

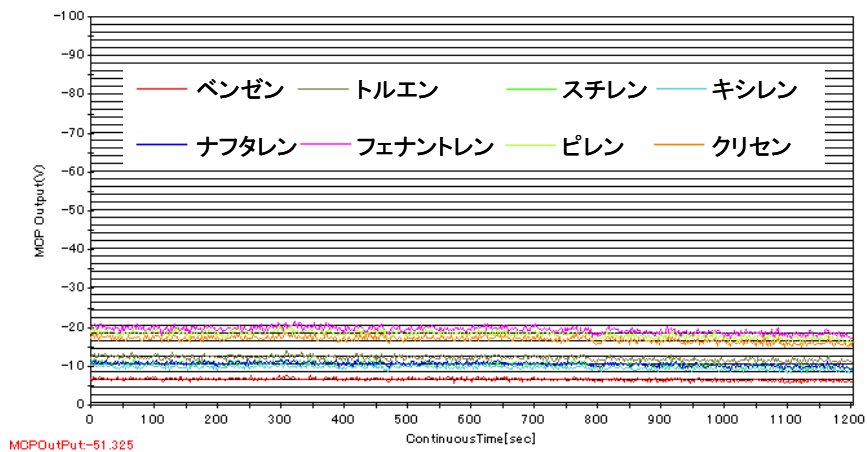
#### 4.1.3.2 車両排出ガスの評価

NEDO 開発車両および対照車両（新長期規制対応）をシャシダイナモ上でモード運転し（JC08 モード\_コールドおよびホット）、直接排出ガスの一部を質量分析装置に導入し、質量スペクトルを求めた。計測条件は前項のエンジン試験と同様である。

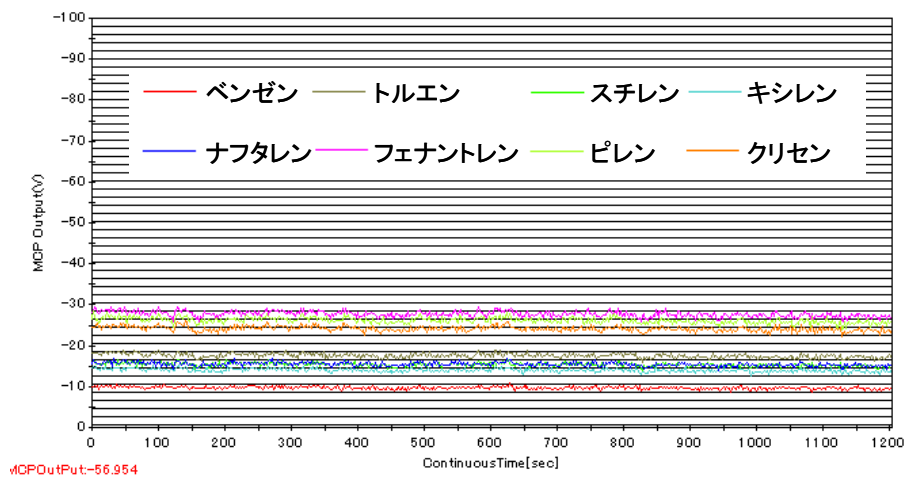
**Fig.4.1.3.14** に対照車両（新長期規制対応）から排出される芳香族成分の過渡計測結果を示す。また、**Fig. 4.1.3.15** に示すように、モードの加速や減速、アイドリング等の 26 のポイントで質量スペクトルの測定を行った。その結果を **Fig. 4.1.3.16**～**Fig. 4.1.3.19**（コールド）および **Fig. 4.1.3.20**～**Fig. 4.1.3.23**（ホット）に示す。これらからわかるように、コールドモード、ホットモードに関係なく、ピークは一切観測されず、検出限界（数 ppb～数十 ppb）以下であることがわかった。

**Fig. 4.1.3.24** は同様の計測を NEDO 開発車両でおこなった結果である。また、**Fig. 4.1.3.25**～**Fig. 4.1.3.28** および **Fig. 4.1.3.29**～**Fig. 4.1.3.32** に **Fig. 4.1.3.15** で示したポイントで測定した質量スペクトル（コールドおよびホット）を示す。これらからわかるように、コールド・スタート、ホット・スタートに関係なく、ピークは一切観測されず、検出限界（数 ppb～数十 ppb）以下であることがわかった。

