、清浄空気群 (BG) を 100% として相対的に評価し、対照群と比較して細胞生存率が 50% を下回った群があった場合には毒性ありとし、50% 細胞生存率を算出した。

また、リアルタイム PCR 解析については、BG を 1 として相対的に評価した。独立 2 標本間では、ANOVA (analysis of variance) の F 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.05$) には Student の t 検定を、認められなかったときには Wilcoxon 検定を行った。また、多群比較では、Bartlett 検定にて等分散性の検定を行い、有意差が認められた場合 ($P < 0.1$) には Dunnett 多重比較検定を、有意差が認められなかったときは Steel 検定を行った。 $P < 0.05$ をもって有意差ありとした。なお、清浄空気群との比較 (*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 、***: $P < 0.001$)、尿素 SCR エンジン排気と対照エンジン排気の比較 (#: $P < 0.05$ 、##: $P < 0.01$ 、###: $P < 0.001$) を示した。

3.3 結果

3.3.1 曝露環境モニタリング結果

3.3.1.1 エンジン運転

曝露期間中のエンジン運転条件を表 3.3.1.1 に示す。運転中は連続してモニタリングし、記録は曝露中に 1 時間毎に行った。

尿素 SCR エンジン、対照エンジンとも目標どおりに運転された。

表 3.3.1.1 エンジン運転条件

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		平均	SD	平均	SD
回転数	[rpm]	1320	0	1320	0
トルク	[Nm]	850	0	827	0
出力	[kW]	118	0	114	0
尿素添加量	[g/min]	52	0.1	-	-
排気温度	[°C]	373	0	457	0
排気圧	[kPa]	9	0	4	0
燃料流量	[g/min]	404	0	390	0
OCC入口温度	[°C]	369	0	-	-
SCR入口温度	[°C]	363	0	-	-
SCR出口温度	[°C]	361	0	-	-
吸入DT入口温度	[°C]	181	1.7	357	0

3.3.1.2 曝露ディーゼル排気の性状

希釈トンネルでの排気性状および捕集したPMの性状分析結果を表3.3.1.2に示した。NO₂以外の各測定成分濃度は、尿素SCRエンジン排気の方が低値であった。

表3.3.1.2 ディーゼル排気の性状（希釈トンネル）

	尿素SCRエンジン		対照エンジン	
	平均	SD	平均	SD
希釈比	29	0.1	29	0.1
吸入DT (°C)	22.5	0.0	28.7	0.2
CO (ppm)	0.7	0.0	7.6	0.0
CO ₂ (%)	0.30	0.00	0.30	0.00
THC (ppmC)	1.6	0.0	2.5	0.0
NO _x (ppm)	4.2	0.0	13.3	0.1
NO (ppm)	3.4	0.0	13.0	0.1
NO ₂ (ppm)	0.84	0.02	0.30	0.04
PM (HV) (mg/m ³)	0.034	0.001	1.032	0.025
SOF (%)	4.3		8.5	
Naphthalene (ng/m ³)	0.24		3.21	
Acenaphthene (ng/m ³)	N.D.		5.33	
Fluorene (ng/m ³)	N.A.		N.A.	
Phenanthrene (ng/m ³)	1.72		143	
Anthracene (ng/m ³)	0.11		15.6	
Fluoranthene (ng/m ³)	0.33		21.3	
Pyrene (ng/m ³)	0.40		23.3	
B[a]A (ng/m ³)	0.01		N.A.	
Chrysene (ng/m ³)	N.D.		N.A.	
B[b]F (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
B[k]F (ng/m ³)	N.D.		0.00	
B[a]P (ng/m ³)	Tr.		0.02	
DB[ah]A (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
B[ghi]P (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
I[123-cd]P (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
1-NP (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
1,3-DNP (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
1,6-DNP (ng/m ³)	N.D.		0.02	
1,8-DNP (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
Benzoquinone (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
Naphthoquinone (ng/m ³)	N.D.		20.6	
Anthraquinone (ng/m ³)	2.24		140	
Phenanthrenequinone (ng/m ³)	N.D.		55.2	
Chrysenequinone (ng/m ³)	N.D.		N.D.	
TA100-S9 (R/m ³)	*		120	
TA100+S9 (R/m ³)	*		100	
TA98-S9 (R/m ³)	*		40	
TA98+S9 (R/m ³)	*		30	

*: 復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以下

N.D. (Not Detected) : 検出されない

N.A. : 分析せず

Tr. : 検出されているが、定量不可

両エンジン排気のPM抽出物（SOF）の被験物質濃度と復帰変異コロニー数との関係をFig. 3.3.1.1に示した。尿素SCRエンジン排気では復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以下であり、変異原性は認められなかった。対照エンジン排気のSOFは陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したことから、このSOFには変異原性を示すことが認められた。比活性値とPM捕集時の流量から単位体積当りの復帰変異コロニー数（R/m³）を求めたのが、

表3.3.1.2中の数値である。

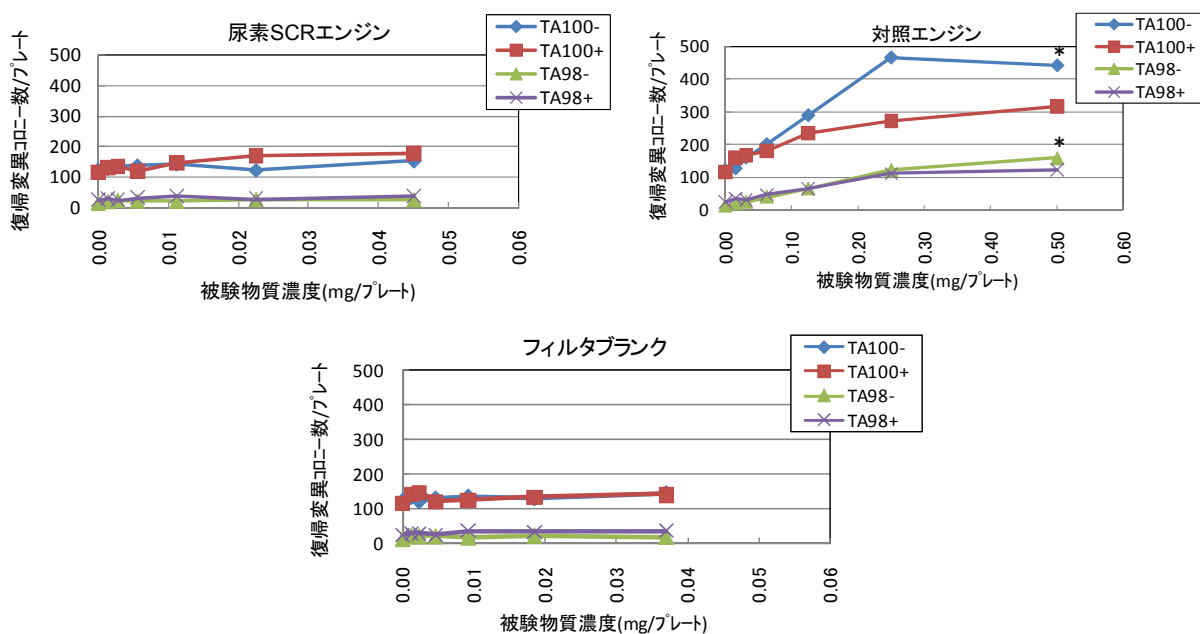


Fig. 3.3.1.1 SOFの変異原性 (エームス試験)

(*生育阻害)

SOFのDTTアッセイ (Fig. 3.3.1.2) より、200 nmolのDTTを消費するSOF濃度 (DTT50%消費濃度、試験に用いたSOF量が少ないため外挿値) (Fig. 3.3.1.3) は、尿素SCRエンジン排気のSOF濃度はフィルタブランクよりも低値であった。さらに、尿素SCRエンジン排気は対照エンジン排気と比較してDTTを消費するSOF濃度が高いことから、尿素SCRエンジン排気は対照エンジン排気よりもSOFの酸化活性が低いことが示された。

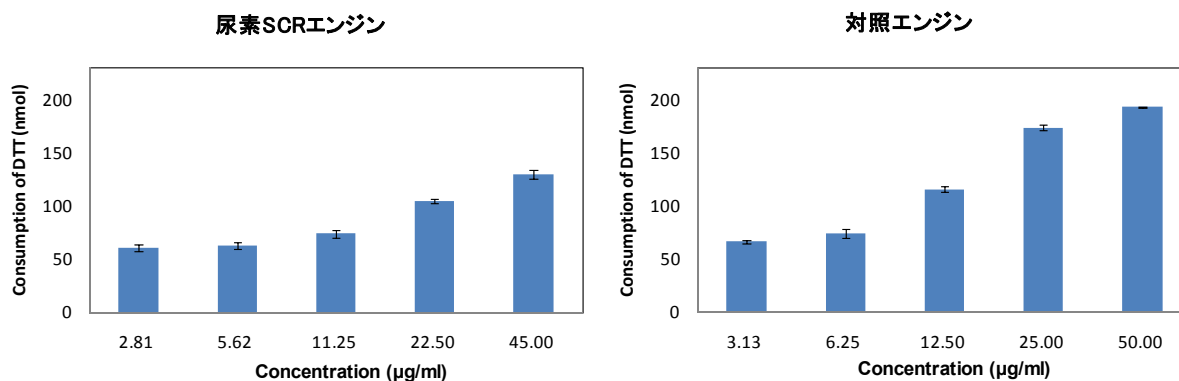


Fig. 3.3.1.2 SOFの酸化活性 (DTTアッセイ)

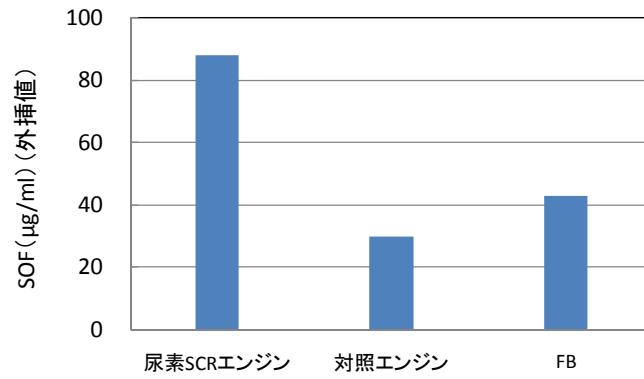


Fig. 3.3.1.3 DTT50%消費濃度（外挿値）

なお、金属元素はPM捕集フィルタの分析値がブランクフィルタの分析値よりも低かったため、両エンジン排気中の濃度は算出できなかった。

3.3.1.3 曝露チャンバー内の曝露濃度

1) 同一希釈系列

尿素SCRエンジン排気の各試験群の7日間における被験物質濃度測定結果を表3.3.1.3に、同様に対照エンジン排気の各群の測定結果を表3.3.1.4に示す。高濃度群のPM濃度とNO₂濃度は、尿素SCRエンジン排気で約0.04 mg/m³、0.78 ppm、対照エンジン排気で0.95 mg/m³、0.3 ppmであり、PM濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約0.04倍、NO₂濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約2.5倍であった。

高濃度群の微量成分（アルデヒド類や炭化水素類など）は、対照エンジン排気に比して尿素SCRエンジン排気で酸化触媒処理の効果により大きく低減された。各群のPM濃度とガス中のPAH濃度については、高濃度群のガス中のナフタレンなどは分析上の妨害成分が多く定量できなかったが、環数の少ないピレン以下のPAHはガス中に多い傾向がある。5環以上のPAHの多くは捕集流量の制約もあり検出されなかった。

尿素由来成分は曝露期間中2回測定した。尿素SCRエンジン排気中の尿素は、高濃度群で14.9 µg/m³、2回目に1.1 µg/m³が検出され、1回目が高値であったが、他の成分には特異的な変化は見られなかったため、2回の平均値を用いて約8 µg/m³の濃度とした。尿素SCRエンジン排気のみシアヌル酸とメラミンが微量検出された。対照エンジン排気で約0.5 µg/m³検出されたが、これは清浄空気と同程度であった。

PM個数濃度分布をFig.3.3.1.4に示した。また、個数最多径（モード径）と個数濃度を表3.3.1.3、表3.3.1.4中に示した。尿素SCRエンジン排気はモード径が50 nm前後であり、対照エンジン排気に比して粒径は小さく、個数濃度は対照に比して一桁近く低値であった。対照エンジン排気のモード径は80～90 nmであり、高濃度群のモード径が若干大きくなる傾向にあるが、これはPMの凝集によるものと思われる。

曝露動物の評価を行う1日目、3日目、7日目までの曝露濃度を表3.3.1.5および表3.3.1.6に示す。1、3日間の平均濃度は、7日間曝露の平均値と大差ないことから、1、3日間の微量成分濃度は7日間での測定値を適用可能であると見なした。

表3.3.1.3 各試験群の曝露濃度（尿素SCRエンジン）

		高濃度		中濃度		低濃度		清浄空気		エンジン比較	
		平均 ± SD		平均 ± SD		平均 ± SD		平均 ± SD		平均 ± SD	
PM	(mg/m ³)	0.036 ± 0.002		0.006 ± 0.001		0.003 ± 0.001		0.004 ± 0.001		0.019 ± 0.003	
NO ₂	(ppm)	0.78 ± 0.06		0.08 ± 0.01		0.04 ± 0.01		0.002 ± 0.001		0.40 ± 0.03	
NO _x	(ppm)	4.16 ± 0.19		0.42 ± 0.04		0.21 ± 0.02		0.011 ± 0.003		2.09 ± 0.10	
NO	(ppm)	3.38 ± 0.16		0.35 ± 0.03		0.18 ± 0.02		0.009 ± 0.003		1.70 ± 0.09	
CO	(ppm)	0.50 ± 0.11		0.17 ± 0.11		0.15 ± 0.11		0.13 ± 0.09		0.34 ± 0.11	
CO ₂	(%)	0.302 ± 0.003		0.066 ± 0.002		0.053 ± 0.001		0.040 ± 0.001		0.171 ± 0.003	
O ₂	(%)	20.5 ± 0.1		20.8 ± 0.1		20.8 ± 0.1		20.8 ± 0.1		20.7 ± 0.1	
THC	(ppmC)	2.90 ± 0.09		2.93 ± 0.09		2.93 ± 0.09		2.93 ± 0.09		2.92 ± 0.09	
CH ₄	(ppm)	1.87 ± 0.11		1.92 ± 0.11		1.92 ± 0.11		1.94 ± 0.11		1.89 ± 0.11	
NH ₃	(ppb)	53.4 ± 23.5		10.9 ± 0.6		10.2 ± 0.7		5.3 ± 0.9		21.50 ± 6.61	
HCHO	(ppb)	1.27 ± 0.21		1.26 ± 0.25		1.18 ± 0.21		1.21 ± 0.19		1.35 ± 0.12	
Acetaldehyde	(ppb)	0.57 ± 0.09		0.55 ± 0.06		0.53 ± 0.05		0.54 ± 0.04		0.62 ± 0.05	
SO ₂	(ppb)	0.85 ± 0.44		0.92 ± 0.04		0.91 ± 0.63		0.74 ± 0.05		1.12 ± 0.04	
1,3-Butadiene	(ppb)	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	
Benzene	(ppb)	0.49 ± 0.16		0.41 ± 0.17		0.41 ± 0.18		0.40 ± 0.17		0.41 ± 0.17	
N ₂ O	(ppm)	3.50 ± 0.09		0.60 ± 0.04		0.46 ± 0.02		0.31 ± 0.00		1.83 ± 0.05	
PM個数	(N/cc)	1.38E+05 ± 4.24E+03		1.42E+04 ± 1.70E+03		7.12E+03 ± 8.70E+02		0.00E+00 ± 0.00E+00		7.07E+04 ± 6.15E+02	
モード径	(nm)	51.8 ± 3.3		50.9 ± 1.1		45.5 ± 1.1		9.8 ± 0.0		48.8 ± 4.4	
		PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS
Naphthalene	(ng/m ³)	N.D.	1.9	N.D.	1.5	N.D.	1.7	N.D.	1.4	N.D.	1.5
Acenaphthene	(ng/m ³)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fluorene	(ng/m ³)	N.D.	0.3	N.D.	0.4	N.D.	0.6	N.D.	0.2	N.D.	0.4
Phenanthrene	(ng/m ³)	1.6	1.4	Tr.	1.1	Tr.	3.4	Tr.	0.0	0.9	0.9
Anthracene	(ng/m ³)	Tr.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	Tr.	N.D.
Fluoranthene	(ng/m ³)	1.0	Tr.	0.4	N.D.	0.4	0.9	N.D.	0.2	0.7	0.3
Pyrene	(ng/m ³)	1.3	0.5	0.7	0.2	0.6	1.3	N.D.	0.4	1.0	0.7
B[a]A	(ng/m ³)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Chrysene,B[b]F,B[k]F,B[a]P,DB[ah]A,B[ghi]P,I[123-cd]P,1-NP: Tr. or N.D.											
尿素	(μg/m ³)	7.98						0.47		0.52	
シアヌル酸	(μg/m ³)	0.09						N.D.		N.D.	
アンメリド	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.	
アンメリン	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.	
メラミン	(μg/m ³)	0.01						N.D.		N.D.	
シアアン	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.	

表3.3.1.4 各試験群の曝露濃度（対照エンジン）

		高濃度		中濃度		低濃度		清浄空気		エンジン比較	
		平均 ± SD		平均 ± SD		平均 ± SD		平均 ± SD		平均 ± SD	
PM	(mg/m ³)	0.952 ± 0.127		0.101 ± 0.008		0.059 ± 0.005		0.003 ± 0.000		0.032 ± 0.003	
NO ₂	(ppm)	0.31 ± 0.10		0.05 ± 0.02		0.02 ± 0.01		0.02 ± 0.01		0.32 ± 0.09	
NO _x	(ppm)	13.14 ± 0.25		1.33 ± 0.08		0.71 ± 0.08		0.05 ± 0.03		13.15 ± 0.26	
NO	(ppm)	12.83 ± 0.26		1.29 ± 0.08		0.69 ± 0.07		0.03 ± 0.03		12.83 ± 0.24	
CO	(ppm)	7.29 ± 0.22		0.81 ± 0.10		0.46 ± 0.10		0.10 ± 0.09		7.26 ± 0.22	
CO ₂	(%)	0.306 ± 0.005		0.067 ± 0.001		0.054 ± 0.001		0.041 ± 0.001		0.306 ± 0.005	
O ₂	(%)	20.5 ± 0.1		20.8 ± 0.1		20.8 ± 0.1		20.9 ± 0.1		20.5 ± 0.1	
THC	(ppmC)	4.08 ± 0.06		3.04 ± 0.05		2.97 ± 0.05		2.90 ± 0.05		4.00 ± 0.05	
CH ₄	(ppm)	1.84 ± 0.03		1.88 ± 0.02		1.87 ± 0.04		1.91 ± 0.05		1.84 ± 0.02	
NH ₃	(ppb)	31.8 ± 18.8		12.0 ± 8.0		11.5 ± 3.6		5.9 ± 3.8		24.8 ± 10.1	
HCHO	(ppb)	46.95 ± 0.01		6.61 ± 2.01		4.29 ± 1.16		1.76 ± 1.47		49.98 ± 0.72	
Acetaldehyde	(ppb)	10.64 ± 0.82		2.58 ± 0.99		2.12 ± 0.95		1.63 ± 1.11		11.23 ± 0.62	
SO ₂	(ppb)	6.58 ± 0.91		1.24 ± 0.93		1.72 ± 1.14		0.84 ± 0.29		1.37 ± 0.71	
1,3-Butadiene	(ppb)	4.90 ± 0.36		0.57 ± 0.12		0.19 ± 0.16		0.00 ± 0.00		4.60 ± 0.32	
Benzene	(ppb)	2.69 ± 0.11		0.61 ± 0.01		0.50 ± 0.02		0.41 ± 0.03		2.61 ± 0.16	
N ₂ O	(ppm)	0.32 ± 0.00		0.31 ± 0.00		0.31 ± 0.01		0.31 ± 0.00		0.32 ± 0.01	
PM個数	(N/cc)	1.07E+06 ± 3.40E+03		1.15E+05 ± 1.42E+03		6.32E+04 ± 1.18E+03		8.16E+00 ± 4.52E+00		3.63E+04 ± 2.62E+01	
モード径	(nm)	91.5 ± 4.7		81.3 ± 1.1		77.8 ± 3.9		58.2 ± 0.5		80.2 ± 14.7	
		PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS	PM	GAS
Naphthalene	(ng/m ³)	3.0	N.Q.	N.D.	90.7	N.D.	46.2	N.D.	1.6	N.D.	N.Q.
Acenaphthene	(ng/m ³)	5.1	N.D.	N.D.	1.2	N.D.	1.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fluorene	(ng/m ³)	3.0	N.Q.	Tr.	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.	0.2	N.D.	N.Q.
Phenanthrene	(ng/m ³)	144.3	46.2	7.3	5.5	2.3	4.2	Tr.	0.8	1.3	22.2
Anthracene	(ng/m ³)	18.0	1.2	1.0	0.6	0.4	0.5	N.D.	N.D.	N.D.	0.4
Fluoranthene	(ng/m ³)	30.6	0.6	3.7	0.5	2.0	Tr.	Tr.	0.4	1.1	0.4
Pyrene	(ng/m ³)	37.1	1.0	5.0	1.1	3.0	0.2	Tr.	1.1	1.1	0.4
B[a]A	(ng/m ³)	0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Chrysene,B[b]F,B[k]F,B[a]P,DB[ah]A,B[ghi]P,I[123-cd]P,1-NP: Tr. or N.D.											
尿素	(μg/m ³)	0.49						0.62		0.55	
シアヌル酸	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.	
アンメリド	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.	
アンメリン	(μg/m ³)	N.D.						0.00		N.D.	
メラミン	(μg/m ³)	N.D.						0.00		N.D.	
シアアン	(μg/m ³)	N.D.						N.D.		N.D.	

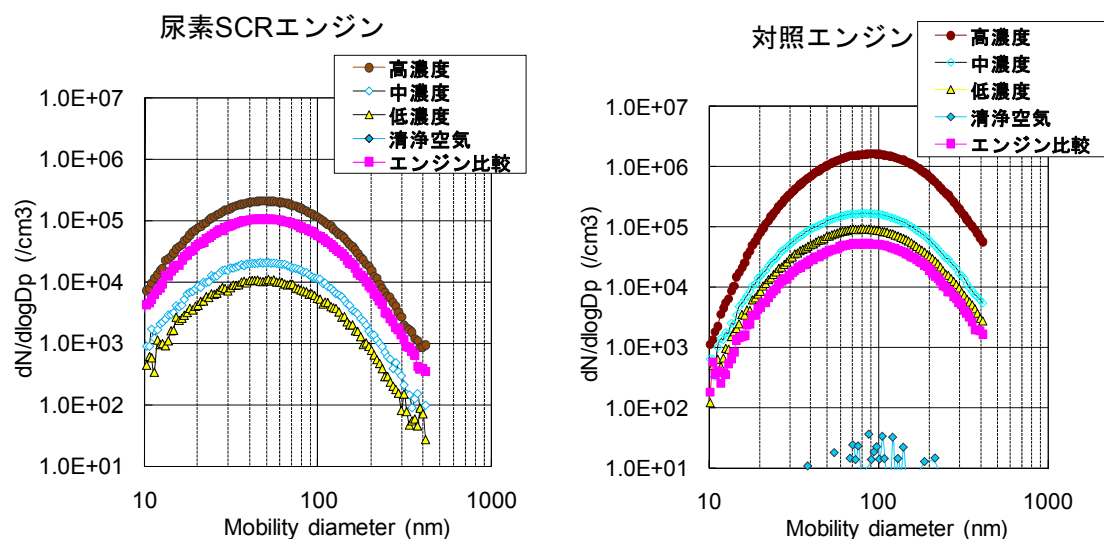


Fig. 3.3.1.4 各試験群のPM個数濃度分布

表3.3.1.5 1、3、7日曝露の曝露濃度（尿素SCRエンジン）

1日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.037 ± 0.003	0.005	0.002	—	0.019 ± 0.002
NO _x	(ppm)	4.34 ± 0.06	0.36 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.011 ± 0.001	2.16 ± 0.05
NO	(ppm)	3.55 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.009 ± 0.001	1.76 ± 0.04
NO ₂	(ppm)	0.80 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.003 ± 0.001	0.40 ± 0.04
CO ₂	(vol%)	0.30 ± 0.001	0.06 ± 0.001	0.05 ± 0.000	0.04 ± 0.000	0.17 ± 0.002
CO	(ppm)	0.51 ± 0.10	0.17 ± 0.11	0.18 ± 0.10	0.13 ± 0.09	0.36 ± 0.13
O ₂	(vol%)	20.53 ± 0.12	20.89 ± 0.11	20.90 ± 0.11	20.92 ± 0.10	20.73 ± 0.10
THC	(ppmC)	3.01 ± 0.09	3.04 ± 0.09	3.04 ± 0.07	3.04 ± 0.07	3.02 ± 0.09
3日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.037 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.005	0.019 ± 0.001
NO _x	(ppm)	4.33 ± 0.059	0.42 ± 0.05	0.22 ± 0.024	0.011 ± 0.003	2.16 ± 0.05
NO	(ppm)	3.52 ± 0.060	0.34 ± 0.04	0.18 ± 0.019	0.010 ± 0.003	1.75 ± 0.04
NO ₂	(ppm)	0.81 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.40 ± 0.03
CO ₂	(vol%)	0.30 ± 0.003	0.07 ± 0.002	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.17 ± 0.002
CO	(ppm)	0.50 ± 0.09	0.16 ± 0.09	0.16 ± 0.08	0.12 ± 0.07	0.34 ± 0.10
O ₂	(vol%)	20.47 ± 0.09	20.82 ± 0.10	20.84 ± 0.09	20.86 ± 0.08	20.67 ± 0.09
THC	(ppmC)	2.92 ± 0.09	2.94 ± 0.08	2.95 ± 0.08	2.94 ± 0.08	2.93 ± 0.09
7日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.036 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.019 ± 0.003
NO _x	(ppm)	4.16 ± 0.19	0.42 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.011 ± 0.003	2.09 ± 0.10
NO	(ppm)	3.38 ± 0.16	0.35 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.009 ± 0.003	1.70 ± 0.09
NO ₂	(ppm)	0.78 ± 0.06	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.40 ± 0.03
CO ₂	(vol%)	0.30 ± 0.003	0.07 ± 0.002	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.17 ± 0.003
CO	(ppm)	0.50 ± 0.11	0.17 ± 0.11	0.15 ± 0.11	0.13 ± 0.09	0.34 ± 0.11
O ₂	(vol%)	20.46 ± 0.08	20.81 ± 0.08	20.82 ± 0.08	20.84 ± 0.07	20.65 ± 0.08
THC	(ppmC)	2.90 ± 0.09	2.93 ± 0.09	2.93 ± 0.09	2.93 ± 0.09	2.92 ± 0.09

表3.3.1.6 1、3、7日曝露の曝露濃度（対照エンジン）

1日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	1.050 ± 0.021	0.092 ± 0.017	0.062	—	0.034 ± 0.010
NO _x	(ppm)	13.29 ± 0.20	1.35 ± 0.06	0.77 ± 0.08	0.04 ± 0.01	13.38 ± 0.27
NO	(ppm)	13.08 ± 0.21	1.30 ± 0.06	0.74 ± 0.07	0.03 ± 0.01	13.05 ± 0.22
NO ₂	(ppm)	0.21 ± 0.13	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.32 ± 0.10
CO ₂	(vol%)	0.31 ± 0.004	0.07 ± 0.001	0.06 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.31 ± 0.005
CO	(ppm)	7.39 ± 0.14	0.81 ± 0.04	0.51 ± 0.05	0.09 ± 0.05	7.39 ± 0.16
O ₂	(vol%)	20.49 ± 0.11	20.85 ± 0.11	20.90 ± 0.10	20.95 ± 0.07	20.54 ± 0.08
THC	(ppmC)	4.16 ± 0.02	3.09 ± 0.04	3.03 ± 0.04	2.97 ± 0.03	4.06 ± 0.01
3日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	1.050 ± 0.017	0.097 ± 0.011	0.061 ± 0.002	0.003	0.033 ± 0.006
NO _x	(ppm)	13.08 ± 0.28	1.30 ± 0.06	0.70 ± 0.07	0.04 ± 0.01	13.11 ± 0.30
NO	(ppm)	12.81 ± 0.32	1.26 ± 0.06	0.69 ± 0.07	0.02 ± 0.01	12.81 ± 0.27
NO ₂	(ppm)	0.27 ± 0.13	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.30 ± 0.10
CO ₂	(vol%)	0.31 ± 0.005	0.07 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.31 ± 0.005
CO	(ppm)	7.31 ± 0.15	0.80 ± 0.08	0.47 ± 0.08	0.09 ± 0.07	7.29 ± 0.15
O ₂	(vol%)	20.49 ± 0.06	20.85 ± 0.06	20.88 ± 0.05	20.92 ± 0.05	20.53 ± 0.04
THC	(ppmC)	4.11 ± 0.07	3.06 ± 0.05	2.99 ± 0.05	2.93 ± 0.05	4.01 ± 0.05
7日曝露		高濃度 (1/1)	中濃度 (1/10)	低濃度 (1/20)	清浄空気	エンジン比較
PM	(mg/m ³)	0.952 ± 0.127	0.101 ± 0.008	0.059 ± 0.005	0.003 ± 0.000	0.032 ± 0.003
NO _x	(ppm)	13.14 ± 0.25	1.33 ± 0.08	0.71 ± 0.08	0.05 ± 0.03	13.15 ± 0.26
NO	(ppm)	12.83 ± 0.26	1.29 ± 0.08	0.69 ± 0.07	0.03 ± 0.03	12.83 ± 0.24
NO ₂	(ppm)	0.31 ± 0.10	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.32 ± 0.09
CO ₂	(vol%)	0.31 ± 0.005	0.07 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.31 ± 0.005
CO	(ppm)	7.29 ± 0.22	0.81 ± 0.10	0.46 ± 0.10	0.10 ± 0.09	7.26 ± 0.22
O ₂	(vol%)	20.46 ± 0.07	20.81 ± 0.07	20.84 ± 0.06	20.88 ± 0.06	20.49 ± 0.06
THC	(ppmC)	4.08 ± 0.06	3.04 ± 0.05	2.97 ± 0.05	2.90 ± 0.05	4.00 ± 0.05

2) エンジン排気比較系列

エンジン比較群の曝露濃度を上記の表3.3.1.3～表3.3.1.6中に、PM個数濃度分布をFig. 3.3.1.4中に示した。上記、表中のエンジン比較群のみの値を抜き出して、表3.3.1.7に示す。PM濃度、NO₂濃度の差は両エンジン排気でそれぞれ0.013 mg/m³、0.08 ppmとわずかな差であった。NO、COやアルデヒド類の濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気よりも低値であった。PM個数モード径は、尿素SCRエンジン排気で約50 nm、対照エンジン排気で約80 nmであり、尿素SCRエンジン排気中のPMの粒径は対照エンジン排気よりも小さかった。個数濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気よりも約2倍高かった。尿素濃度は両エンジン排気ともほぼ同一濃度であった。

表 3.3.1.7 エンジン比較群の曝露濃度

		尿素SCRエンジン	対照エンジン
PM	(mg/m ³)	0.019	0.032
NO ₂	(ppm)	0.40	0.32
NO _x	(ppm)	2.09	13.15
NO	(ppm)	1.70	12.83
CO	(ppm)	0.34	7.26
CO ₂	(%)	0.171	0.306
O ₂	(%)	20.7	20.5
THC	(ppmC)	2.92	4.00
CH ₄	(ppm)	1.89	1.84
NH ₃	(ppb)	21.50	24.8
HCHO	(ppb)	1.35	49.98
Acetaldehyde	(ppb)	0.62	11.23
SO ₂	(ppb)	1.12	1.37
1,3-Butadiene	(ppb)	0.00	4.60
Benzene	(ppb)	0.41	2.61
N ₂ O	(ppm)	1.83	0.32
Phenanthrene	(ng/m ³)	0.9	1.3
Fluoranthene	(ng/m ³)	0.7	1.1
Pyrene	(ng/m ³)	1.0	1.1
モード径	(nm)	48.8	80.2
PM個数	(N/cc)	7.1E+04	3.6E+04
尿素	(μg/m ³)	0.52	0.55

3.3.1.4 曝露環境モニタリング結果のまとめ

曝露チャンバー内のPM濃度やNO₂濃度は、各試験群とも目標曝露濃度に近く、ほぼ安定していた。

1) 同一希釈系列

高濃度群のPM重量濃度とNO₂濃度は、尿素SCRエンジン排気で約0.04 mg/m³、0.78 ppm、対照エンジン排気で0.95 mg/m³、0.3 ppmであり、PM濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約1/25倍、NO₂濃度は尿素SCRエンジン排気が対照エンジン排気の約2.5倍であった。尿素SCRエンジン排気のNO₂濃度が高値であったのは、排気後処理の酸化触媒によるものと考えられる。

高濃度群の微量成分（アルデヒド類や炭化水素類など）は、尿素SCRエンジン排気では対照エンジン排気に比して大きく低減された。これは尿素SCRエンジンの酸化触媒処理の効果と考えられる。尿素SCRエンジン排気からの尿素は約8 μg/m³であった。尿素SCRエンジン排気のみシアヌル酸とメラミンが微量検出された。対照エンジン排気で約0.5 μg/m³検出されたが、これは清浄空気レベルであった。

PM個数濃度分布のモード径は、尿素SCRエンジン排気で50 nm前後、対照エンジン排気で80～90 nmであった。

2) エンジン排気比較系列

PM濃度、NO₂濃度は両エンジン排気でわずかに差があった。また、NO、COやアルデヒド類の濃度は尿素SCRエンジン排気が低濃度であった。

PM 個数濃度分布のモード径は、尿素 SCR エンジン排気で約 50 nm、対照エンジン排気で約 80 nm であり、尿素 SCR エンジン排気の方が小さかった。

3.3.2 健康影響評価

3.3.2.1 ラット短期吸入曝露試験

ここでは、両系列に共通した結果を示した。

1) 飼育環境

曝露時および非曝露時におけるチャンバー内環境を表 3.3.2.1 に示した。曝露チャンバー内の温度は、対照エンジン排気の高濃度群およびエンジン比較群で曝露時に 25℃台を示したが、その他の試験群では曝露時および非曝露時ともほぼ 22℃台であった。また、湿度は平均値 54.9~69.9%であった。流量は、約 3.0 m³/分でほぼ一定であった。さらに、圧力では、曝露時は平均値 29.1~48.7 Pa で、非曝露時では平均値 47.4~53.8 Pa であった。

表 3.3.2.1 ラット飼育環境

曝露時	高濃度	中濃度	低濃度	清浄空気	エンジン比較
	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
尿素SCRエンジン					
温度 (°C)	22.8 ± 0.2	22.2 ± 0.1	22.0 ± 0.1	22.4 ± 0.1	22.4 ± 0.1
湿度 (%RH)	69.9 ± 0.7	64.3 ± 1.0	61.3 ± 1.0	57.6 ± 1.0	65.9 ± 0.8
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1
圧力 (Pa)	40.4 ± 9.3	40.0 ± 5.7	46.7 ± 15.1	44.9 ± 3.2	42.3 ± 4.6
対照エンジン					
温度 (°C)	25.4 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.6 ± 0.1	22.9 ± 0.1	25.0 ± 0.2
湿度 (%RH)	60.0 ± 1.5	60.0 ± 1.4	61.5 ± 1.2	55.1 ± 1.3	60.2 ± 4.1
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1
圧力 (Pa)	44.2 ± 3.4	38.6 ± 7.5	39.2 ± 6.5	48.7 ± 1.1	29.1 ± 7.9
非曝露時					
非曝露時	高濃度	中濃度	低濃度	清浄空気	エンジン比較
	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
尿素SCRエンジン					
温度 (°C)	22.0 ± 0.0	22.2 ± 0.1	22.0 ± 0.1	22.5 ± 0.0	22.0 ± 0.0
湿度 (%RH)	60.9 ± 0.7	63.3 ± 0.9	60.3 ± 0.9	57.1 ± 0.7	61.0 ± 0.8
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1
圧力 (Pa)	52.7 ± 5.8	53.4 ± 4.7	53.8 ± 3.0	51.5 ± 3.8	50.0 ± 5.6
対照エンジン					
温度 (°C)	22.6 ± 0.2	22.3 ± 0.1	22.5 ± 0.1	22.9 ± 0.1	22.8 ± 0.3
湿度 (%RH)	58.1 ± 0.6	59.4 ± 1.0	61.3 ± 0.6	54.9 ± 0.6	57.9 ± 0.5
流量 (m ³ /min)	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
圧力 (Pa)	51.7 ± 4.5	47.4 ± 7.0	50.3 ± 8.3	52.5 ± 3.1	53.3 ± 5.6

2) 曝露期間中の体重、摂餌量および摂水量

曝露期間中の体重変化を **Fig. 3.3.2.1** に示した。尿素 SCR エンジン排気は、曝露期間が長くなるにつれて成長による体重の増加が見られたが、曝露濃度による影響は認められなかった。なお、対照エンジン排気の中濃度群の曝露 2 日目で体重の減少傾向が認められた。これは 1 つの飼育ケージで飲水量が減少したためで、給水瓶の詰りによる飲水不良によるものであることが推測された。なお、翌日には体重が回復したことから、曝露濃度による影響ではないと判断した。

曝露期間中の摂餌量の変化を **Fig. 3.3.2.2** に示した。尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 1 日曝露で摂餌量の減少がみられたが、その後の変化はみられなかった。対照エンジン排気では、特に影響を認めなかった。

曝露期間中の摂水量の変化を **Fig. 3.3.2.3** に示した。尿素 SCR エンジン排気は、特に影響を認めなかった。しかし、前述のように、対照エンジン排気の中濃度群の曝露 2 日目で給水瓶の詰りによる摂水量の減少傾向が認められたが、翌日には摂水量が回復したため、曝露濃度による影響ではないと判断した。

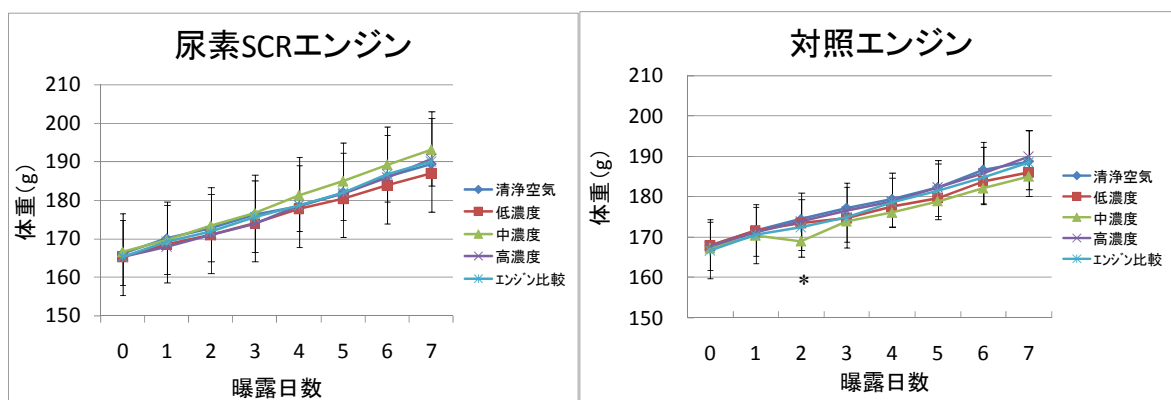


Fig. 3.3.2.1 曝露期間中のラット体重 (n = 12~24)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群)

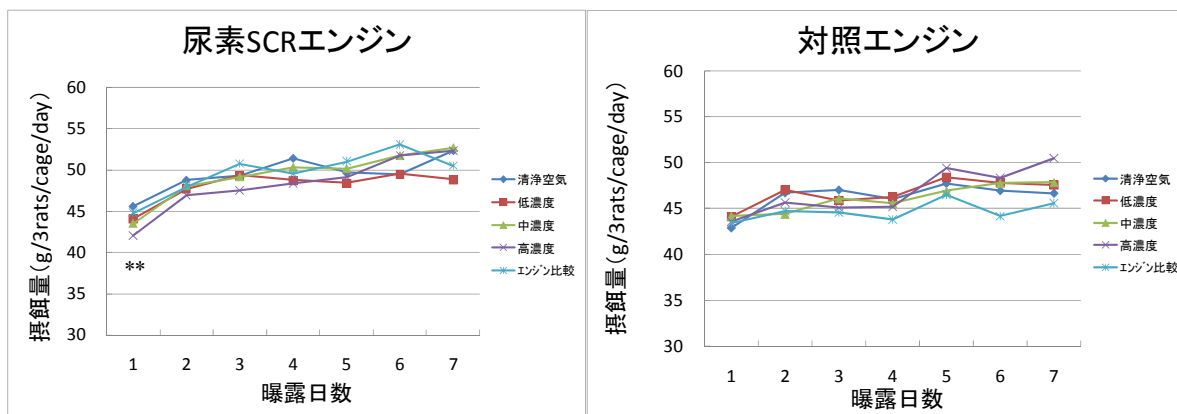


Fig. 3.3.2.2 曝露期間中のラット摂餌量 (n = 4~8)

(**): P<0.01 vs.清浄空気群)