以上の結果から、NEDO 開発車両では過渡的にも特異な排出がなく、その濃度レベルは新長期規制対応の車両と同等以下であることがわかった。



JC08\_Cold



JC08\_Hot

Fig. 4.1.3.14 対照車両（新長期規制対応）から排出される芳香族成分の過渡変化

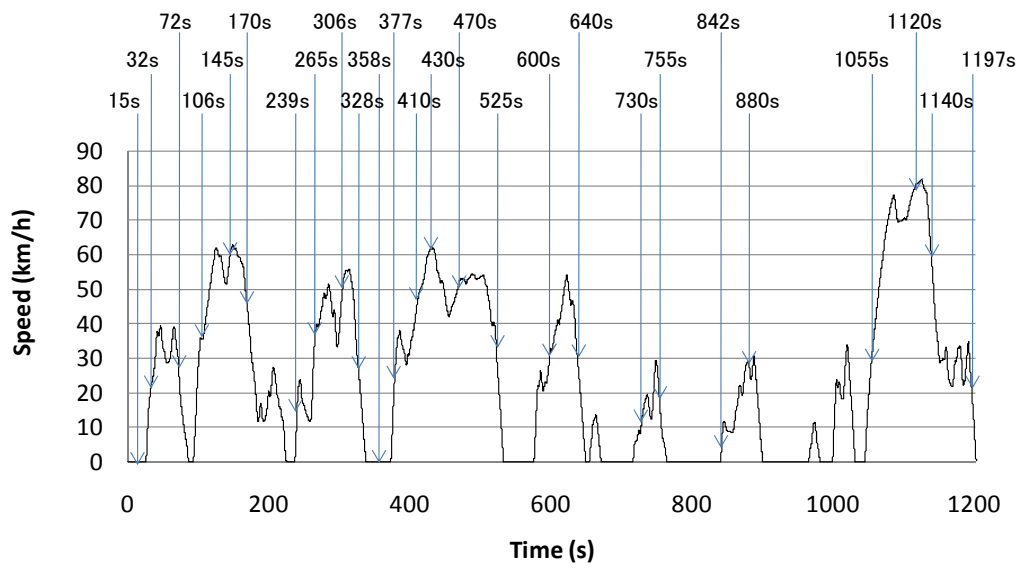


Fig. 4.1.3.15 JC08 モードでの質量スペクトルの測定ポイント

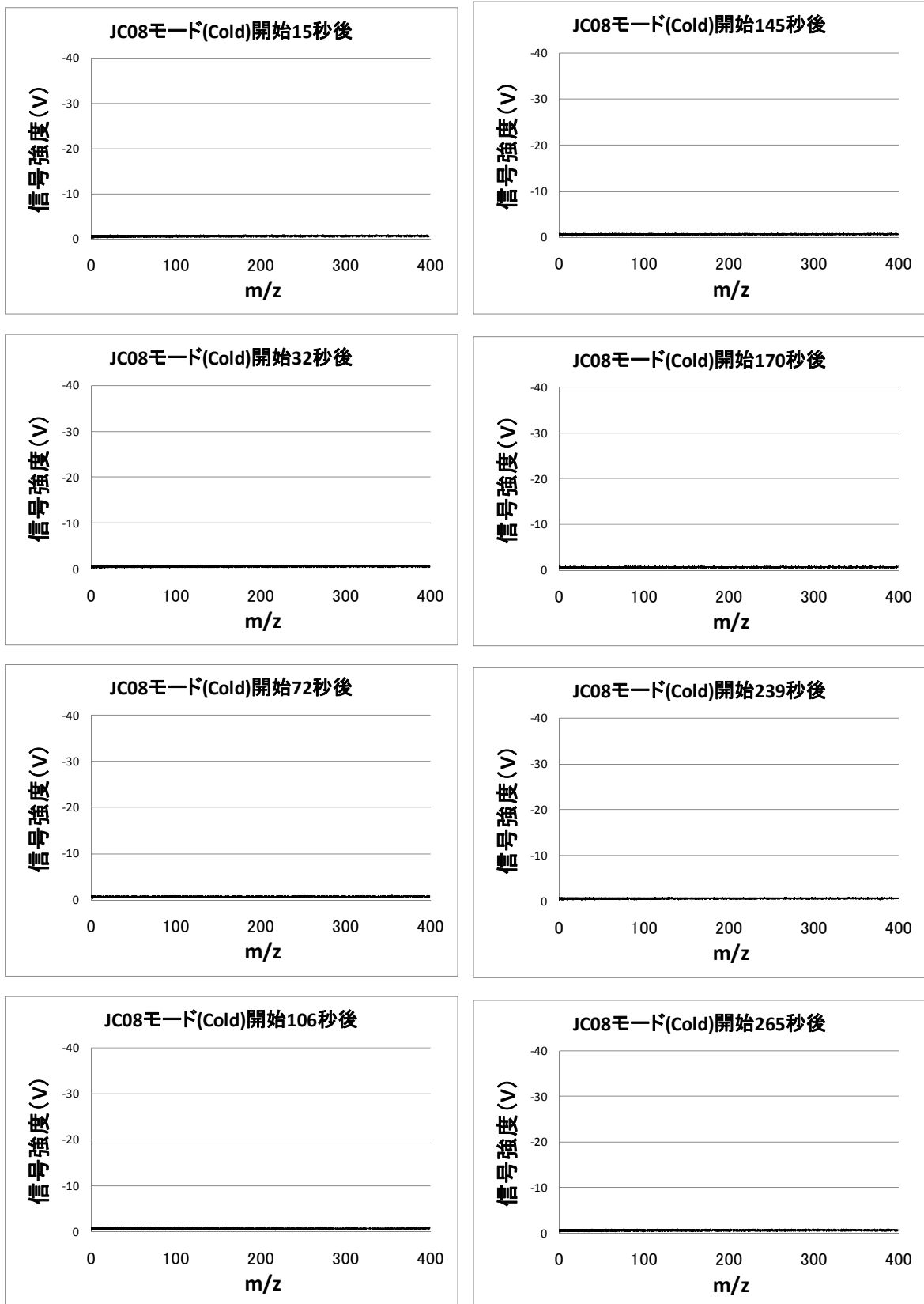


Fig. 4.1.3.16 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル (JC08モード\_Cold)

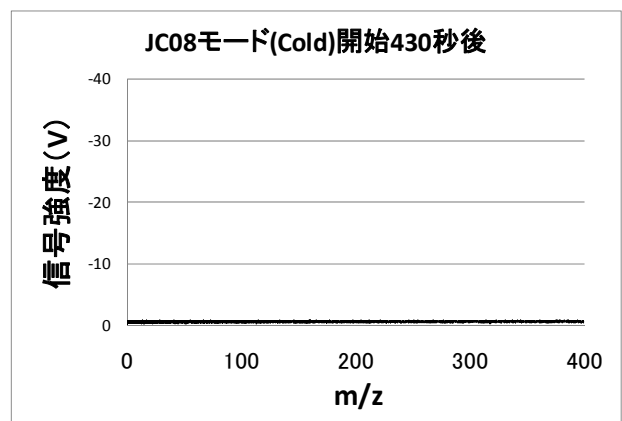
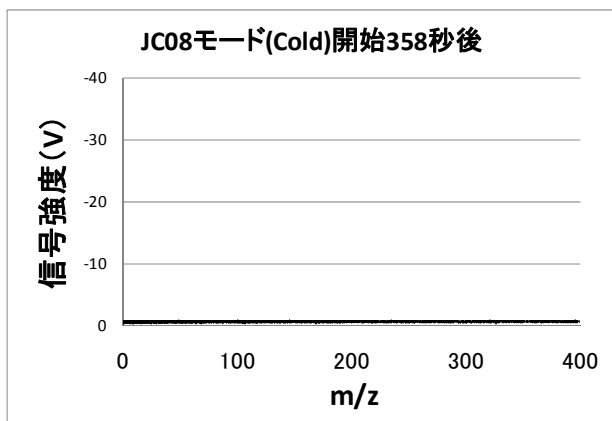
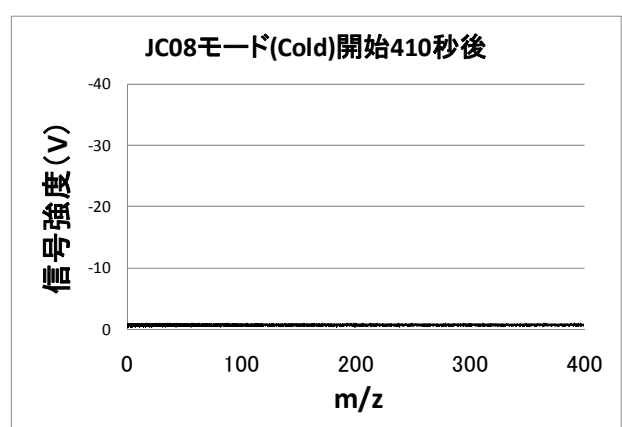
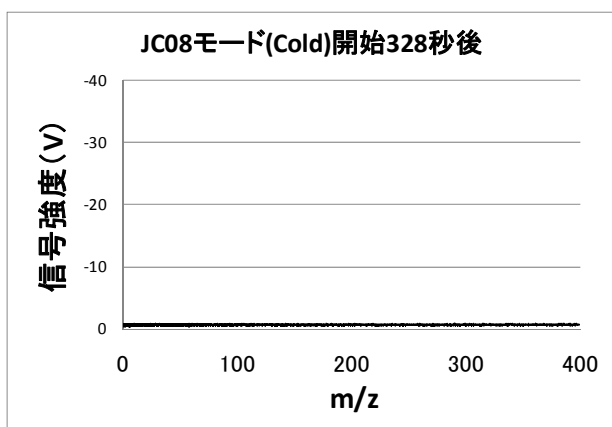
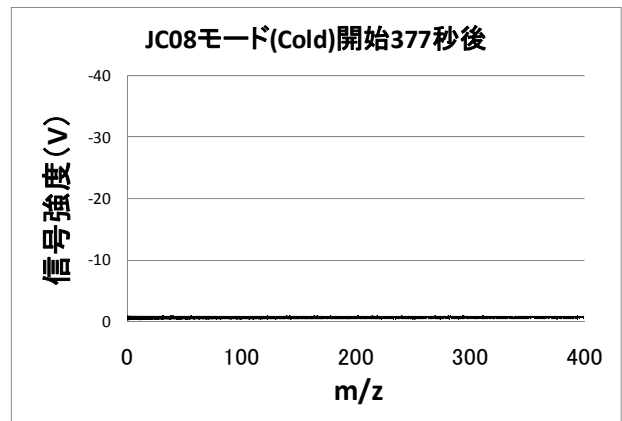
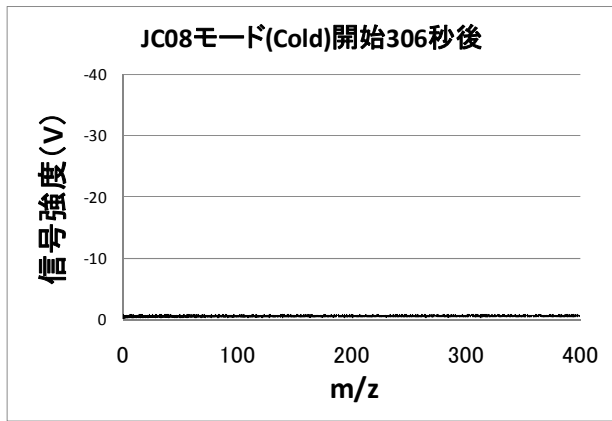