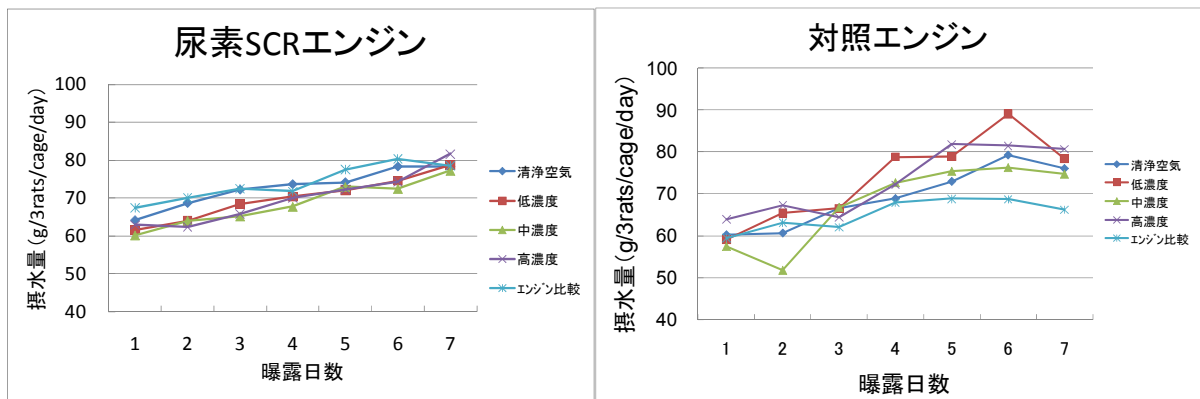


Fig. 3.3.2.3 曝露期間中のラット摂水量 (n = 4~8)

3.3.2.2 ラット短期吸入曝露試験 (同一希釈系列)

1) 解剖時体重および臓器重量

1、3、7日曝露したラットの解剖時データを示した。臓器の相対重量 (体重換算重量) は、絶対重量 (生重量) とほぼ同様な傾向であったため、ここでは絶対重量のみ示した。

(1) 体重、気管・肺重量、心臓および大脳重量

体重、気管・肺重量は、両エンジン排気とも各試験群で成長に伴う増加が認められ、曝露濃度による抑制性的な変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.4、Fig. 3.3.2.5)。

心臓および大脳重量では、両エンジン排気とも各試験群で曝露濃度による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.6、Fig. 3.3.2.7)。

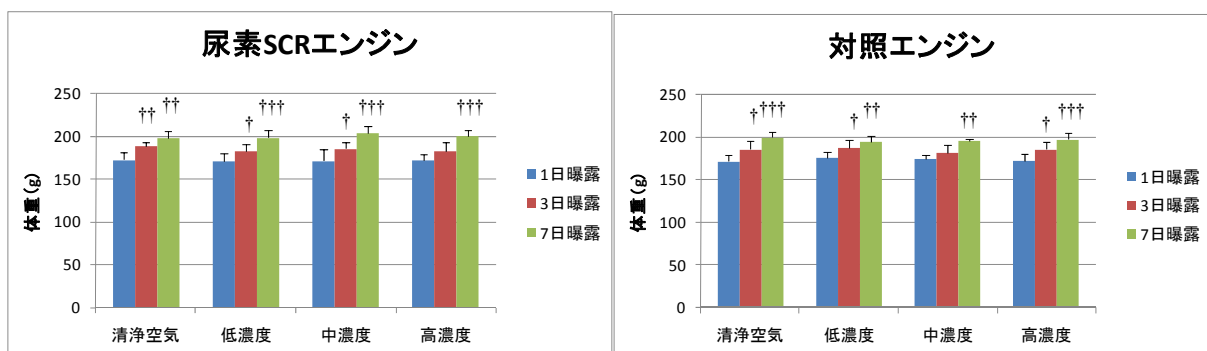


Fig. 3.3.2.4 解剖時のラット体重 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

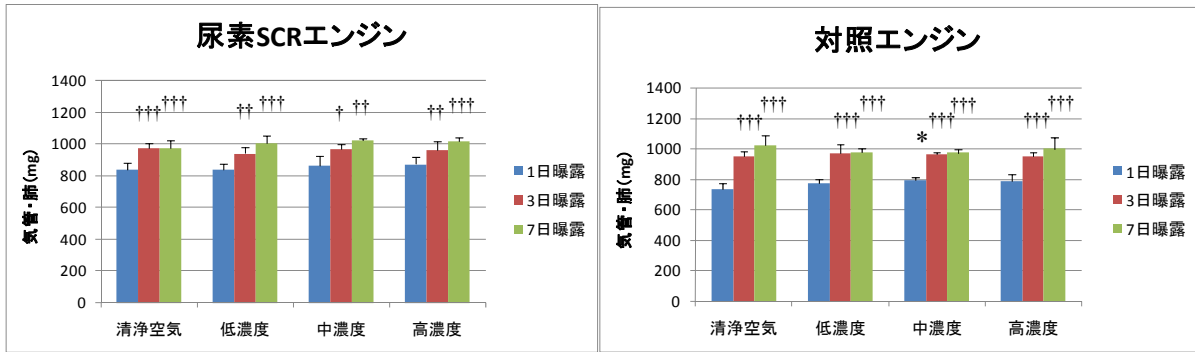


Fig. 3.3.2.5 ラット気管・肺重量 (n = 6)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

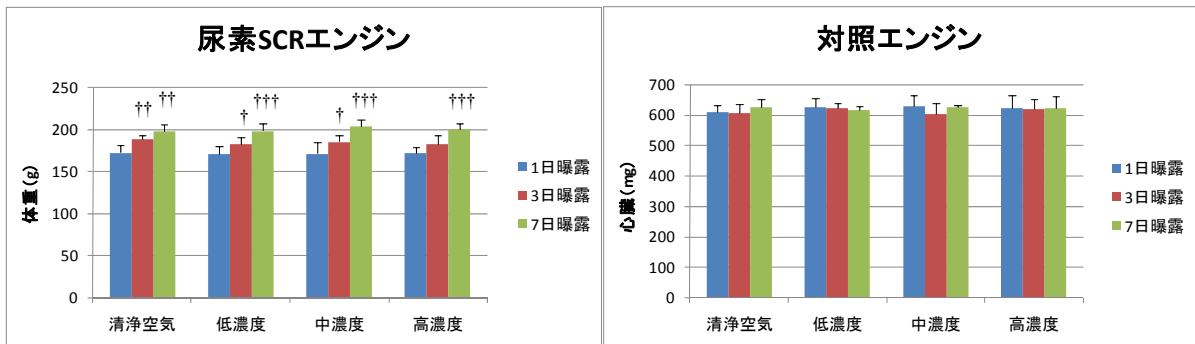


Fig. 3.3.2.6 ラット心臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 1日曝露)

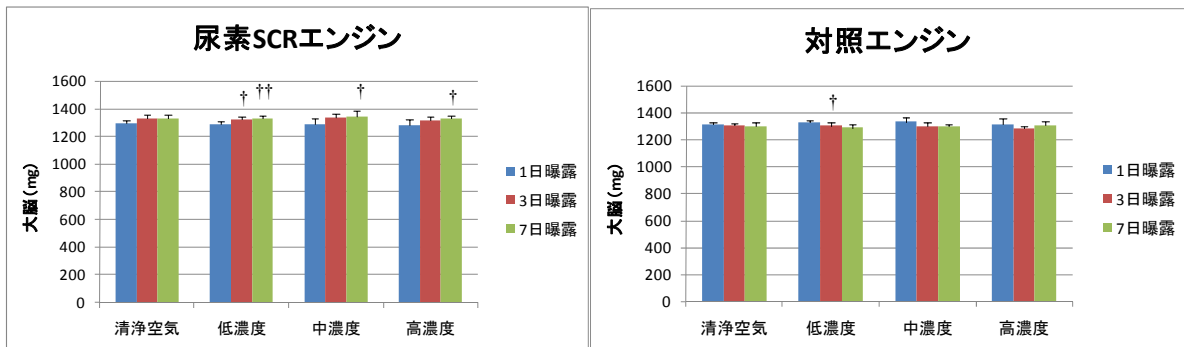


Fig. 3.3.2.7 ラット大脳重量 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1日曝露)

(2) 肝臓重量

肝臓重量は、曝露濃度依存的および曝露期間依存的な増加が認められた (Fig. 3.3.2.8)。また、相対重量でも曝露濃度依存的な増加が見られていた。

この肝臓重量の増加が曝露濃度による影響であるかを確認するため、曝露をしていない

ラットを用いて、同日内の午前と午後それぞれ肝臓重量を計測した。その結果、肝臓重量は午前と比べて午後の重量が減少する傾向にあり、さらに相対重量では有意差のあることが認められた (Fig. 3.3.2.8-2)。また、後述の肝臓の病理解析で、両エンジン排気とも試験群で違いがほとんど認められなかったことも併せて、Fig. 3.3.2.8 でみられた変動は曝露濃度による影響ではなく、各試験群の解剖開始時間の差異による日内変動による変化であると推測された。

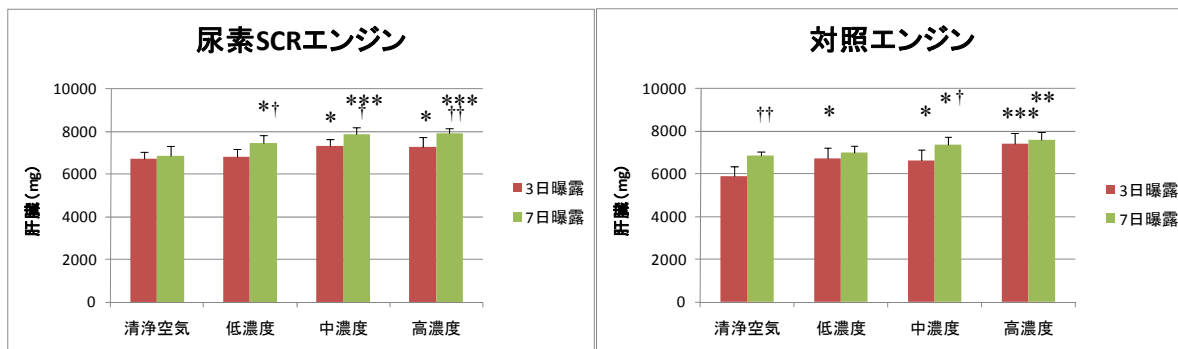


Fig. 3.3.2.8 ラット肝臓重量 (n = 6)

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

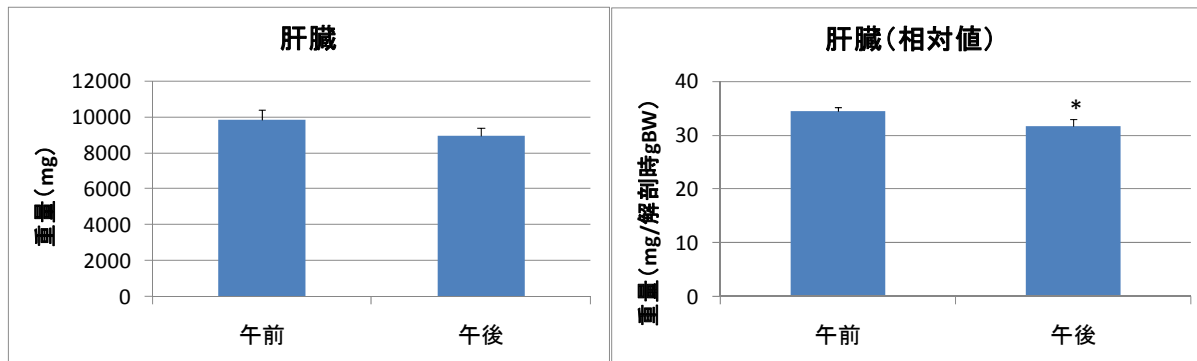


Fig. 3.3.2.8-2 ラット肝臓重量の日内変動 (n = 4)

(*: P<0.05 vs. 午前)

(3) 小脳、腎臓、副腎、胸腺、脾臓および精巣重量

小脳重量では、対照エンジン排気の高濃度群と清浄空気群で曝露期間による差がみられたものの、曝露濃度による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.9)。

腎臓、副腎および胸腺重量では、両エンジン排気とも曝露濃度や曝露期間による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.10～Fig. 3.3.2.12)。また、脾臓および精巣重量では、両エンジン排気とも各試験群で成長による重量増加傾向がみられ、曝露濃度による変化は認められなかった (Fig. 3.3.2.13、Fig. 3.3.2.14)。

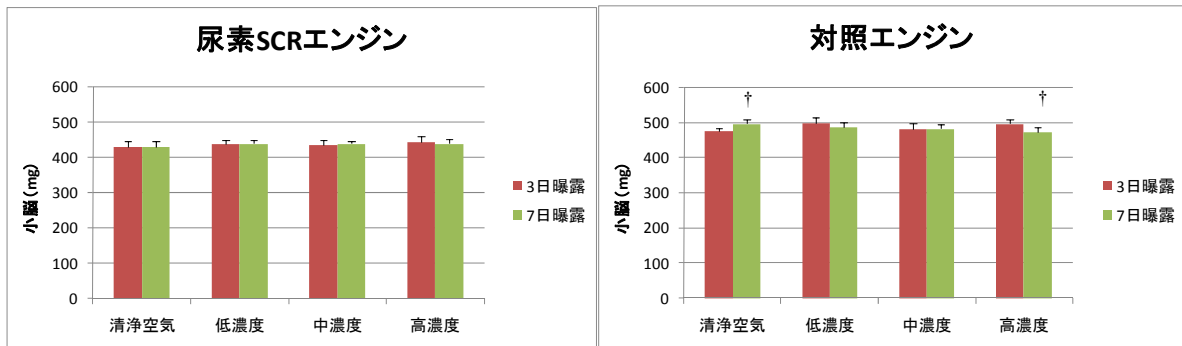


Fig. 3.3.2.9 ラット小脳重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露)

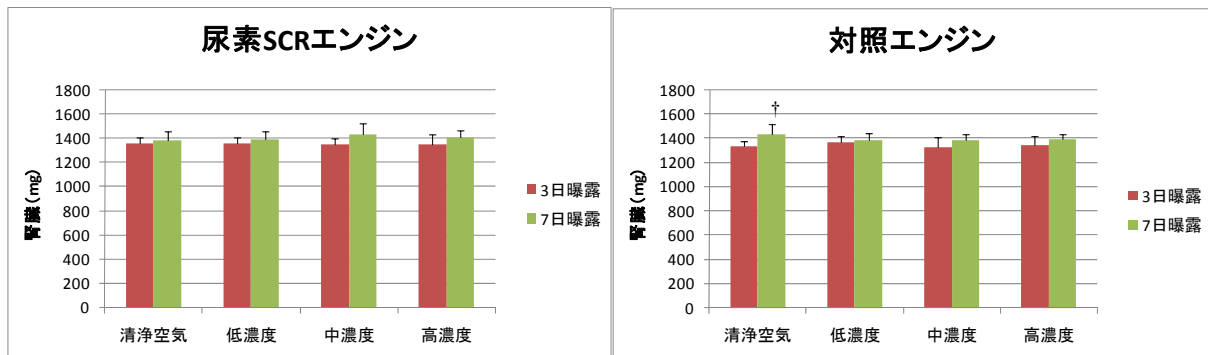


Fig. 3.3.2.10 ラット腎臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露)

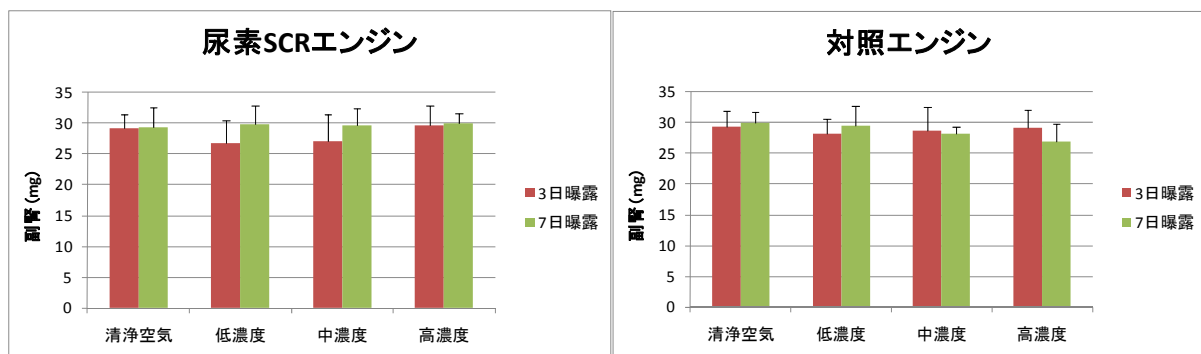


Fig. 3.3.2.11 ラット副腎重量 (n = 6)

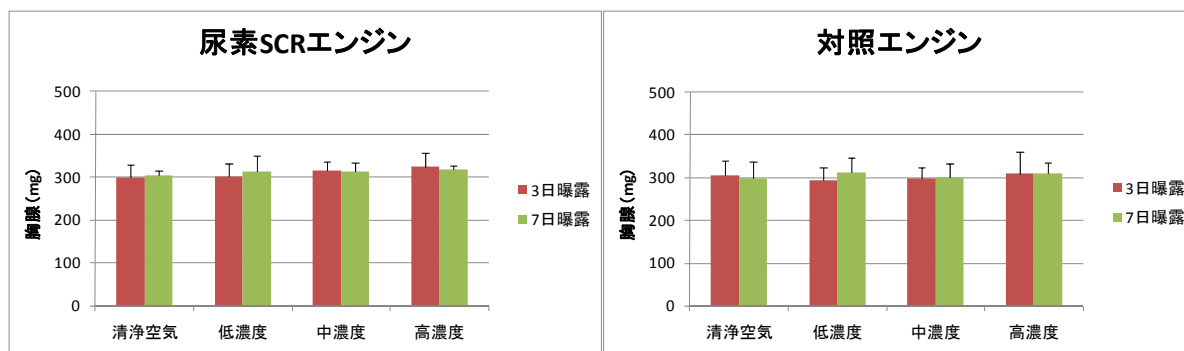


Fig. 3.3.2.12 ラット胸腺重量 (n = 6)

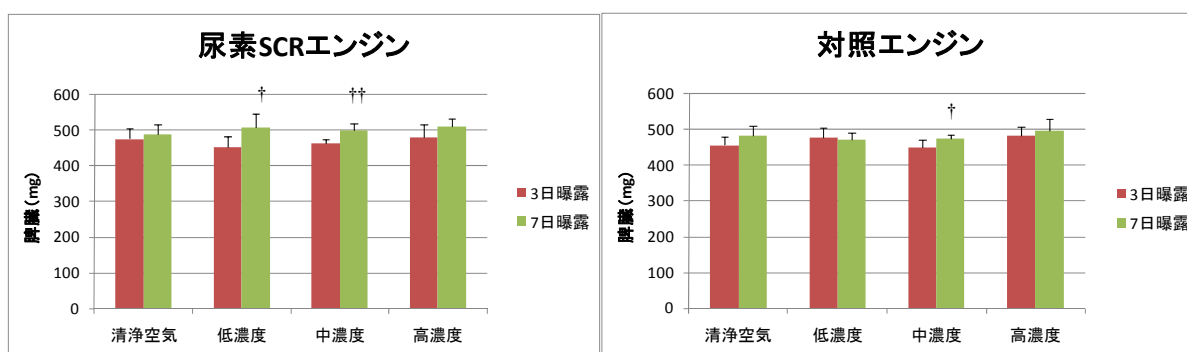


Fig. 3.3.2.13 ラット脾臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

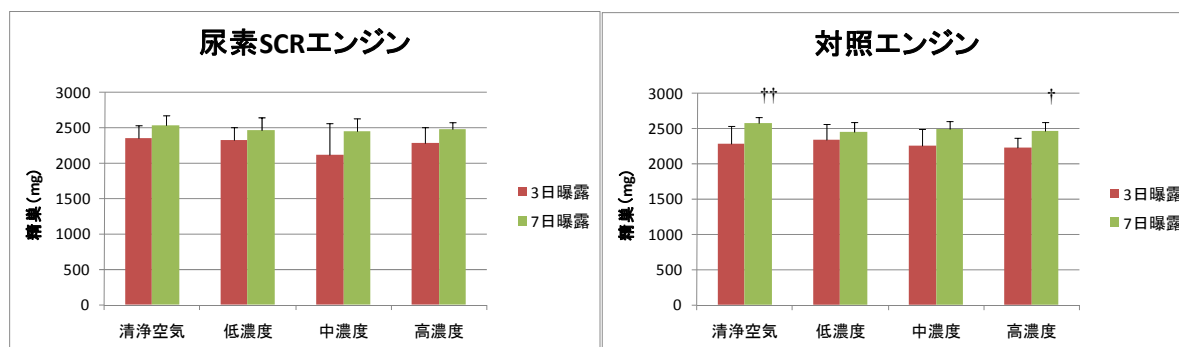


Fig. 3.3.2.14 ラット精巣重量 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

(4) 解剖時体重および臓器重量のまとめ

- 体重、気管・肺、肝臓、精巣など一部の臓器において、解剖時間の差異や成長に伴う重量増加が認められたが、曝露濃度による変化は認められなかった。
- 両エンジン排気による臓器重量の特異的な影響は認められなかった。

2) BALF 中炎症細胞数

BALF は 3、7 日曝露の解剖時に採取した。

表 3.3.2.2 に回収率を示した。なお、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3 日曝露で、一個体が回収率 62.2%であったため、総細胞数のデータから除外した。なお、細胞分画のデータは、この個体も含めて解析した。

その結果、尿素 SCR エンジン排気は各試験群で回収率に差が認められなかった。対照エンジン排気では、清浄空気群と比べて中濃度群の 7 日曝露で回収率に有意な増加が認められた。

表 3.3.2.2 BALF 4.5 mL (1.5 mL×3 回) で肺胞洗浄したときの回収率 (n = 4~6)

	試験群	3日曝露(%)	7日曝露(%)
尿素SCRエンジン	高濃度	92.8 ± 2.1	93.3 ± 3.4
	中濃度	94.4 ± 2.7	96.7 ± 1.9
	低濃度	91.5 ± 4.3	95.2 ± 3.0
	清浄空気	94.7 ± 5.1	91.1 ± 5.2
	エンジン比較	91.9 ± 3.6	92.2 ± 3.9
対照エンジン	高濃度	91.1 ± 5.2	93.3 ± 3.1
	中濃度	95.6 ± 4.4	94.8* ± 2.3
	低濃度	92.0 ± 5.1	92.6 ± 3.3
	清浄空気	93.7 ± 4.1	93.3 ± 2.8
	エンジン比較	93.8 ± 4.8	93.8 ± 5.5

*: P<0.05 vs.清浄空気群

(1) BALF 中総細胞数

Fig. 3.3.2.15 に、各試験群の BALF 中の総細胞数を示した。尿素 SCR エンジン排気 of 各試験群は、3 日曝露と比べて 7 日曝露で減少傾向が認められた。一方、対照エンジン排気では、清浄空気群と比べて高濃度群の 3 日曝露で有意に減少した。

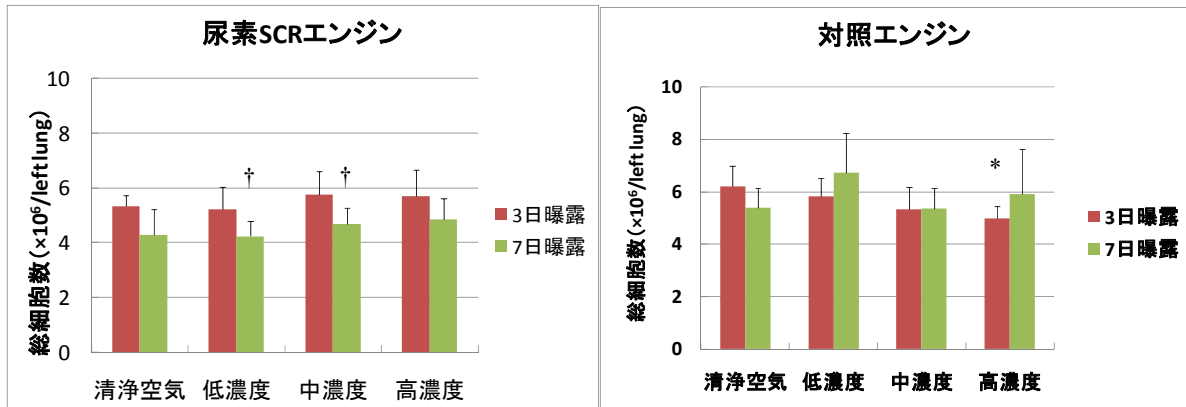


Fig. 3.3.2.15 ラット BALF 中総細胞数 (n = 5~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 3日曝露)

(2) BALF 中細胞分画

BALF 中の細胞構成成分は大部分が Mφ で占められており、その他、好中球、好酸球、リンパ球が認められた (Fig. 3.3.2.16)。

Mφ 分画は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群と比べて有意に減少した。対照エンジン排気では、低濃度群と高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群と比べて有意に減少した。(Fig. 3.3.2.17)。

好中球分画および好酸球分画は、曝露濃度や曝露期間による影響はほとんど認められなかった (Fig. 3.3.2.18、Fig. 3.3.2.19)。

リンパ球分画は、両エンジン排気とも高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群と比べて有意な増加が認められた (Fig. 3.3.2.20)。

しかし、細胞分画の計測総数が 200 であったことから、これらの変化は軽微であり、曝露濃度による影響とは判断できなかった。

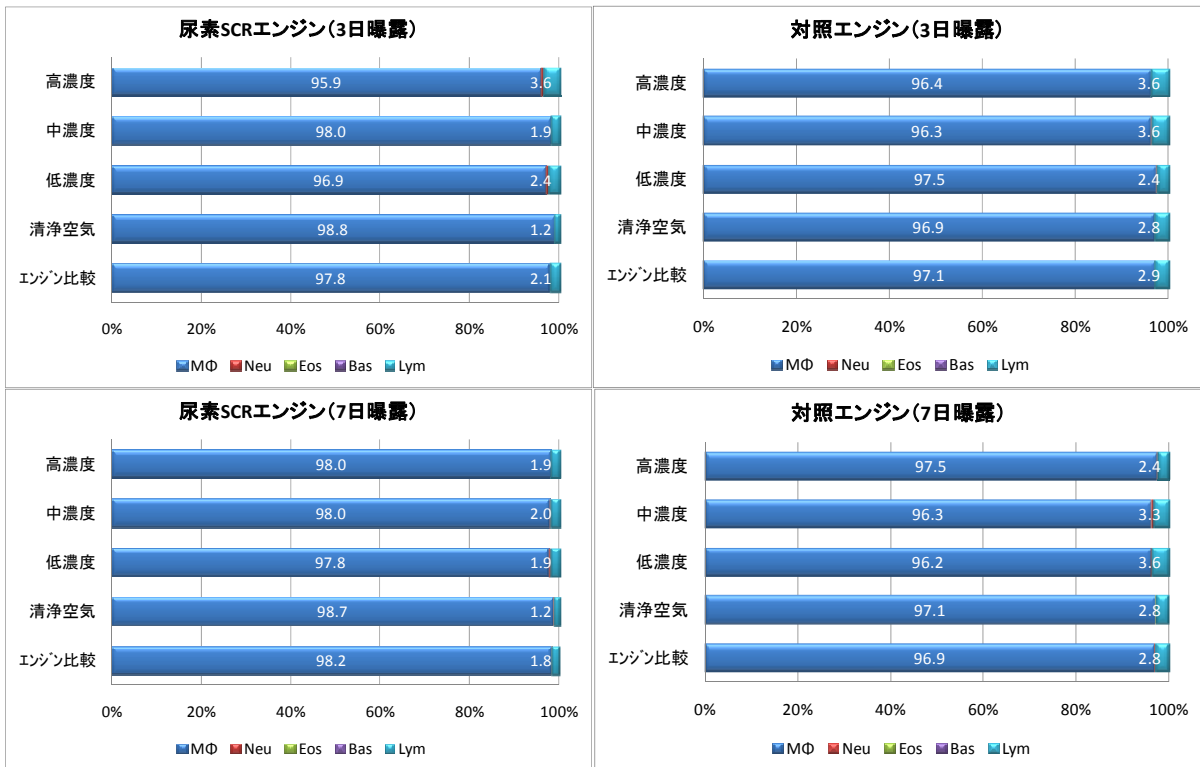


Fig. 3.3.2.16 BALF の細胞分画 (n = 5~6)

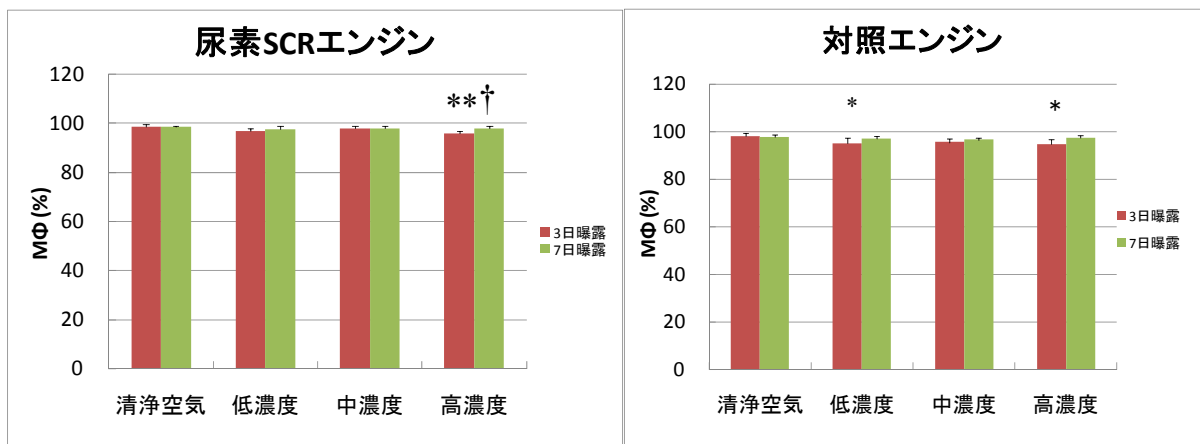


Fig. 3.3.2.17 BALF の Mφ 分画 (%) (n = 5~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05 vs. 3 日曝露)

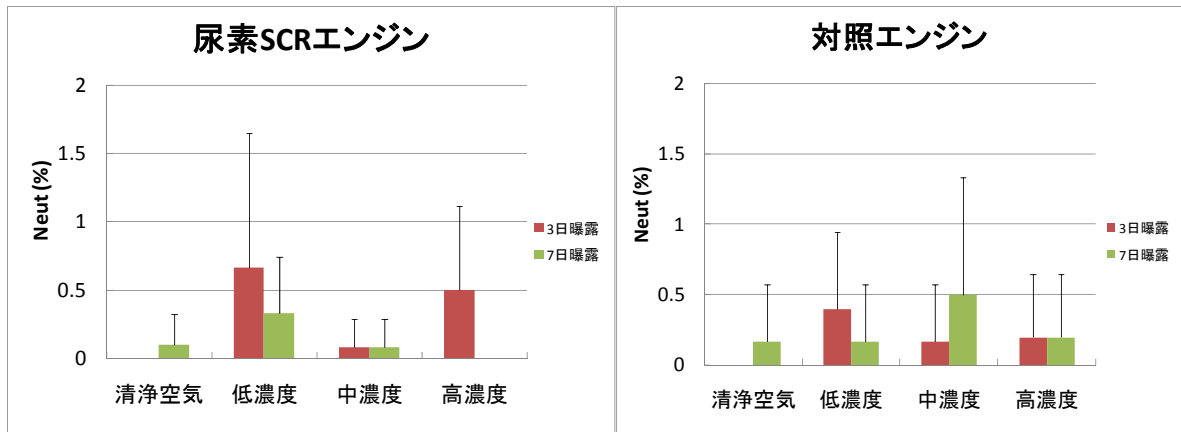


Fig. 3.3.2.18 BALF の好中球分画 (%) (n = 5~6)

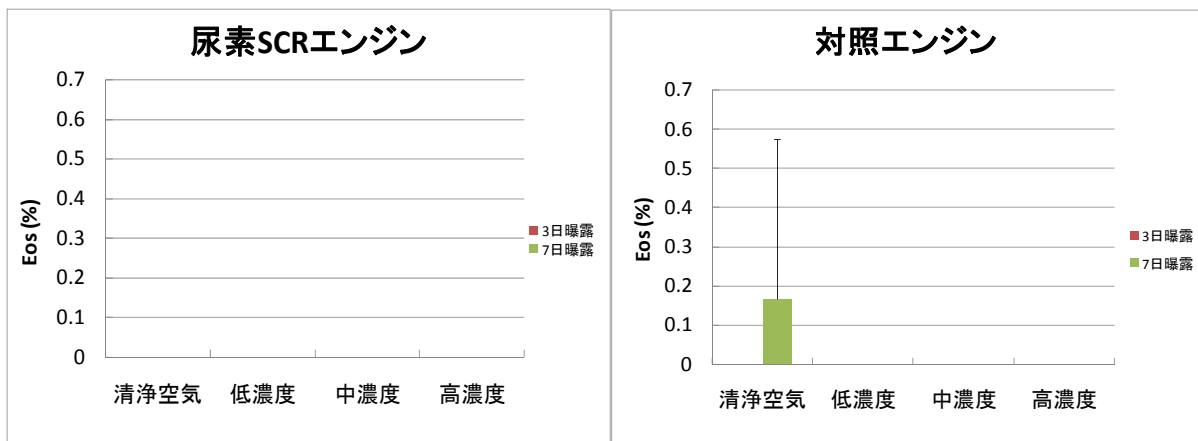


Fig. 3.3.2.19 BALF の好酸球分画 (%) (n = 5~6)

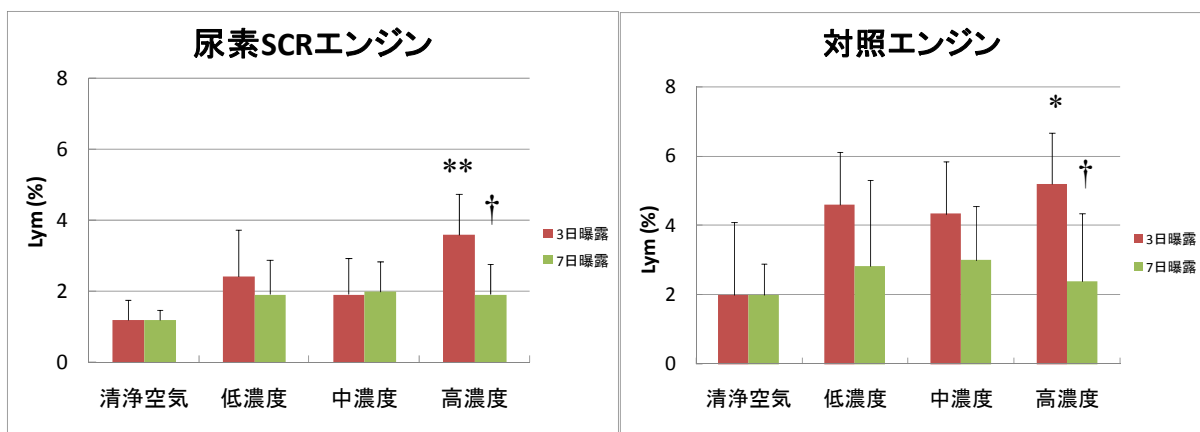


Fig. 3.3.2.20 BALF のリンパ球分画 (%) (n = 5~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 3日曝露)

(3) BALF 中炎症細胞数のまとめ

* BALF 中の総細胞数

- 尿素 SCR エンジン排気の低および中濃度群の 7 日曝露は、3 日曝露よりも減少した。
- 対照エンジン排気では、清浄空気群と比べて高濃度群の 3 日曝露で有意に減少した。

* BALF 中の構成細胞（百分率）

- 大部分が Mφ であり、その他、好中球、好酸球、リンパ球が認められた。
- Mφ は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3 日曝露で有意に減少した。
- リンパ球は、両エンジン排気とも高濃度群の 3 日曝露で有意な増加が認められた。
- 好酸球および好中球では曝露濃度やエンジン排気による影響は見られなかった。

これら BALF 中の炎症細胞数の変化は軽微であることから、曝露濃度やエンジン排気により肺に炎症を与えるとまでは言い難かった。

3) 血液検査

(1) 血液生化学検査

1、3、7 日曝露した血液検査の結果を表 3.3.2.3 および表 3.3.2.4 に示した。なお、特に変化のみられた項目はグラフでも示した。

pH は、尿素 SCR エンジン排気の清浄空気群や対照エンジン排気の高濃度群で曝露期間による上昇が認められた。

pCO₂ は、尿素 SCR エンジン排気では清浄空気群の 7 日曝露で 3 日曝露に比べて有意な低下が認められたが、対照エンジン排気では高濃度群の 1、3 日曝露で清浄空気群と比べて有意な上昇が認められた。

pO₂、Cl および iCa は、曝露濃度や曝露期間による影響はほとんど認められなかった。

BE_{ecf} は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 3、7 日曝露で 1 日曝露に比べて上昇傾向が認められた。対照エンジン排気では高濃度群の 1、3 日曝露で、また、中濃度群の 3 日曝露で清浄空気群に比べて有意に上昇した。

HCO₃⁻、TCO₂ および Hb は、両エンジン排気とも曝露期間が長くなるにつれて上昇する傾向がみられた。

Hct⁷⁰ は、特に対照エンジン排気の高濃度群の 3、7 日曝露で上昇が認められたが、曝露濃度による影響はほとんど認められなかった。

Na は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群の 1、7 日曝露で清浄空気群に比べて有意に低下した。また、対照エンジン排気でも低、中濃度の 3 日曝露で有意に低下した。

K⁷¹ は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で、3、7 日曝露で上昇傾向が認められたが、曝露濃度による影響はほとんどみられなかった (Fig. 3.3.2.21)。

⁷⁰ Hct [hematocrit]: ヘマトクリット。血液の中にどのくらいの血球成分があるのかを容積比で表したものであり、正常では、血球と血漿の容積比はほぼ一定だが、脱水、多血症などでは高値となり、鉄欠乏性貧血、溶血性貧血などでは低値を示す。

⁷¹ K [potassium]: カリウム。神経の興奮や心筋（心臓の筋肉）の働きを助けるなど生命活動の維持調節に重要な電解質の一つで、細胞内液からの流出、腎臓での濾過や再吸収などによって変動する。体内のカリウムの 90% は尿からの排泄によるため、腎不全などにより腎臓の機能が低下すると尿量が減少し、血液中のカリウムは高値になる。一方、激しい下痢や嘔吐のときには吐物や便とともに体外に排出されるため、血液中のカリウムは低値になる。

BUN⁷²は、両エンジン排気の中、高濃度群の3、7日曝露で清浄空気群に比べて、有意に上昇した。また、低から高濃度群の3、7日曝露で1日曝露と比べて有意に上昇した（Fig. 3.3.2.22）。尿素 SCR エンジン排気では、K と発現変動が類似していた。

Glu⁷³は、尿素 SCR エンジン排気の1日曝露と、対照エンジン排気の3日曝露でそれぞれ清浄空気群と比べて有意な上昇を認めた。（Fig. 3.3.2.23）。

⁷² **BUN** [blood urea nitrogen]: 血液尿素窒素。尿素の中に含まれる窒素分で、血液中の尿素は腎臓に運ばれ、糸球体でろ過されて尿中に排泄される。腎臓の排泄機能が低下（尿毒症、ネフローゼ症候群など）すると尿素窒素が尿中にうまく排泄されず、血液中に増加する。また、尿素は肝臓で合成されるため、重症肝機能障害（中毒性肝炎、劇症肝炎、肝硬変の末期など）には合成能力が低下し、低値になる。分子量から、尿素窒素（N-N）(mg/dL) × 2.144 = 尿素（O=C-NH₂-NH₂）(mg/dL) で示される。

⁷³ **Glu** [glucose]: 血糖。インスリンやグルカゴン、甲状腺ホルモンなどにより一定の量に保たれている。しかし、インスリンの減少や、ストレス、肥満などにより血糖値が上昇する。また、インスリノーマ（インスリン分泌過剰）、肝臓がん、絶食などにより血糖値が低下する。

表 3.3.2.3 iSTAT によるラット血液生化学検査（尿素 SCR エンジン）

1日曝露	n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH	6	7.372	6	7.363	6	7.349	6	7.342
pCO ₂ (mmHg)	6	52.30	6	52.63	6	53.08	6	53.38
pO ₂ (mmHg)	6	12.3	6	15.8	5	13.8	6	14.3
BEecf (mmol/L)	6	5.0 *	6	4.5	6	3.3	6	3.0
HCO ₃ (mmol/L)	6	30.38 *	6	29.93	6	29.15	6	28.85
TCO ₂ (mmol/L)	6	32.2 *	6	31.7	6	30.7	6	30.7
sO ₂ (%)	6	13.3	6	20.0	5	15.6	6	16.7
Hct (%PCV)	6	41.0	6	41.3	6	41.3	6	41.7
Hb (g/dL)	6	13.9	6	14.1	6	14.1	6	14.2
Na (mmol/L)	6	137.8 **	6	138.2 **	6	139.3	6	140.2
K (mmol/L)	6	3.8 *	6	3.6	6	3.6	6	3.4
Cl (mmol/L)	5	102.0	6	102.0 *	6	103.2	6	103.3
iCa (mmol/L)	6	1.423	6	1.417 *	6	1.417	6	1.388
BUN (mg/dL)	5	8.4 ***	6	10.7 **	6	10.8 **	6	13.3
Glu (mg/dL)	5	183.4 **	6	184.0 **	6	176.7 *	6	154.8
3日曝露	n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH	3	7.352	5	7.406 †	5	7.387	4	7.391 †††
pCO ₂ (mmHg)	3	55.27	5	50.96	5	51.6	4	50.9
pO ₂ (mmHg)	3	14.7	5	16.8	5	14.2	4	14.5
BEecf (mmol/L)	3	4.7	5	7.0	5	6.0 ††	4	6.0 ††
HCO ₃ (mmol/L)	3	30.43	5	32.02	5	31.0 ††	4	30.9 †
TCO ₂ (mmol/L)	3	32.0	5	33.6	5	32.6 ††	4	32.5 †
sO ₂ (%)	3	20.0	5	24.6	5	17.6	4	19.5
Hct (%PCV)	4	43.3	6	43.8 ††	6	44.7 ††	6	43.3
Hb (g/dL)	4	14.7 †	6	14.9 ††	6	15.2 ††	6	14.7333
Na (mmol/L)	4	138.3	6	138.8	6	138.833	6	138.7 †
K (mmol/L)	4	4.08	6	3.93 †	6	3.95 †	6	4.07 †††
Cl (mmol/L)	4	102.8	6	102.3	6	101.8 †	6	101.8 †
iCa (mmol/L)	3	1.42	5	1.42	5	1.40	4	1.41
BUN (mg/dL)	4	16.5 **,†††	6	16.7 **,†††	6	14.7 †††	6	13.7
Glu (mg/dL)	4	172.5	6	180.3	6	185.0	6	180.8 ††
7日曝露	n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH	5	7.382	4	7.398	5	7.387	6	7.398 †††
pCO ₂ (mmHg)	5	53.94	4	52.60	5	52.0	6	49.9 †
pO ₂ (mmHg)	5	12.2	4	17.0	5	20.6	6	17.7
BEecf (mmol/L)	5	7.0 †	4	7.5 *,†	5	6.2 †††	6	5.8 ††
HCO ₃ (mmol/L)	5	32.04	4	32.38	5	31.3 ††	6	30.7 ††
TCO ₂ (mmol/L)	5	33.8	4	34.0 *	5	32.6 ††	6	32.2 †
sO ₂ (%)	5	15.0	4	23.3	5	32.4	6	26.2
Hct (%PCV)	5	42.4	6	43.8 ††	4	44.5	6	44.2 ††
Hb (g/dL)	5	14.4	6	14.9 ††	4	15.2 †	6	15 ††
Na (mmol/L)	5	138.2 *	6	138.2 *	4	139.3	6	139.8
K (mmol/L)	5	4.22 †	6	4.18 ††	4	3.93	6	3.95 †††
Cl (mmol/L)	5	103.8 ††	6	102.7	4	102.8	6	102.7
iCa (mmol/L)	5	1.41 *	4	1.40	5	1.40	6	1.35 †
BUN (mg/dL)	5	17.4 **,†††	6	18.7 **,†††	4	16.3 **,†††	6	13.2
Glu (mg/dL)	5	180.2	6	178.0	4	181.8	6	189.2 ††

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs.1日曝露

表 3.3.2.4 iSTAT によるラット血液生化学検査 (対照エンジン)

1日曝露		n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH		3	7.361	4	7.391	6	7.363	6	7.385
pCO ₂	(mmHg)	3	56.03 **	4	48.78	6	52.13	6	48.82
pO ₂	(mmHg)	3	8.7	4	17.5	6	11.8	6	15.0
BEecf	(mmol/L)	3	6.3 *	4	4.5	6	4.3	6	4.0
HCO ₃	(mmol/L)	3	31.77 **	4	29.55	6	29.67	6	29.10
TCO ₂	(mmol/L)	3	33.7 ***	4	31.0	6	31.2	6	30.5
sO ₂	(%)	3	7.3	4	24.5	6	12.5	6	19.3
Hct	(%PCV)	4	40.8	5	41.0	6	40.7	6	42.0
Hb	(g/dL)	4	13.9	5	13.9	6	13.8	6	14.3
Na	(mmol/L)	4	137.8	5	138.5	6	137.5	6	138.2
K	(mmol/L)	4	4.3 **	5	3.8	6	4.0	6	3.8
Cl	(mmol/L)	4	102.3	5	102.4	5	102.4	5	103.2
iCa	(mmol/L)	3	1.400	4	1.405	6	1.397	6	1.383
BUN	(mg/dL)	4	10.3	5	10.8	5	10.2	5	11.8
Glu	(mg/dL)	4	183.5 **	5	168.2	5	167.0	5	158.4
3日曝露		n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH		4	7.386	5	7.404	5	7.398 ††	3	7.380
pCO ₂	(mmHg)	4	53.18	5	49.74	5	49.5	3	48.5
pO ₂	(mmHg)	4	11.3	5	15.8	5	16.6	3	15.0
BEecf	(mmol/L)	4	6.8 **	5	6.6 **†	5	5.6	3	3.7
HCO ₃	(mmol/L)	4	31.80 **	5	31.12 *	5	30.4	3	28.7
TCO ₂	(mmol/L)	4	33.5 **	5	32.6 *	5	31.8	3	30.0
sO ₂	(%)	4	11.8	5	21.2	5	23.0	3	19.7
Hct	(%PCV)	6	43.3 *.†	6	44.7 ††	6	44.5 †††	4	45.3 †††
Hb	(g/dL)	6	14.7 *.†	6	15.2 ††	6	15.1 †††	4	15.4 †††
Na	(mmol/L)	6	139.7	6	139.2 *	6	138.5 **	4	141.3 †††
K	(mmol/L)	6	3.93	6	3.78	6	3.93	4	4.05
Cl	(mmol/L)	6	102.0	6	101.3	6	102.0	4	102.8
iCa	(mmol/L)	4	1.42	5	1.39	5	1.42	3	1.40
BUN	(mg/dL)	6	16.0 ***,†††	6	15.5 ***,†††	6	13.0 ††	4	12.3
Glu	(mg/dL)	6	179.0 **	6	188.0 ***,††	6	191.3 ***,†††	4	167.0
7日曝露		n	高濃度	n	中濃度	n	低濃度	n	清浄空気
pH		4	7.371	4	7.389	6	7.402 †††	3	7.320
pCO ₂	(mmHg)	4	54.78	4	52.65	6	50.7 *	3	62.4 †
pO ₂	(mmHg)	4	16.0	4	12.3	6	13.5	2	12.0
BEecf	(mmol/L)	4	6.3	4	6.5 †	6	6.7 ††	3	5.7
HCO ₃	(mmol/L)	4	31.68	4	31.75 †	6	31.6 ††	3	31.9 ††
TCO ₂	(mmol/L)	4	33.3	4	33.5 †	6	33.0 ††	3	33.7 ††
sO ₂	(%)	4	23.5	4	14.0	6	16.8	2	13.5
Hct	(%PCV)	6	44.8 †††	6	45.7 †	6	45.5 †††	4	44.5 ††
Hb	(g/dL)	6	15.3 †††	6	15.5 †	6	15.5 †††	4	15.125 ††
Na	(mmol/L)	6	140.0	6	140.0	6	139.8 †††	4	140.0 †
K	(mmol/L)	6	4.33	6	3.98	6	3.78 *	4	4.08
Cl	(mmol/L)	6	102.5	6	102.0	6	102.0	4	101.8
iCa	(mmol/L)	4	1.41	4	1.40	6	1.41	3	1.40
BUN	(mg/dL)	6	17.8 ***,†††	6	17.5 ***,†††	6	14.2 †††	4	12.8
Glu	(mg/dL)	6	174.7	6	178.5	6	183.2 ††	4	185.0 ††

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs.1日曝露

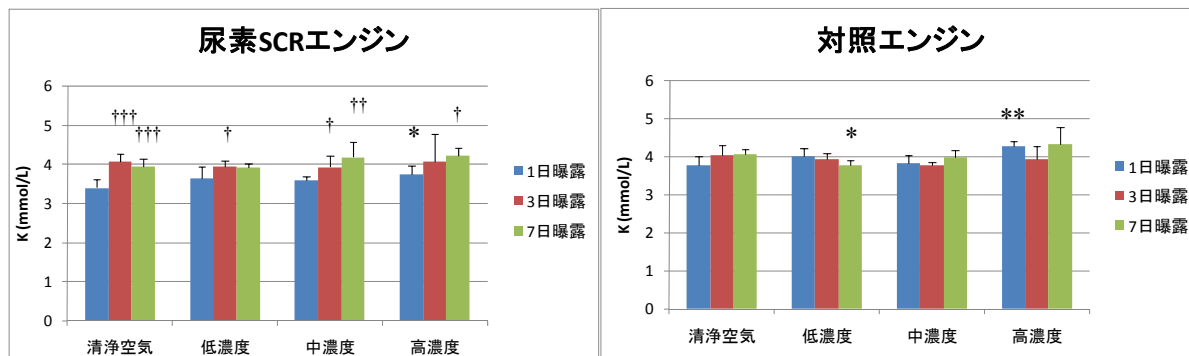


Fig. 3.3.2.21 ラット血液 K (n = 4~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs.1 日曝露)

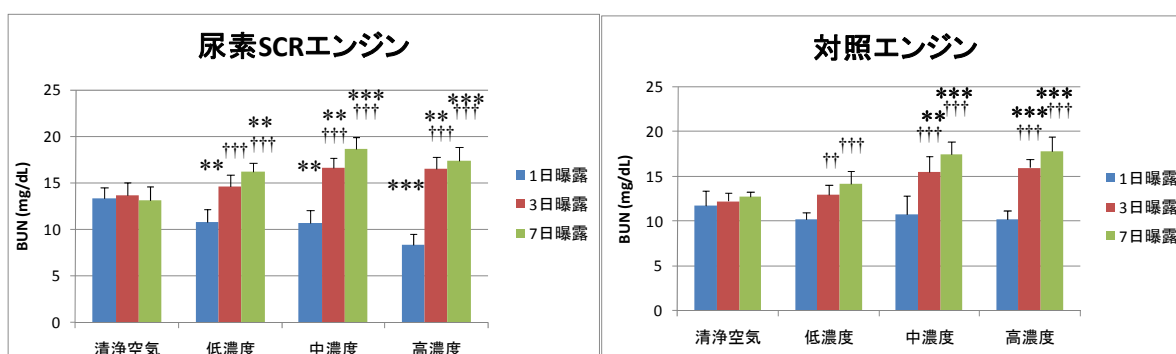


Fig. 3.3.2.22 ラット血液 BUN (n = 4~6)

(** : P<0.01, *** : P<0.001 vs.清浄空気群, †† : P<0.01, ††† : P<0.001 vs.1 日曝露)

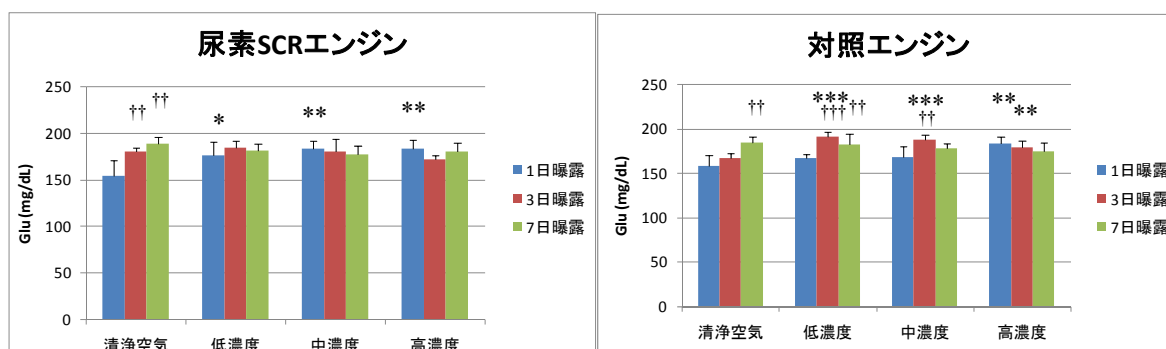


Fig. 3.3.2.23 ラット血液 Glu (n = 4~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs.1 日曝露)

(2) 血液凝固能検査

7日曝露したラットの血液凝固能検査の結果を表 3.3.2.5 および Fig. 3.3.2.24 に示した。尿素 SCR エンジン排気は、曝露濃度による有意差は認められなかった。また、対照エンジン排気と比較しても有意な差は認められなかった。PT は両エンジン排気の清浄空気群で差が認められた。また、対照エンジン排気の高濃度群で APTT の短縮傾向、フィブリノーゲンの上昇傾向が認められた。

表 3.3.2.5 ラット血液凝固能 (7日曝露)

		n	PT (sec)		n	APTT (sec)		n	Fibrinogen (mg/dL)	
			平均 ± SD			平均 ± SD			平均 ± SD	
尿素SCRエンジン	高濃度	9	15.8 ± 0.34		9	19.3 ± 2.55		9	258.7 ± 12.3	
	清浄空気	7	15.9 [#] ± 0.30		7	18.9 ± 1.50		7	254.4 ± 10.5	
対照エンジン	高濃度	1	16.0		1	16.8		1	281.0	
	清浄空気	3	16.6 ± 0.12		3	18.6 ± 0.25		3	265.7 ± 10.5	

#: P<0.05 vs. 対照エンジン排気

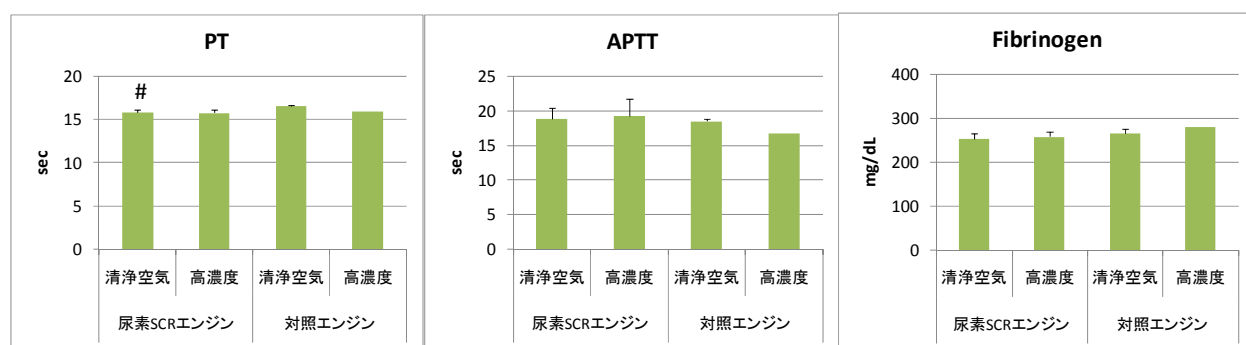


Fig. 3.3.2.24 ラット血液凝固能 (7日曝露) (表 3.3.2.5 をグラフ化) (n = 1~9)

(#: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

(3) 酸化ストレス能検査

酸化ストレス損傷マーカーである 8-OHdG を Fig. 3.3.2.25 に、また、抗酸化能を示す PAO を Fig. 3.3.2.26 に示した。また、Fig. 3.3.2.25-2 および Fig. 3.3.2.26-2 は、Fig. 3.3.2.25 および Fig. 3.3.2.26 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気では、低濃度群の 7日曝露、また、中、高濃度群の全曝露期間で 8-OHdG が有意に低下あるいは検出限界以下 (ND) であった。また、PAO は 8-OHdG が低下した試験群でほぼ有意に上昇した。

一方、対照エンジン排気では、8-OHdG は全ての曝露濃度および曝露期間の中で、高濃度群の 1日曝露が最も高値であり、これは尿素 SCR エンジン排気の試験群と比べても高値であった。しかし、清浄空気群の 1日曝露で全てのサンプルが ND であったことから、有意差検定を行っていない。また、高濃度群では曝露期間が延長すると、8-OHdG が検出されなくなった。中濃度群では、曝露期間に依存して 8-OHdG が上昇した。しかし、PAO は

高濃度群を含めて 8-OHdG を反映した応答を示していなかった。

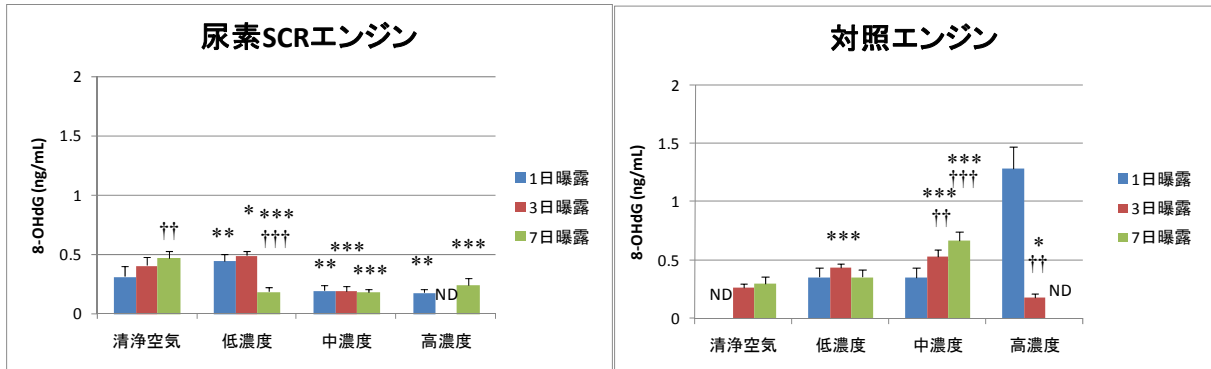


Fig. 3.3.2.25 ラット血清 8-OHdG (曝露濃度ごと) (n = 3~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, †: P<0.01, ††: P<0.001 vs.1日曝露)

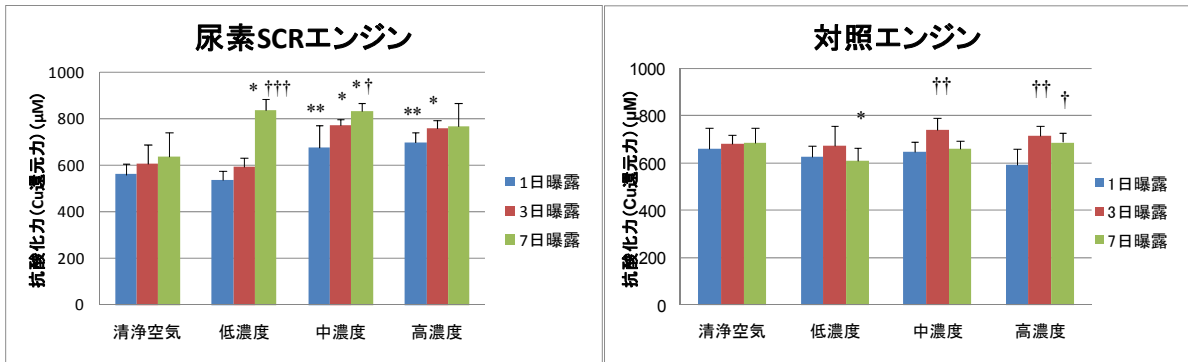


Fig. 3.3.2.26 ラット血清 PAO (抗酸化能) (曝露濃度ごと) (n = 6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

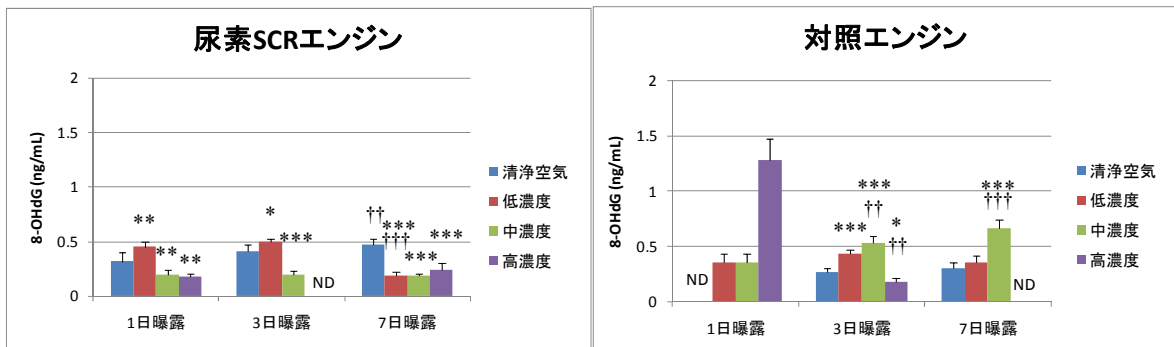


Fig. 3.3.2.25-2 ラット血清 8-OHdG (曝露期間ごと)
(Fig. 3.3.2.25 を改変) (n = 3~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, †: P<0.01, ††: P<0.001 vs. 1日曝露)

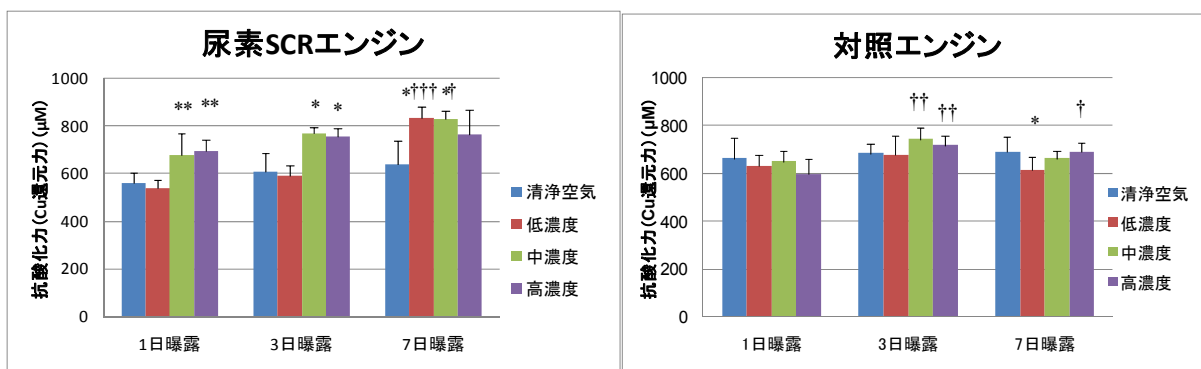


Fig. 3.3.2.26-2 ラット血清 PAO (曝露期間ごと) (Fig. 3.3.2.26 を改変) (n = 6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露)

(4) 血液検査のまとめ

- 血液生化学検査では、両エンジン排気で BUN および Glu が上昇したことから、何らかの影響を与えている可能性が示唆された。
- 血液凝固能検査では、エンジン排気の違いによる影響は認められなかった。
- 尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも活性酸素による損傷が少ないことが推測された。
- 対照エンジン排気の高濃度群の 1 日曝露で、活性酸素による損傷が大きいことが認められた。

4) 遺伝子解析

(1) リアルタイム PCR 解析

a) 肺の遺伝子発現量

肺の CYP1A1 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.27 に示した。また、Fig. 3.3.2.27-2 は Fig. 3.3.2.27 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、中、高濃度群の 7 日曝露で 1 日曝露より発現量が増加した。対照エンジン排気では、低、中濃度群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。

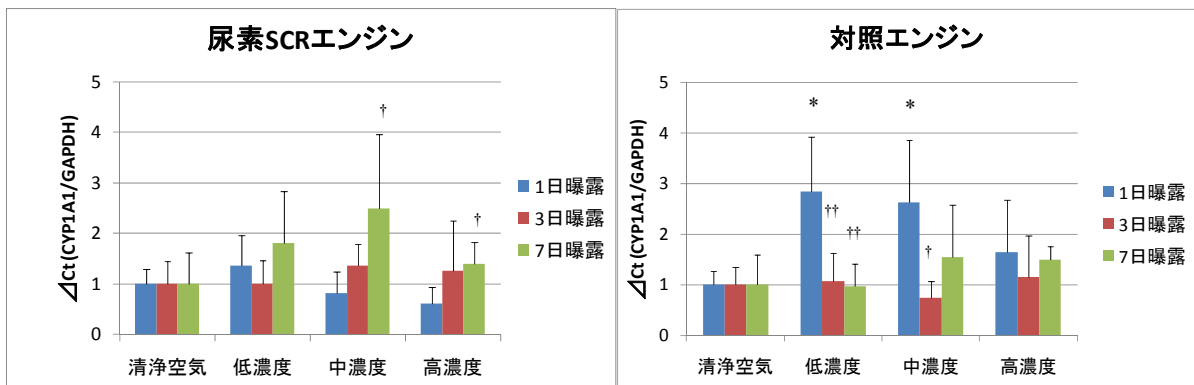


Fig. 3.3.2.27 ラット肺の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

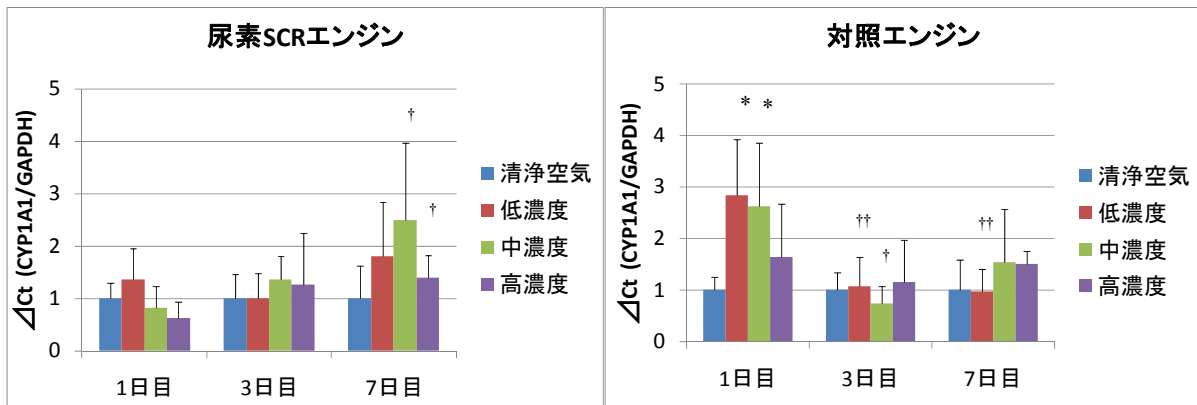


Fig. 3.3.2.27-2 ラット肺の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.27 を改変)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

肺の HO-1 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.28 に示した。また、Fig. 3.3.2.28-2 は Fig. 3.3.2.28 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、高濃度群の 1、3 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。対照エンジン排気では、発現量への影響が見られなかった。

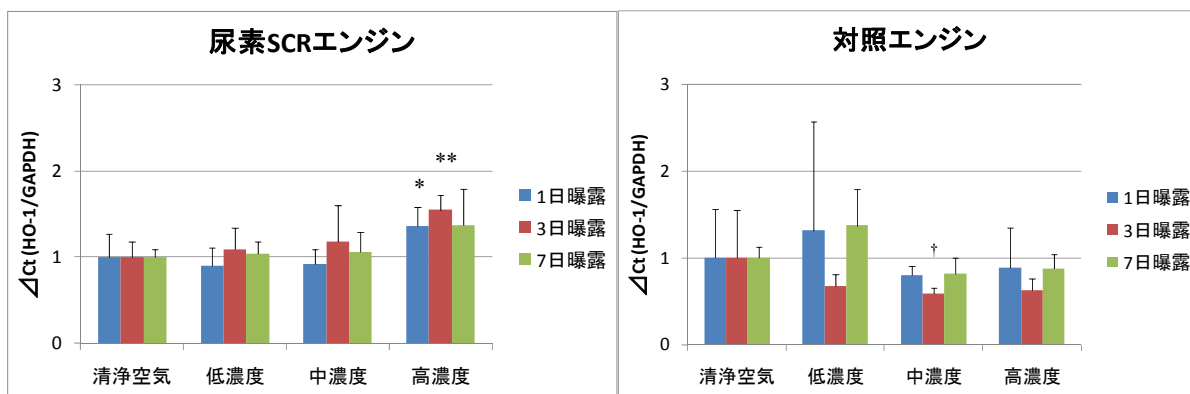


Fig. 3.3.2.28 ラット肺の HO-1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

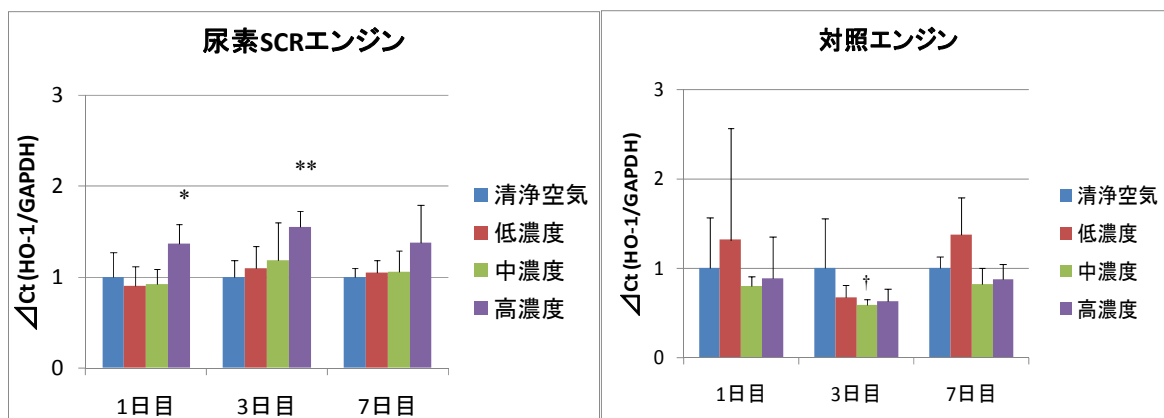


Fig. 3.3.2.28-2 ラット肺の HO-1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.28 を改変)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

肺の IL-1 β 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.29 に示した。また、Fig. 3.3.2.29-2 は Fig. 3.3.2.29 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、中濃度群の全ての曝露期間で清浄空気群よりも発現量が低下傾向にあった。対照エンジン排気では、中、高濃度群の 3 日曝露で清浄空気群よりも発現量が低下した。

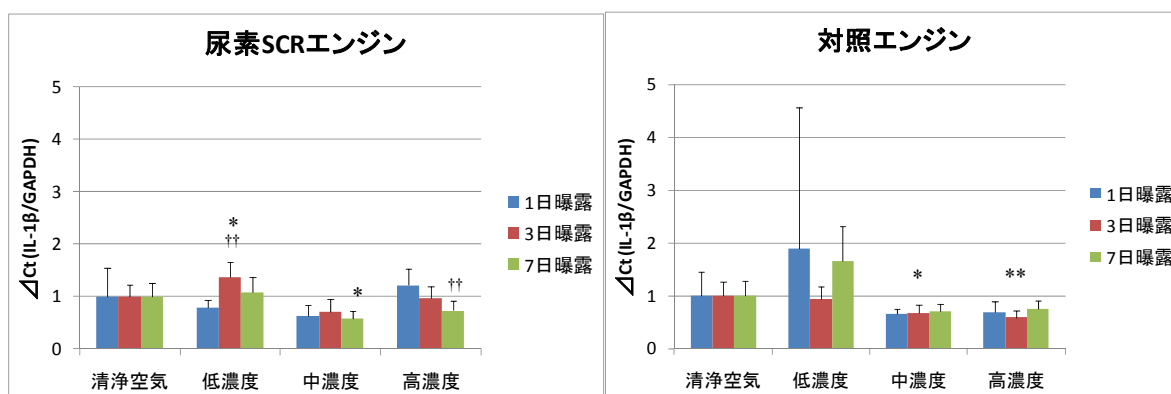


Fig. 3.3.2.29 ラット肺の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

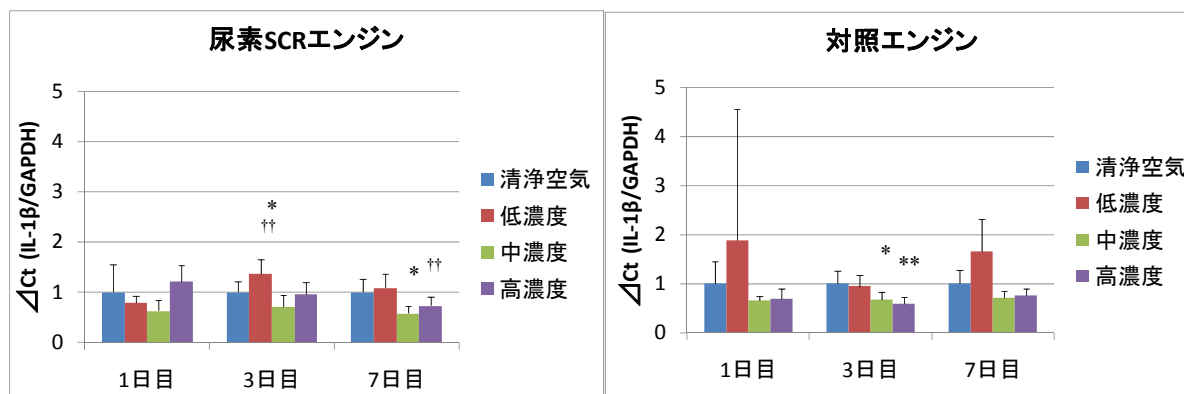


Fig. 3.3.2.29-2 ラット肺の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.29 を改変)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

肺の TNF α 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.30 に示した。また、Fig. 3.3.2.30-2 は Fig. 3.3.2.30 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、低濃度群の 3、7 日曝露、高濃度群の 1 日曝露で清浄空気群より発現量が増加した。対照エンジン排気では、各試験群で発現量への影響がみられなかった。

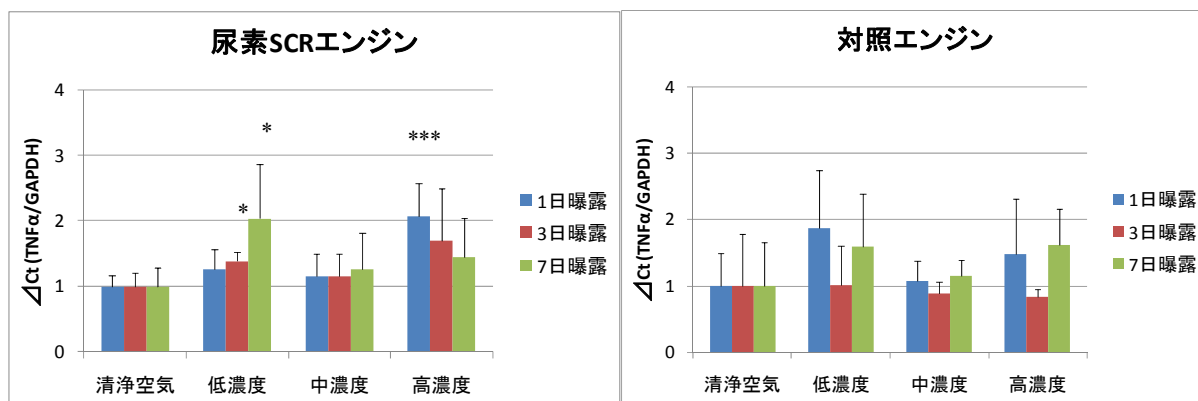


Fig. 3.3.2.30 ラット肺の TNF α 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群)

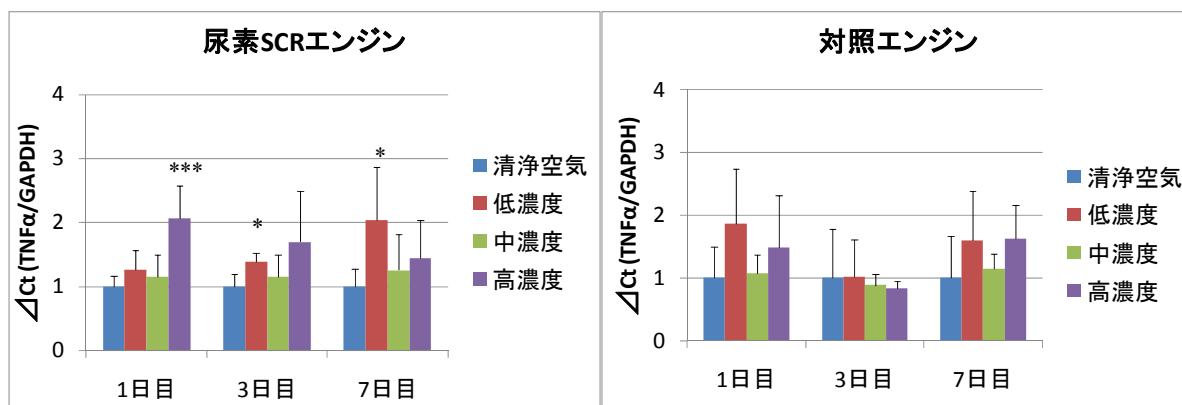


Fig. 3.3.2.30-2 ラット肺の TNF α 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.30 を改変)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群)

b) 心臓の遺伝子発現量

心臓の CYP1A1 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.31** に示した。また、**Fig. 3.3.2.31-2** は **Fig. 3.3.2.31** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は各試験群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。対照エンジン排気では、中、高濃度群の 1、7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。

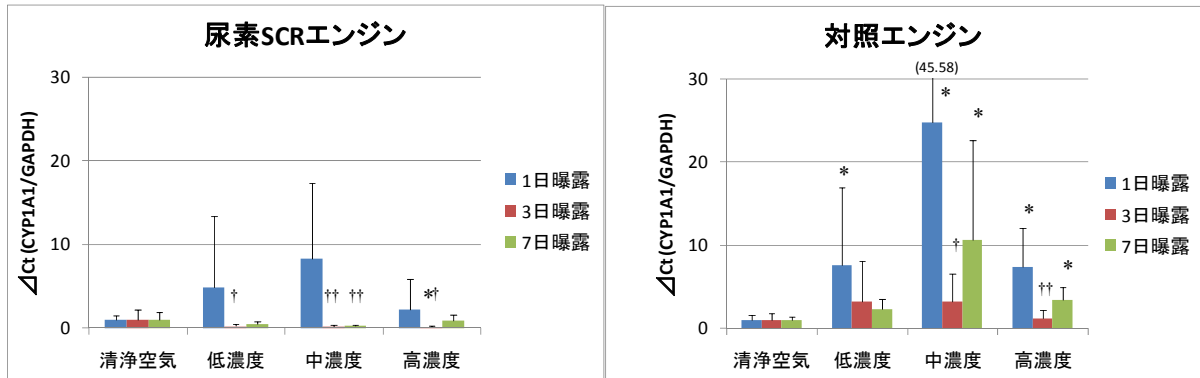


Fig. 3.3.2.31 ラット心臓の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: $P < 0.05$ vs. 清浄空気群, †: $P < 0.05$, ††: $P < 0.01$ vs. 1 日曝露)

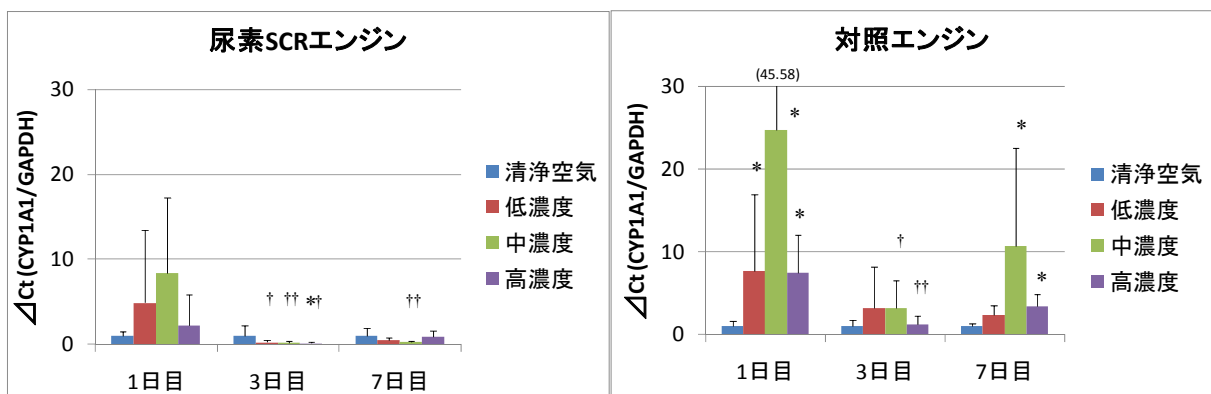


Fig. 3.3.2.31-2 ラット心臓の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(**Fig. 3.3.2.31** を改変)

(*: $P < 0.05$ vs. 清浄空気群, †: $P < 0.05$, ††: $P < 0.01$ vs. 1 日曝露)

心臓の HO-1 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.32** に示した。また、**Fig. 3.3.2.32-2** は **Fig. 3.3.2.32** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群で発現量への影響がみられなかった。対照エンジン排気では、特に中、高濃度群の 7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加した。

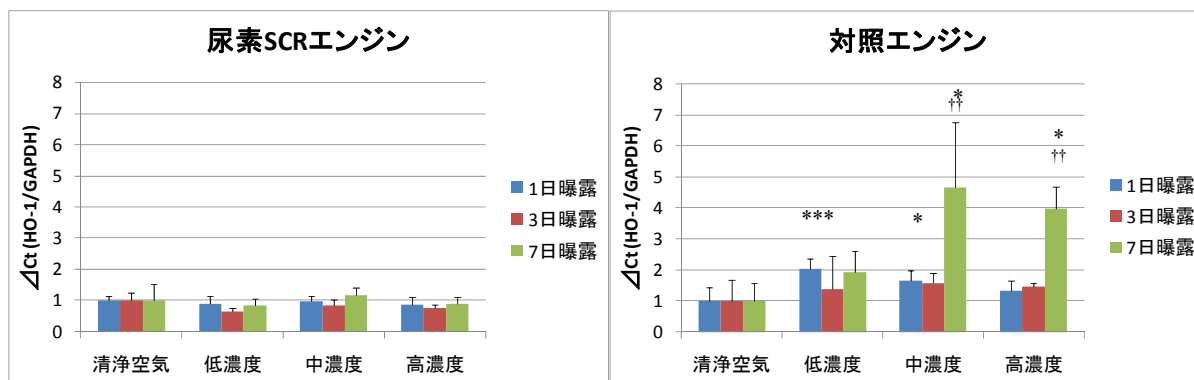


Fig. 3.3.2.32 ラット心臓の HO-1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

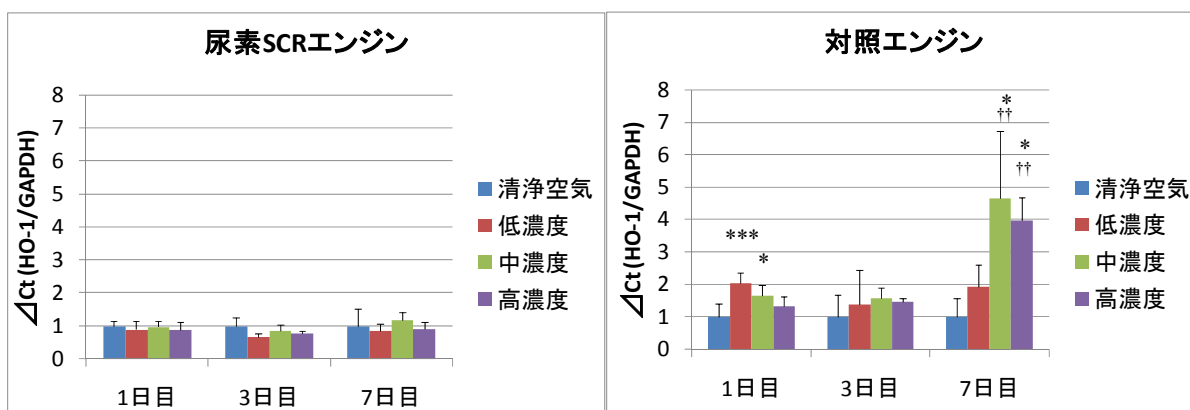


Fig. 3.3.2.32-2 ラット心臓の HO-1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)
(**Fig. 3.3.2.32** を改変)