Fig. 4.1.3.17 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08モード\_Cold)

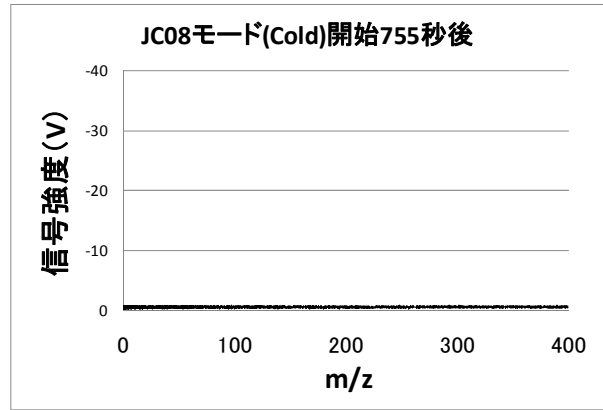
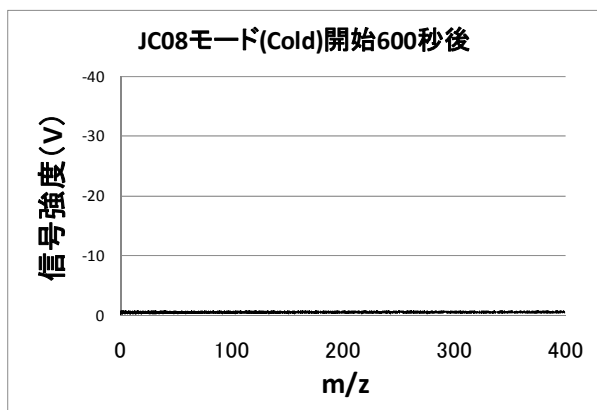
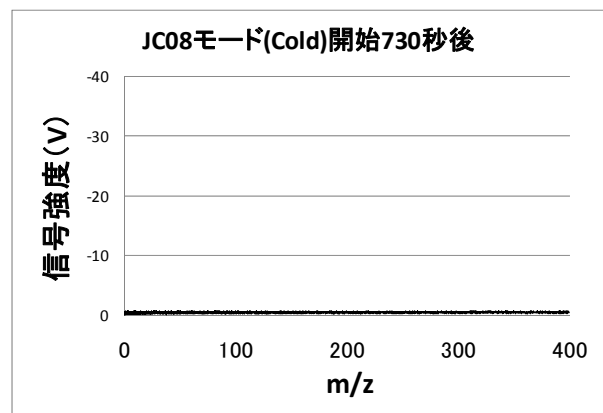
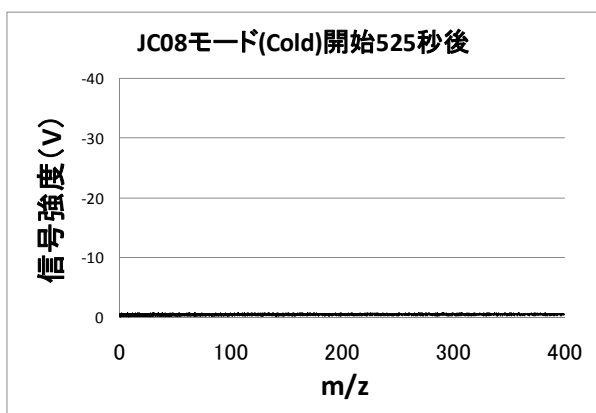
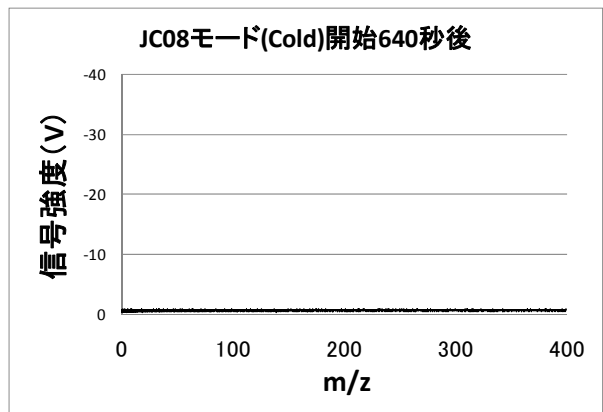
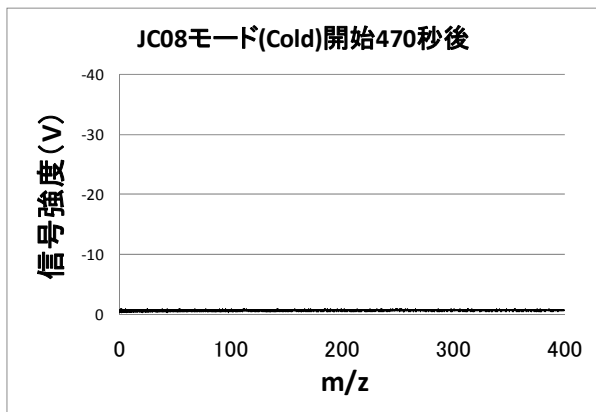


Fig. 4.1.3.18 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08モード\_Cold)