(*: P<0.05, ***: P<0.001 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

心臓の IL-1 β 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.33** に示した。また、**Fig. 3.3.2.33-2** は **Fig. 3.3.2.33** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。対照エンジン排気では、各試験群で曝露濃度および曝露期間により発現量が増加した。

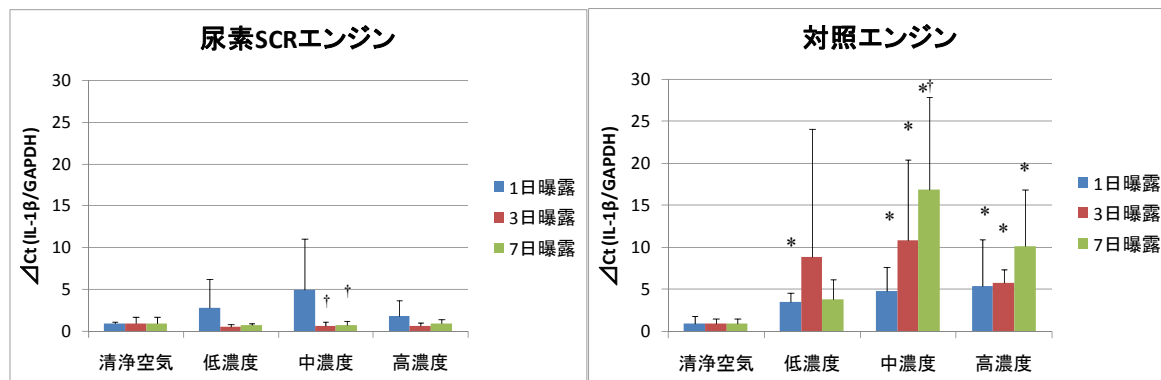


Fig. 3.3.2.33 ラット心臓の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

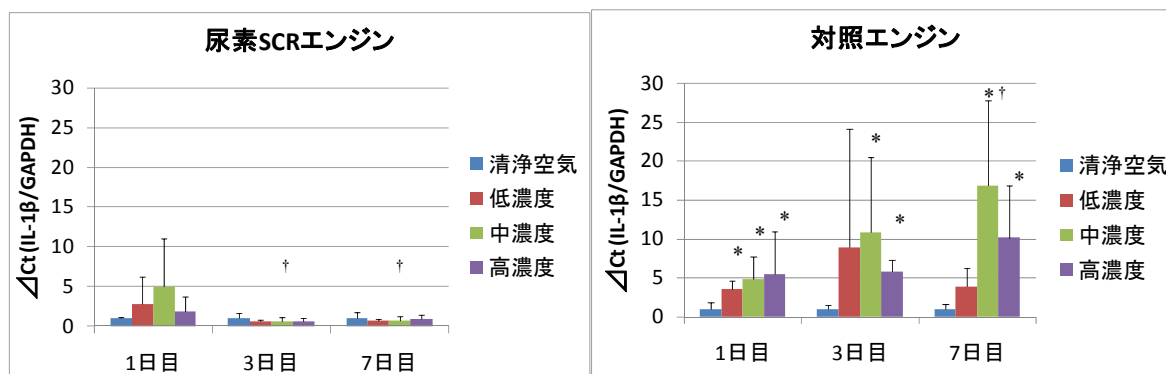


Fig. 3.3.2.33-2 ラット心臓の IL-1 β 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(**Fig. 3.3.2.33** を改変)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

心臓の TNF α 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.34 に示した。また、Fig. 3.3.2.34-2 は Fig. 3.3.2.34 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群の 1 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。対照エンジン排気では、曝露濃度や曝露期間により発現量が増加した。

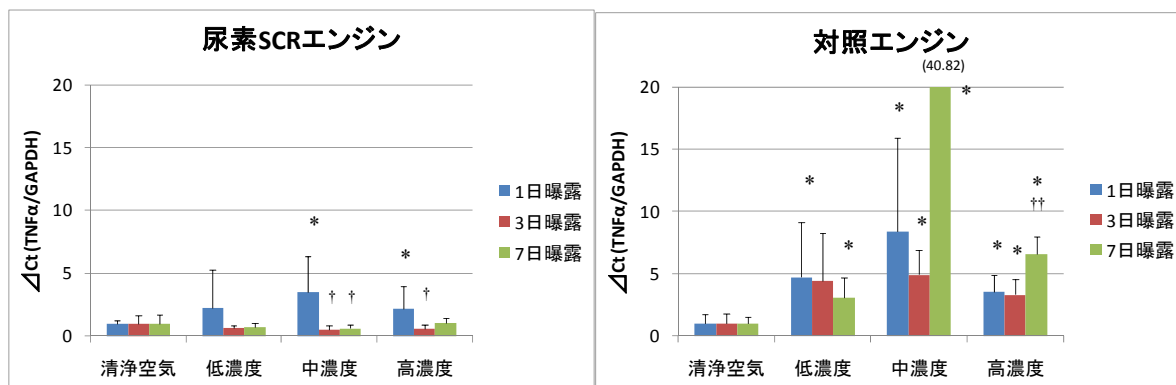


Fig. 3.3.2.34 ラット心臓の TNF α 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

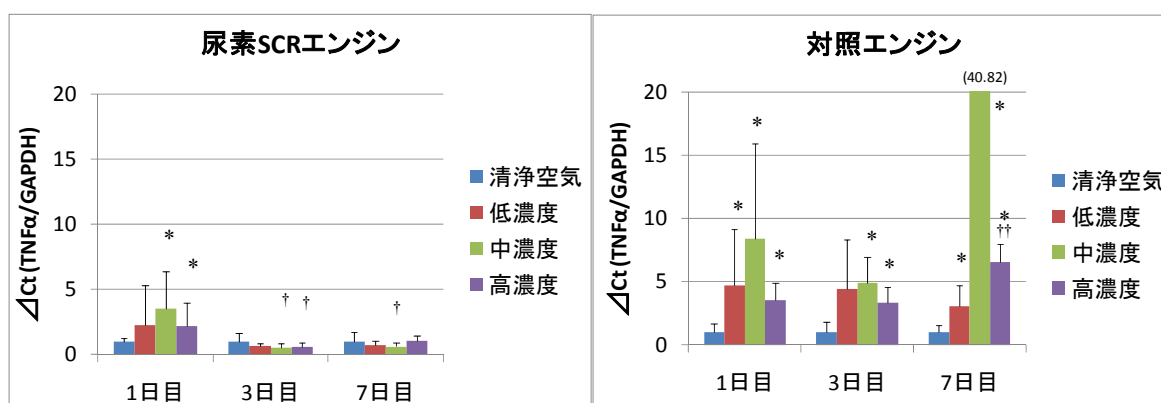


Fig. 3.3.2.34-2 ラット心臓の TNF α 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.34 を改変)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

c) 大脳遺伝子発現量

大脳の CYP1A1 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.35** に示した。また、**Fig. 3.3.2.35-2** は **Fig. 3.3.2.35** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、中、高濃度群で清浄空気群よりも発現量が低下傾向にあった。対照エンジン排気は、各試験群で清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。

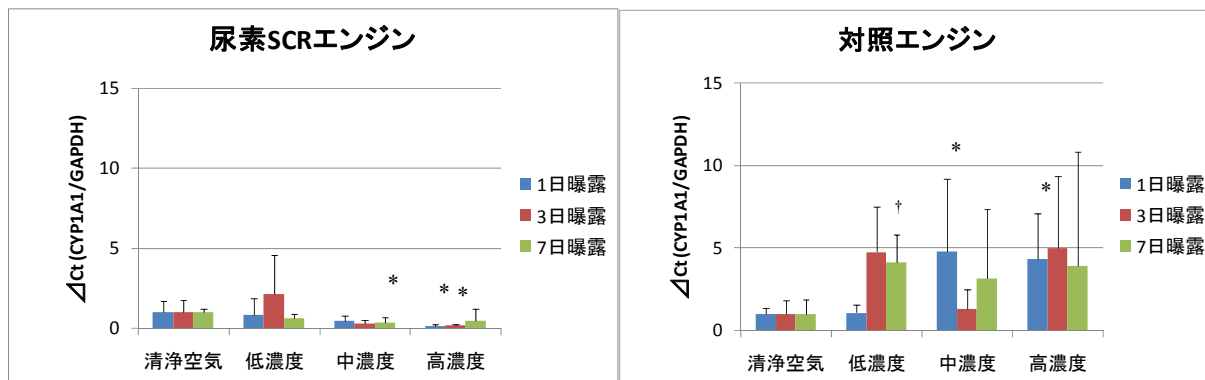


Fig. 3.3.2.35 ラット大脳の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露濃度ごと)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

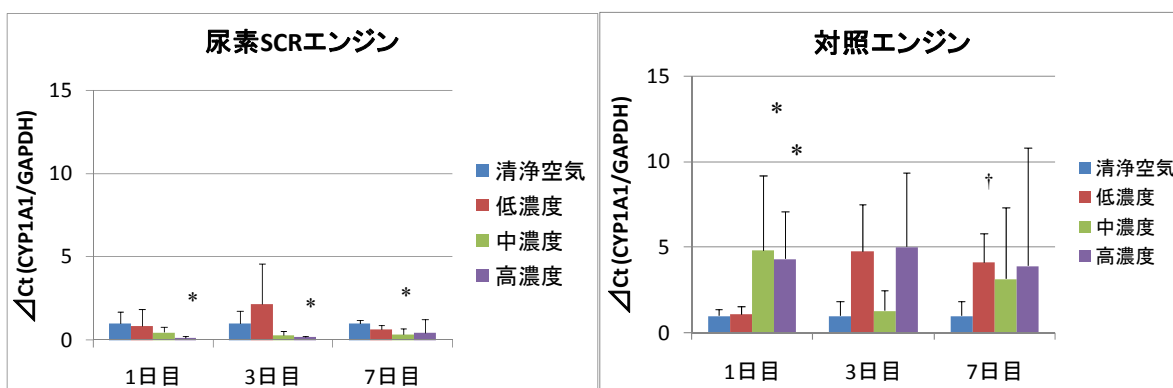


Fig. 3.3.2.35-2 ラット大脳の CYP1A1 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(**Fig. 3.3.2.35** を改変)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

大脳の HO-1 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.36** に示した。また、**Fig. 3.3.2.36-2** は **Fig. 3.3.2.36** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群で発現量への影響はみられなかった。対照エンジン排気では、低濃度群の 3、7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が増加し、高濃度群の 7 日曝露で清浄空気群よりも発現量が低下した。

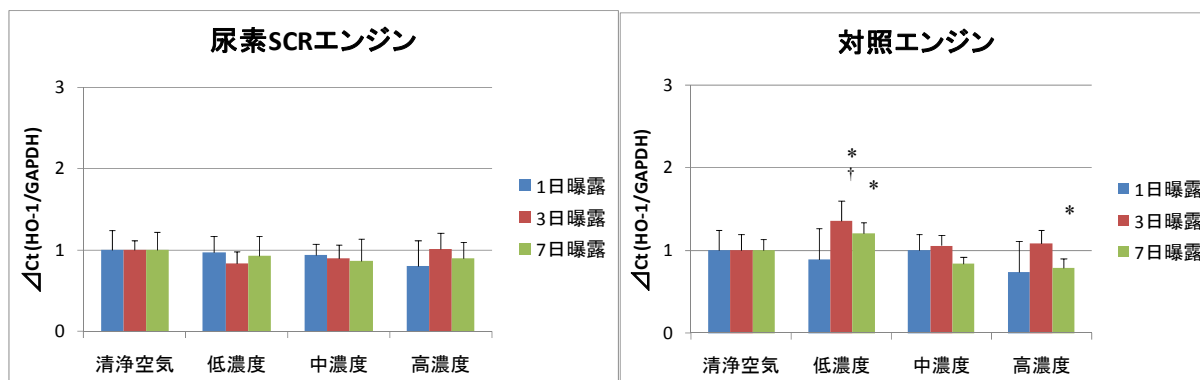


Fig. 3.3.2.36 ラット大脳の HO-1 遺伝子発現量（曝露濃度ごと）

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

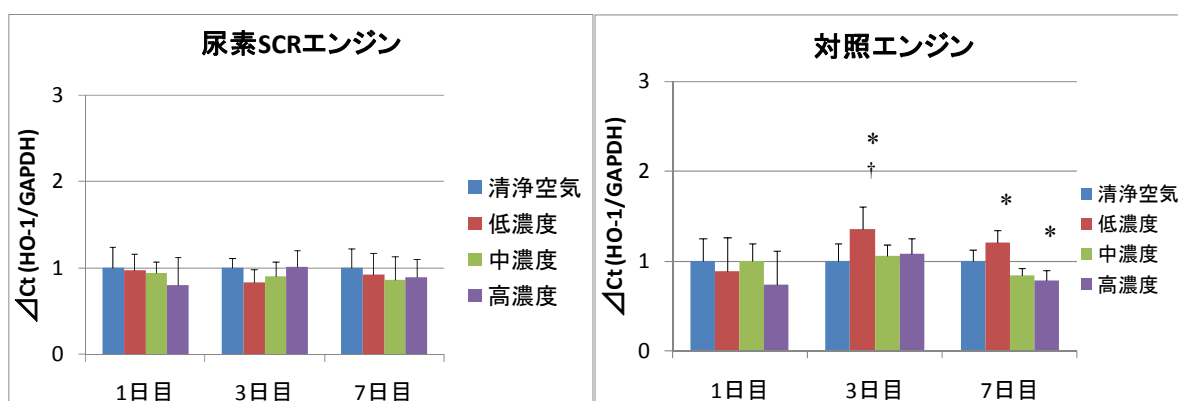


Fig. 3.3.2.36-2 ラット大脳の HO-1 遺伝子発現量（曝露期間ごと）

(**Fig. 3.3.2.36** を改変)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露)

大脳の IL-1 β 遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.37** に示した。また、**Fig. 3.3.2.37-2** は **Fig. 3.3.2.37** を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、低濃度群の 3 日曝露で発現量が増加した。対照エンジン排気では、低濃度群の 3、7 日曝露、および高濃度群の 3 日曝露で、清浄空気群および 1 日曝露よりも発現量が増加した。

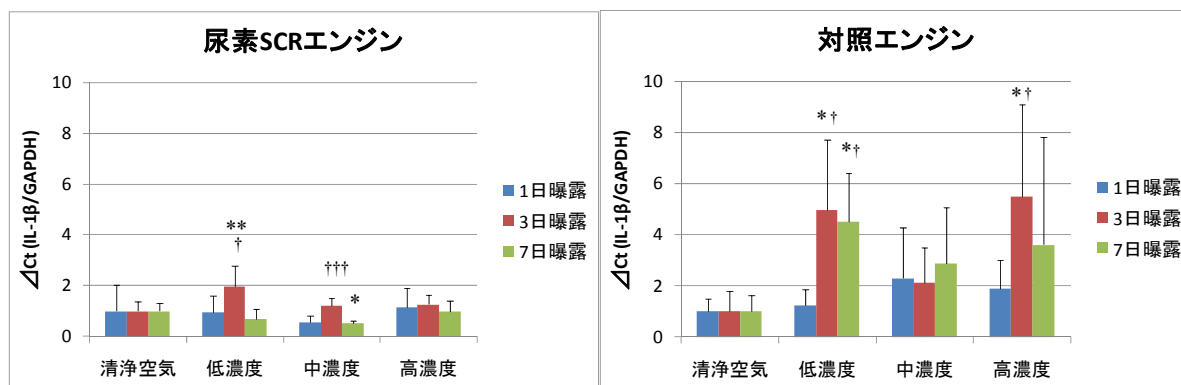


Fig. 3.3.2.37 ラット大脳の IL-1 β 遺伝子発現量（曝露濃度ごと）

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露)

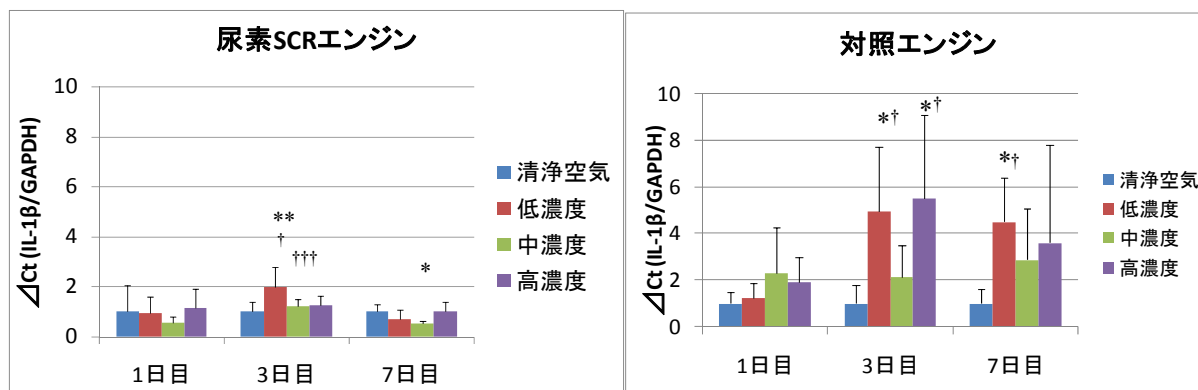


Fig. 3.3.2.37-2 ラット大脳の IL-1 β 遺伝子発現量（曝露期間ごと）
（**Fig. 3.3.2.37** を改変）

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露)

大脳の TNF α 遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.38 に示した。また、Fig. 3.3.2.38-2 は Fig. 3.3.2.38 を曝露期間でまとめ直した。

尿素 SCR エンジン排気は、各試験群で発現量に変動がみられなかった。対照エンジン排気では、低濃度群の 3、7 日曝露、高濃度群の 3 日曝露で発現量が増加傾向にあった。

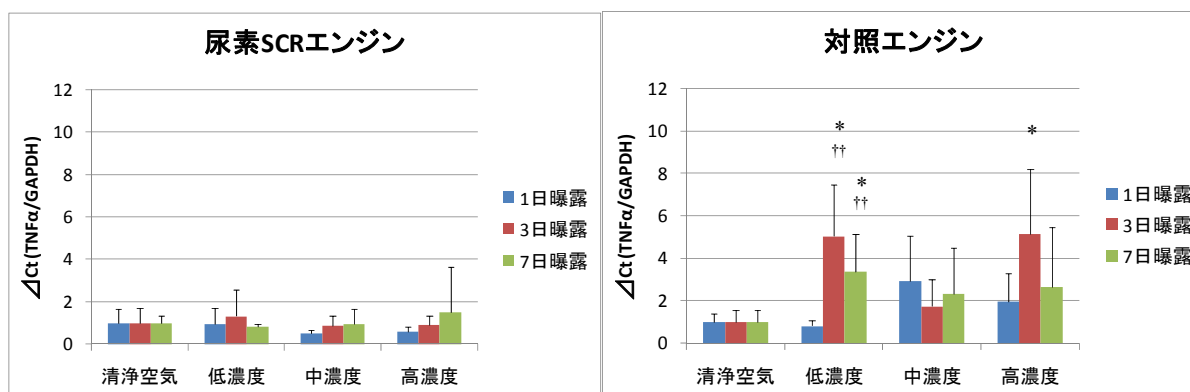


Fig. 3.3.2.38 ラット大脳の TNF α 遺伝子発現量

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

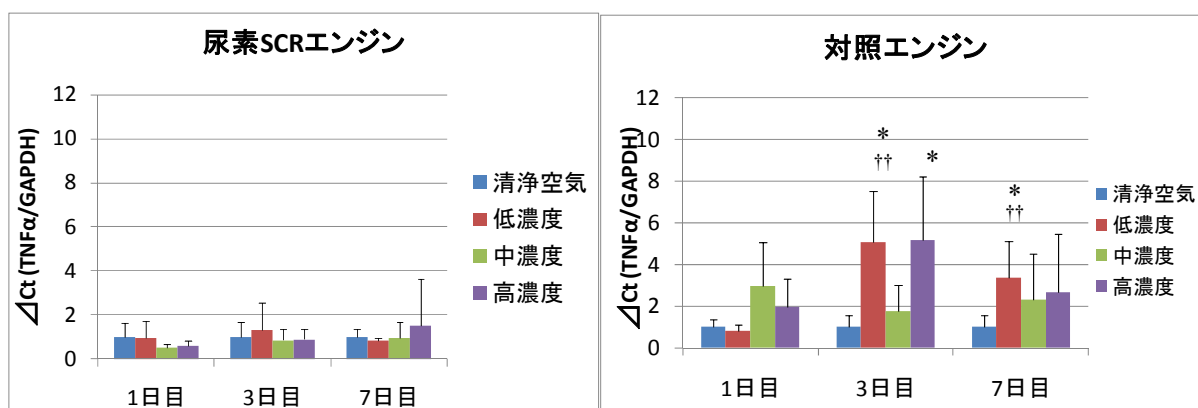


Fig. 3.3.2.38-2 ラット大脳の TNF α 遺伝子発現量 (曝露期間ごと)

(Fig. 3.3.2.38 を改変)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

d) リアルタイム PCR 解析まとめ

- 肺では、尿素 SCR エンジン排気で HO-1 と TNF α の遺伝子発現量が増加したことから、酸化ストレスや炎症に影響を与えていることが示唆された。
- 心臓では、対照エンジン排気の 7 日曝露で、CYP1A1、HO-1 および IL-1 β の遺伝子発現量が増加した。これらは、対照エンジン排気の PM 濃度が高値であったことによる影響である可能性が示唆された。

- 心臓では、尿素 SCR エンジン排気で CYP1A1、IL-1 β および TNF α 遺伝子の発現の傾向が類似していた。
- 大脳では、対照エンジン排気で IL-1 β および TNF α の遺伝子発現量が増加していたことから、炎症に影響を与えていることが示唆された。
- 大脳では、CYP1A1、IL-1 β および TNF α 遺伝子は、両エンジン排気で発現の傾向が類似していた。
- CYP1A1 遺伝子は、各臓器に共通して対照エンジン排気で発現が増加する傾向があった。

遺伝子レベルでは、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓、大脳に影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) DNA マイクロアレイ解析

表 3.3.2.6 は、DNA マイクロアレイ解析の遺伝子発現量の結果の概要を示した。

肺では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも発現変動の程度を示す SD がやや大きく、変動している遺伝子数も若干多かった。

心臓では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気より SD はやや小さかった。また、変動している遺伝子数は尿素 SCR エンジン排気では 7 日曝露よりも 1 日曝露で、対照エンジン排気は 1 日曝露よりも 7 日曝露で多く、両エンジン排気で発現傾向の異なっていることが認められた。

大脳において、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも SD が小さく、変動している遺伝子数も少なかった。

表 3.3.2.6 ラットの各臓器における遺伝子発現量のばらつき (SD) と発現変動した数

エンジン排気	検討試験群/標準試験群	曝露期間	肺			心臓			大脳		
			SD	≥ 2.0	≤ 0.5	SD	≥ 2.0	≤ 0.5	SD	≥ 2.0	≤ 0.5
尿素SCRエンジン	高濃度群/清浄空気群	1日	0.46	1343	527	0.44	1268	467	0.36	497	277
		7日	0.46	1325	686	0.40	713	243	0.39	1022	331
対照エンジン	高濃度群/清浄空気群	1日	0.39	906	229	0.42	989	281	0.52	1752	889
		7日	0.40	1075	475	0.50	1456	456	0.46	1303	585

a) Gene Tree

Fig. 3.3.2.39 に、遺伝子発現の傾向を確認する Gene Tree を示した。対照とする群の遺伝子発現量よりも検討した群での発現量が亢進しているときは赤で示され、抑制しているときには緑で示される。Fig. 3.3.2.39 内に示された各 Bar は各遺伝子の発現傾向が上から下へ示されており、横並びに比較すると、各試験群での発現傾向の違いを確認できる。ここでは、一つ一つの遺伝子の発現傾向に着目するのではなく、両エンジン排気で 1、7 日曝露した各臓器における各試験群での発現全体の違いを検討した。

肺では、両エンジン排気の 1 日曝露で発現傾向に差異がみられた。7 日曝露の両エンジン排気では、1 日曝露ほどではないが若干の差異がみられた。尿素 SCR エンジン排気では、

1日曝露と7日曝露で発現傾向が逆になっている遺伝子が多くみられ、曝露期間の延長で、発現遺伝子が増えていることが認められた。また、対照エンジン排気では、7日曝露で1日曝露よりも強い発現抑制がかかっている傾向がみられた。一方、各試験群で Distance 値に似か寄りは見られなかった。

心臓では、両エンジン排気の1日曝露で、発現傾向の類似性がみられた。また、7日曝露では、両エンジン排気で発現傾向が逆になっていた。対照エンジン排気では曝露期間による発現変動の大きな差異はあまりみられなかった。Distance 値からは、尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で発現傾向が他と異なっていることが認められた。

大脳では、対照エンジン排気の1、7日曝露、尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で、発現傾向の類似性がみられた。また、尿素 SCR エンジン排気の1日曝露は、他の試験群とは逆の発現傾向を示していた。

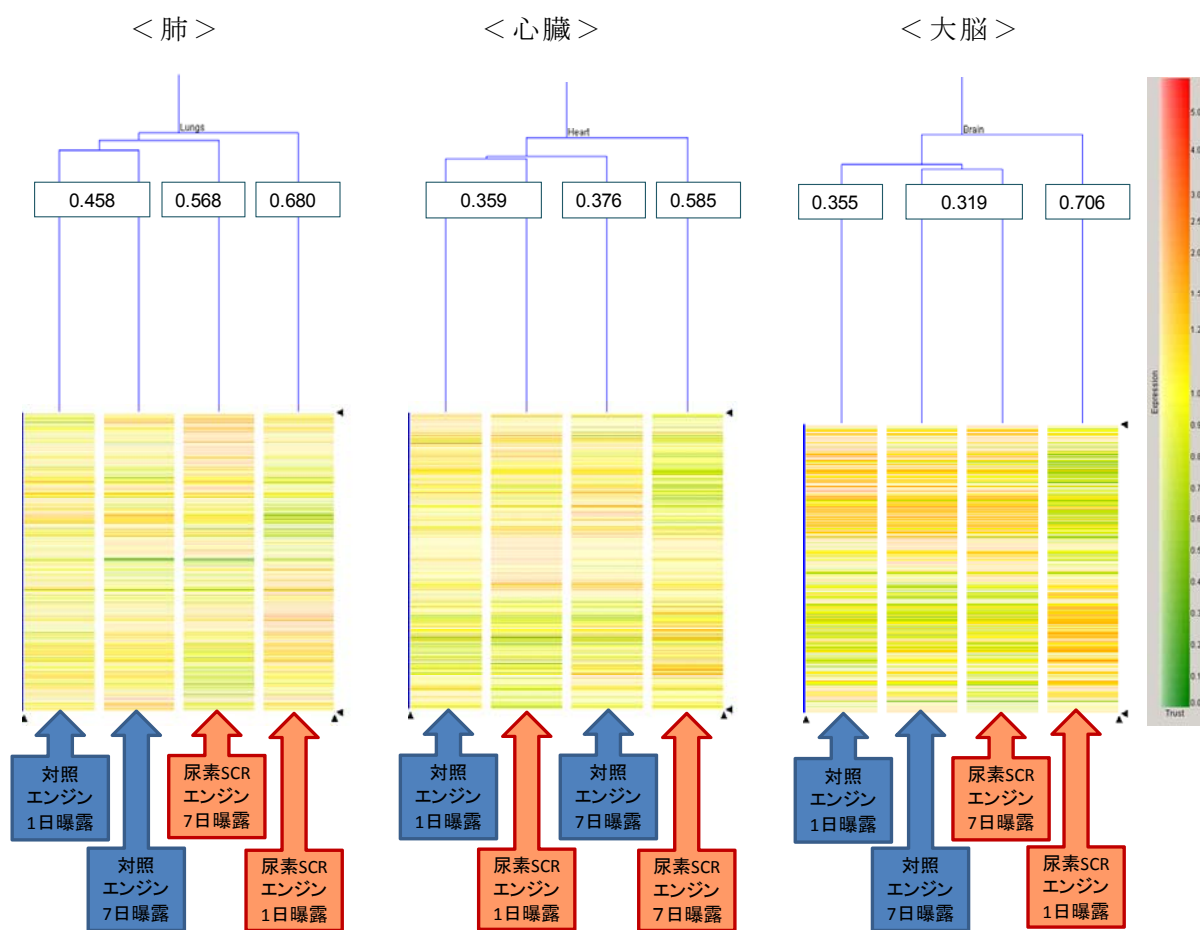


Fig. 3.3.2.39 ラット各臓器における遺伝子発現傾向 (Gene Tree)
シード内の数値は Distance 値を示し

b) Gene Ontology

表 3.3.2.7～表 3.3.2.9 では、Gene Ontology (GO) で分類された遺伝子の発現量の SD を臓器ごとに示した。また、ばらつきが最も大きい試験群の SD 値を下線で示した。

表 3.3.2.7 は、肺の GO 分類を示した。酸化ストレス関連遺伝子分類中のほとんどや細胞成長や細胞分裂、細胞死に関わる遺伝子分類の SD 値が、特に尿素 SCR エンジン排気で高値を示した。酸化ストレスによる影響は細胞分裂にも影響を与えるため、それらの関連についても示唆された。

表 3.3.2.7 GO 分類されたラット肺の遺伝子発現量のばらつき

		尿素 SCR エンジン		対照エンジン	
		1 日曝露	7 日曝露	1 日曝露	7 日曝露
成長	細胞増殖	<u>0.35</u>	0.32	0.31	0.31
	細胞成長	<u>0.42</u>	0.38	0.26	0.29
細胞分裂	DNA 代謝	<u>0.43</u>	0.35	0.30	0.31
	転写	<u>0.41</u>	0.41	0.29	0.34
細胞傷害	外部刺激応答	0.34	<u>0.42</u>	0.31	0.31
	細胞死	<u>0.46</u>	0.44	0.28	0.31
酸化ストレス	ストレス応答	<u>0.38</u>	0.34	0.19	0.28
	アポトーシス	<u>0.46</u>	0.45	0.28	0.31
	グルタチオン代謝	0.41	0.48	<u>0.66</u>	0.21
	抗酸化活性	0.22	<u>0.50</u>	0.18	0.17
	ケトン体の合成と低下	<u>0.44</u>	0.33	0.18	0.23
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	<u>0.39</u>	0.39	0.31	0.32
細胞シグナル伝達	ステロイド生合成	0.27	0.37	0.23	<u>0.38</u>
	カルシウムシグナル経路	0.41	<u>0.46</u>	0.26	0.38
	MAPK シグナル経路	0.37	<u>0.40</u>	0.23	0.33
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	<u>0.47</u>	0.41	0.37	0.35
	TGFβ シグナル経路	0.51	<u>0.51</u>	0.30	0.30

表 3.3.2.8 は、心臓の GO 分類を示した。細胞増殖、グルタチオン代謝や抗酸化活性、ケトン体合成などの遺伝子分類では、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で SD 値が高い傾向にあった。細胞分裂や細胞傷害、ストレス応答、アポトーシス、カタラーゼ活性、細胞シグナル伝達系、炎症・アレルギー関連の遺伝子分類では、対照エンジン排気の 7 日曝露で SD 値が高い傾向にあった。

なお、MAPK シグナル経路関連の遺伝子分類では、尿素 SCR エンジン排気の 7 日曝露にて SD 値が他より顕著に高かった。この分類内で大きく変動していた遺伝子を調べたところ、similar to putative voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit (predicted) (Acc. No. XM_232320) と Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2 (Acc. No. BI292115) であり、それらの発現量は 15.76 および 15.56 と顕著な発現亢進であった。

表 3.3.2.8 GO 分類されたラット心臓の遺伝子発現量のばらつき

		尿素 SCR エンジン		対照エンジン	
		1 日曝露	7 日曝露	1 日曝露	7 日曝露
成長	細胞増殖	<u>0.36</u>	0.26	0.31	0.35
	細胞成長	0.36	0.26	0.32	<u>0.44</u>
細胞分裂	DNA 代謝	0.36	0.27	0.33	<u>0.37</u>
	転写	0.36	0.37	0.34	<u>0.49</u>
細胞傷害	外部刺激応答	0.41	0.29	0.39	<u>0.51</u>
	細胞死	0.34	0.31	0.29	<u>0.42</u>
酸化ストレス	ストレス応答	0.28	0.23	0.31	<u>0.32</u>
	アポトーシス	0.35	0.31	0.29	<u>0.43</u>
	グルタチオン代謝	<u>0.58</u>	0.35	0.45	0.53
	抗酸化活性	<u>0.26</u>	0.25	0.17	0.21
	ケトン体の合成と低下	<u>0.36</u>	0.28	0.24	0.31
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	0.36	0.27	0.32	<u>0.42</u>
細胞シグナル伝達	プロテインキナーゼ活性	0.37	0.26	0.33	<u>0.42</u>
	ステロイド生合成	0.53	0.30	0.26	<u>0.70</u>
	カルシウムシグナル経路	0.39	0.27	0.26	<u>0.48</u>
	MAPK シグナル経路	0.37	<u>1.21</u>	0.35	0.44
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	0.35	0.36	0.33	<u>0.43</u>
	TGFβ シグナル経路	0.47	0.28	0.36	<u>0.48</u>
	細胞接着分子 (CAMs)	0.43	0.29	0.27	<u>0.48</u>

表 3.3.2.9 に示した大脳では、ケトン体合成と低下やプロテインキナーゼ活性に関与する遺伝子分類を除くほとんどの遺伝子分類で、対照エンジン排気の SD 値が高い傾向にあった。特に、細胞成長、細胞傷害、ストレス応答、アポトーシス、グルタチオン代謝などに加え、神経変性疾患や嗅球伝達に関わる遺伝子分類においては、対照エンジン排気の 1 日曝露で SD 値がさらに高い傾向にあった。

表 3.3.2.9 GO 分類されたラット大脳の遺伝子発現量のばらつき

		尿素 SCR エンジン		対照エンジン	
		1 日曝露	7 日曝露	1 日曝露	7 日曝露
成長	細胞増殖	0.30	0.34	<u>0.43</u>	0.39
	細胞成長	0.26	0.32	<u>0.41</u>	0.37
細胞分裂	DNA 代謝	0.26	0.36	0.44	<u>0.45</u>
	転写	0.25	0.34	<u>0.44</u>	0.39
細胞傷害	外部刺激応答	0.29	0.37	<u>0.45</u>	0.37
	細胞死	0.31	0.34	<u>0.44</u>	0.43
酸化ストレス	ストレス応答	0.23	0.30	<u>0.33</u>	0.31
	アポトーシス	0.31	0.34	<u>0.45</u>	0.42
	グルタチオン代謝	0.24	0.31	<u>0.36</u>	0.35
	抗酸化活性	0.21	0.21	0.22	<u>0.25</u>
	ケトン体の合成と低下	0.30	<u>0.46</u>	0.33	0.23
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	0.36	0.32	<u>0.42</u>	0.38
細胞シグナル伝達	プロテインキナーゼ活性	<u>0.59</u>	0.34	0.45	0.38
	ステロイド生合成	0.22	0.29	<u>0.42</u>	0.41
	カルシウムシグナル経路	0.27	0.32	0.49	<u>0.49</u>
	MAPK シグナル経路	0.28	0.33	0.43	<u>0.53</u>
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	0.31	0.36	0.53	<u>0.53</u>
	TGFβ シグナル経路	0.28	0.31	<u>0.50</u>	0.38
神経	神経変性疾患	0.32	0.25	<u>0.38</u>	0.28
	嗅球伝達	0.28	0.31	<u>0.47</u>	0.29

c) 注目すべき遺伝子の発現変化

特に留意しておくべき遺伝子を臓器ごとにピックアップし、エンジン排気とその曝露期間による発現量の差異について検討した。結果を表 3.3.2.10～表 3.3.2.12 に示した。

表 3.3.2.10 に示す肺で特に重要と思われる遺伝子の中では、chemokine (C-C motif) ligand 11 (Eotaxin) (Acc. No. NM_019205) の遺伝子発現が対照エンジンの 1 日曝露で 2 倍以上に発現が亢進されたが、その他に、変動のみられた遺伝子はなかった。

また、表 3.3.2.11～表 3.3.2.12 に示す心臓や大脳で特に重要と思われる遺伝子の中では、特に変動のみられた遺伝子はなかった。

表 3.3.2.10 ラット肺で変動する可能性のある代表的な遺伝子の発現変化

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		1日曝露	7日曝露	1日曝露	7日曝露
NM_031055	matrix metalloproteinase 9	1.08	0.92	1.20	0.84
U65656	matrix metalloproteinase 2	1.07	0.88	1.00	0.76
NM_053819	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	1.31	1.26	1.04	1.29
NM_019205	chemokine (C-C motif) ligand 11	0.60	1.11	2.05	1.53
NM_031116	chemokine (C-C motif) ligand 5	1.16	1.07	1.30	1.20
NM_138880	interferon gamma	0.50	0.75	0.52	0.57
NM_012589	interleukin 6	0.83	1.05	0.85	1.30
NM_017329	surfactant, pulmonary-associated protein A1	0.89	0.80	1.02	0.95
NM_138842	surfactant associated protein B	0.85	0.72	0.71	0.81
BI295745	Surfactant associated protein C	0.82	0.84	1.19	0.99
NM_012878	surfactant associated protein D	0.62	0.44	0.66	0.61

表 3.3.2.11 ラット心臓で変動する可能性のある代表的な遺伝子の発現変化

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		1日曝露	7日曝露	1日曝露	7日曝露
NM_012589	interleukin 6	0.97	1.26	1.04	0.99
NM_012612	natriuretic peptide precursor type A	0.81	0.73	0.78	0.78
NM_031545	natriuretic peptide precursor type B	1.38	1.23	1.51	1.21
NM_030985	angiotensin II receptor, type 1 (AT1A)	0.86	1.02	0.86	0.84
AA926148	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	0.70	0.66	0.90	0.79
NM_012548	endothelin 1	1.20	1.17	1.57	1.36
NM_012550	endothelin receptor type A	0.85	0.83	1.15	1.05
NM_012922	caspase 3, apoptosis related cysteine protease	1.39	1.15	1.33	1.34

表 3.3.2.12 ラット大脳で変動する可能性のある代表的な遺伝子の発現変化

		尿素SCRエンジン		対照エンジン	
		1日曝露	7日曝露	1日曝露	7日曝露
XM_227525	nerve growth factor, beta (mapped)	0.88	1.55	1.63	1.33
NM_012513	brain derived neurotrophic factor	0.66	0.82	0.79	0.84
NM_031073	neurotrophin 3	1.18	1.47	1.18	1.67
J05276	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	0.99	1.33	1.32	1.20
M64867	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	0.58	1.20	1.95	1.12
NM_031761	c-fos induced growth factor	1.26	0.69	1.12	0.95
NM_021835	Jun oncogene	1.48	1.31	0.89	1.13
AI059604	Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	1.04	0.69	1.33	0.68
NM_012944	dopamine receptor D4	0.83	0.83	0.66	0.65

d) DNA マイクロアレイ解析まとめ

- 肺では、対照エンジン排気と比べて尿素 SCR エンジン排気での遺伝子発現変動が大き

く、酸化ストレス関連の遺伝子の変動が認められた。

- 心臓では、対照エンジン排気の 7 日曝露での遺伝子発現変動が大きく、酸化ストレス関連をはじめ、代謝関連などの遺伝子発現変動が認められた。
- 脳では、尿素 SCR エンジン排気と比べて対照エンジン排気で遺伝子発現変動が大きく、代謝に関連した遺伝子の変動が認められた。

遺伝子発現の変動傾向は、各臓器でリアルタイム PCR 解析と同様の傾向であり、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓および脳に影響を与える可能性が示唆された。

5) 病理解析

(1) 呼吸器系の評価

a) 尿素 SCR エンジン排気

低、中、高濃度群の各試験群とも、清浄空気群と比較して、気管から細気管支、終末細気管支にかけての気道部の線毛細胞に線毛の短縮や脱落、あるいは非線毛細胞（杯細胞、クララ細胞）に杯細胞の増生や粘液産生の亢進、クララ細胞の膨隆などの変化を認めなかった。また、気道上皮下の線維化や炎症細胞浸潤も認めなかった。（**Fig. 3.3.2.40**、**Fig. 3.3.2.41**）。

肺胞部では肺胞構築は各試験群とも正常に保たれており、肺胞の過拡張や破壊など重篤な変化は認められなかった（**Fig. 3.3.2.40**、**Fig. 3.3.2.41**）。低濃度群、中濃度群では清浄空気群と同様に変化は認められなかった。一方、高濃度群では、II 型上皮細胞の増生を認める個体が増加し、また、肺胞腔内の肺胞マクロファージ（AM）⁷⁴の軽度な炭粉貪食を一部の個体に認めた（**Fig. 3.3.2.42**、**表 3.3.2.13**）。

⁷⁴ **肺胞マクロファージ**[alveolar macrophage]：肺胞に存在するマクロファージ（大食細胞、Mφ）。II 型上皮細胞により産生された肺サーファクタントを分解・除去する。細胞内には蛋白質を分解する酵素があり、取り込んだ細菌やウイルスを消化し、無毒化する。多くは、最後には線毛エスカレーターで運ばれる。

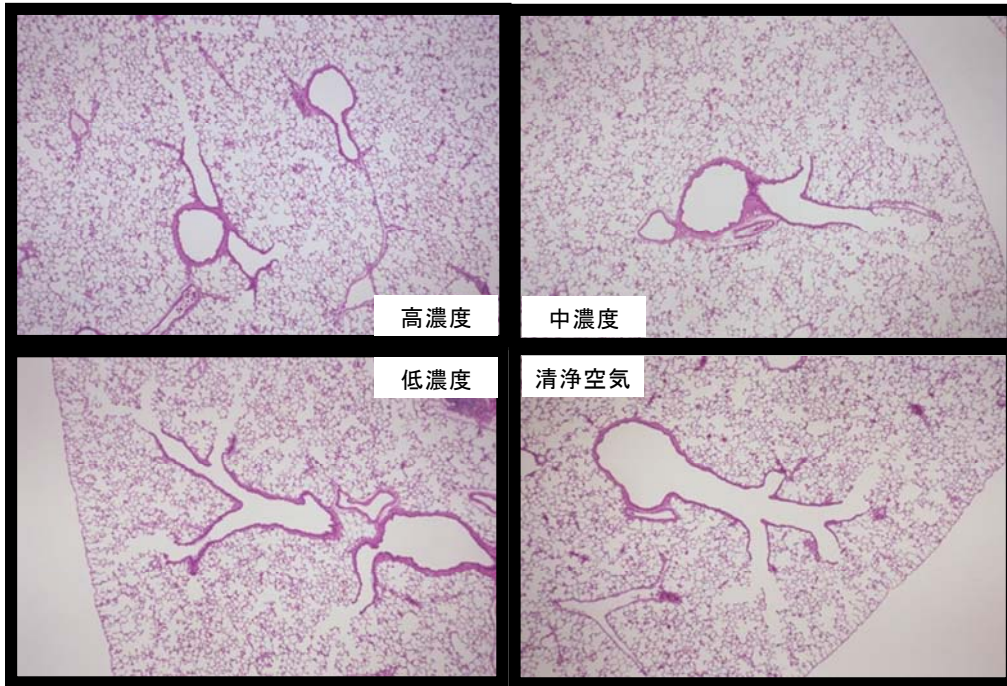


Fig. 3.3.2.40 ラット肺組織（尿素 SCR エンジン）（HE 染色、撮影倍率：10 倍）

各試験群とも肺胞構築に異常は認めない。

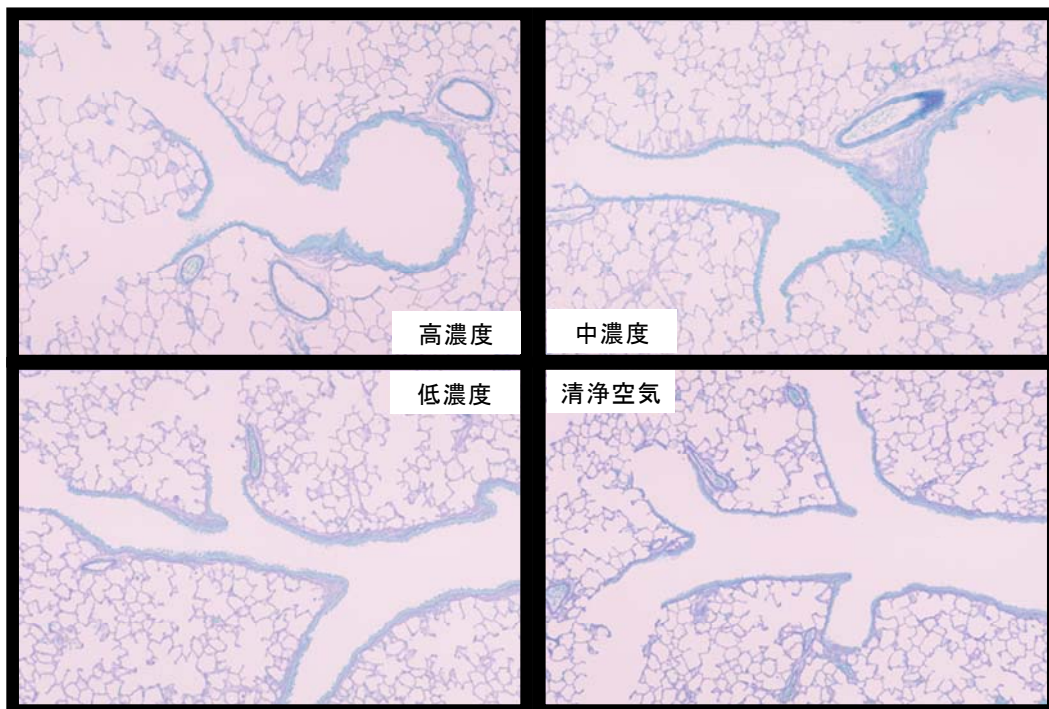


Fig. 3.3.2.41 ラット気道部（尿素 SCR エンジン）
（AB・PAS 染色、撮影倍率：25 倍）

各試験群とも気道の粘液産生に異常は認めない。

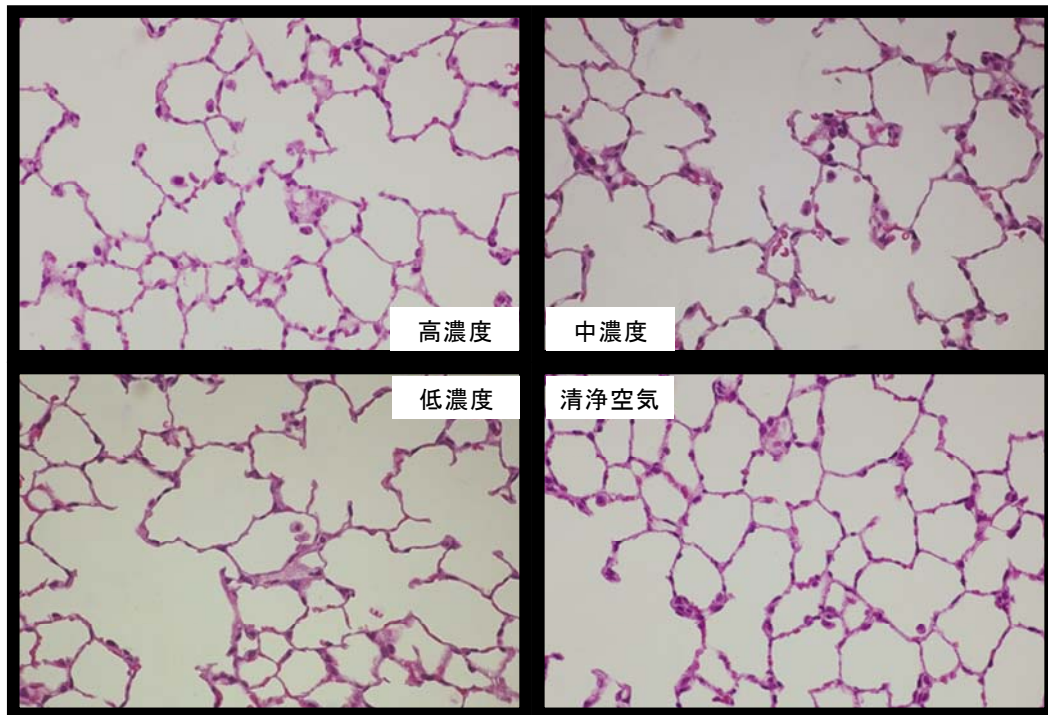


Fig. 3.3.2.42 ラット肺胞部（尿素 SCR エンジン）（HE 染色、撮影倍率：100 倍）

b) 対照エンジン排気

低、中、高濃度群の各試験群とも、清浄空気群と比較して、気管から細気管支、終末細気管支にかけての気道部の線毛細胞に線毛の短縮や脱落、あるいは非線毛細胞（杯細胞、クララ細胞）に杯細胞の増生や粘液産生の亢進、クララ細胞の膨隆などの変化や、気道上皮下の線維化や炎症細胞浸潤を認めなかった（**Fig. 3.3.2.43**、**Fig. 3.3.2.44**）。

肺胞部では、肺胞構築は各試験群とも正常に保たれており、肺胞の過拡張や破壊など重篤な変化は認められなかった（**Fig. 3.3.2.45**）。一方、中濃度以上の試験群では、II 型上皮細胞の増生や肺胞腔内へ粒子貪食のために浸潤した AM の粒子貪食や増生が認められ、低濃度群では肺胞部の変化は認められず、対照群と同様であった（**表 3.3.2.13**）。中濃度群では II 型上皮細胞の軽度な増生に加えて、肺胞腔内の AM の炭粉貪食が全個体に軽度に認められ、なかには中等度の貪食を示す個体もあった。高濃度群では、II 型上皮細胞の増生を軽度に認める個体が中濃度群と比較して増加し、AM の炭粉貪食に関しては、ディーゼルエンジン排気中の黒色粒子が AM の細胞内に明確にかつ多量に認められ、そのため AM のサイズが増大していた。また、一部の個体で AM の軽度な増生も認められた（**Fig. 3.3.2.45**）。

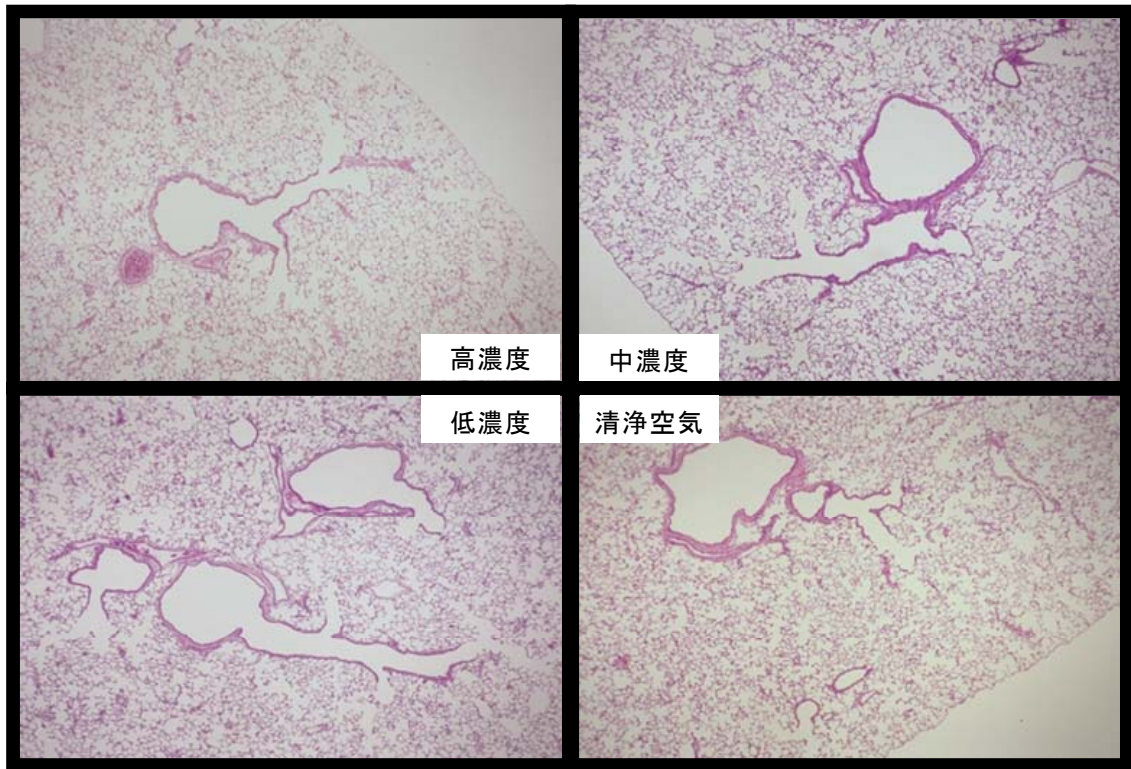


Fig. 3.3.2.43 ラット肺組織（対照エンジン）（HE 染色、撮影倍率：10 倍）

各試験群とも肺胞構築に異常は認めない。

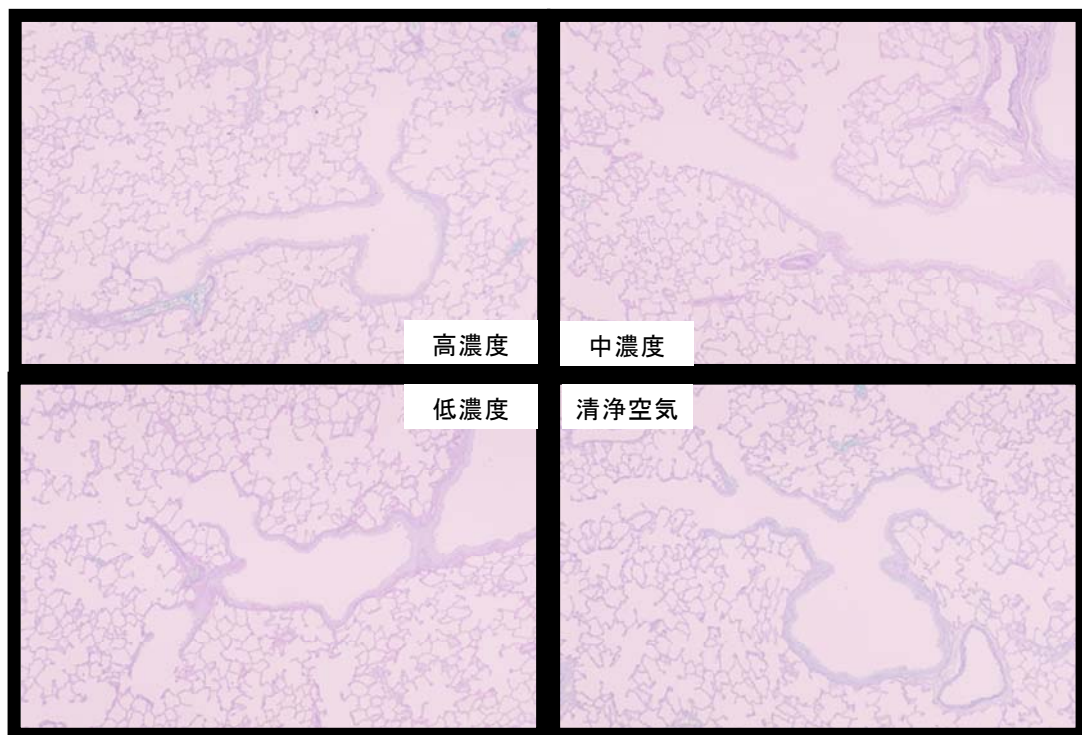


Fig. 3.3.2.44 ラット気道部（対照エンジン）（AB・PAS 染色、撮影倍率：25 倍）

各試験群とも気道の粘液産生に異常は認めない。

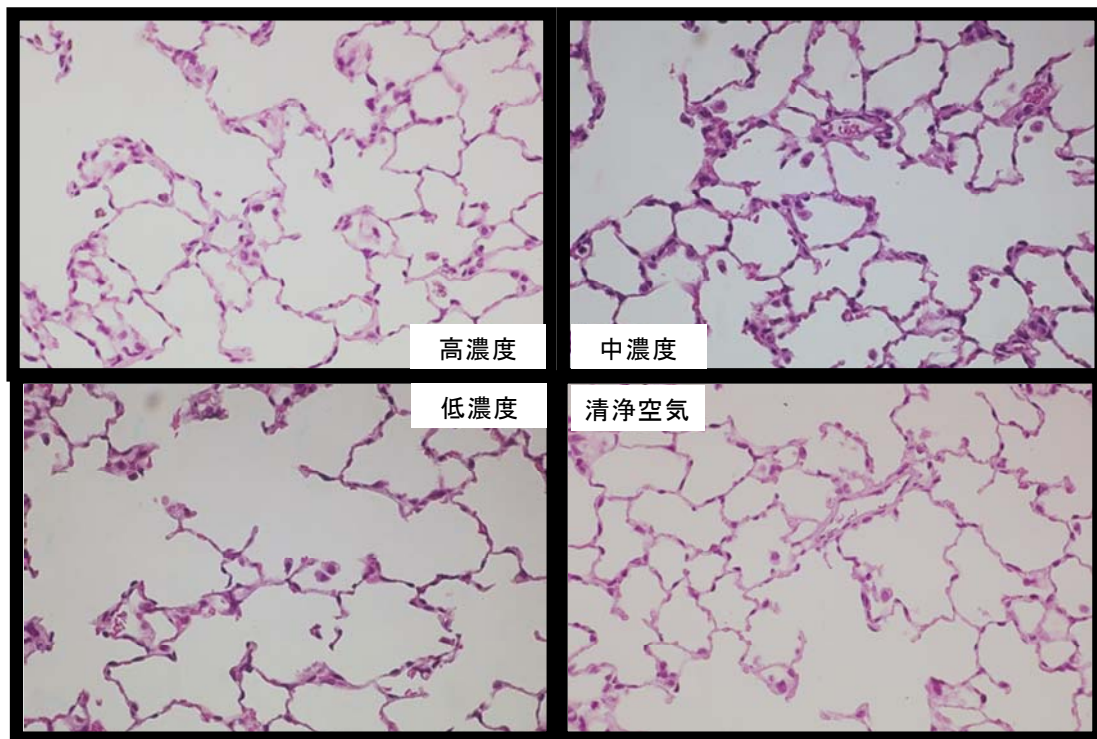


Fig. 3.3.2.45 ラット肺胞部（対照エンジン）（HE染色、撮影倍率：100倍）

表 3.3.2.13 ラット呼吸器の病理学的評価

	肺胞腔：肺胞マクロファージ		肺胞上皮：Ⅱ型上皮
	炭粉貪食	増生	増生
尿素SCRエンジン			
高濃度	—～＋ (5)～(1)	— (6)	—～＋ (3)～(3)
中濃度	— (6)	— (6)	— (6)
低濃度	— (6)	— (6)	— (6)
清浄空気	— (6)	— (6)	— (6)
対照エンジン			
高濃度	+++ (6)	—～＋ (5)～(1)	—～＋ (3)～(3)
中濃度	+～++ (5)～(1)	— (6)	—～＋ (5)～(1)
低濃度	— (6)	— (6)	— (6)
清浄空気	— (6)	— (6)	— (6)

高濃度群ではⅡ型上皮の増生や粒子貪食マクロファージが認められる。中濃度群は高濃度群より軽度であり、低濃度群は清浄空気群と同様である。

(2) 呼吸器系以外の臓器の評価

a) 尿素 SCR エンジン排気

清浄空気群を含む全ての試験群で、一部の個体に肝臓の胆管や小葉間周囲の炎症細胞浸潤 (Fig. 3.3.2.46)、腎臓の皮質に間質の線維化 (Fig. 3.3.2.47)、および心臓の右心室に炎症細胞浸潤が局所的あるいは散在性に軽度に認められた (Fig. 3.3.2.48、表 3.3.2.14)。

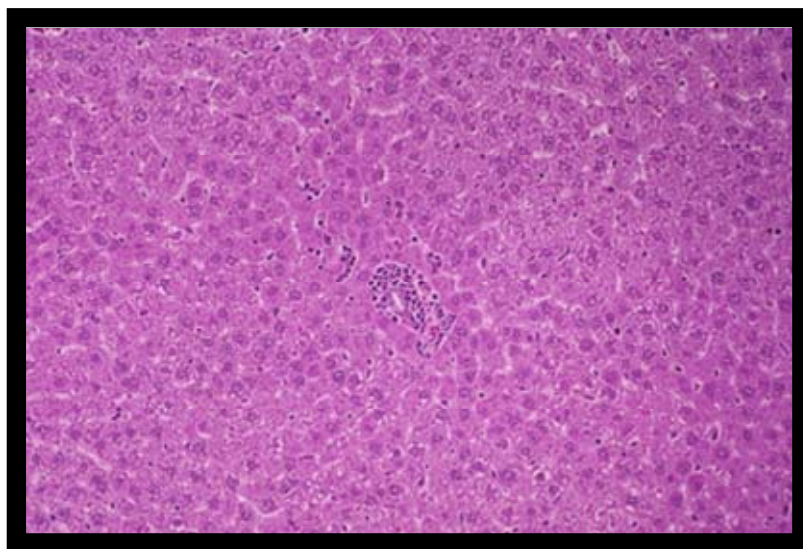


Fig. 3.3.2.46 ラット肝臓 (胆管周囲の炎症細胞浸潤、高濃度群)
(HE 染色、撮影倍率 : 50 倍)

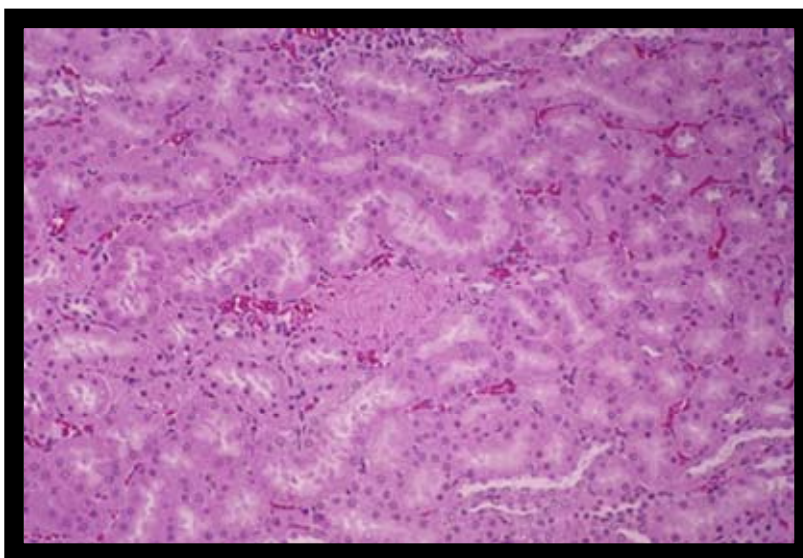


Fig. 3.3.2.47 ラット腎臓 (間質の線維化、清浄空気群)
(HE 染色、撮影倍率 : 50 倍)

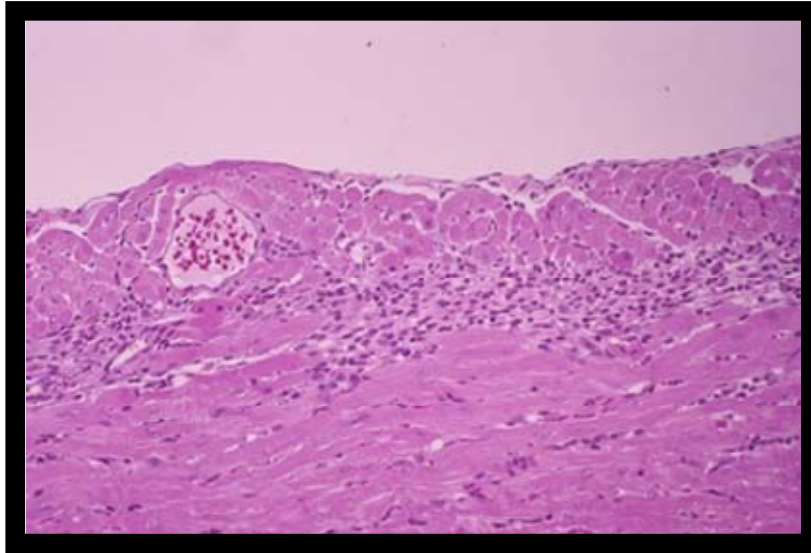


Fig. 3.3.2.48 ラット心臓（右心室の炎症細胞浸潤、高濃度群）
（HE 染色、撮影倍率：50 倍）

b) 対照エンジン排気

清浄空気群を含む全ての試験群で、尿素エンジン排気と同様に、一部の個体に肝臓の胆管や小葉間周囲の炎症細胞浸潤(**Fig. 3.3.2.49**)、腎臓の皮質に間質の線維化(**Fig. 3.3.2.50**)、および心臓の右心室に炎症細胞浸潤が局所的あるいは散在性に軽度に認められた (**Fig. 3.3.2.51**、表 3.3.2.14)。

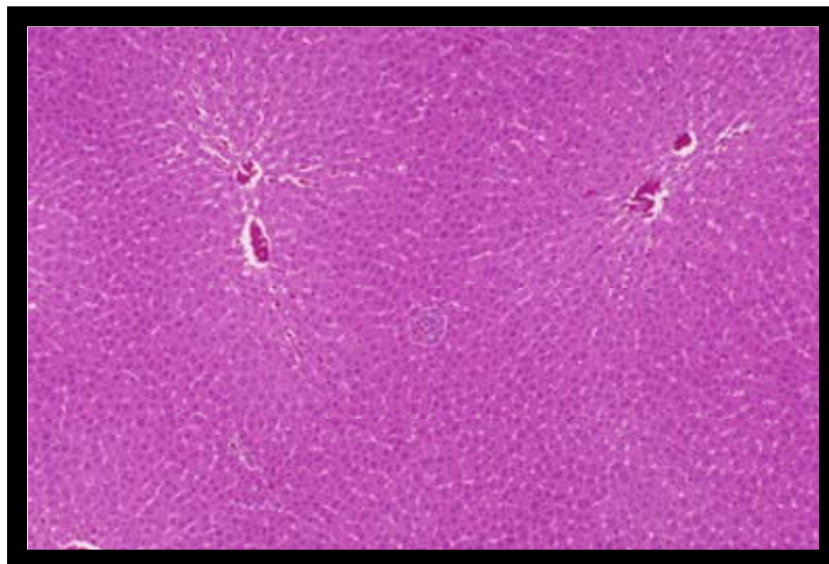


Fig. 3.3.2.49 ラット肝臓（胆管周囲の炎症細胞浸潤、清浄空気群）
（HE 染色、撮影倍率：25 倍）

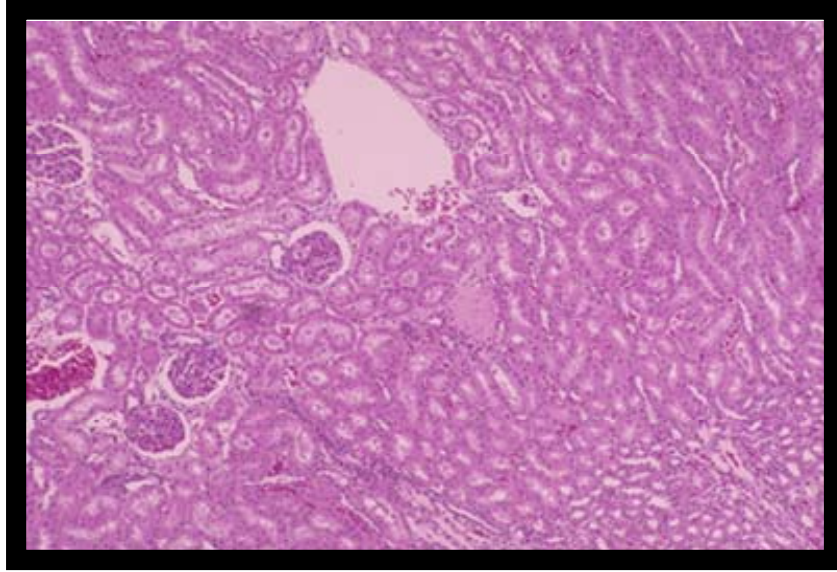


Fig. 3.3.2.50 ラット腎臓（間質の線維化、清浄空気群）
（HE 染色、撮影倍率：25 倍）

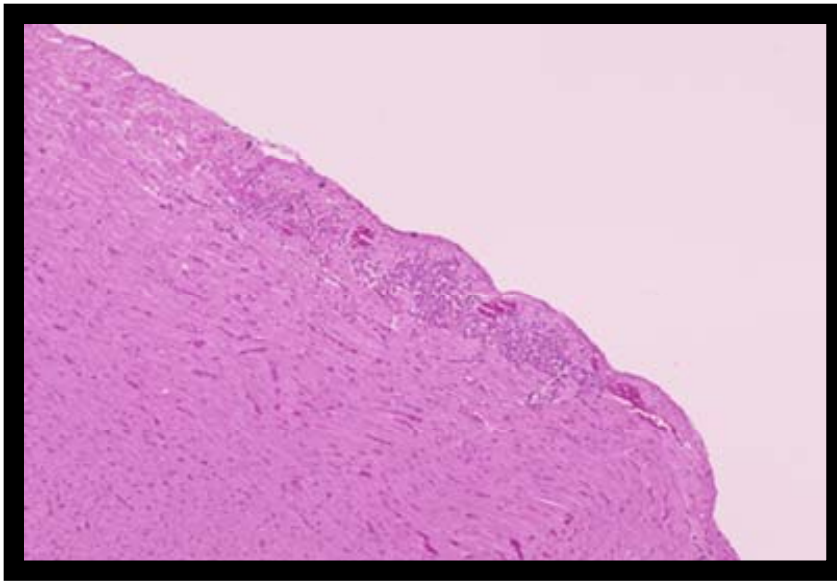


Fig. 3.3.2.51 ラット心臓（右心室の炎症細胞浸潤、低濃度群）
（HE 染色、撮影倍率：25 倍）

表 3.3.2.14 ラットの呼吸器以外の臓器の病理学的評価

	肝 臓	腎 臓	心 臓
	胆管周囲の細胞浸潤	間質の線維化	細胞浸潤
尿素SCRエンジン			
高濃度	0	0	1
中濃度	0	4	0
低濃度	0	2	0
清浄空気	2	2	0
対照エンジン			
高濃度	2	0	0
中濃度	0	4	0
低濃度	0	1	1
清浄空気	1	3	0

(3) 病理解析まとめ

- 清浄空気群を含む両エンジン排気の肺胞構築は正常に保たれており、また、気道部では粘液産生などの炎症性変化も認められなかった。
- 両エンジン排気による呼吸器の影響は、肺胞部での粒子貪食 AM や II 型上皮細胞の増生が認められた。尿素 SCR エンジン排気は、対照エンジン排気よりも影響が軽度であった。
- 両エンジン排気による呼吸器以外の臓器への病理学的影響は認められなかった。

尿素 SCR エンジン排気は、対照エンジン排気より呼吸器の病理学的影響が軽減されることが示唆された。

6) 小括

(1) 尿素 SCR エンジン排気

肺の病理学的影響は軽微であった。また、血液検査では酸化ストレスの影響も軽微であったが、応答機構が作用している可能性が示唆された。遺伝子解析では、リアルタイム PCR 解析により、特に肺で HO-1 や TNF α 遺伝子の発現量が増加したが、心臓や大脳では対照エンジン排気に比べて軽微な変化であった。また、DNA マイクロアレイ解析により、肺での酸化ストレス関連遺伝子の発現変動が見られた。

(2) 対照エンジン排気

病理解析では、7日曝露で肺胞腔にマクロファージの炭粉貪食や肺胞 II 型上皮細胞の軽度な増生が用量依存性に増加した。臓器重量や BALF 中の好中球分画の増加は認められなかったが、リンパ球分画の軽微な増加傾向が認められた。血液検査では、酸化ストレスを示唆するような影響が見られた。遺伝子解析では、肺では 1日曝露で CYP1A1 遺伝子の発現量の増加が見られ、特に心臓と大脳で CYP1A1 や IL-1 β 、TNF α 遺伝子の発現量が増加し

た。

以上から、特に病理学的変化より、尿素 SCR エンジン排気は、対照エンジン排気よりも健康に対する影響が軽度であることが確認できた。また、遺伝子発現に強く影響の見られた臓器が両エンジン排気で異なったことから、両エンジン排気が生体に及ぼす影響に対する作用機序は、若干異なる可能性が示唆された。

3.3.2.3 ラット短期吸入曝露試験（エンジン排気比較系列）

1) 解剖時体重および臓器重量

エンジンシステム排気の比較データでは、生データと各エンジン排気試験での清浄空気群を1とした相対値を示した。なお、臓器重量については、同一希釈系列の結果と同様、ここでも絶対重量のみを示した。

(1) 体重、気管・肺重量、心臓および大脳重量

体重、気管・肺の重量は、成長に伴う増加が認められ、エンジン排気や曝露期間の違いによる影響は認められなかった（**Fig. 3.3.2.52**、**Fig. 3.3.2.53**）。

心臓重量では、エンジン排気や曝露期間の違いによる影響は認められなかった（**Fig. 3.3.2.54**）。

大脳重量では、尿素 SCR エンジン排気の3、7日曝露で、対照エンジン排気と比べて重量の増加を認めたが、相対値では影響がみられなかったため、エンジン排気による違いではなく解剖時の人為的影響によるものと推察された。（**Fig. 3.3.2.55**）。

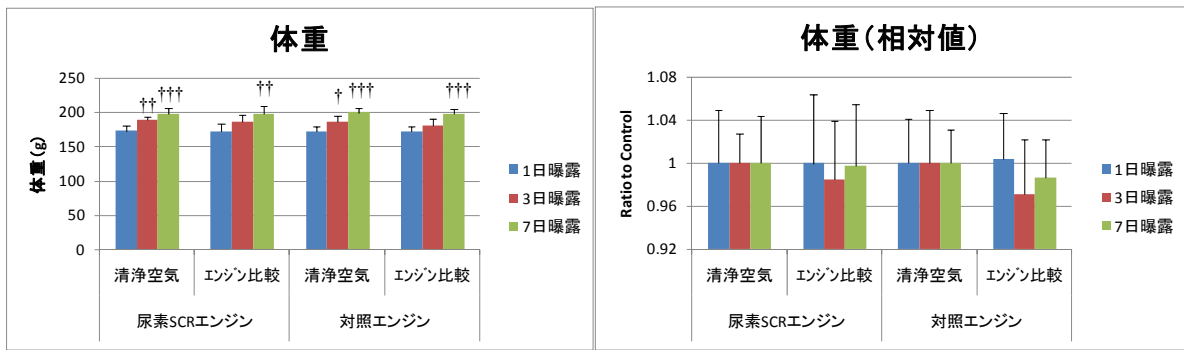


Fig. 3.3.2.52 解剖時のラット体重 (n = 6)

(†: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露)

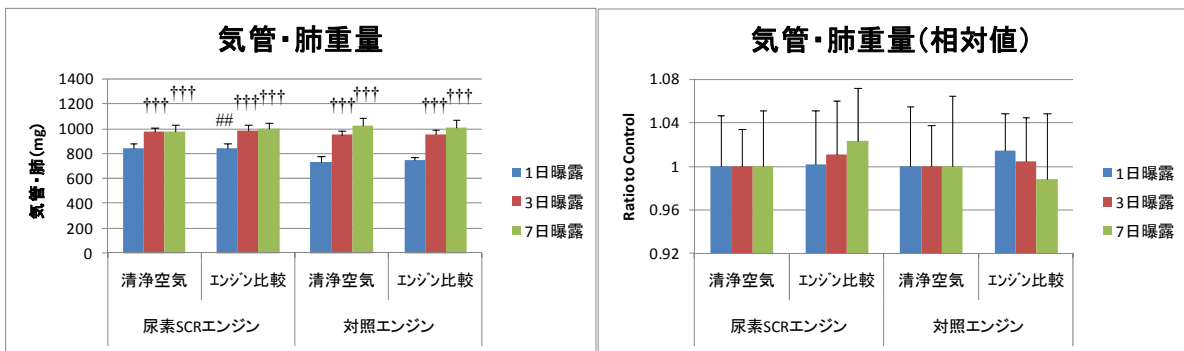


Fig. 3.3.2.53 ラット気管・肺重量 (n = 6)

(†††: P<0.001 vs. 1 日曝露, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

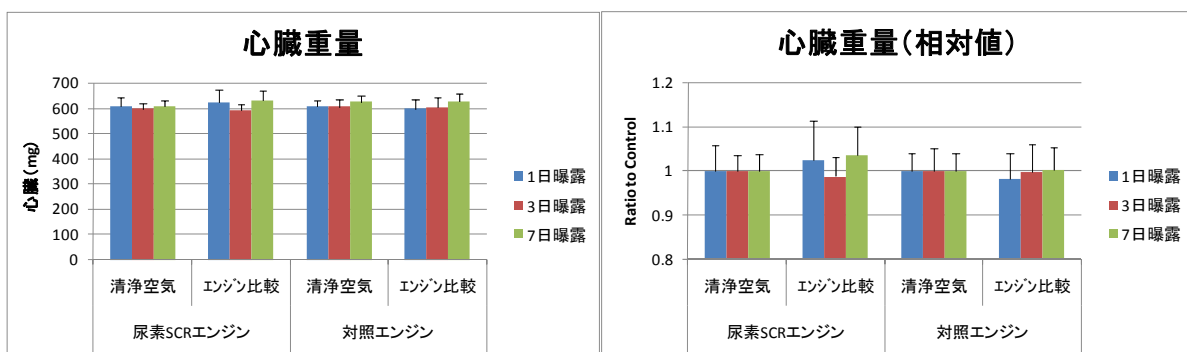


Fig. 3.3.2.54 ラット心臓重量 (n = 6)

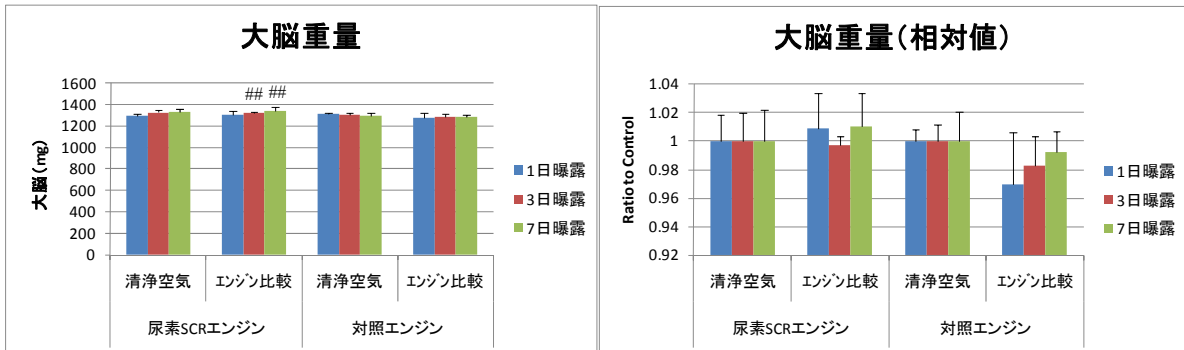


Fig. 3.3.2.55 ラット大脳重量 (n = 6)

(##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

(2) 肝臓重量

肝臓重量では、同一希釈系列 (Fig. 3.3.2.8) とは異なり、曝露による影響は見られなかった。対照エンジン排気では、3日曝露と比べて7日曝露で重量が有意に増加しているが、相対値では有意差が認められなかった。このことから、この影響は成長に伴う重量増加であり、曝露やエンジン排気の影響ではないと推察された (Fig. 3.3.2.56)。

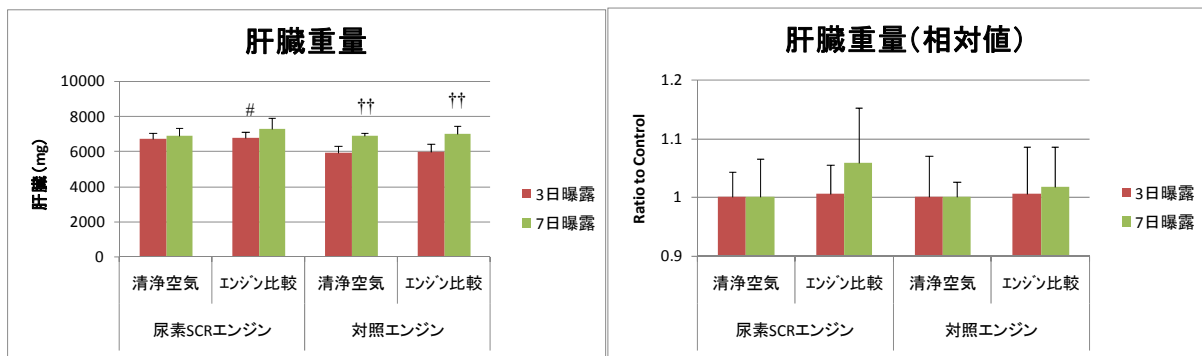


Fig. 3.3.2.56 ラット肝臓重量 (n = 6)

(††: P<0.01 vs. 1日曝露, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

(3) 小脳、腎臓、副腎、胸腺、脾臓および精巣重量

小脳重量では、尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で対照エンジン排気よりも重量が減少した。しかし、相対値では有意差が認められなかったことから、曝露やエンジン排気による影響ではないと推察された (Fig. 3.3.2.57)。

腎臓重量では、尿素 SCR エンジン排気の3日曝露で対照エンジンよりも重量が増加したが、相対値では有意差が認められなかったことから、曝露やエンジン排気による影響ではないと推察された (Fig. 3.3.2.58)。

副腎重量および脾臓重量では、曝露やエンジン排気による影響は認められなかった (Fig.