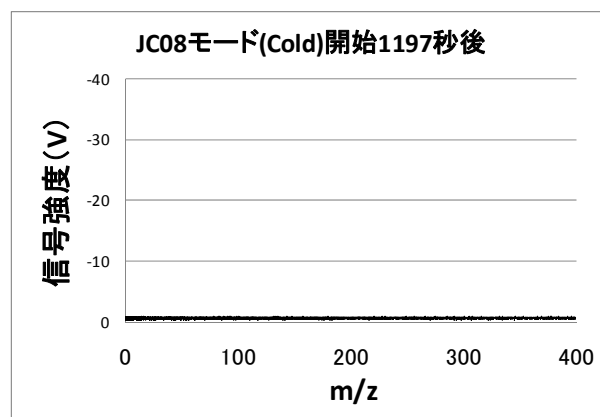
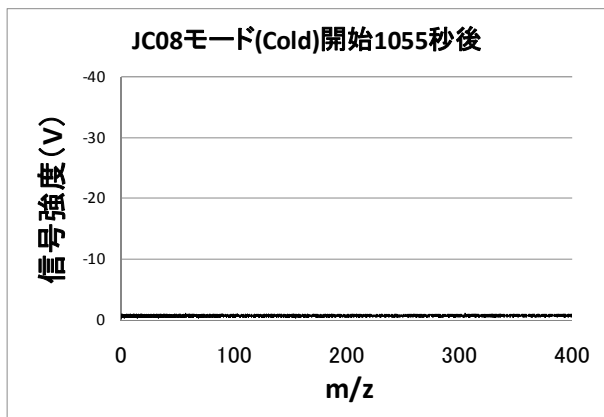
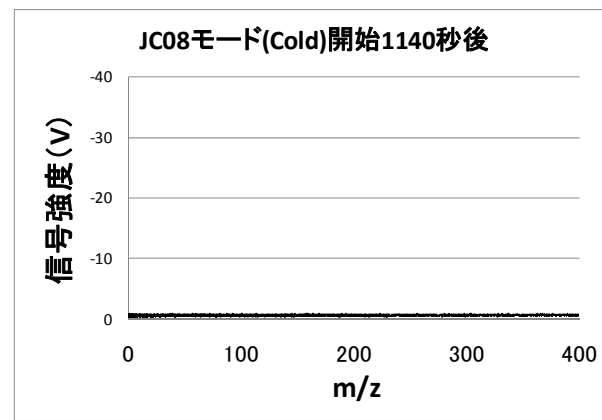
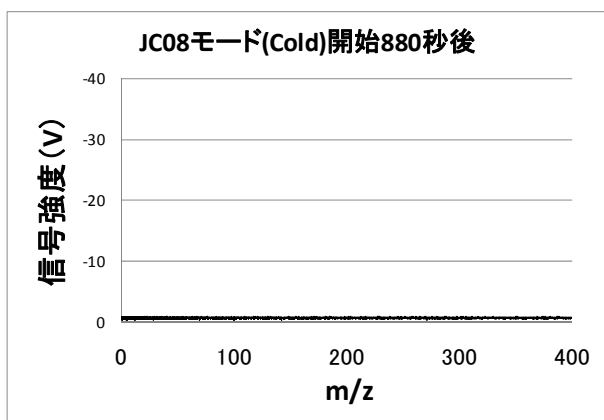
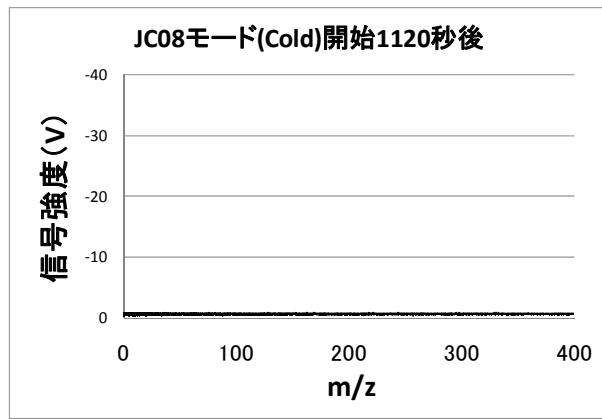
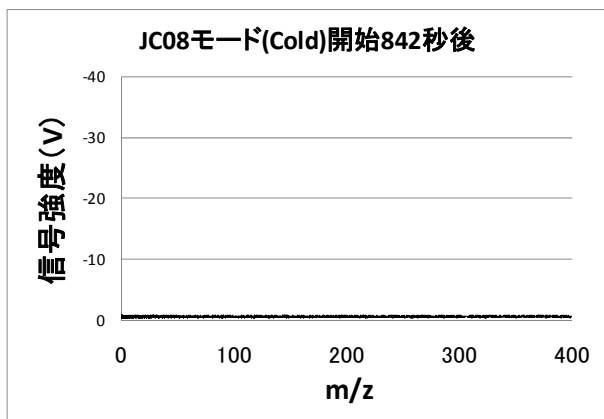


Fig. 4.1.3.19 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08モード\_Cold)