3.3.2.59、Fig. 3.3.2.60)。

胸腺重量では、重量に有意差は認められなかった。相対値では尿素 SCR エンジン排気の3日曝露で対照エンジン排気よりも有意に増加したが、これは対照エンジン排気の3日曝露で重量が減少傾向であったため、清浄空気群との相対値換算によりその差が明確になったことによると判断された (Fig. 3.3.2.61)。

精巣重量では、成長に伴う増加傾向が見られ、曝露やエンジン排気による影響は認められなかった (Fig. 3.3.2.62)。

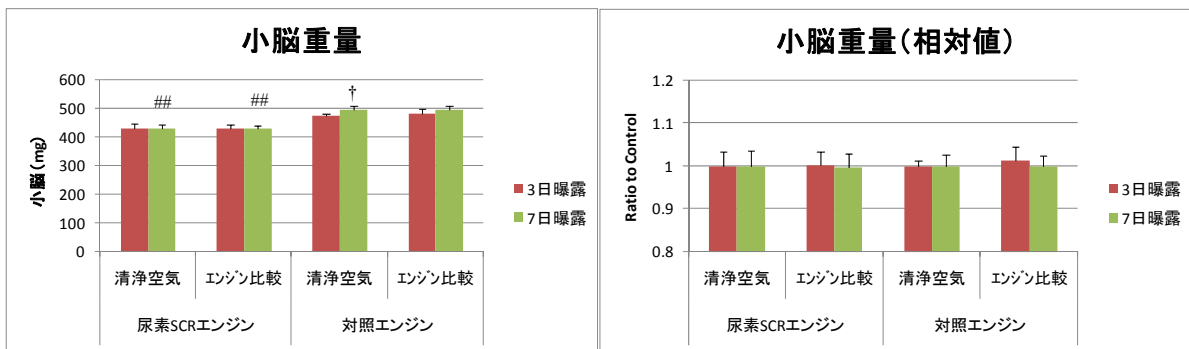


Fig. 3.3.2.57 ラット小脳重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

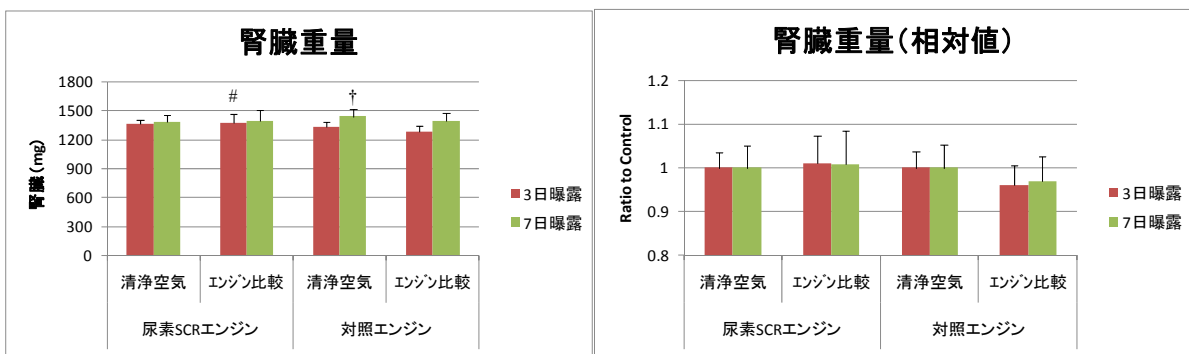


Fig. 3.3.2.58 ラット腎臓重量 (n = 6)

(†: P<0.05 vs. 3日曝露, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

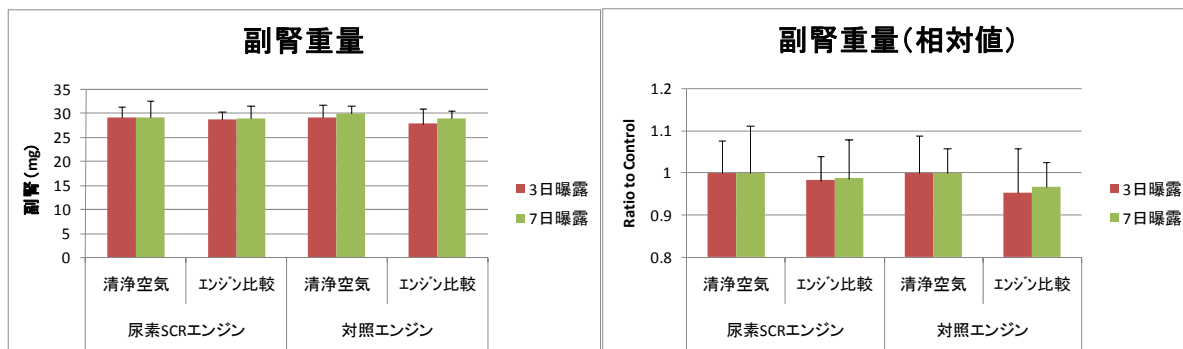


Fig. 3.3.2.59 ラット副腎重量 (n = 6)

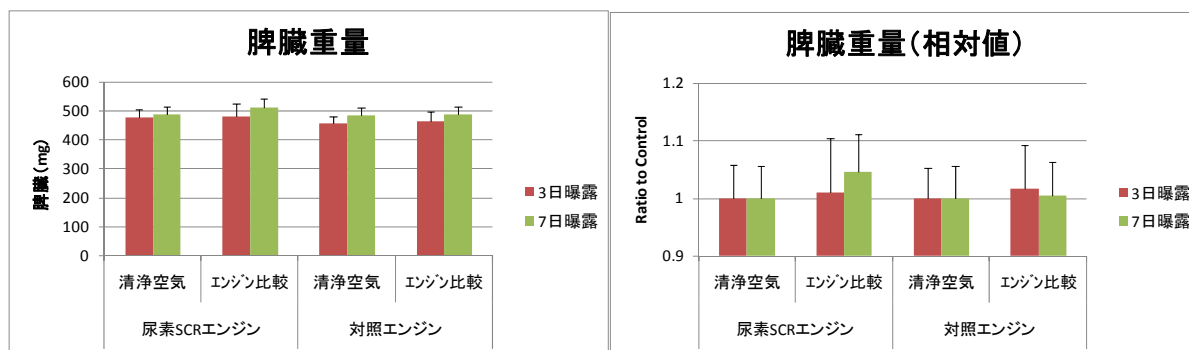


Fig. 3.3.2.60 ラット脾臓重量 (n = 6)

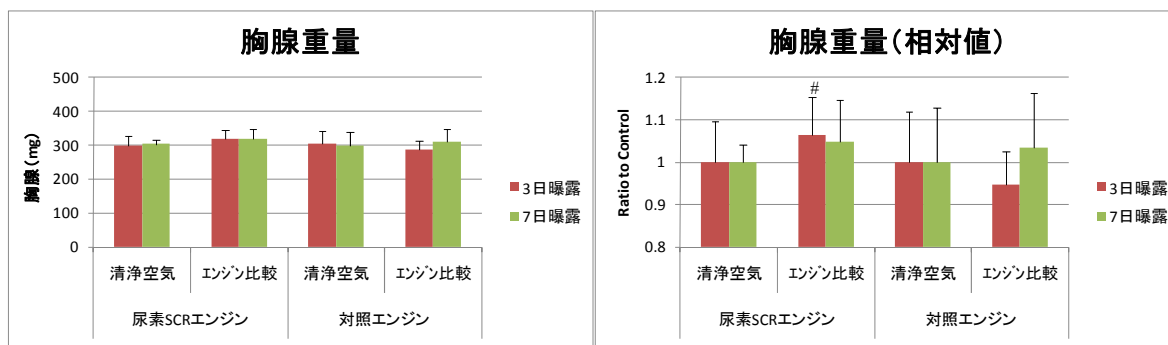


Fig. 3.3.2.61 ラット胸腺重量 (n = 6)

(#: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

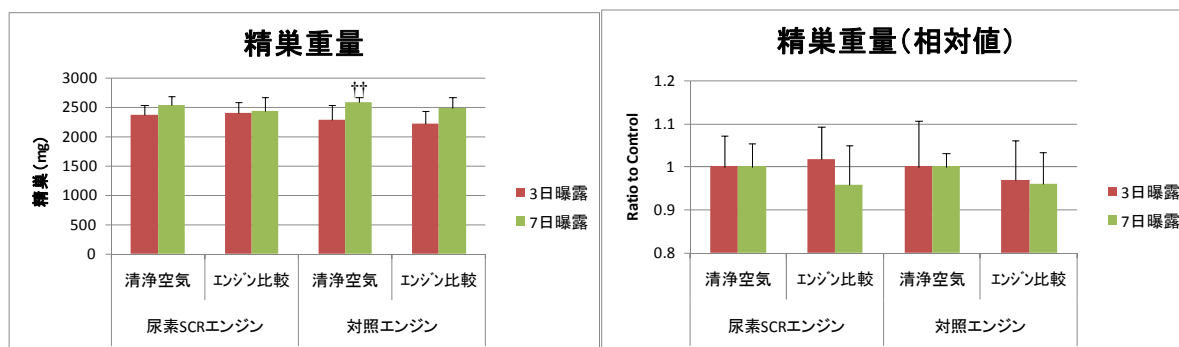


Fig. 3.3.2.62 ラット精巣重量 (n = 6)

(††: P<0.01 vs. 3日曝露)

(4) 解剖時体重および臓器重量のまとめ

- 体重、気管・肺、肝臓、精巣など一部の臓器において成長に伴う重量増加や、一部の臓器において差が認められたが、曝露やエンジン排気による影響とは考えがたく、両エンジン排気とも臓器重量への特異的変化は認めなかった。
- これらは、同一希釈系列で示した体重および臓器重量の結果よりも軽微な変化であった。

2) BALF 中炎症細胞数

BALF の回収率は、前述の表 3.3.2.2 に示したとおりである。

(1) BALF 中総細胞数

Fig. 3.3.2.63 に各試験群の BALF 中の総細胞数を示す。尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で BALF 総細胞数に減少が認められた。相対値では、計測細胞数と同様に尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で有意に減少し、7 日曝露との差が明確になった。

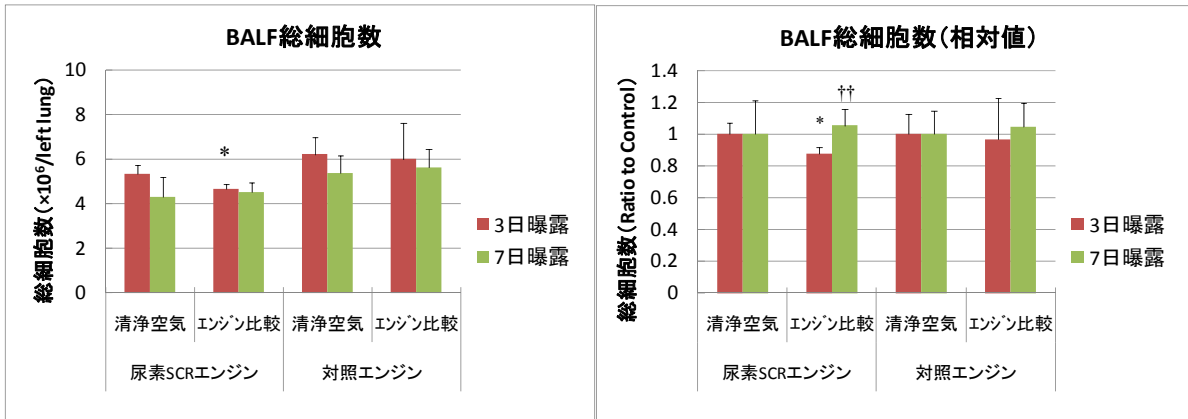


Fig. 3.3.2.63 ラット BALF 中総細胞数 (n = 5~6)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群, ††: P<0.01 vs. 3日曝露)

(2) BALF 中細胞分画

細胞分画の結果は Fig. 3.3.2.16 で示したとおりである。

各細胞分画の変化を Fig. 3.3.2.64~Fig. 3.3.2.67 に示した。

Mφ 分画は、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で清浄空気群よりも有意に減少した。

好中球分画および好酸球分画は、どの試験群でも出現率がわずかであり、曝露やエンジン排気による影響はほとんど認められなかった。なお、好中球分画の相対値のグラフでは、3 日曝露の清浄空気群が 0%であったため、7 日曝露データのみを記載している。

リンパ球分画は、曝露やエンジン排気による影響が認められなかった。

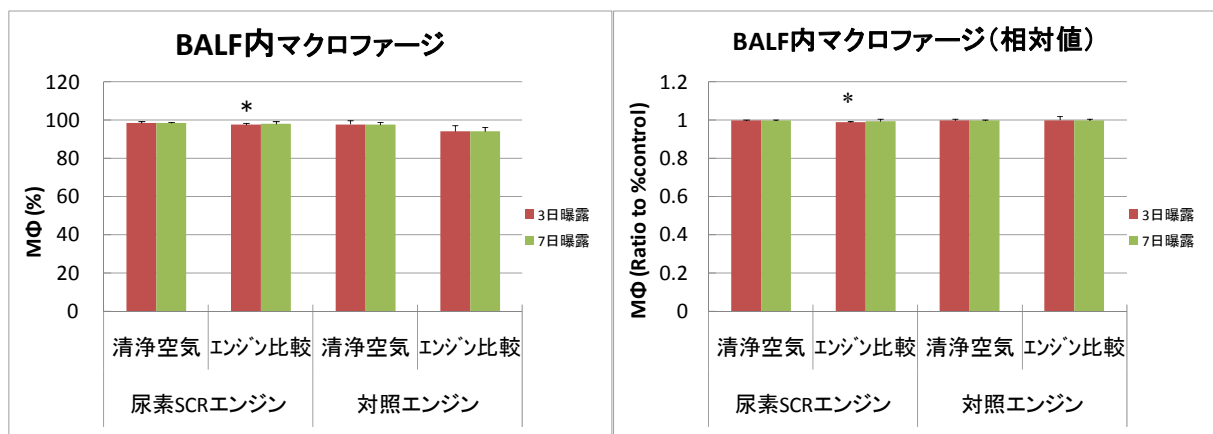


Fig. 3.3.2.64 BALF の Mφ 分画 (%) (n = 5~6)

(*: P<0.05 vs.清浄空気群)

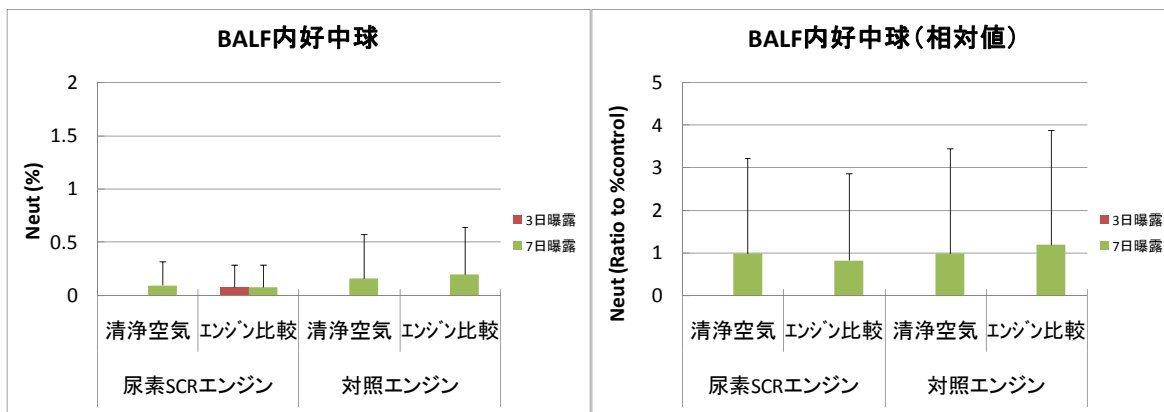


Fig. 3.3.2.65 BALF の好中球分画 (%) (n = 5~6)

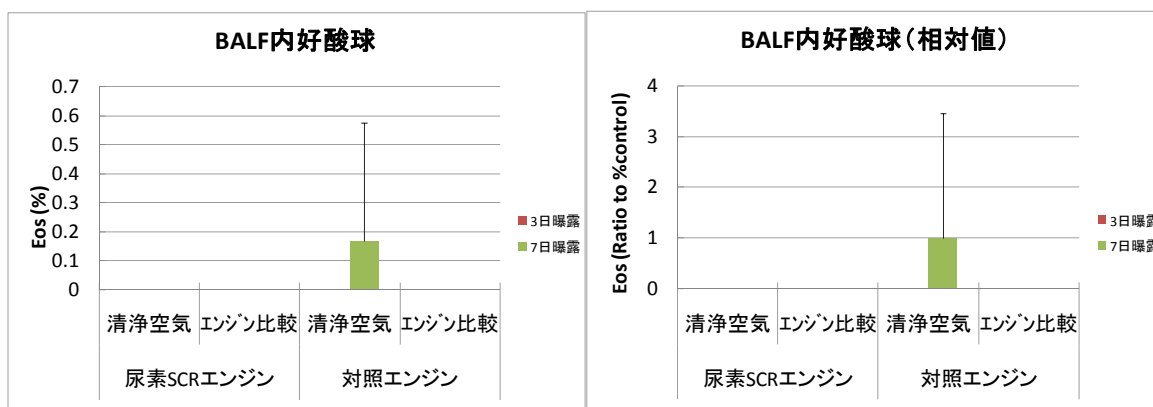


Fig. 3.3.2.66 BALF の好酸球分画 (%) (n = 5~6)

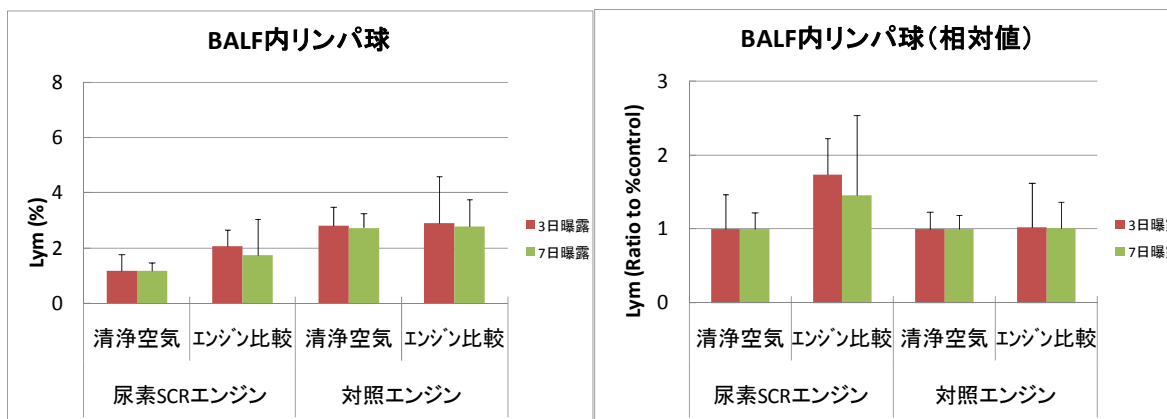


Fig. 3.3.2.67 BALF のリンパ球分画 (%) (n = 5~6)

(3) BALF 中炎症細胞数のまとめ

- 総細胞数は、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で減少が認められた。
- 尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で Mφ 分画は有意に減少したが、軽微な変化であったことから、曝露やエンジン排気による影響とはいえない。
- BALF 中の好中球分画、好酸球分画およびリンパ球分画では、影響はみられなかった。

3) 血液検査

(1) 血液生化学検査

結果の一覧を表 3.3.2.15 に示す。

K は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で、1 日曝露に比べて上昇傾向が認められた (Fig. 3.3.2.68)。

BUN は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で対照エンジン排気に比べて有意に上昇した (Fig. 3.3.2.69)。また、1 日曝露で清浄空気群と比べて有意に減少した。対照エンジン排気では特に影響は認められなかった。

エンジン排気中の尿素濃度は、尿素 SCR エンジン排気のエンジン比較群で $0.52 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、清浄空気群で $0.47 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、対照エンジン排気のエンジン比較群で $0.55 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、清浄空気群で $0.49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であったことから、同一希釈系列の結果と同様に、BUN の変化はエンジン排気中の尿素濃度に依存したものではないと考えられる。

Glu では、両エンジン排気の清浄空気群で曝露期間依存性に上昇が認められた (Fig. 3.3.2.70)。また、対照エンジン排気のエンジン比較群でも同様の傾向が認められた。

表 3.3.2.15 iSTAT によるラット血液生化学検査

1日曝露	尿素SCRエンジン				対照エンジン			
	n	清浄空気	n	エンジン比較	n	清浄空気	n	エンジン比較
pH	6	7.342	6	7.360	6	7.385	6	7.360
pCO ₂ (mmHg)	6	53.38	6	52.52	6	48.82	6	51.50
pO ₂ (mmHg)	6	14.3	6	12.3	6	15.0	6	11.0
BEecf (mmol/L)	6	3.0	6	4.2 *	6	4.0	6	3.7
HCO ₃ (mmol/L)	6	28.85	6	29.58 *	6	29.10	6	29.05
TCO ₂ (mmol/L)	6	30.7	6	31.2	6	30.5	6	30.7
sO ₂ (%)	6	16.7	6	13.5	6	19.3	6	10.8
Hct (%PCV)	6	41.7	6	41.3	6	42.0	6	41.8
Hb (g/dL)	6	14.2	6	14.1	6	14.3	6	14.2
Na (mmol/L)	6	140.2	6	140.3 ##	6	138.2	6	137.7
K (mmol/L)	6	3.4	6	3.4 ##	6	3.8	6	3.9
Cl (mmol/L)	6	103.3	6	102.5	5	103.2	6	103.0
iCa (mmol/L)	6	1.388	6	1.388	6	1.383	6	1.398
BUN (mg/dL)	6	13.3	6	11.2 *	5	11.8	6	11.0
Glu (mg/dL)	6	154.8	6	171.3	5	158.4	6	169.0
3日曝露	n	清浄空気	n	エンジン比較	n	清浄空気	n	エンジン比較
pH	4	7.391 †††	1	7.413	3	7.380	4	7.384
pCO ₂ (mmHg)	4	50.9	1	51.10	3	48.5	4	48.63
pO ₂ (mmHg)	4	14.5	1	15.0	3	15.0	4	19.0 †
BEecf (mmol/L)	4	6.0 ††	1	8.0 ††	3	3.7	4	4.0
HCO ₃ (mmol/L)	4	30.9 †	1	32.60 †	3	28.7	4	29.03
TCO ₂ (mmol/L)	4	32.5 †	1	34.0 †	3	30.0	4	30.5
sO ₂ (%)	4	19.5	1	19.0	3	19.7	4	28.8 †
Hct (%PCV)	6	43.3	5	43.4	4	45.3 †††	5	45.0 †
Hb (g/dL)	6	14.7333	5	14.8	4	15.4 †††	5	15.3 †
Na (mmol/L)	6	138.7 †	5	138.4 †	4	141.3 †††	5	139.8 *
K (mmol/L)	6	4.07 †††	5	4.08 †††	4	4.05	5	4.10
Cl (mmol/L)	6	101.8 †	5	102.4	4	102.8	5	103.2
iCa (mmol/L)	4	1.41	1	1.40	3	1.40	4	1.41
BUN (mg/dL)	6	13.7	5	14.0 ††.#	4	12.3	5	12.4
Glu (mg/dL)	6	180.8 ††	5	186.6 #	4	167.0	5	181.2 *
7日曝露	n	清浄空気	n	エンジン比較	n	清浄空気	n	エンジン比較
pH	6	7.398 †††	6	7.393	3	7.320	3	7.390
pCO ₂ (mmHg)	6	49.9 †	6	52.15 #	3	62.4 †	3	48.90
pO ₂ (mmHg)	6	17.7	6	14.7	2	12.0	3	13.3
BEecf (mmol/L)	6	5.8 ††	6	6.8 †††	3	5.7	3	4.7
HCO ₃ (mmol/L)	6	30.7 ††	6	31.73 ††	3	31.9 ††	3	29.67
TCO ₂ (mmol/L)	6	32.2 †	6	33.3 ††	3	33.7 ††	3	31.0
sO ₂ (%)	6	26.2	6	18.2	2	13.5	3	16.3
Hct (%PCV)	6	44.2 ††	5	43.4	4	44.5 ††	6	44.8 †
Hb (g/dL)	6	15 ††	5	14.8	4	15.125 ††	6	15.3
Na (mmol/L)	6	139.8	5	138.4	4	140.0 †	6	139.7
K (mmol/L)	6	3.95 †††	5	4.18 †††	4	4.08	6	3.88
Cl (mmol/L)	6	102.7	5	102.4	4	101.8	6	101.8 †
iCa (mmol/L)	6	1.35 †	6	1.37	3	1.40	3	1.38
BUN (mg/dL)	6	13.2	5	15.2 †††.#	4	12.8	6	12.8 †
Glu (mg/dL)	6	189.2 ††	5	184.4 #	4	185.0 ††	6	188.2 †

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01, ###: P<0.001 vs. 対照エンジン排気

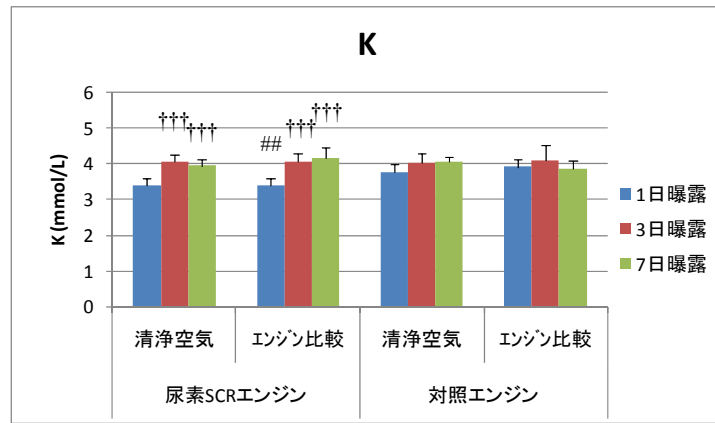


Fig. 3.3.2.68 ラット血液 K (n = 4~6)

(†††: P<0.001 vs. 1 日曝露, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

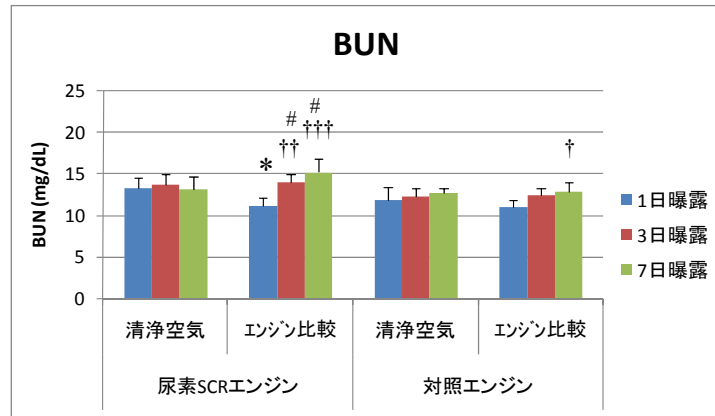


Fig. 3.3.2.69 ラット血液 BUN (n = 4~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露, #: P<0.05 vs. 対照エン

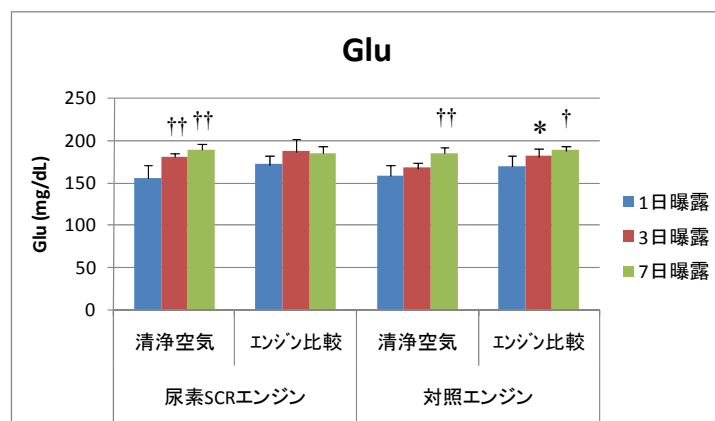


Fig. 3.3.2.70 ラット血液 Glu (n = 4~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露)

(2) 酸化ストレス能検査

酸化ストレス損傷マーカーである 8-OHdG と抗酸化能を示す PAO を **Fig. 3.3.2.71** に、さらに曝露期間ごとにまとめ直したものを **Fig. 3.3.2.71-2** に示した。

8-OHdG は、両エンジン排気とも清浄空気群よりも低値を示しているため、酸化ストレスによる影響を受けていないことが示唆された。また、PAO は対照エンジン排気の 7 日曝露で有意に減少したが、酸化ストレス応答を示唆するまでには至らなかった。

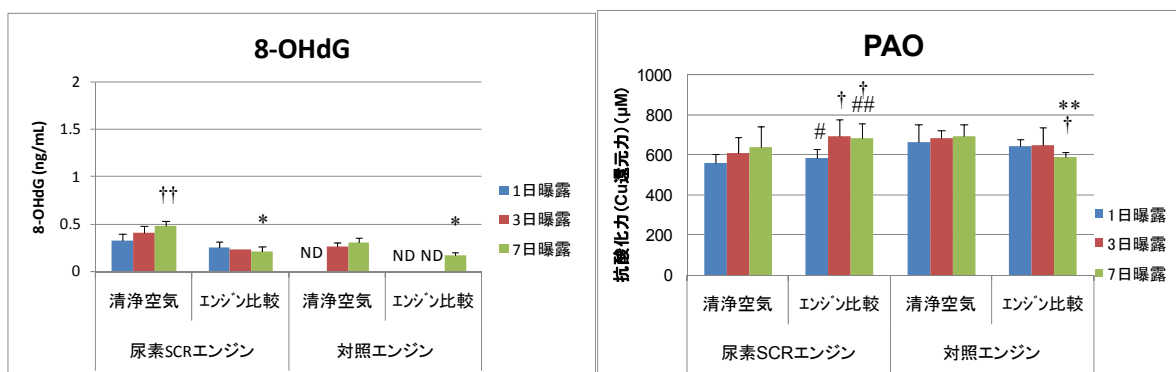


Fig. 3.3.2.71 酸化ストレス応答 (n = 2~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

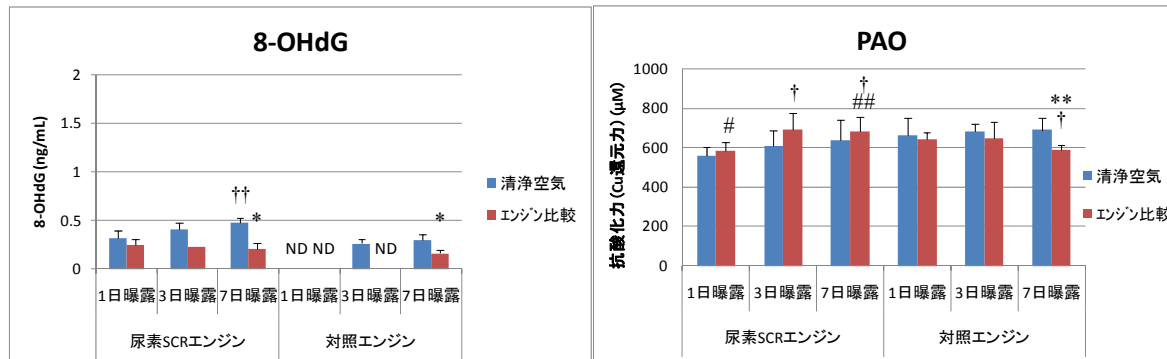


Fig. 3.3.2.71-2 酸化ストレス応答 (曝露期間ごと) (**Fig. 3.3.2.71** を改変) (n = 2~6)

(ND: Not Detected, *: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, †: P<0.05, ††: P<0.01 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

(3) 血液検査のまとめ

- 生化学検査では、尿素 SCR エンジン排気で BUN が上昇した。
- 酸化ストレスへの影響では、活性酸素による損傷が認められないことが推測された。なお、この反応は同一希釈系列の結果よりも軽微であった。

4) 遺伝子解析

(1) リアルタイム PCR 解析

a) 肺の遺伝子発現量

肺の遺伝子発現量を **Fig. 3.3.2.72** に示した。なお、**Fig. 3.3.2.72-2** は、**Fig. 3.3.2.72** を曝露期間でまとめ直した。

CYP1A1 遺伝子は、両エンジン排気とも発現量に影響はみられなかった。

HO-1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露により発現量が増加したが、これは対照エンジン排気と比べても増加していた。

IL-1 β 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で対照エンジン排気よりも発現量が増加した。

TNF α 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で、対照エンジン排気の 1 日曝露で、それぞれ清浄空気群よりも発現量が増加した。

肺における遺伝子発現量は、CYP1A1 遺伝子を除いて、尿素 SCR エンジン排気で発現量が増加する傾向が認められた。

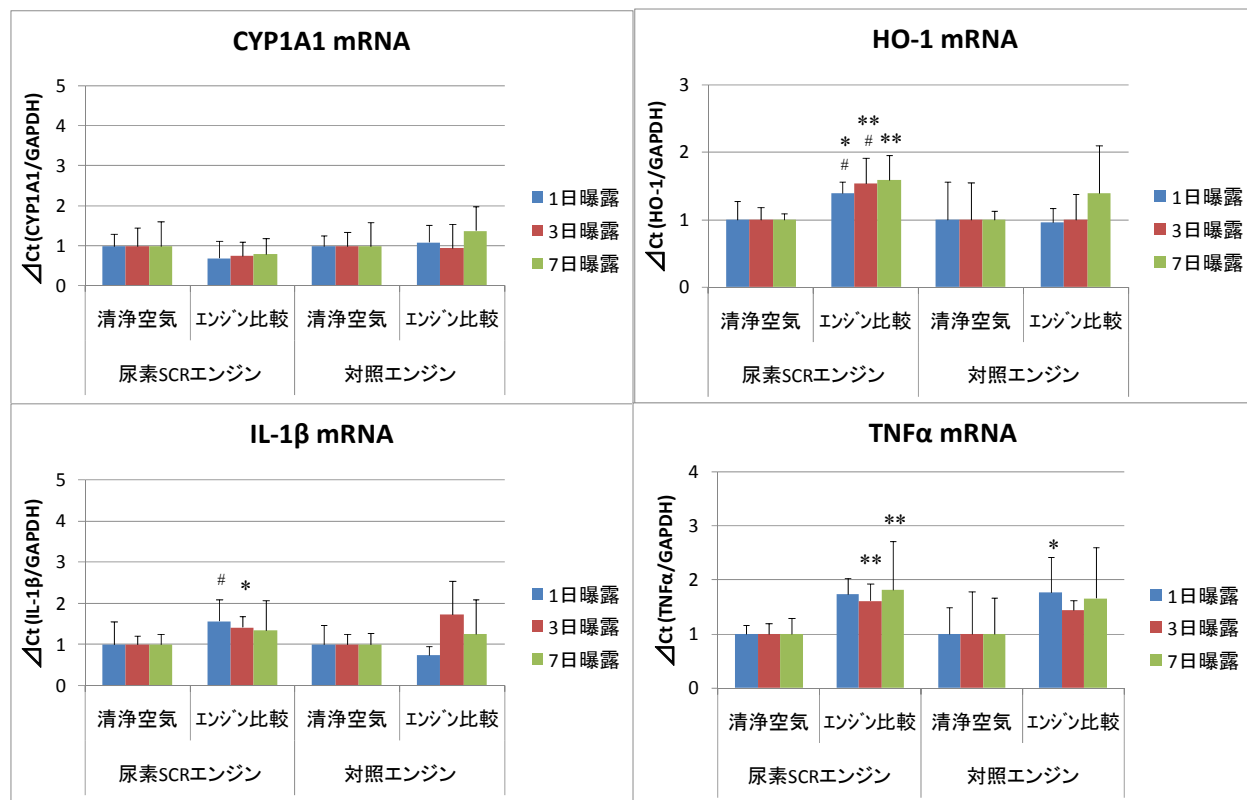


Fig. 3.3.2.72 肺の遺伝子発現量 (n = 6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

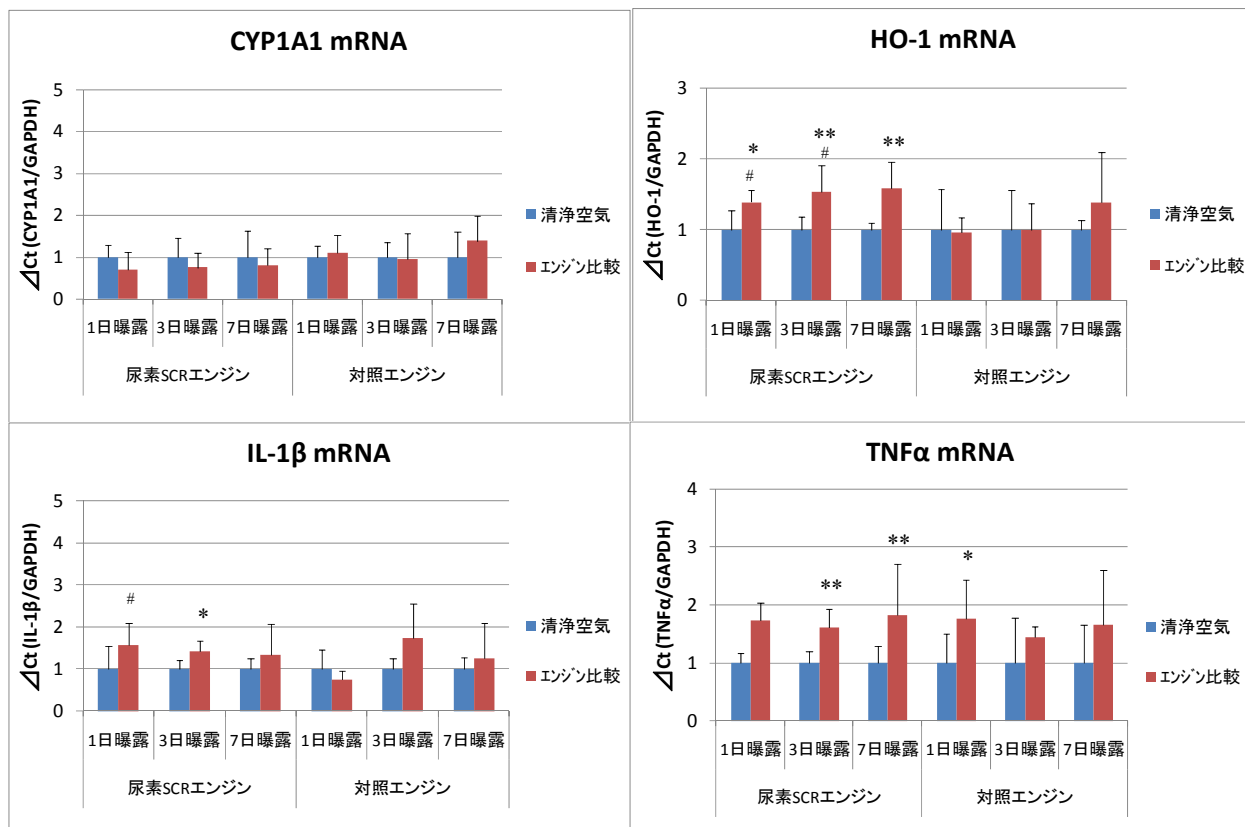


Fig. 3.3.2.72-2 肺の遺伝子発現量（曝露期間ごと）（**Fig. 3.3.2.72** を改変）（n = 6）

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs. 清浄空気群, #: P<0.05 vs. 対照エンジン排気)

b) 心臓の遺伝子発現量

心臓の遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.73 に示した。なお、Fig. 3.3.2.73-2 は、Fig. 3.3.2.73 を曝露期間でまとめ直した。

CYP1A1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 3、7 日曝露で、対照エンジン排気に比べて発現量が低下した。対照エンジン排気の 1 日曝露では、清浄空気群よりも発現量が増加した。

HO-1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で発現量が減少した。対照エンジン排気の 7 日曝露で発現量が増加した。

IL-1 β 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で清浄空気群および対照エンジン排気のエンジン比較群と比べて発現量が増加した。

TNF α 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気では発現量への影響が認められなかったが、対照エンジン排気の 3、7 日曝露で発現量の増加傾向が認められた。

心臓における遺伝子発現量は、尿素 SCR エンジン排気は IL-1 β 遺伝子が 1 日曝露で有意に増加したものの、特に影響はほとんど認められなかった。しかし、対照エンジン排気では、曝露後半で発現量の増加傾向が認められた。

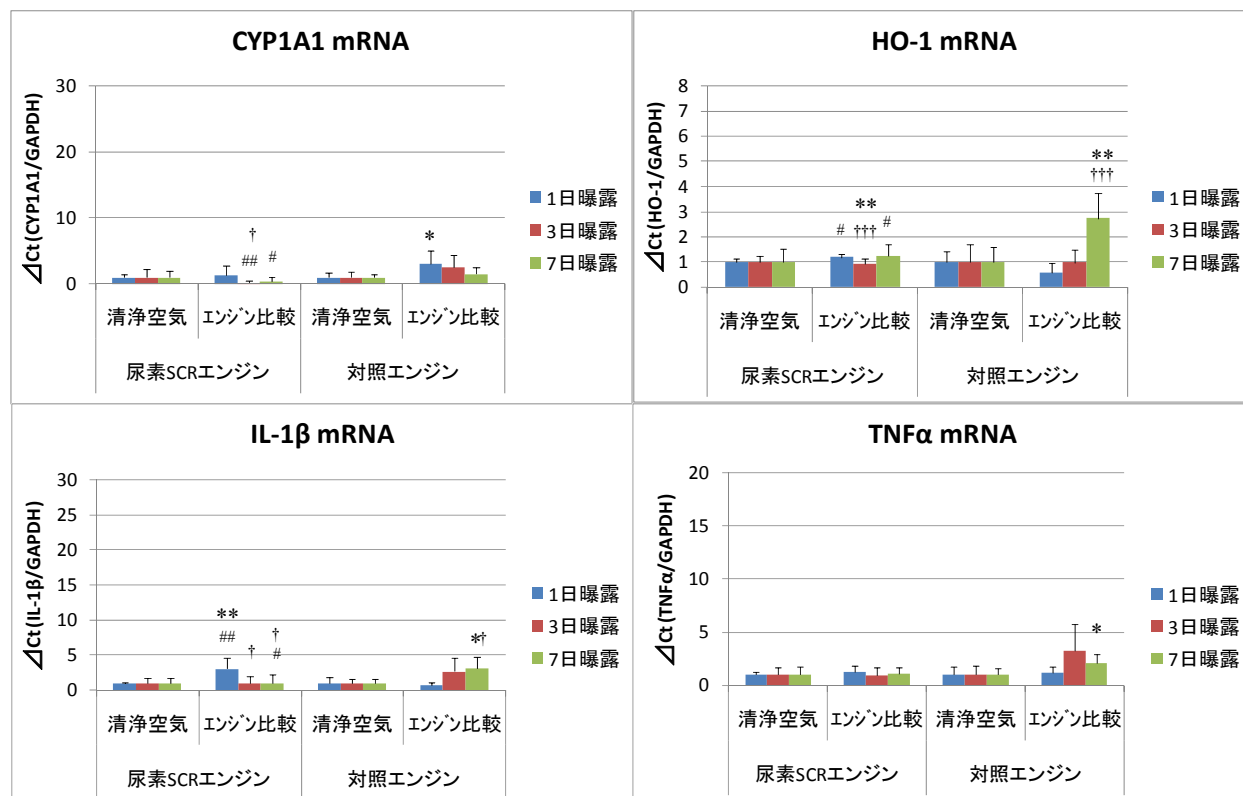


Fig. 3.3.2.73 心臓の遺伝子発現量 (n = 5~6)