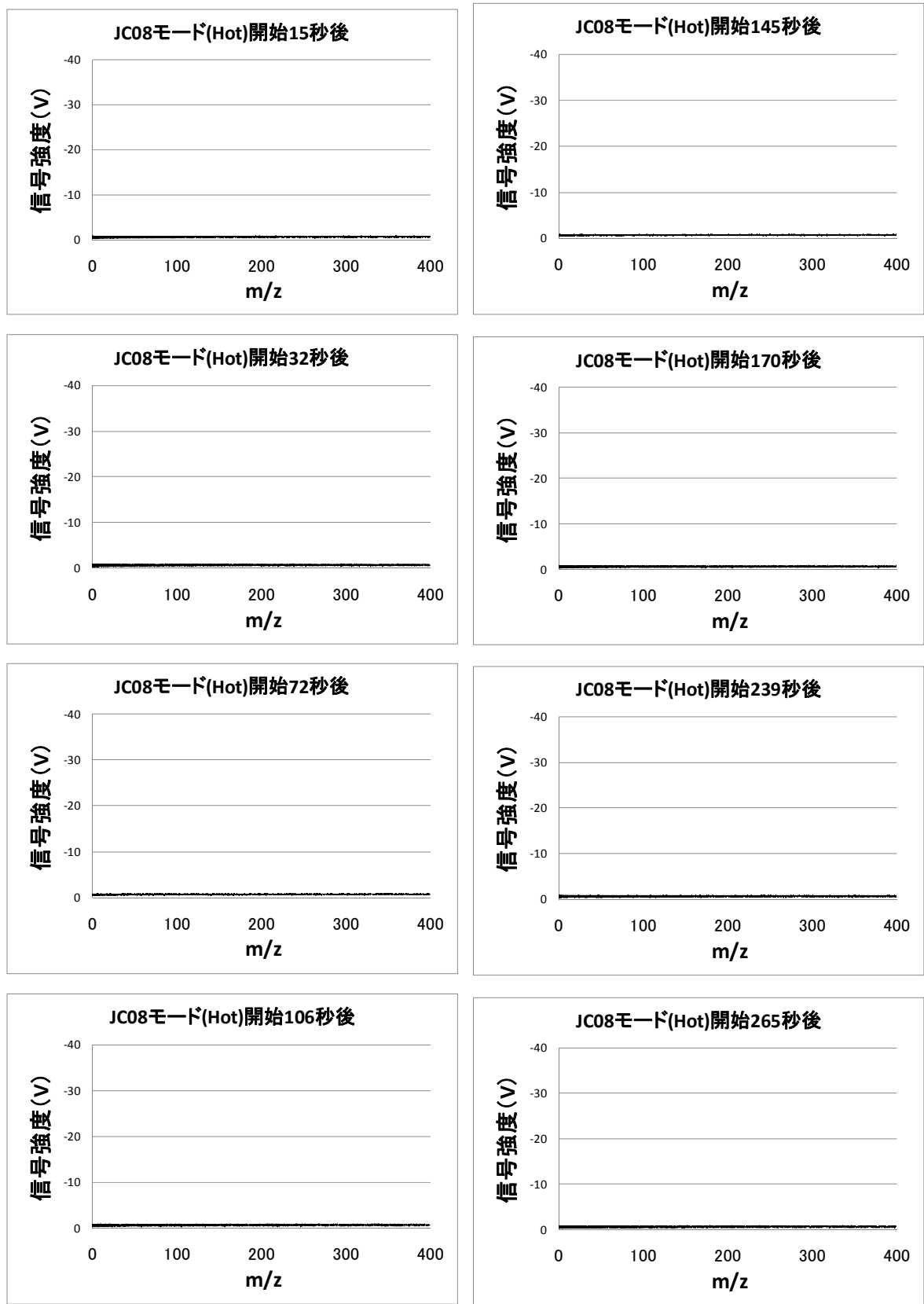


Fig. 4.1.3.20 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル (JC08モード\_Hot)



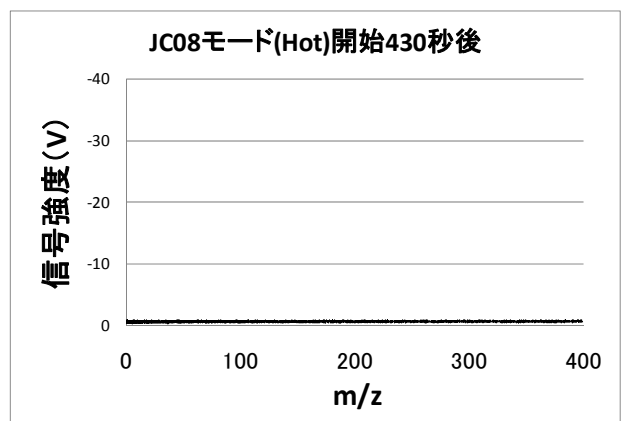
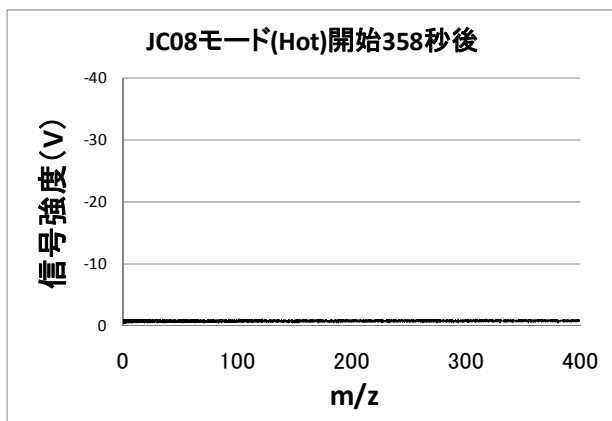
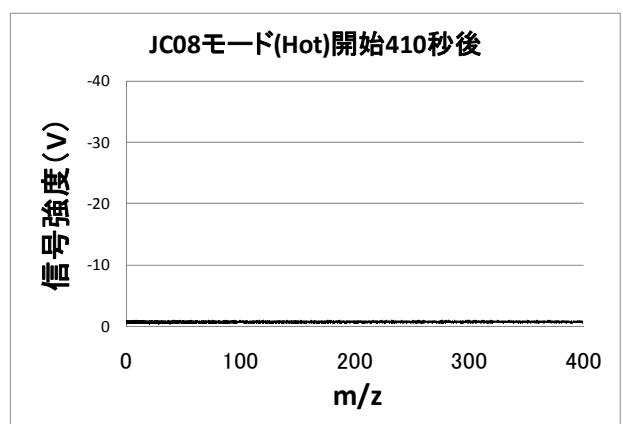
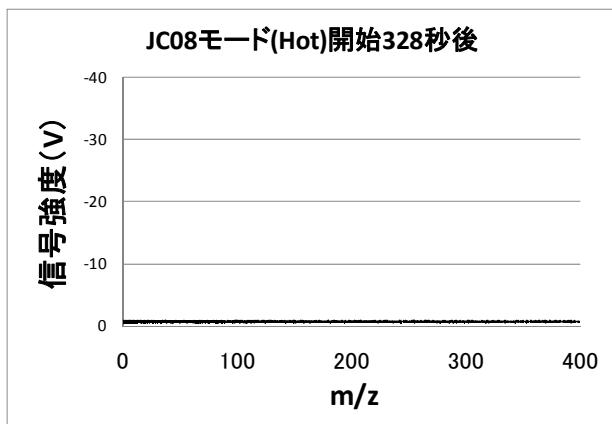
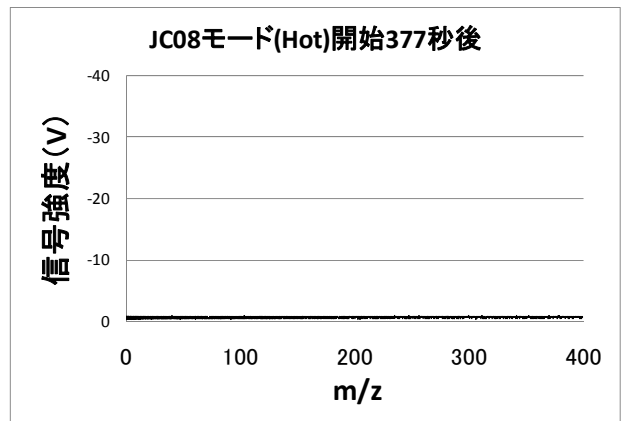
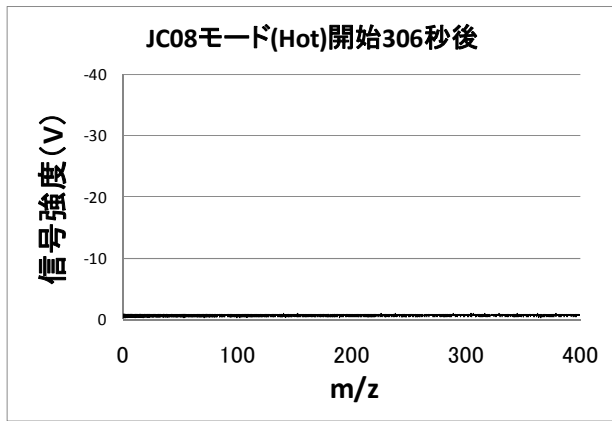


Fig. 4.1.3.21 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08モード\_Hot)

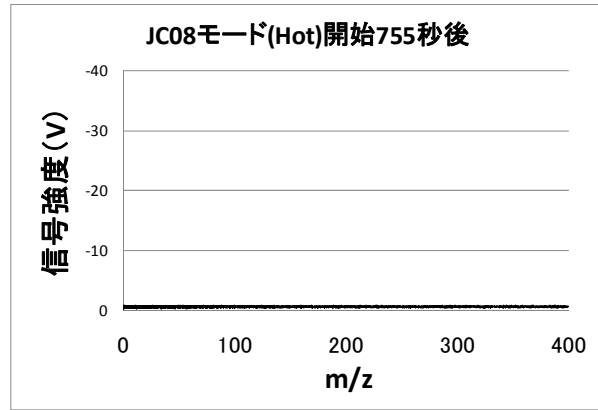
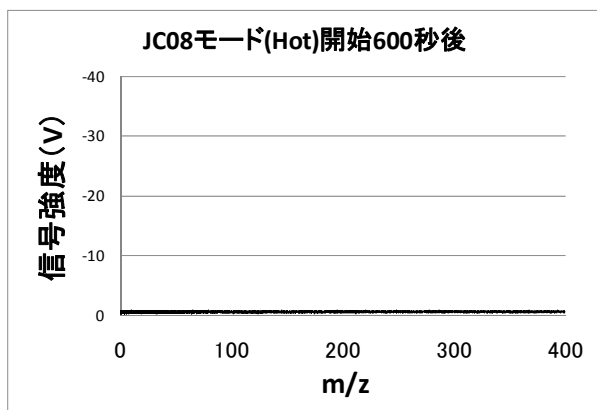
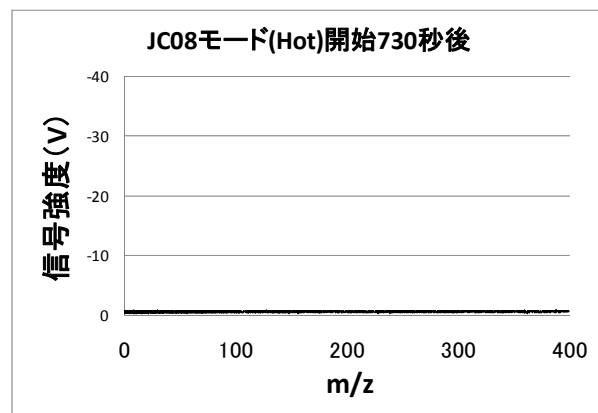
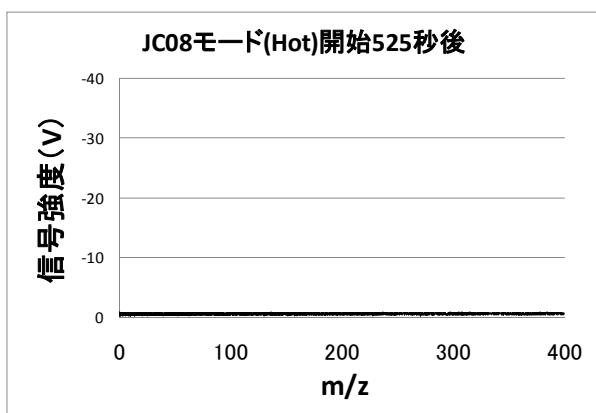
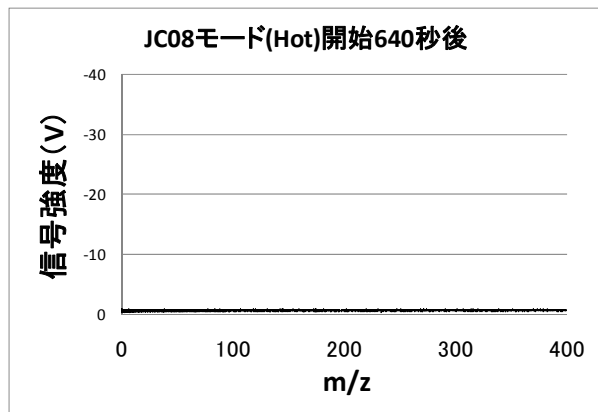
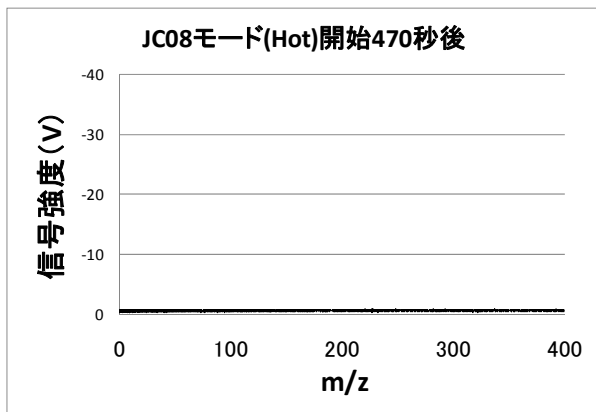


Fig. 4.1.3.22 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08モード\_Hot)