(*: P<0.05, **: P<0.01 vs.清浄空気群, †: P<0.05, †††: P<0.001 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

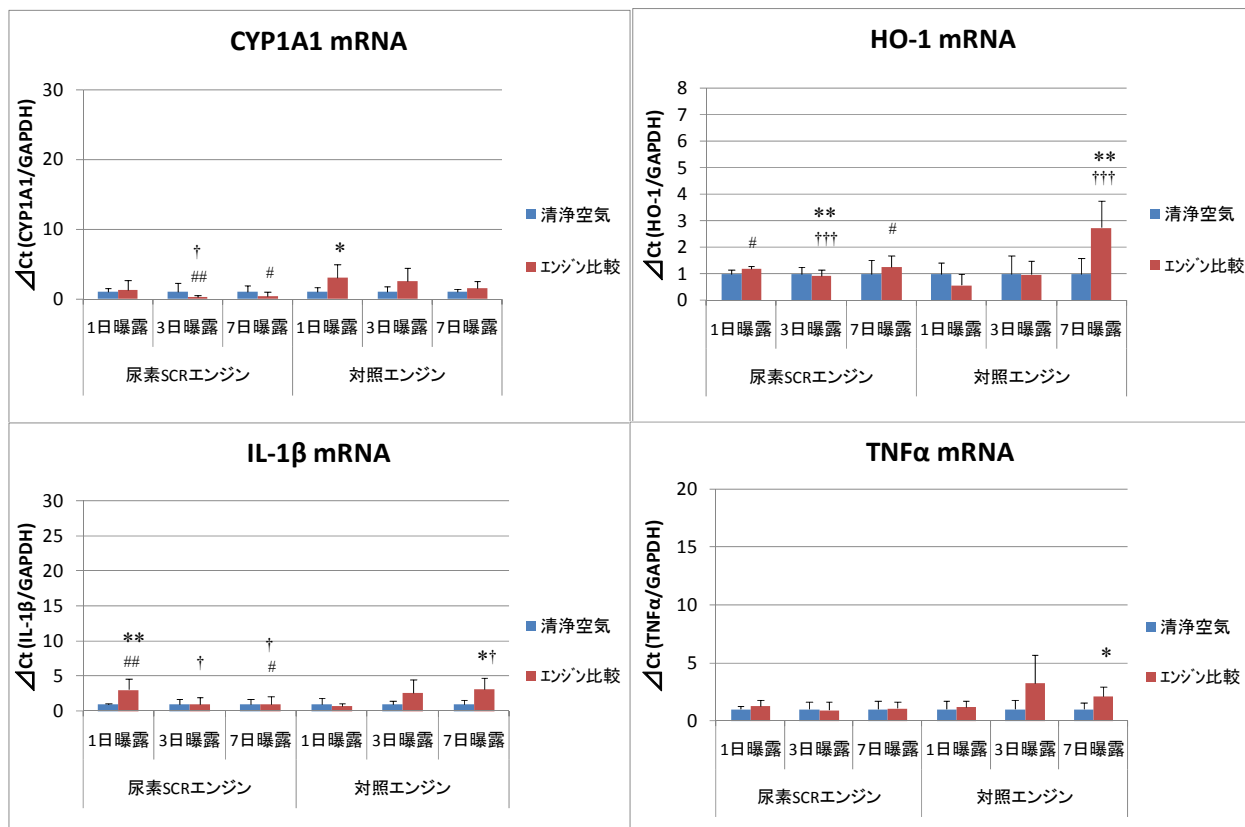


Fig. 3.3.2.73-2 心臓の遺伝子発現量（曝露期間ごと）

（Fig. 3.3.2.73 を改変）（n = 5～6）

（*： P<0.05, **： P<0.01 vs. 清浄空気群, †： P<0.05, †††： P<0.001 vs. 1日曝露, #： P<0.05, ##： P<0.01 vs. 対照エンジン排気）

c) 大脳遺伝子発現量

大脳遺伝子発現量を Fig. 3.3.2.74 に示した。なお、Fig. 3.3.2.74-2 に、Fig. 3.3.2.74 を曝露期間でまとめ直した。

CYP1A1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気の 1 日曝露で、清浄空気群と比べて発現量が低下した。また、対照エンジン排気の 1 日曝露では、清浄空気群よりも発現量が増加傾向にあった。

HO-1 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露による影響は認められなかった。対照エンジン排気の 7 日曝露では発現量が減少した。

IL-1 β 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露による影響は認められなかった。対照エンジン排気の 1 日曝露では発現量が増加した。

TNF α 遺伝子は、尿素 SCR エンジン排気で曝露による影響は認められなかった。対照エンジン排気の 1 日曝露では発現量が増加した。

大脳遺伝子発現量は、尿素 SCR エンジン排気で影響があまり認められなかったが、対照エンジン排気では 1 日曝露では発現量の増加傾向が認められた。

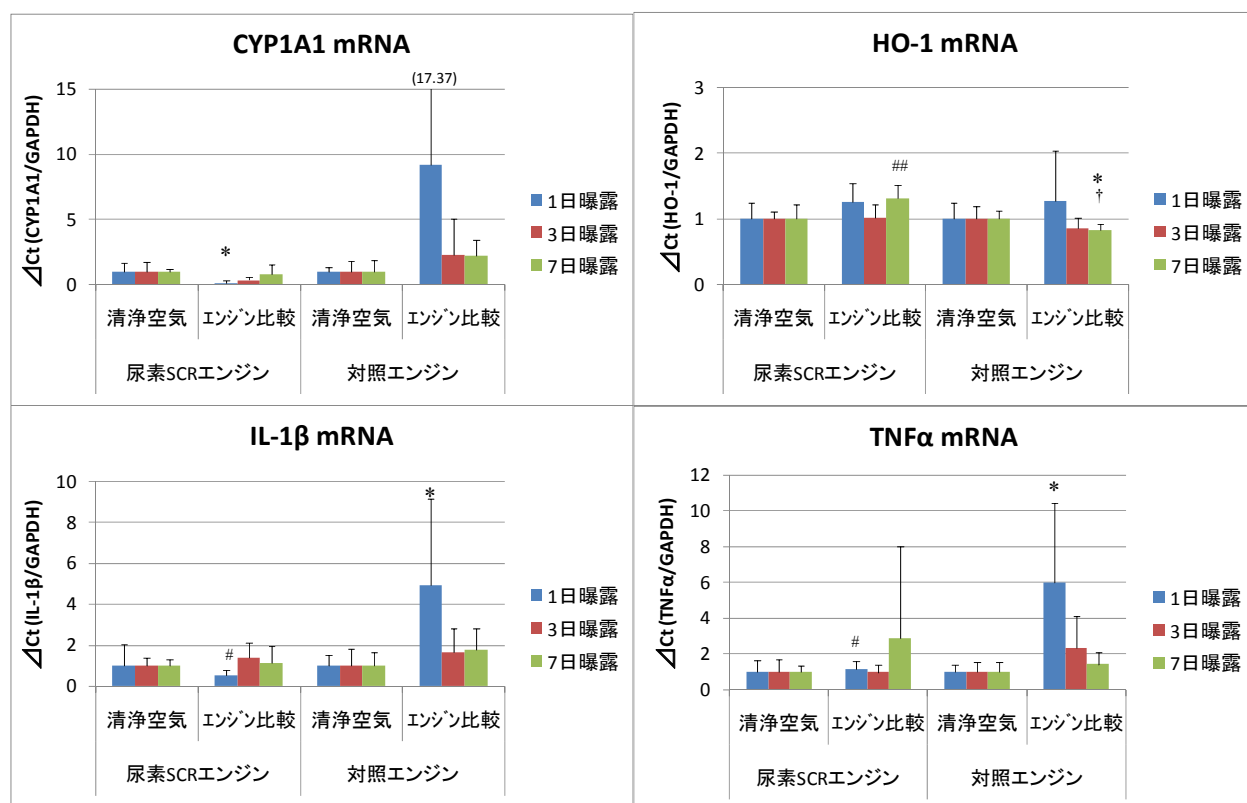


Fig. 3.3.2.74 大脳遺伝子発現量 (n = 3~6)

(*: P<0.05 vs. 清浄空気群, †: P<0.05 vs. 1 日曝露, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs. 対照エンジン排気)

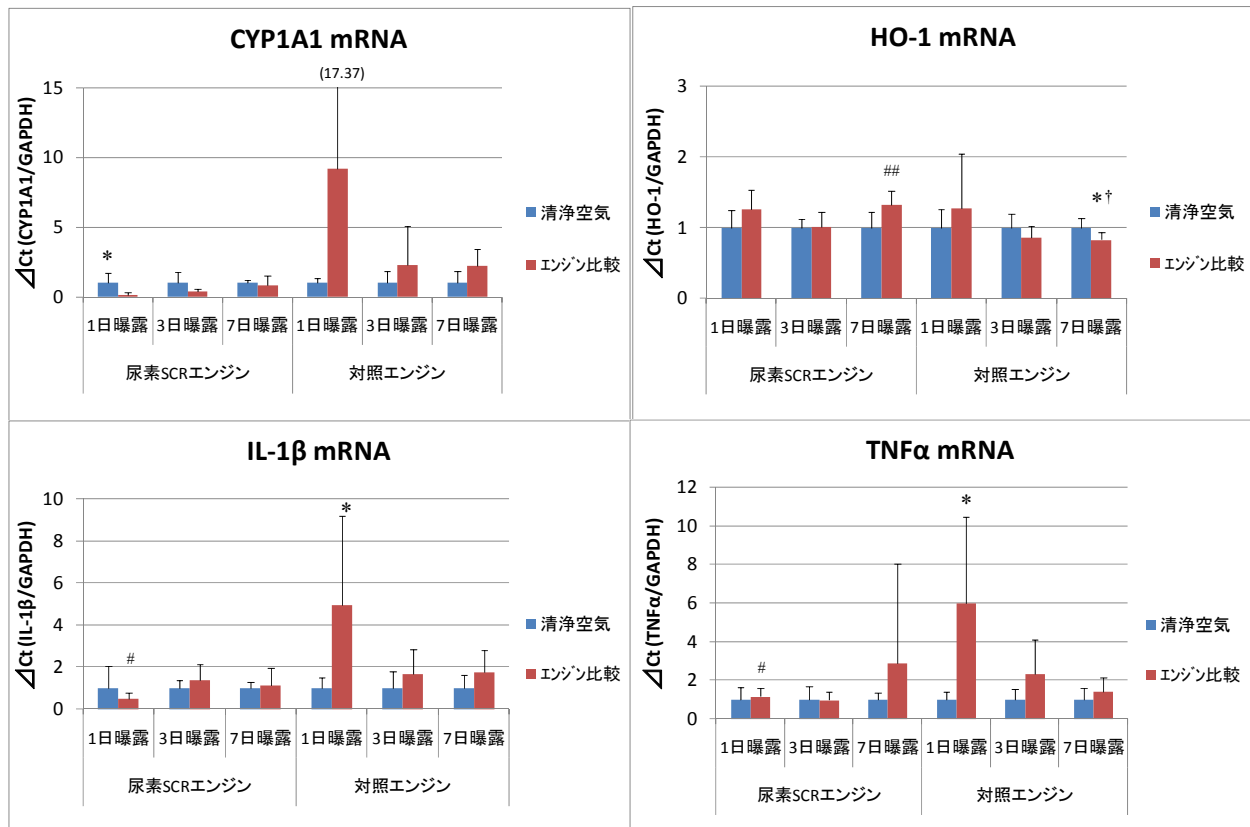


Fig. 3.3.2.74-2 大脳の遺伝子発現量（曝露期間ごと）

（Fig. 3.3.2.74 を改変）（n = 3～6）

（*：P<0.05 vs. 清浄空気群，†：P<0.05 vs. 1日曝露，#：P<0.05，##：P<0.01 vs. 対照エンジン排気）

d) リアルタイム PCR 解析まとめ

- 肺では、尿素 SCR エンジン排気で HO-1、IL-1β および TNFα 遺伝子の発現量が増加していたため、酸化ストレスや炎症に影響を与えていることが示唆された。
- 心臓では、尿素 SCR エンジン排気は特に影響がほとんど認められず、対照エンジン排気では、特に検討した全ての遺伝子の発現が増加傾向を示した。これらは、対照エンジン排気中の PM 濃度による影響である可能性が示唆された。
- 大脳では、尿素 SCR エンジン排気は特に影響がほとんど認められず、対照エンジン排気の 1 日曝露で CYP1A1、IL-1β および TNFα 遺伝子の発現量が増加していたため、PAH による反応や炎症に影響を与えていることが示唆された。
- CYP1A1 遺伝子は、対照エンジン排気で発現が増加する傾向があり、心臓および脳に共通していた。ただし、これらの影響は、同一希釈系列の結果よりも軽微なものであった。

同一希釈系列の結果と同様に、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓、大脳に影響を及ぼす傾向が示唆された。

（2）DNA マイクロアレイ解析

尿素 SCR エンジン排気での各臓器の遺伝子発現量の結果を表 3.3.2.16 に示した。なお、この発現量は、対照エンジン排気での各臓器の遺伝子発現量で標準化させたものである。全体の変動幅を示す SD 値は 3 臓器中、大脳が最も高く 0.59 であり、肺では 0.51、心臓は 0.49 であった。

また、2 倍以上あるいは 0.5 倍以下の発現変動がみられた遺伝子数は、SD 値の大きかった大脳で最も多く、一番小さかったのは心臓であり、SD 値の大きさと同じ順であった。

表 3.3.2.16 各臓器における発現量のばらつき (SD) と発現変動した数

曝露群	検討エンジン排気群 ／標準エンジン排気群	曝露期間	肺			心臓			大脳		
			SD	≥2.0	≤0.5	SD	≥2.0	≤0.5	SD	≥2.0	≤0.5
エンジン比較群	尿素SCRエンジン／対照エンジン	7日	0.51	1583	583	0.49	1429	337	0.59	1964	810

a) Gene Ontology

表 3.3.2.17 に、GO で分類された対照エンジン排気に対する尿素 SCR エンジン排気の変動した遺伝子の発現量のばらつきを臓器ごとに示した。また、ばらつきが最も大きい臓器の SD 値を下線で示した。

肺では、細胞死、アポトーシス、細胞接着因子 (CAMs) 分類での SD 値が大きかった。

心臓では、グルタチオン代謝、炎症・アレルギー関連の分類での SD 値が大きかった。

大脳では、成長関連、細胞分裂関連、細胞傷害関連、ストレス応答、抗酸化活性、薬物代謝関連、プロテインキナーゼ活性、炎症・アレルギー関連の分類で SD 値が大きく、肺や心臓よりも SD 値が大きいものが多かった。

表 3.3.2.17 GO 分類された遺伝子の発現量のばらつき (7日曝露)

		肺	心臓	大脳
成長	細胞増殖	0.34	0.40	<u>0.41</u>
	細胞成長	0.40	0.44	<u>0.60</u>
細胞分裂	DNA 代謝	0.46	0.35	<u>0.52</u>
	転写	0.42	0.43	<u>0.52</u>
細胞傷害	外部刺激応答	0.30	0.39	<u>0.47</u>
	細胞死	<u>0.51</u>	0.36	0.48
酸化ストレス	ストレス応答	0.31	0.36	<u>0.40</u>
	アポトーシス	<u>0.50</u>	0.36	0.47
	グルタチオン代謝	0.39	<u>0.72</u>	0.62
	抗酸化活性	0.21	0.48	<u>0.69</u>
	ケトン体の合成と低下	<u>0.26</u>	0.18	0.26
薬物代謝活性	カタラーゼ活性	0.38	0.38	<u>0.49</u>
細胞シグナル伝達	プロテインキナーゼ活性	0.41	0.38	<u>0.55</u>
	ステロイド生合成	0.18	<u>0.37</u>	0.19
	カルシウムシグナル経路	0.43	<u>0.45</u>	0.45
	MAPK シグナル経路	0.40	0.41	<u>0.43</u>
炎症・アレルギー	サイトカイン-サイトカイン受容体作用	0.48	0.44	<u>0.58</u>
	TGFβ シグナル経路	0.28	<u>0.57</u>	0.51
	細胞接着分子 (CAMs)	<u>0.65</u>	0.47	0.42
神経	神経変性疾患	-	-	0.47
	嗅球伝達	-	-	0.27

b) 遺伝子発現量ランキング

表 3.3.2.18 は、対照エンジン排気と比較して尿素 SCR エンジン排気で強く発現した遺伝子上位 10 位を挙げた。Gene Bank No.や Gene Name が未決定のものが多かったが、特に、肺では炎症関連の遺伝子、心臓では細胞骨格に関連する遺伝子、大脳では癌・代謝酵素関連の遺伝子などの発現亢進が確認された。

一方、表 3.3.2.19 は、尿素 SCR エンジン排気と比較して対照エンジン排気で強く発現した遺伝子上位 10 位を挙げた。表 3.3.2.18 と同様に、Gene Bank No.や Gene Name が未決定のものが多かったが、肺では未解明の遺伝子、心臓では免疫関連の遺伝子、大脳では代謝関連の遺伝子などの発現亢進が確認された。

表 3.3.2.18 尿素 SCR エンジン排気で強く発現した遺伝子（上位 10 位）（7 日曝露）
（対照エンジン排気と比較して）

	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
肺	AA963848	Similar to RIKEN cDNA 4930579G22 (predicted)	8.97
		Q6FIL1 (Q6FIL1) Strain CBS138 chromosome M complete sequence, partial (9%) [TC540833]	8.00
	NM_001001799	transmembrane protein 35	7.93
		Q26195 (Q26195) Pva1 protein, partial (10%) [TC540959]	7.78
	BG663446	Transcribed locus	7.68
			7.66
	XM 343113	Tnf receptor-associated factor 3 (predicted)	7.53
	BG670091	RNA binding motif protein 14	7.09
	XM 578222	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to mKIAA3013 protein (LOC502723), mRNA [XM 578222]	7.04
		Q8BU53 (Q8BU53) Mus musculus 2 days pregnant adult female oviduct cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E230038K10 product:procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-	6.80
心臓	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
			9.28
	NM_001000727	olfactory receptor 1551 (predicted)	9.11
	BF403977	Transcribed locus	8.58
		MLC1_MOUSE (Q8VHK5) Membrane protein MLC1, partial (26%) [TC554741]	7.95
	NM_024346	stathmin-like 3	7.82
	NM_017342	surfactant associated protein C	7.52
	AW142860	Transcribed locus	7.47
		Q8R4C3 (Q8R4C3) Csr1, partial (43%) [TC523252]	7.22
		Q7PG24 (Q7PG24) ENSANGP00000023115, partial (14%) [TC559109]	7.19
NM_012526	chromogranin B	6.93	
大脳	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
	NM_017342	surfactant associated protein C	25.93
	AW142467	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1	11.75
	NM_017144	troponin I type 3 (cardiac)	10.49
			10.09
	AI555513	UI-R-C2p-qw-f-09-0-UI.s1 UI-R-C2p Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C2p-qw-f-09-0-UI 3', mRNA	10.02
	NM_022665	Alkaline phosphatase 1, intestinal, defined by SSR	9.65
	CO397681	AGENCOURT_27538120 NIH_MGC_254 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7312253 5', mRNA	9.10
	NM_031545	natriuretic peptide precursor type B	8.77
	CR475266	Transcribed locus	8.39
XM 226200	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3 (predicted)	7.74	

表 3.3.2.19 対照エンジン排気で強く発現した遺伝子（上位 10 位）（7 日曝露）
（尿素 SCR エンジン排気と比較して）

	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression	
肺	AA944419	EST199918 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMAG94 3' end, mRNA	14.28	
	BE113435	Ras responsive element binding protein 1 (predicted)	7.03	
	BE109496	Transcribed locus, moderately similar to XP_240481.3 PREDICTED: similar to M-protein [Rattus	5.55	
	BE108930	Transcribed locus	4.98	
	NM_001012193	retinol dehydrogenase 11	4.54	
	NM_053810	synaptosomal-associated protein 29	4.24	
	XM_346919	PREDICTED: Rattus norvegicus LOC360791 (predicted) (LOC360791), mRNA [XM_346919]	4.01	
	XM_232613	carboxypeptidase A6 (predicted)	3.74	
	XM_222928	Rattus norvegicus similar to choroideremia-like protein (LOC289266), mRNA [XM_222928]	3.62	
	XM_342113	Rattus norvegicus similar to Periodic tryptophan protein 2 homolog (LOC361820), mRNA [XM_342113]	3.57	
	心臓	GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
		NM_053951	mcf.2 transforming sequence-like	12.72
		BM986458	Linker of T-cell receptor pathways	8.68
XM_340958		immunoglobulin superfamily, member 4 (predicted)	4.77	
XM_575596		similar to Rho-GTPase-activating protein 25 (predicted)	4.76	
XM_218601		E2F transcription factor 8	4.42	
XM_218487		similar to Gene model 1082 (predicted)	4.14	
AF037200		Rattus norvegicus zinc finger transcription factor REST protein mRNA, type A 5'UTR.	3.47	
CO396892		Transcribed locus	3.24	
AI556299		UI-R-C2p-rk-d-06-0-UI.s1 UI-R-C2p Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C2p-rk-d-06-0-UI 3', mRNA	3.21	
XM_345875		Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 1700011A15 (RGD1305207), mRNA.	3.20	
大脳		GenBank Acc. No	Gene Name	Level of Expression
		XM_225368	activator of basal transcription 1	11.80
	XM_345596	Eph receptor A2 (predicted)	9.34	
	NM_199082	secreted and transmembrane 1	7.72	
	NM_001004284	zinc finger, MYND domain-containing 10	6.23	
	NM_001012118	odd-skipped related 2 (Drosophila)	5.63	
	NM_012532	ceruloplasmin	5.50	
	NM_173151	phosphate cytidyltransferase 1, choline, beta isoform	4.84	
	XM_222019	similar to RIKEN cDNA 9430031J16 (predicted)	4.27	
	AW252650	Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	4.05	
	XM_341115	lactase	3.95	

c) DNA マイクロアレイ解析まとめ

- 肺では、尿素 SCR エンジン排気で、特に酸化ストレス関連の遺伝子の変動が認められた。
- 心臓では、対照エンジン排気の 7 日曝露で、酸化ストレス関連をはじめ、代謝関連などの遺伝子発現変動が認められた。
- 大脳では、対照エンジン排気で、代謝に関連した遺伝子の変動が認められた。
- 遺伝子発現の変動傾向は、各臓器でリアルタイム PCR 解析と同様の傾向であった。リアルタイム PCR 解析と同様に、尿素 SCR エンジン排気は肺に、対照エンジン排気は心臓、大脳に影響を及ぼす可能性が示唆された。

5) 病理解析

(1) 呼吸器系の評価

両エンジン排気とも気管から終末細気管支に至る気道部および肺胞構築に変化は認められなかった。さらに、清浄空気群と比較して、気道部の線毛細胞、非線毛細胞（杯細胞、クララ細胞）に線毛の短縮、脱落あるいは杯細胞の増生や粘液産生の亢進、クララ細胞の膨隆などの変化や、気道上皮下の線維化や炎症細胞浸潤を認めなかった（Fig. 3.3.2.75、Fig. 3.3.2.76）。

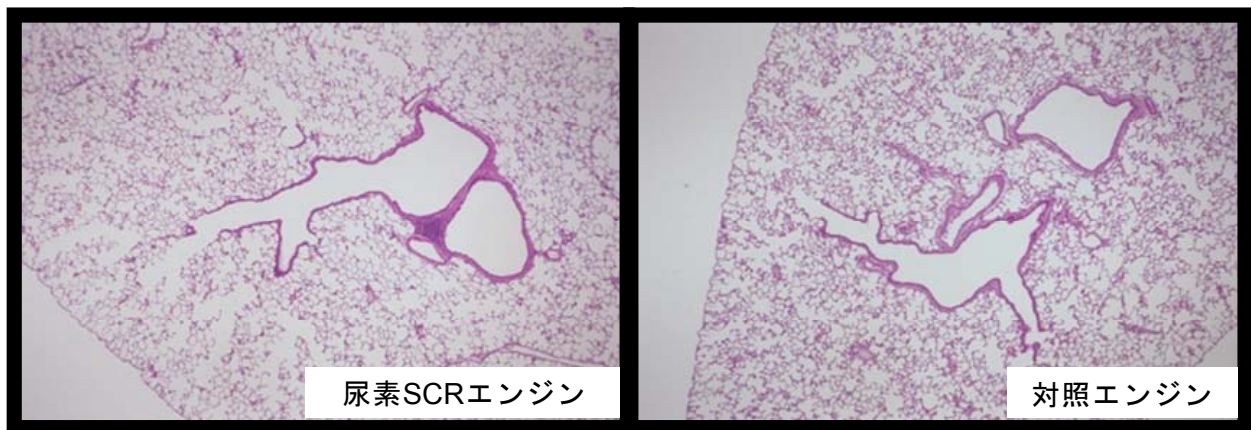


Fig. 3.3.2.75 エンジン比較群の肺組織（HE 染色、撮影倍率：10 倍）

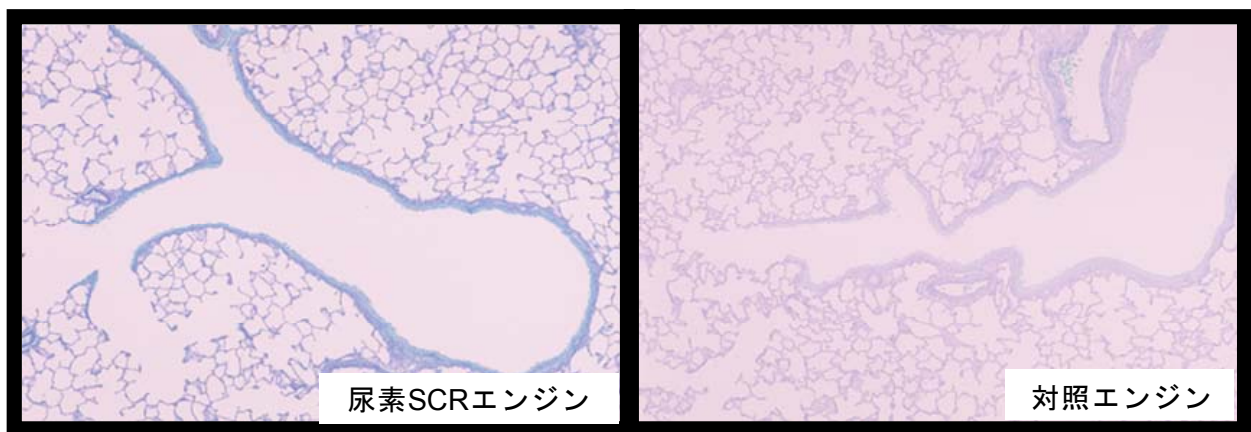


Fig. 3.3.2.76 エンジン比較群の気道部（AB・PAS 染色、撮影倍率：25 倍）

各試験群とも気道の粘液産生に異常は認めない。

両エンジン比較群は PM および NO_2 はほぼ同程度の濃度であるが、肺胞部では対照エンジン排気で II 型上皮細胞の軽微な増生を一部の個体で認めた (**Fig. 3.3.2.77**、**表 3.3.2.20**)。

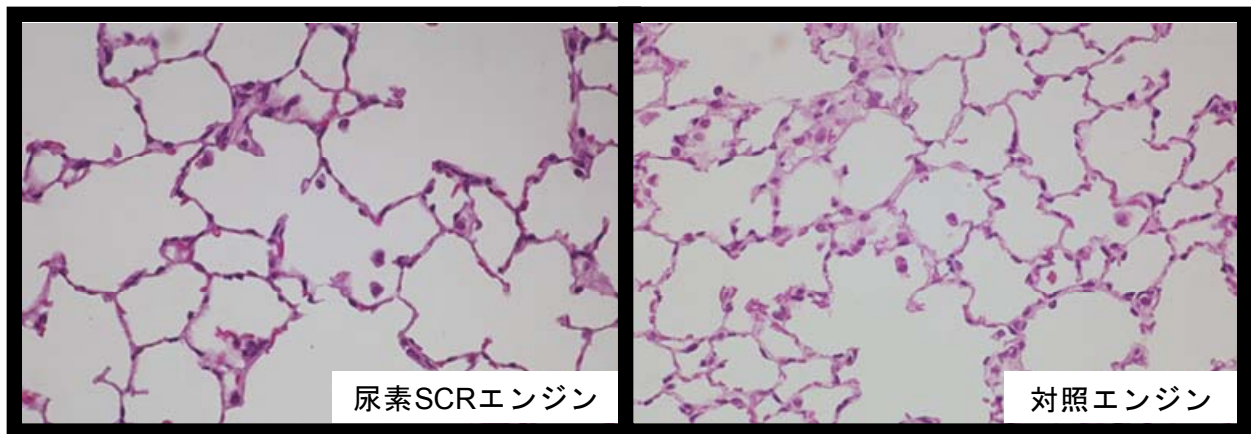


Fig. 3.3.2.77 エンジン比較群の肺胞部（HE 染色、撮影倍率：100 倍）

対照エンジン排気では II 型上皮細胞の軽度な増生を認める。

表 3.3.2.20 各エンジン排気の呼吸器の病理学的評価

	肺胞腔：肺胞マクロファージ		肺胞上皮：II 型上皮
	炭粉貪食	増生	増生
尿素SCRエンジン			
清浄空気	— (6)	— (6)	— (6)
エンジン比較	— (6)	— (6)	— (6)
対照エンジン			
清浄空気	— (6)	— (6)	— (6)
エンジン比較	— (6)	— (6)	—～+ (4)～(2)

(2) 呼吸器系以外の臓器の評価

清浄空気群を含む全ての試験群で、一部の個体に肝臓の胆管や小葉間周囲の炎症細胞浸潤、腎臓の皮質に間質の線維化、および心臓の右心室に炎症細胞浸潤が局所的あるいは散在性に軽度に認められた（表 3.3.2.21）。両エンジン排気による影響の違いは認められなかった。

表 3.3.2.21 各エンジン排気の呼吸器以外の臓器の変化

	肝 臓	腎 臓	心 臓
	胆管周囲の細胞浸潤	間質の線維化	細胞浸潤
尿素SCRエンジン			
清浄空気	2	2	0
エンジン比較	1	3	1
対照エンジン			
清浄空気	1	3	0
エンジン比較	0	4	0

(3) 病理解析まとめ

- 尿素 SCR エンジン排気は呼吸器系やそれ以外の臓器に対する病理学的な変化は認められなかった。
- 対照エンジン排気では、肺胞 II 型上皮細胞の増生が認められたが、軽微な変化であった。

これらのことから、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気に比べて影響は軽微であり、同一希釈系列の結果よりも軽度であった。

6) 小括

(1) 尿素 SCR エンジン排気

肺への病理学的影響は認められなかった。3日曝露で、BALF中の総細胞数の減少がみられ、リンパ球の増加が認められたが、軽微な変化であった。遺伝子解析での HO-1、IL-1 β や TNF α の遺伝子発現量は肺で増加したが、心臓や大脳では軽微あるいは低下した。

(2) 対照エンジン排気

病理解析では、対照エンジン排気で肺胞 II 型上皮細胞の軽度な増生が認められた。BALF中の炎症細胞数や分画に変化は認められなかった。遺伝子解析では、肺で TNF α の発現量の増加傾向がみられ、心臓や大脳で CYP1A1 や IL-1 β 、TNF α の遺伝子発現量の変化が認められた。

尿素 SCR エンジン排気の肺組織は影響が認められなかったが、対照エンジン排気では軽微な影響が認められた。一方、尿素 SCR エンジン排気で肺の遺伝子発現量に影響がみられたが、尿素由来生成物はほぼ同濃度であったため、尿素 SCR エンジン排気のどの成分が関与しているかは特定できなかった。

3.3.2.4 培養細胞曝露試験

1) 細胞毒性試験

Fig. 3.3.2.78 に、A549 細胞の細胞生存率を示した。両エンジン排気とも希釈比を変えても、細胞生存率は大きく変化せず、エンジン排気による細胞毒性は認められなかった。

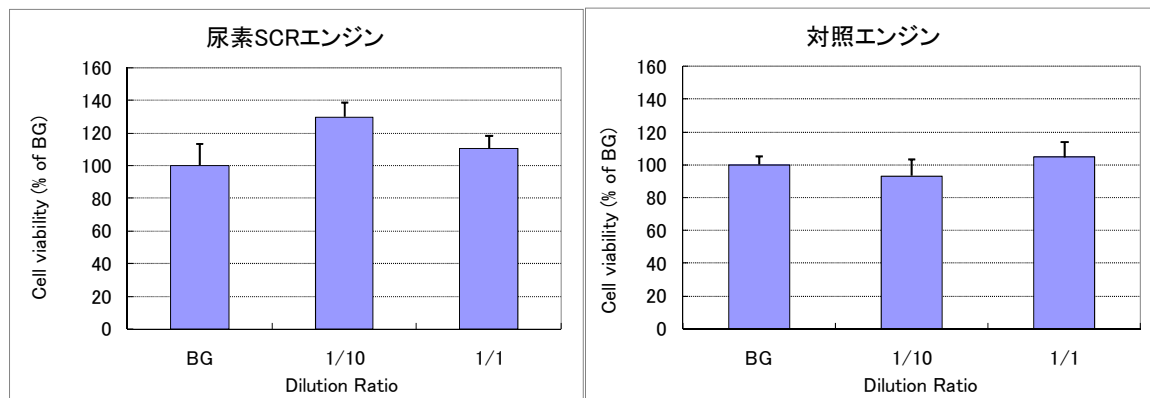


Fig. 3.3.2.78 ディーゼルエンジン排気曝露された A549 細胞に対する細胞生存率 (細胞毒性試験) (n = 3)

2) 遺伝子解析 (リアルタイム PCR 解析)

Fig. 3.3.2.79 に A549 細胞の遺伝子発現量の変化を示した。両エンジン排気で検討遺伝子に対する発現量に有意差は認められなかったが、対照エンジン排気で HO-1 遺伝子発現量の増加傾向がみられた。

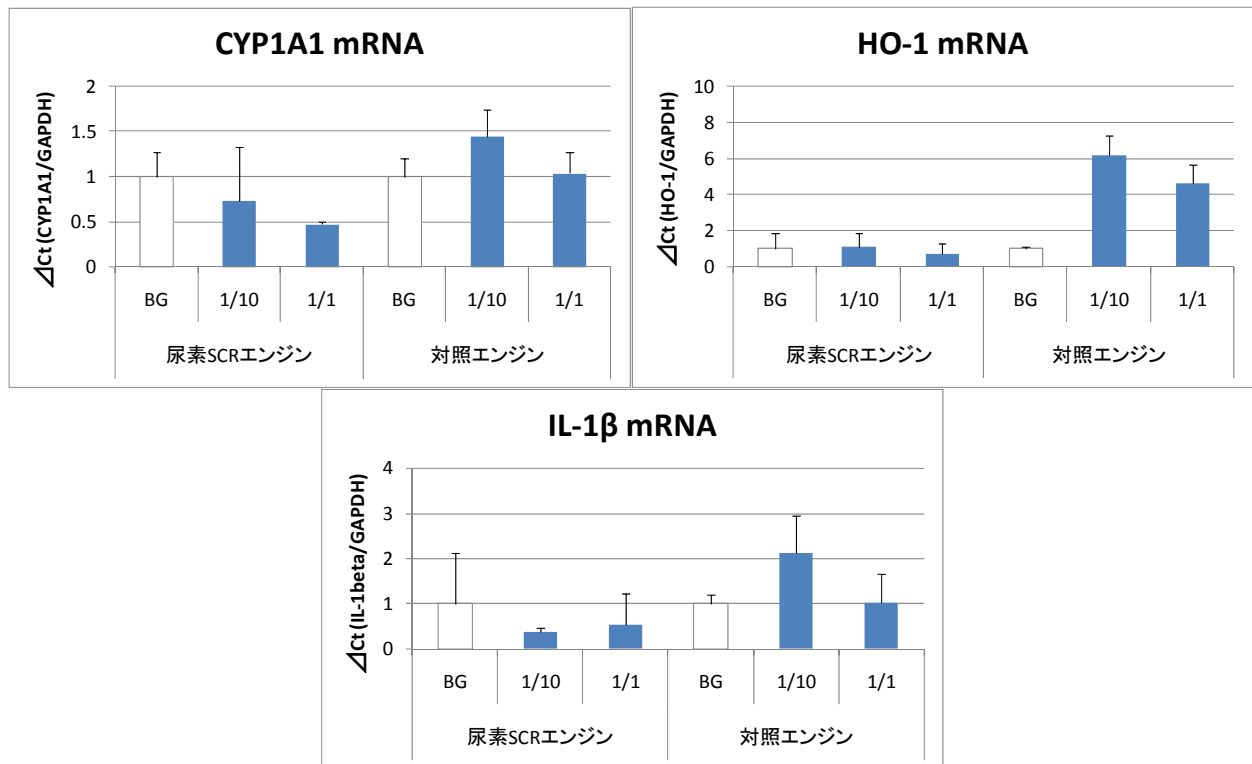


Fig. 3.3.2.79 ディーゼルエンジン排気曝露された A549 細胞の各検討遺伝子発現量 (リアルタイム PCR 解析) (n = 2~3)

3) 小括

動物曝露チャンバー内に給気されている排気を、培養細胞曝露装置を用いてヒトの呼吸器系由来細胞に曝露した。その結果、細胞毒性試験では、両エンジン排気とも細胞生存に影響を及ぼさなかった。また、遺伝子解析では、両エンジン排気とも検討遺伝子の発現量に有意差を認めなかったが、対照エンジン排気で HO-1 遺伝子の発現量の増加傾向がみられた。

以上より、対照エンジン排気は、ヒト呼吸器系由来細胞に酸化ストレスを与える傾向があることが示唆された。

3.4 考察

本調査は、開発された次世代低公害車の排気が、既存の排気と比べ健康面に対する改善効果がみられることを、あるいは少なくとも増悪しないことを確認することが目的であった。そこで、尿素 SCR エンジン（新長期規制対応エンジン）システムおよび長期規制対応エンジンシステムからの排気を実験小動物にそれぞれ短期間吸入曝露し、第一標的臓器である呼吸器への健康影響を中心に比較評価を行い、エンジンシステムの改良による排気の影響への軽減効果を調査した。

健康影響評価では、ラットを用いた短期吸入曝露試験とヒト呼吸器系由来培養細胞を用

いた細胞曝露試験を実施した。ラットの短期吸入曝露試験では、各エンジンシステムからの排気の影響を量・反応関係で検討する試験と、尿素添加システムの有無による排気の影響の違いを検討する試験を設定して尿素 SCR エンジンシステム排気の低減効果を調査した。

3.4.1 曝露濃度レベルについて

本調査で試験した尿素 SCR エンジン排気および対照エンジン排気について、同一希釈系列のうち、影響の検出しやすい高濃度群で PM 濃度、NO₂ 濃度や他の成分濃度はどのようなレベルであったか、大気環境基準値（環境省ホームページ）や環境省等が公表している全国の平成 18 年度大気環境濃度（環境省ホームページ）などと比較して考察した。

PM 濃度は、対照エンジン排気の高濃度群では、環境基準値（1 時間値の 1 日平均値が 0.10 mg/m³ 以下であり、かつ 1 時間値が 0.20 mg/m³ 以下）の 0.1 mg/m³ の 10 倍を目標濃度に設定した。また、尿素 SCR エンジン排気では、対照エンジン排気と同様の希釈倍率に設定した。このような環境基準値よりも 1 桁高値の設定は、吸入毒性試験を量・反応関係で評価する際の最高濃度設定の目安となるであろう。また、両エンジン排気の同一希釈倍率の設定は、市場で走行する車両のエンジンシステムのみが置き換わった場合を想定することができ、両エンジン排気の全体の影響を単純に比較することができる。高濃度群の PM 濃度は、尿素 SCR エンジン排気で約 0.04 mg/m³ となったが、この濃度は SPM として環境基準値以下であり、大気環境濃度レベルである。