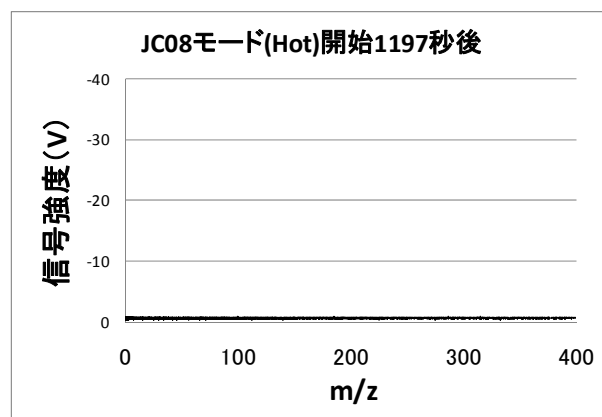
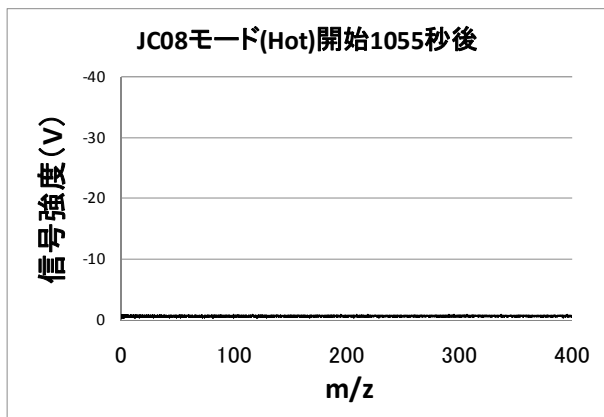
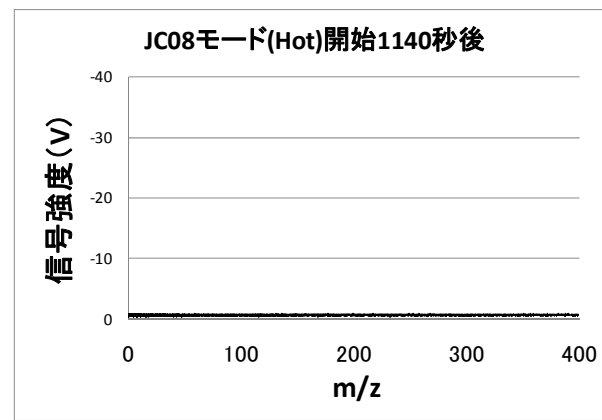
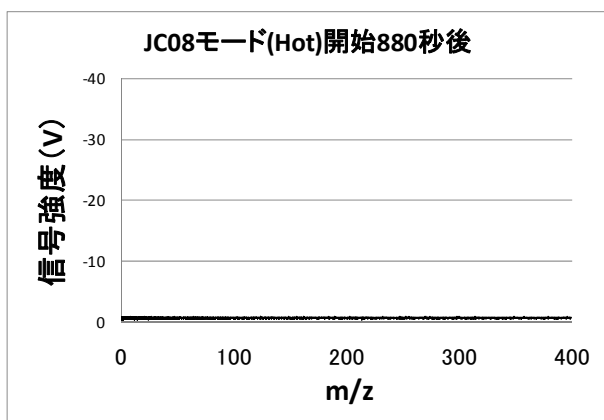
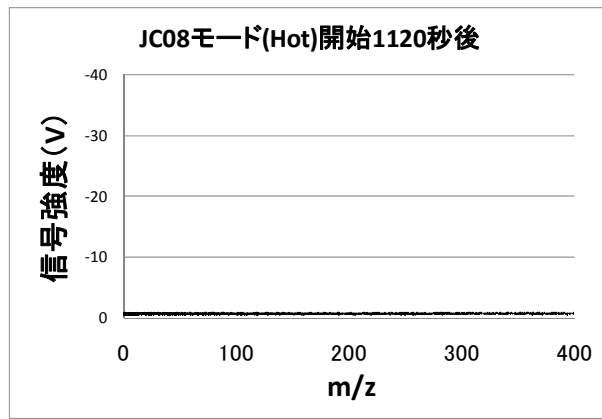
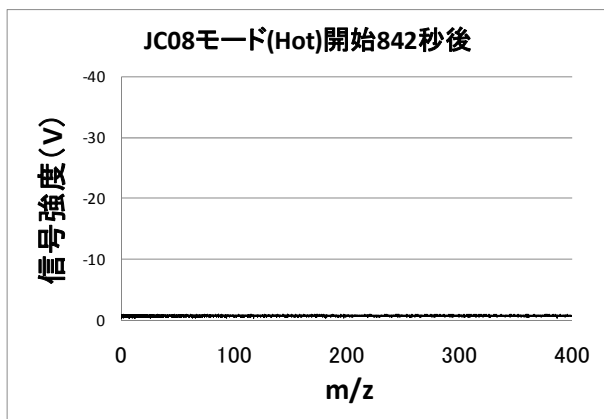
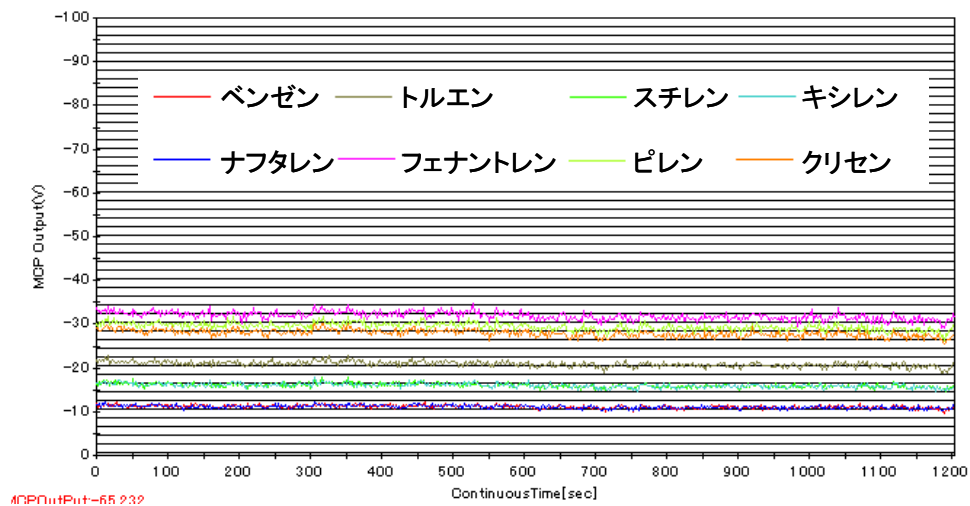
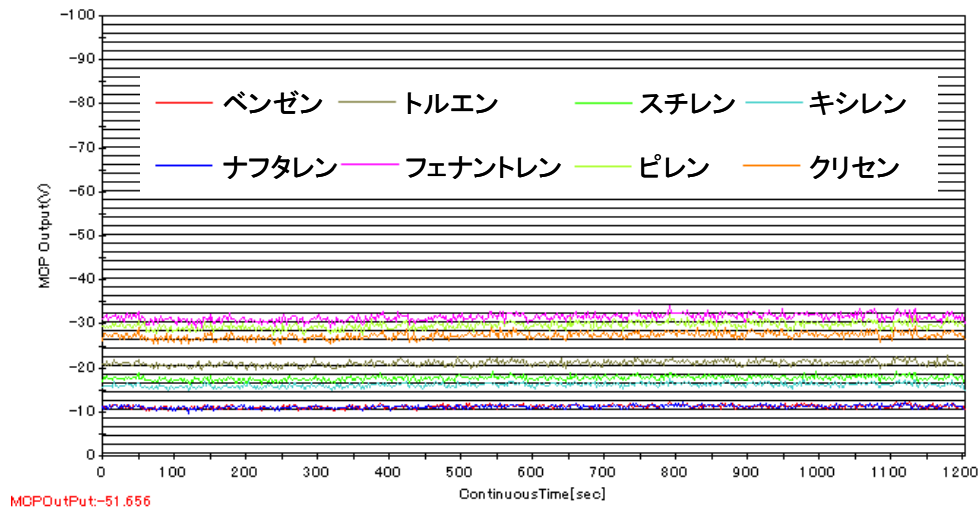


Fig. 4.1.3.23 対照車両（新長期規制対応）の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08モード\_Hot)