PM 個数濃度と粒径については、尿素 SCR エンジン排気の個数濃度は約 1.4×10⁵ 個/cc であり、対照エンジン排気（10⁶ 個/cc）に比して一桁近く低値であった。10⁵ 個/cc は沿道で観察される濃度レベルである。また、尿素 SCR エンジン排気モード径は 50 nm 前後であり、対照エンジン排気（80～90 nm）に比較して粒径は小さい。これは、尿素 SCR エンジンでは燃料の高圧噴射により燃焼改善を伴うことで PM の微細化が発生するため、粒径が異なった可能性が考えられる。対照エンジン排気モード径は、低濃度から高濃度になるに従い、約 80 nm から 90 nm に若干大きくなる傾向があった。これは PM 個数濃度に依存してみられたことから、PM の凝集によるものと思われた。現在、自動車排気中の PM 個数濃度や数十 nm の PM 粒径の違いと健康影響についての定量的な評価結果は見当たらない。

NO₂ 濃度は、PM と同様に、対照エンジン排気の高濃度群で環境基準値（1 時間値の 1 日平均値が 0.04 ppm から 0.06 ppm のゾーン内又はそれ以下）の 10 倍を目標としたが、平均濃度 0.3 ppm と若干至らなかった。希釈倍率を下げて、さらに高濃度に設定することは可能であったが、動物飼育環境上の制約から 0.3 ppm 以上の高濃度にするには困難であった。対照エンジン排気と同一の希釈倍率とした尿素 SCR エンジン排気の NO₂ 濃度は 0.78 ppm であり、対照エンジン排気の約 2.5 倍であったが、これは許容濃度（ACGIH, TLV-TWA, 3 ppm）以下であった。しかし、NO₂ 濃度が尿素 SCR エンジン排気で増加した理由については、尿素 SCR エンジンシステムが酸化触媒を装着していることで NO₂ 排出が対照エンジン排気よりも増加した可能性が考えられる。

NO 濃度は、尿素 SCR エンジン排気で約 3.4 ppm、対照エンジン排気で 12.8 ppm であっ

た。これらは、いずれも許容濃度（ACGIH, TLV-TWA, 25 ppm）以下であった。

CO濃度は、高濃度群で、尿素 SCR エンジン排気 0.5 ppm、対照エンジン排気 7.3 ppm であったが、これは環境基準値（1時間値の1日平均値 10 ppm 以下かつ1時間値の8時間平均値が 20 ppm 以下）以下であった。さらに、環境濃度は 0.6～0.8 ppm であることから、尿素 SCR エンジン排気は環境濃度レベル、対照エンジン排気は環境濃度の 10 倍程度であったといえる。

SO₂濃度は、高濃度群で両エンジン排気とも環境基準値（1時間値の1日平均値 0.04 ppm 以下かつ1時間値 0.1 ppm 以下）以下であり、対照エンジン排気は環境濃度（3～4 ppb）レベル程度であった。

ベンゼン濃度は、尿素 SCR エンジン排気で環境基準値（1年平均値 0.003 mg/m³ 以下）以下、対照エンジン排気では環境基準値の 3 倍程度の濃度であった。

1,3-ブタジエン濃度は、尿素 SCR エンジン排気で検出限界以下、対照エンジン排気では環境基準指針値（年平均値 2.5 µg/m³）以下であった。

ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒド濃度は、現在のところ大気環境基準値や指針値の設定はない。大気環境濃度は、ホルムアルデヒドが 3.3 µg/m³、アセトアルデヒドが 2.8 µg/m³ であるため、尿素 SCR エンジン排気ではいずれも大気環境濃度以下、対照エンジン排気ではホルムアルデヒドは大気環境濃度の 10 倍程度、アセトアルデヒドは 2 倍程度の濃度であった。シックハウスに関する室内濃度指針値（ホルムアルデヒド：0.08 ppm、アセトアルデヒド：0.03 ppm）と比較すると、尿素 SCR エンジン排気では両アルデヒドとも指針値以下、対照エンジン排気ではアセトアルデヒドが室内指針値を超えた。

BaP濃度は、現在のところ大気環境基準値や指針値の設定はない。大気環境濃度は、0.35 ng/m³ であり、尿素 SCR エンジン排気ではいずれも大気環境濃度以下であった。

NH₃濃度は、測定された 0.05 ppm は臭気感知（5 ppm～）の 1/100 であり、眼や鼻、咽喉の粘膜の刺激濃度（400 ppm～）や許容濃度（25 ppm）に対しては極めて低値である。

尿素濃度は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で 1 回目に 14.9 µg/m³、2 回目に 1.1 µg/m³ が検出された。今回、他の成分には特異的な変化は見られなかったため、2 回の平均値を用いて約 8 µg/m³ の濃度とした。1 回目の尿素測定値が 2 回目より高値を示した理由としては、試験開始前に濃度設定のため尿素 SCR エンジンを用いた予備試験を実施したときに、排気中の尿素が配管途中に付着していた可能性が考えられた。尿素的融点は 133～135℃ であり、吸入トンネルの入口温度の 181℃ より低い。尿素は常圧下で 160℃ にて分解するといわれており、仮に曝露中に尿素が排出されたとしても SCR 触媒出口温度 360℃ であるため、触媒で分解、酸化されるものと考えられる。

また、清浄空気群でも低濃度ではあるが尿素が検出されているが、清浄空気群は高性能フィルタと活性炭フィルタで濾過した空気を供給しており、曝露装置の清浄空気の供給系や測定のためのサンプリング用配管もエンジン排気の系とは独立している。そのため、清浄空気群で検出された尿素は、尿素 SCR エンジン排気由来というよりは、実験動物に由来したものか、あるいは大気常在成分の可能性が考えられる。

シアン濃度は検出限界（2.5 ppm）以下であった。これは、シアン化水素の許容濃度 5 mg/m³（約 4 ppm）以下であった。

一方、エンジン排気比較系列では、PM 濃度および NO₂ 濃度で差がみられたが、わずか

であった。また、その他の微量成分濃度は、尿素 SCR エンジン排気が対照エンジン排気よりも低値であった。これは排気後処理装置（酸化触媒）の効果と考えられる。本系列の試験は、尿素添加の影響を検出する目的であるが、両エンジン排気で尿素由来成分濃度に差異はなかった。

以上の結果から、尿素 SCR エンジン排気中で測定対象とした多くの微量成分濃度は、環境基準値ないし指針値以下であり、現状の大気環境濃度を悪化する濃度レベルにはないものと思われる。しかし、NO₂ 濃度は対照エンジン排気よりも尿素 SCR エンジン排気で高濃度であったこと、また、PM 個数濃度と粒径は両エンジン排気で差異が見られたことから、今後、これらの複合影響を明らかにするためには、更なる調査が必要であると考えられる。

3.4.2 同一希釈系列（量・反応関係による検討）

両エンジンシステムの排気全体を評価するために、同一希釈系列による試験群を設定し、量・反応関係について検討した。

両エンジン排気とも、曝露期間中の体重や摂餌量、摂水量の変動は認められなかった。また、7日間の曝露期間中で1,3および7日曝露時に解剖し、臓器重量を測定したところ、一部の臓器で成長による増加がみられたが、曝露濃度および曝露期間による影響はほとんど認められなかった。体重および臓器重量に特記すべき影響が認められなかったのは、従来のエンジン排気と比べ本試験での長期および新長期規制対応エンジンの排気での濃度が極めて低く、また、短期間の曝露であったことによるものと考えられた。

両エンジン排気の第一標的臓器である呼吸器への形態学的影響は、本実験条件下では1日6時間、7日間の曝露のため極めて軽度であった。しかし、PM濃度が0.04 mg/m³程度の曝露であれば、明らかに光顕レベルの観察で粒子吸入により動員されたAMの増加と粒子貪食が亢進されていることが認められた。ディーゼルエンジン排気の長期間曝露ではPM濃度が0.1 mg/m³でも粒子貪食AMが光顕、電顕観察で確認されている（加藤ら、1992）。本試験の病理観察は光顕のみであったが、0.1 mg/m³以下のPM濃度での肺内粒子沈着およびAMによる粒子貪食が短期間の曝露で起こっているのかどうか、さらに高濃度排気での吸入粒子の体内動態などを明らかにするためには、電顕レベルでの確認が必要となるだろう。しかし、高濃度群においても呼吸器組織への直接的な影響は認められておらず、また、好中球や肥満細胞などの炎症を惹起する炎症細胞の動員もみられないことから、呼吸器への影響は吸入粒子のAMによる貪食の域に留まっているものと思われる。

気管・肺のBALF中の炎症細胞は、尿素 SCR エンジン排気では曝露濃度による影響はみられなかったが、3日曝露より7日曝露で総細胞数の減少傾向が認められた。また、対照エンジン排気では、高濃度群の3日曝露で清浄空気群よりも総細胞数の有意な減少が認められた。粒子などにより肺内で何らかの炎症反応が起きているのであれば、白血球が肺内に動員され、BALF中の総細胞数が増加する（Noritake et al., 2007; Li et al., 2007）。一方、外部刺激により肺胞壁にAM接着が起こったことによりBALF中の細胞数が減少したという報告（Hirano, 1997）があるが、BALFの回収率では曝露濃度による差は認められなかった。しかし、総細胞数が減少傾向であることから、肺胞への細胞接着により細胞数が減少した可能性がある。一方、病理解析では程度の差はあるものの、両エンジン排気で用量依

存性に AM 数の増加が認められていることから結果は一致していない。しかし、どの影響も軽微であることから、それらの点を明らかにするためには、より詳細な検討が必要なのかもしれない。

血液生化学検査では、尿素 SCR エンジンの尿素との関連から、特に BUN が注目された。BUN は、両エンジン排気とも 1 日曝露では試験群で低下がみられ、3、7 日曝露では逆に上昇した。また、エンジン排気中の尿素濃度は、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群を除き、測定時期のほとんどで同程度であり、また尿素 SCR エンジン排気の高濃度群は清浄空気群の約 17 倍の濃度であった。しかし、両エンジン排気の高濃度群と BUN はほぼ同値であったことから、エンジン排気中の尿素はラット血液中の BUN に影響を与えている可能性は低いと考えられた。また、ラットは暗期 (19:00-7:00) で食餌を含めた各種行動が活発になること、1 日曝露と 3、7 日曝露では解剖時間が異なること、解剖順は曝露濃度の影響を考慮して高濃度群から実施したことから、BUN の変化には食餌が反映されている可能性が示唆された。ただし、酸化ストレス状況下で BUN が上昇するという報告があること (Yu and Yao, 2008; Tenorio-Velázquez et al., 2005) から、DE および DEP 中の酸化ストレスにより影響を与えている可能性も否定できない。これらのメカニズムを解明するためには、今後の詳細な検討が必要であると考えられた。

また、Glu では、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群と対照エンジン排気の高濃度群で有意な上昇が認められた。しかし、解剖時期および解剖順序による上昇傾向が考えられることから、BUN と同様、食餌性の影響である可能性が示唆された。

K では、特に尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で期間依存性に上昇している。これは BUN の変化と類似しており何らかの関連がある可能性が示唆されるが、対照エンジン排気ではこのような類似性がみられないことから、尿素 SCR エンジン排気特有の物質による可能性もあり、そのメカニズム解明が必要と考える。その他、pH や pO_2 や pCO_2 などの血液ガス成分は、ペントバルビタールナトリウムで深麻酔処置したこと、右心室からの採血であったことにより、参考データに留めることにした。

血液凝固能検査では、どの測定項目も有意な差は認められなかった。しかし、対照エンジン排気の高濃度群で APTT の短縮傾向およびフィブリノーゲンの増加傾向が認められた。DE あるいは DEP により血液凝固能が亢進するという報告があり (Inoue et al., 2006; ディーゼル排気と循環器疾患)、本試験の結果を裏付けるものである。しかし、十分なサンプル数が確保できなかったことから、両エンジン排気に対する健康影響の差異をより明確化するためには、さらなる解析が必要であろう。

8-OHdG は、酸化ストレスを受けると増加すると考えられているが、尿素 SCR エンジンと対照エンジン排気の高濃度群への影響は、特に中濃度と高濃度では異なっていた。即ち、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で、8-OHdG が低濃度群の 7 日曝露、中、高濃度群の全ての曝露期間で有意に低下あるいは検出限界以下であったのに対し、対照エンジン排気では、高濃度の 3 日と 7 日曝露を除き増加していた。一方、PAO は、対照エンジン排気では、曝露濃度や期間からみても、有意な変化はみられるものの特徴的な差はみられなかったが、尿素 SCR エンジン排気では、低濃度群の 7 日曝露、中、高濃度群の全ての曝露期間で有意に上昇あるいは上昇傾向を示した。尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で 8-OHdG の増加が抑制されたのは PAO の増加によるものと推測された。このことは、尿素 SCR エンジン排気と対照エン

ジン排気の酸化ストレスを起こす物質が相違していることが示唆され、おそらく、酸化ストレスの相対的強度は、尿素SCRエンジン排気の方が強く、8-OHdGの増加を起こす前あるいは増加したことにより、生体の防御機構が働いてPAOが増加し、8-OHdGの増加が抑制されたのではないかと推測された。対照エンジン排気では、PAOの増加を引き起こすほど酸化ストレスが強くないので、尿素SCRエンジン排気に比し8-OHdGの増加がみられたのではないかと推測された。このことは、肺のHO-1の遺伝子発現量が、尿素SCRエンジン排気では濃度依存性の増加傾向がみられたのに対し、対照エンジン排気では曝露濃度や期間からみても差がみられなかったことから支持されることが示唆される。しかし、対照エンジン排気の高濃度群の1日曝露では、8-OHdGが本試験中の最大値を示し、さらに排気中のPMが高濃度群で0.1 mg/m³であったことから、対照エンジン排気による8-OHdGの上昇は、粒子に付着した酸化ストレス物質によるものであるという可能性も示唆される。さらに、DTTアッセイによるSOFの酸化活性が尿素SCRエンジン排気よりも対照エンジン排気で強かったことは、尿素SCRエンジン排気に比べ対照エンジン排気の方が絶対値レベルでも活性酸素による損傷が大きいことを示しており、この影響の差異については原因物質の違いによるものと推察できる。また、ナノ粒子を多く含むディーゼル排気曝露（100 µg/m³、5時間/日、5日間）により生じた酸化ストレスは、マウスのレドックス⁷⁵環境に異常をきたさなかったという報告（古山ら、2008）があることから、原因物質の違いだけではなく、曝露期間による影響を含めた更なる検討が必要と考えられる。

リアルタイム PCR 解析での肺の遺伝子は、対照エンジン排気よりも尿素 SCR エンジン排気で発現が亢進する傾向がみられた。なお、CYP1A1 遺伝子では尿素 SCR エンジン排気の7日曝露で発現が亢進する傾向がみられ、対照エンジン排気の1日曝露で発現量が有意に増加した。これらの変化が粒子に付着している PAH によるものであれば、エンジンの種類あるいは PM 濃度により作用機序あるいは発現期間に差異がある可能性が高い。しかし、本試験中で最も PM 濃度が高い対照エンジン排気の高濃度群にて、発現量に差が認められなかったことから、他の要因による可能性が考えられた。また、尿素 SCR エンジン排気の高濃度群で、HO-1 や TNFα 遺伝子の発現量が増加した。酸化促進剤であるヘムが存在すると HO-1 が誘導され、またヘムは Mφ から TNFα を分泌させることが知られている（高橋ら、2007）。これらは酸化ストレスで発現増加する遺伝子であることから、8-OHdG および PAO の酸化ストレス応答機構と同様の傾向が示唆された。また、DNA マイクロアレイ解析では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気よりも発現量のばらつきが大きく、さらに変動する遺伝子数が多かった。特に、細胞分裂やアポトーシスに関する遺伝子の変動が大きかった。定量的および定性的な遺伝子解析から、肺では対照エンジン排気よりも尿素 SCR エンジン排気で遺伝子発現変動が大きいことがわかった。

尿素 SCR エンジン排気で肺の遺伝子変動が大きかった理由について、排気成分から考察すると、尿素 SCR エンジン排気中の NO₂、N₂O および尿素的平均濃度は、対照エンジン排気よりも高値で、NO₂ は尿素 SCR エンジン排気で 0.78 ppm、対照エンジン排気で 0.31 ppm、N₂O は尿素 SCR エンジン排気で 3.50 ppm、対照エンジン排気で 0.32 ppm、尿素は尿素 SCR エンジン排気で 7.98 ppm、対照エンジン排気で 0.49 ppm であった。NO₂ や N₂O について

⁷⁵ レドックス[Redox : Reduction/Oxidation] : 生体内での酸化還元反応の制御機構。レドックス反応は単なる酸化ストレス、ROS (reactive oxygen species) の中和だけでなく、細胞内のシグナル伝達の重要な役割を持つことが判明している。

は種々の報告があり、NO₂は10 ppmの急性吸入曝露でラット肺を損傷させる（Hochscheid et al., 2005）。本試験においては、尿素 SCR エンジン排気でのNO₂濃度は、日本の大気汚染に係る環境基準値（環境省・大気汚染に関わる環境基準）の約130～200倍と非常に高濃度であるため、肺に影響を与えている可能性が考えられる。また、自動車エンジン排気中にも検出されているN₂O（Toyoda et al., 2008）は、地球温暖化ガスとして問題視されている（Xu et al., 2007）だけではなく、ニューロパチーを引き起こすこと（Brodsky et al., 1981）や職業曝露による自然流産のリスクを増加させること（Rowland et al., 1995）が報告されている。一方、N₂Oはもともと安定性のある物質であり、さらに米国で定められている環境濃度50 ppmよりも本試験では低濃度であるため、影響を与えている因子とは言い難い。また、尿素による報告については、先に述べたように生体への影響はあまり報告されていない。以上のことから、肺の遺伝子発現に変動を与えているのはNO₂による影響の可能性が示唆される。

心臓のリアルタイムPCR解析は、尿素 SCR エンジン排気の1日曝露でCYP1A1、IL-1βおよびTNFα遺伝子の発現量を増加させる傾向があった。しかし、対照エンジン排気では、検討遺伝子の全てにおいて、発現量の顕著な増加を示した。対照エンジン排気は、エンジン排気成分の中で、先に述べたNO₂、N₂O、尿素以外は尿素 SCR エンジン排気よりも高濃度であった。DEおよびDEPで発現亢進がみられる遺伝子をリアルタイムPCR解析で検討したが、ほとんどの遺伝子の発現亢進が認められたため、排気成分中で高濃度である粒子による影響が示唆された。DNAマイクロアレイ解析では、発現量のばらつきは両エンジン排気で同程度であったが、発現変動がみられた遺伝子数は、尿素 SCR エンジン排気で7日曝露より1日曝露で、対照エンジン排気では1日曝露より7日曝露で多かった。尿素 SCR エンジン排気では、GO解析でMAPKシグナル経路分類内の2遺伝子が顕著な発現亢進をしていたため、これらの遺伝子変動については今後リアルタイムPCR解析で定量的に評価する必要があると思われた。また、対照エンジン排気では、7日曝露でアポトーシスや細胞傷害などに関連した遺伝子の発現変動がみられている。これらも粒子による影響の可能性が示唆された。

大脳のリアルタイムPCR解析では、尿素 SCR エンジン排気は検討遺伝子の発現変動がほとんど認められなかったが、対照エンジン排気ではCYP1A1とIL-1β、TNFα遺伝子で発現量の増加が認められた。CYP1A1遺伝子の発現亢進により大脳にPAHの存在が、また、IL-1βおよびTNFα遺伝子の発現亢進により炎症が示唆されるが、HO-1遺伝子が低濃度群で若干の発現増加がみられたのみで、酸化ストレスにはあまり大きく影響していないことが認められた。また、DNAマイクロアレイ解析においても、尿素 SCR エンジン排気で発現量のばらつきは対照エンジン排気に比べて小さく、対照エンジン排気の1日曝露ではアポトーシスや細胞傷害に関連した遺伝子の発現変動が大きかった。

このように、遺伝子発現の傾向は、定量評価が目的のリアルタイムPCR解析と定性評価が目的のDNAマイクロアレイ解析でも同様の傾向があることが示され、第一標的臓器である肺は尿素 SCR エンジン排気で、心臓や大脳では対照エンジン排気で影響を及ぼす可能性が示唆された。このことは、エンジン排気中のNO₂が肺に、PMが大脳や心臓に強く影響を与えたと考えられた。

以上の評価結果を総括すると、肺では、組織形態学的な変化を評価する病理解析による

と、両エンジン排気の影響は本実験条件下では全体的に軽度であった。しかし、粒子貪食 AM や肺胞 II 型上皮細胞の増生が、対照エンジン排気の高濃度群ほど強くみられることから、これらの変化は PM 濃度に依存したものと考えられた。一方、遺伝子解析では、尿素 SCR エンジン排気で発現量の増加が認められたことから、PM 濃度に依存した影響というよりは NO₂ 濃度に影響を受けた可能性が高いと考えられた。さらに、尿素 SCR エンジン排気で、8-OHdG は一時的に増加した後、抗酸化作用により抑制されていた可能性が示唆された。しかし、8-OHdG は対照エンジン排気で最も高値であったことから、NO₂ 濃度の酸化作用もさることながら PM に付着している酸化物質による酸化作用の方に影響を受けやすい可能性や、両エンジン排気で影響の受け方が異なる可能性も考えられた。これらのことから、尿素 SCR エンジン排気では、Mφ に依存した HO-1 および TNFα 遺伝子の発現の変動や 8-OHdG や PAO の酸化ストレス応答機構は、NO₂ により引き起こされている可能性が示唆され、また、対照エンジン排気で観察された 8-OHdG の高値や AM および肺胞 II 型上皮細胞の増生は、PM に依存した変化である可能性が示唆された。しかし、尿素 SCR エンジン排気による肺への影響は、対照エンジン排気と比較して遺伝子解析のみ大きく、病態生理・生化学的結果では小さかった。

一方、心臓や大脳の病理解析では、両エンジン排気とも清浄空気群と比較して差は認められなかった。しかし、両臓器とも対照エンジン排気の方が遺伝子の発現変動が大きく、特に心臓では対照エンジン排気の影響が強くていているため、生理学的な影響を及ぼす可能性が考えられる。大脳では、特に対照エンジン排気で遺伝子の発現量の亢進が認められており、病理解析の結果とは必ずしも結びつかなかった。しかし、PM あるいはその抽出物が血液や嗅球を介して大脳に移行している (Oberdörster et al., 2004) 可能性も考えられることから、今後の検討が必要と思われる。本実験条件下での尿素 SCR エンジン排気による心臓および大脳への影響は、対照エンジン排気と比較して遺伝子解析への影響や病態生理・生化学的变化は小さく、著明な病理学的変化をもたらすほどではなかった。しかし、長期的な曝露が大脳や心臓へどのような影響を及ぼすかについては今後の課題である。

以上より、同一希釈系列による尿素 SCR エンジン排気あるいは対照エンジン排気の第一標的臓器である呼吸器への影響比較から、尿素 SCR エンジンシステムの NO_x 低減効果が大きい同一運転条件下であれば、尿素 SCR エンジン排気の方が概して影響は軽度であることが示された。

しかし、8-OHdG と PAO の推移や肺の HO-1 への影響からみると、尿素 SCR エンジン排気の方が酸化ストレスが強いのではないかという懸念も残り、長期間曝露を行うと尿素 SCR エンジン排気で、より強い形態学的変化を起こす可能性は否定できないと思われる。

3.4.3 エンジン排気比較系列（尿素添加システムの有無による検討）

尿素添加システムの有無によるエンジン排気に対する影響を検討するために、両エンジンシステムの排気成分中の PM 濃度および NO₂ 濃度を同一に設定して、その排気に対する健康影響を評価した。ただし、それぞれのエンジン排気の排気成分は、尿素 SCR エンジン排気で PM 0.019 mg/m³ および NO₂ 0.40 ppm、対照エンジン排気で PM 0.032 mg/m³ および NO₂ 0.32 ppm であり、差は PM 0.013 mg/m³ および NO₂ 0.08 ppm であったため、目標の性

状とは若干異なった。

両エンジン排気とも、曝露期間中の体重や摂餌量、摂水量の変動は認められなかった。また、体重および臓器重量についても、特に曝露による影響はみられなかった。

また、病理解析においては、両エンジン排気で粒子吸入による AM と粒子貪食が認められなかった。排気性状は、PM 個数濃度は尿素 SCR エンジン排気で 7.1×10^4 個/cc、対照エンジン排気で 3.6×10^4 個/cc で、また、平均粒径は尿素 SCR エンジン排気で 48.8 nm、対照エンジン排気で 80.2 nm であり、これは尿素 SCR エンジン排気の方が対照エンジン排気よりも、小さい粒子が多く存在していることを示していた。このような粒子は、光顕レベルでは検出不可能であるため、これらを明らかにするためには今後電顕での詳細な解析が必要となる。一方、対照エンジン排気では II 型肺胞上皮細胞の増生が軽微に認められている。前述のように、排気成分中の PM 濃度および NO₂ 濃度の差が 0.013 mg/m³ および NO₂ 0.08 ppm であったことから、その若干の差による影響である可能性が考えられる。しかし、これらの変化は軽微であり、懸念された尿素 SCR エンジン排気に特有な尿素関連燃焼生成物による健康影響も認められなかった。

BALF 中の炎症細胞については、尿素 SCR エンジン排気の 3 日曝露で総細胞数の減少がみられたが、それは 7 日曝露と同レベルであった。さらに、他の分画成分では差がみられなかったことから、曝露による影響はないものと考えられた。これらは病理解析の結果とほぼ一致していた。

血液生化学検査では、尿素 SCR エンジンの関連から BUN が注目された。BUN は、両エンジン排気とも 1 日曝露では試験群で低下がみられ、3、7 日曝露では逆に上昇傾向がみられた。これは同一希釈系列と同様の傾向である。また、エンジン排気中の尿素が尿素 SCR エンジン排気のエンジン比較群で 0.52 µg/m³、清浄空気群で 0.47 µg/m³、対照エンジン排気のエンジン比較群で 0.55 µg/m³、清浄空気群で 0.62 µg/m³ であった。両エンジン排気ともエンジン比較群と清浄空気群で同程度の尿素濃度であったことから、エンジン排気中の尿素が血液中の BUN に影響を与えている可能性は低いと考えられた。

Glu では、両エンジン排気にて曝露期間依存性の増加傾向が認められている。これは、同一希釈系列と同様に、解剖時間の差異による食餌性の影響である可能性が示唆された。また、K は、尿素 SCR エンジン排気で、同一希釈系列の結果よりもより強く、BUN の変化と類似していた。これは対照エンジン排気ではそのような類似性がみられないことから、尿素 SCR エンジン排気に特有な成分による可能性も考えられる。

酸化ストレスの評価では、8-OHdG と PAO で軽微な変動はみられたものの、同一希釈系列でみられていたような酸化損傷は認められず、両エンジン排気とも酸化ストレスによる影響を引き起こしていないことが示唆された。

肺での遺伝子発現は、リアルタイム PCR 解析にて、尿素 SCR エンジン排気で CYP1A1、IL-1β、TNFα 遺伝子の発現量の増加がみられている。特に、CYP1A1、IL-1β 遺伝子は対照エンジン排気では発現量への影響が認められなかったこと、そして、DNA マイクロアレイ解析では、尿素 SCR エンジン排気の 7 日曝露で炎症関連遺伝子の発現増加がみられたことから、肺への影響は尿素 SCR エンジン排気特有の物質による可能性が考えられた。

心臓の遺伝子発現は、リアルタイム PCR 解析で、尿素 SCR エンジン排気ではほとんどの検討遺伝子で発現に大きな影響がみられなかったが、対照エンジン排気では、CYP1A1

遺伝子は 1 日曝露で、HO-1、IL-1 β および TNF α 遺伝子は 7 日曝露で有意な発現量の増加が認められた。この変化の差は、PM 濃度や NO $_2$ 濃度が両エンジン排気で差があったことに起因している可能性がある。しかし、酸化ストレスへの影響は対照エンジン排気では特に認められなかったことから、応答機構にタイムラグがある可能性も考えられ、その作用機序を解明するために詳細な検討が必要と思われた。

大脳のリアルタイム PCR 解析では、心臓と同様に尿素 SCR エンジン排気ではほとんどの検討遺伝子で発現に影響はほとんど見られず、対照エンジン排気の 1 日曝露で全ての検討遺伝子が有意な発現量の増加を認めた。これについても、対照エンジン排気中の PM 濃度による影響が考えられるが、心臓の発現傾向とは異なり、発現亢進があった曝露初期以外は発現量の差がみられなくなっている。これは、大脳が曝露初期にのみ影響を受けやすいのか、あるいは、曝露後半に別の遺伝子の変動が起こるのかについて検討する必要があると考えられた。また、DNA マイクロアレイ解析では、尿素 SCR エンジン排気の 7 日曝露で、癌や代謝酵素に関連する遺伝子の発現量の増加を確認している。一方、対照エンジン排気の 7 日曝露では、代謝酵素に関連する遺伝子の発現量の増加が確認されている。

これらのことから、第一標的臓器である肺は尿素 SCR エンジン排気で、心臓や大脳では対照エンジン排気で影響が強くみられたことが確認できた。リアルタイム PCR 解析と DNA マイクロアレイ解析では、エンジン排気比較系列による検討でも同一希釈系列の結果と同様な遺伝子発現の傾向であることが認められた。特に肺では、尿素 SCR エンジン排気で影響が認められたことから、それが尿素関連燃焼生成物による可能性も考えられるが、詳細は不明である。

前述のように、本試験では尿素 SCR エンジン排気あるいは対照エンジン排気の PM 濃度および NO $_2$ 濃度を同一に設定したが、エンジン排気中の尿素由来生成物はほぼ同濃度であったため、尿素添加に対する差異は確認できなかった。しかし、尿素 SCR エンジンシステムからの排気成分は平均粒径が小さく個数濃度が多かったこと、また、アルデヒド類などの微量成分濃度に違いがみられたことから、影響の違いはその他の排気成分の違いによる可能性も否定できない。しかし、これらの影響を与えた排気成分の特定はできなかった。さらに、尿素由来生成物の二次産物あるいは未知の物質の影響も懸念され、さらなる詳細な検討が必要と思われる。

なお、エンジン排気比較系列での影響は、同一希釈系列に比べて弱く、その程度もわずかの差であったことから、短期吸入曝露では尿素由来生成物などの尿素 SCR エンジン排気独自の排気成分よりも、PM や NO $_2$ が生体に与える影響が大きいことが示唆された。

3.4.4 培養細胞曝露試験

ラットの吸入曝露試験の条件下で、培養細胞曝露装置を用いてヒト呼吸器系由来細胞を曝露した。細胞毒性試験では、両エンジン排気ともに細胞生存率に影響を与えなかった。また、リアルタイム PCR 解析の発現遺伝子に差は認められなかった。しかし、対照エンジン排気で検討した CYP1A1、HO-1 および IL-1 β 遺伝子の発現量の増加傾向が認められた。特に HO-1 遺伝子はその傾向が強かった。このことから、尿素 SCR エンジン排気はヒト呼吸器系由来細胞に対して影響が認められなかったが、対照エンジン排気では特に酸化スト

レスを与える傾向があることが示唆された。

この結果は、ラット吸入曝露試験の結果と類似するものと考えられ、培養細胞を用いた排気曝露は簡易スクリーニング評価として有用であることが確認できた。

3.4.5 まとめ

尿素 SCR エンジン排気あるいは対照エンジン排気による呼吸器を中心とした影響の比較から、本試験条件下では、尿素 SCR エンジン排気は対照エンジン排気と比較して健康への影響が軽度であることが示された。

3.5 今後の課題

本研究を通して、以下のような課題が考えられる。

本実験条件下において、尿素 SCR エンジン排気中の高濃度群の NO₂ 濃度は対照エンジン排気よりも約 2 倍高く、また、尿素由来生成物やその二次生成物、あるいは未知の物質に対する影響評価を行っておらず、それらに対する懸念もある。また、短期間での影響は検出されなかったものの長期間にわたる影響も懸念される。

1) 本研究結果から示された課題

- ・ 尿素 SCR エンジン排気で影響の見られた評価項目に対する詳細な検討
(肺の HO-1 および TNF α 発現量、DNA マイクロアレイ解析など)
- ・ 遺伝子解析と病態生理・生化学的変化との関連性

2) 長期曝露による、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を含めた慢性影響などの評価

- ・ 短期曝露では捉えることのできなかつた生体変化

3) より現実に近い曝露環境を考慮したエンジン運転条件下での評価

- ・ 過渡モード (都市内実走行モードの反映など)

以上のことから、排気成分に変化をもたらす新たな技術の導入に際しては、より詳細な化学成分分析と健康影響評価を行い、その安全性を確認することが望まれる。

3.6 総括

本調査の目的は、開発される次世代低公害車の排気が、既存の排気と比べ健康に対する改善効果がみられることを、あるいは少なくとも増悪しないことを確認することであった。

そこで、尿素 SCR エンジン排気および長期規制対応エンジン (対照エンジン) 排気を実験小動物 (ラット) にそれぞれ短期間吸入曝露し、第一標的臓器である呼吸器への健康影

響を中心に比較評価を行い、エンジンシステムの改良による排気健康への影響の軽減効果を確認した。評価項目は、体重、臓器重量、BALF（総細胞数、細胞分画）、血液検査（生化学検査、凝固能検査、酸化ストレス能）、遺伝子解析（リアルタイム PCR 解析、DNA マイクロアレイ解析）、病理解析（光顕）とした。

また、ラットに吸入曝露したエンジン排気と同様の排気をヒト呼吸器系由来細胞に曝露して、*in vitro* 評価試験（細胞毒性試験および遺伝子解析）で評価した。

【ラット短期（急性）吸入曝露試験】

- ・ 同一希釈系列（量・反応関係による検討）では、各エンジンシステムからの排気の影響を量・反応関係で評価した。尿素 SCR エンジン排気の肺組織内炭粉貪食マクロファージや II 型上皮細胞の増生、BALF 中リンパ球や血中酸化ストレスマーカーの軽微な変化が認められたが、対照エンジン排気での変化が大きかった。しかし、肺の遺伝子解析ではそれらを反映する結果は得られなかった。
- ・ エンジン排気比較系列（尿素添加システムの有無による検討）では、PM 濃度および NO₂ 濃度を同一にしてその影響を評価した。尿素 SCR エンジン排気で肺組織の影響は認められなかったが、対照エンジン排気では軽微な影響が認められた。一方、尿素 SCR エンジン排気で肺の遺伝子発現量に影響がみられたが、尿素 SCR エンジン排気のどの成分が関与しているかは特定できなかった。

【ヒト呼吸器系由来培養細胞を用いた細胞曝露試験】

- ・ 対照エンジン排気により酸化ストレス影響を示唆する傾向が認められ、それは吸入曝露試験の結果と類似するものと考えられた。

本試験条件下では、尿素 SCR エンジン排気が健康に及ぼす影響は、従来のディーゼルエンジン（長期規制対応エンジン）排気と比べて概ね軽減されていると判断できる。

ただし、本短期（急性）曝露試験の結果から、長期間曝露の影響を予測することは出来ない（影響の質と量共に変化する可能性がある）ことに留意する必要があることを付記しておく。

3.7 謝辞

本調査を遂行するにあたり、試験計画から結果審議まで多岐にわたり、御指導御鞭撻いただきました健康影響調査 WG 委員の諸先生方に深謝申し上げます。

3.8 References

Ball JC. A toxicological evaluation of potential thermal degradation products of urea. SAE 2001-01-3621.

Baulig A, Garlatti M, Bonvallet V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A.

Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust

- particles in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285(3):L671-L679, 2003.
- Brodsky JB, Cohen EN, Brown BW Jr, Wu ML, Witcher CE. Exposure to nitrous oxide and neurologic disease among dental professionals. *Anesth. Analg.* 60(5):297-301, 1981.
- Fujii T, Hogg JC, Keicho N, Vincent R, Van Eeden SF, Hayashi S. Adenoviral E1A modulates inflammatory mediator expression by lung epithelial cells exposed to PM10. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284(2):L290-L297, 2003.
- Gross KB. Pulmonary function testing of animals chronically exposed to diluted diesel exhaust. *J. Appl. Toxicol.* 1(2):116-123, 1981.
- Health Effects Institute Coordinating Research Council. The Advanced Collaborative Emissions Study (ACES), Project plan for emission characterization and health effects assessment. May: 1-63, 2004.
- Hirano S. Quantitative time-course profiles of bronchoalveolar lavage cells following intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice. *Ind. Health.* 35(3):353-358, 1997.
- Huttunen K, Hyvarinen A, Nevalainen A, Komulainen H, Hirvonen MR. Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ. Health Perspect.* 111(1):85-92, 2003.
- Inoue K, Takano H, Sakurai M, Oda T, Tamura H, Yanagisawa R, Shimada A, Yoshikawa T. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances coagulatory disturbance with endothelial damage and systemic inflammation related to lung inflammation. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 231(10):1626-1632, 2006.
- Ishinishi N, Kuwabara N, Nagase S, Suzuki T, Ishiwata S, Kohno T. Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty diesel engines on F344 rats. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 13:329-348, 1986.
- Le Prieur E, Vaz E, Bion A, Dionnet F, Morin JP. Toxicity of diesel engine exhausts in an in vitro model of lung slices in biphasic organotypic culture: induction of a proinflammatory and apoptotic response. *Arch. Toxicol.* 74(8):460-466, 2000.
- Li C, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G, Taya K. Anti-androgenic activity of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *Eur. J. Pharmacol.* 543(1-3):194-199, 2006.
- Li QY, Huang SG, Wan HY, Wu HC, Zhou T, Li M, Deng WW. Effect of smoking cessation on airway inflammation of rats with chronic bronchitis. *Chin. Med. J. (Engl.)* 120(17): 1511-1516, 2007.
- Hochscheid R, Schuchmann U, Kotte E, Kranz S, Heinrichs S, Müller B. NO₂-induced acute and chronic lung injury cause imbalance of glutathione metabolism in type II pneumocytes. *Med. Sci. Monit.* 11(8):BR273-279, 2005.
- Noritake S, Ogawa K, Suzuki G, Ozawa K, Ikeda T. Pulmonary inflammation in brown Norway rats: possible association of environmental particles in the animal room environment. *Exp. Anim.* 56(5): 319-327, 2007.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of

- inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* 16(6-7):437-445, 2004.
- Pacheco KA, Tarkowski M, Sterritt C, Negri J, Rosenwasser LJ, Borish L. The influence of diesel exhaust particles on mononuclear phagocytic cell-derived cytokines: IL-10, TGF-beta and IL-1 beta. *Clin. Exp. Immunol.* 126(3):374-383, 2001.
- Rowland AS, Baird DD, Shore DL, Weinberg CR, Savitz DA, Wilcox AJ. Nitrous oxide and spontaneous abortion in female dental assistants. *Am. J. Epidemiol.* 141(6):531-538, 1995.
- Tenorio-Velázquez VM, Barrera D, Franco M, Tapia E, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J. Hypothyroidism attenuates protein tyrosine nitration, oxidative stress and renal damage induced by ischemia and reperfusion: effect unrelated to antioxidant enzymes activities. *BMC Nephrol.* Nov 7(6) 12, 2005.
- Toyoda S, Yamamoto SI, Arai S, Nara H, Yoshida N, Kashiwakura K, Akiyama KI. Isotopomeric characterization of N₂O produced, consumed, and emitted by automobiles. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 22(5):603-612, 2008.
- Tsukue N, Toda N, Tsubone H, Sagai M, Jin WZ, Watanabe G, Taya K, Birumachi J, Suzuki AK. Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 63(2):115-126, 2001.
- Valavanidis A, Vlahoyianni T, Fiotakis K. Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radic Res.* 39(10):1071-1081, 2005.
- Vogel CF, Sciullo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N, Matsumura F. Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ. Health Perspect.* 113(11):1536-1541, 2005.
- Xu S, Hao X, Stanford K, McAllister TA, Larney FJ, Wang J. Greenhouse gas emissions during co-composting of calf mortalities with manure. *J. Environ. Qual.* 36(6):1914-1919, 2007.
- Yu JB, Yao SL. Protective effects of hemin pretreatment combined with ulinastatin on septic shock in rats. *Chin. Med. J. (Engl).* 121(1): 49-55, 2008.
- 加藤温中、京野洋子、桑原紀之。ディーゼル排気長期吸入後のラット肺の電顕観察－非腫瘍性病変について－。日本胸部疾患学会雑誌 30(2):238-247, 1992.
- 環境省ホームページ：「大気汚染に関わる環境基準」。 <http://www.env.go.jp/kijun/taiki.html>
- 環境省ホームページ：「平成 18 年度地方公共団体等における有害大気汚染物質モニタリング調査結果について」。 http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/mon_h18/index.html
- 環境省ホームページ：「局地的大気汚染の健康影響に関する疫学調査－そら (SORA) プロジェクター」。 <http://www.env.go.jp/chemi/sora/index.html>
- 環境省ホームページ：「環境保健サーベイランス調査」。
<http://www.env.go.jp/chemi/survey/index.html>
- 厚生労働省ホームページ：「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会 中間報告書－第 8 回～第 9 回のまとめについて」。
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/02/h0208-3.html>
- 財団法人日本自動車研究所：「ディーゼル排気と循環器疾患－疾患モデル動物の吸入曝露実

験一」。2005年。

高橋 徹、清水裕子、井上一由、森松博史、榎田佳奈、大森恵美子、赤木玲子、森田 潔。
酸化ストレスに対するヘムオキシゲナーゼ-1の臓器保護的役割。日薬理誌 (Folia
Pharmacol. Jpn.) 130(4):252-256, 2007.

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO):「平成15年度調査報告書 高
効率クリーンエネルギー自動車の研究開発 成果報告書」。平成16年3月。

日産ディーゼル工業株式会社ホームページ。 <http://www.nissandiesel.co.jp/>

日本チャールス・リバー株式会社ホームページ:「近交系ラットF344/DuCrI CrIj (Fischer)」。
<http://www.crj.co.jp/service/product/domestic06.html>

Fischerラット研究会編:「フィッシャーラット」。1996年。

古山 昭子、藤谷 雄二、平野靖史郎。ナノ粒子を多く含むディーゼル排気曝露による酸
化ストレス誘導。第49回大気環境学会年会 講演要旨集 p.529、2008年。