JC08\_Cold



JC08\_Hot

Fig. 4.1.3.24 NEDO 開発車両から排出される芳香族成分の過渡変化

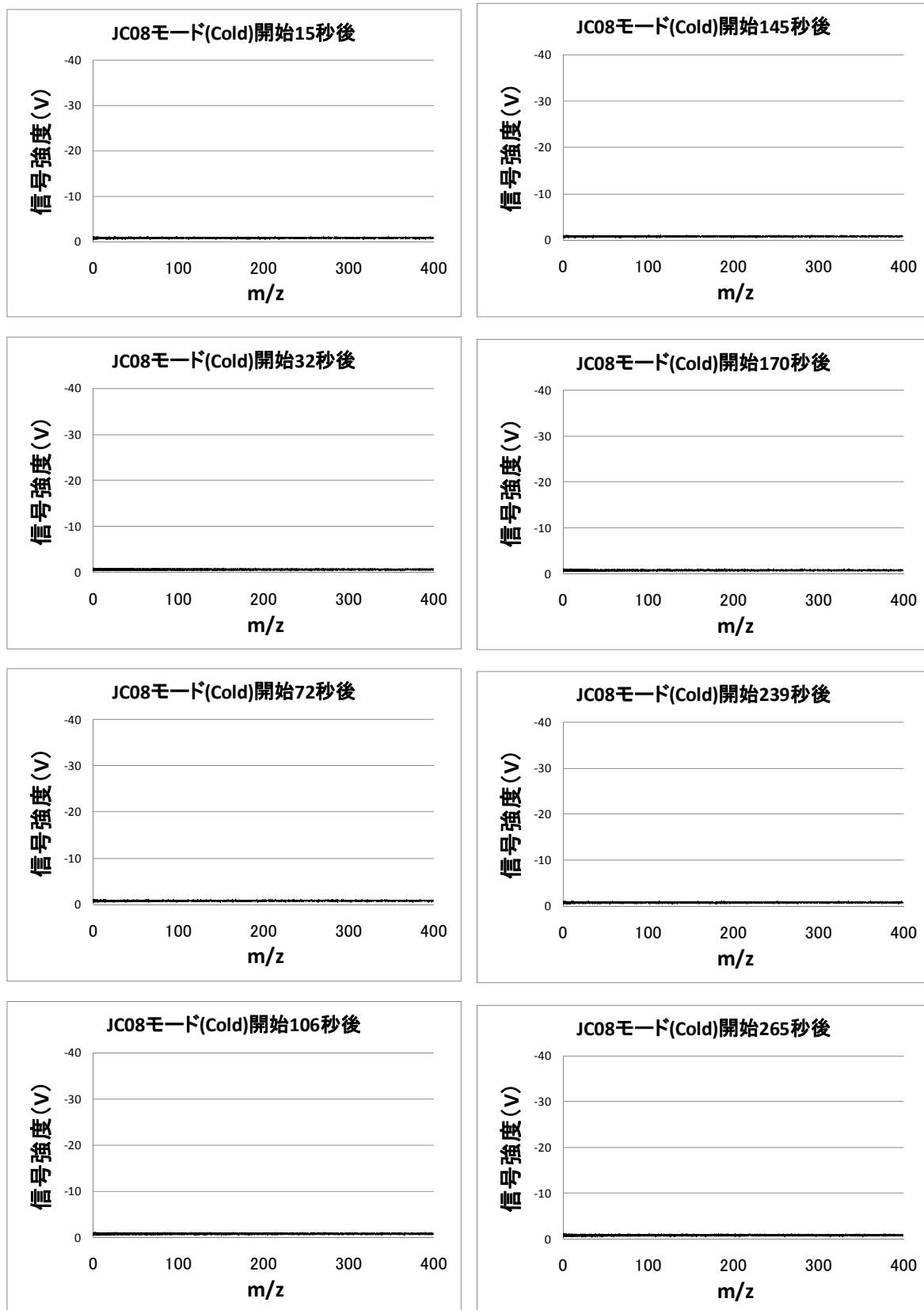


Fig. 4.1.3.25 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル (JC08モード\_Cold)

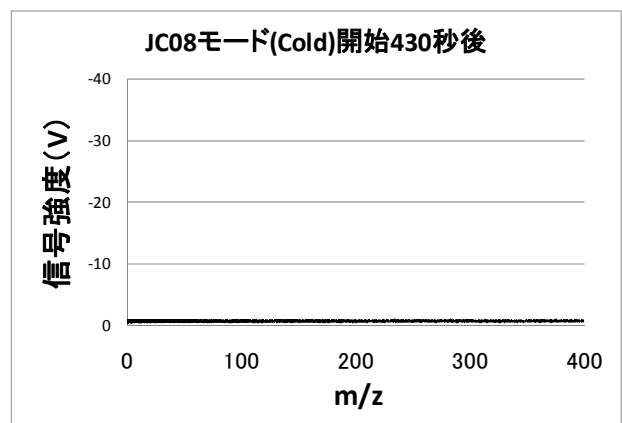
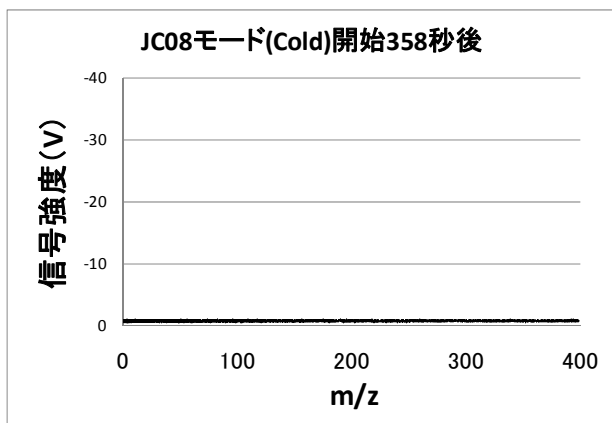
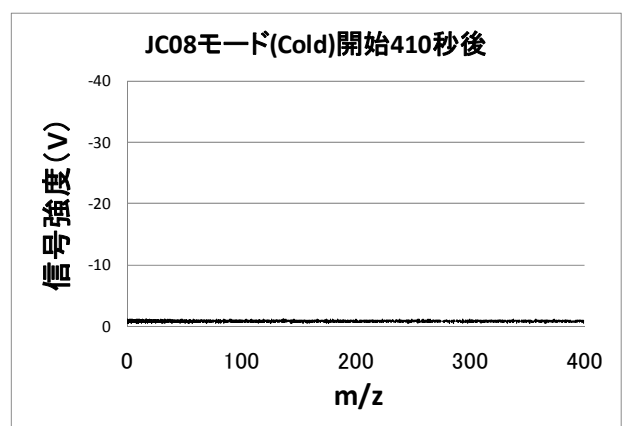
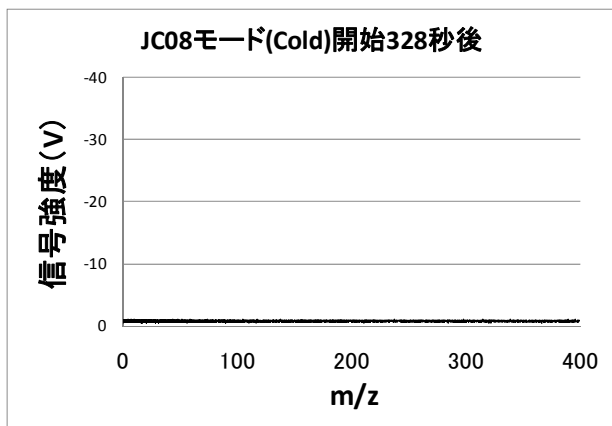
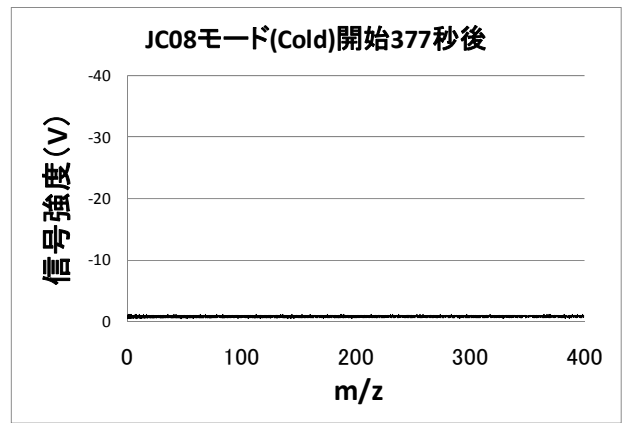
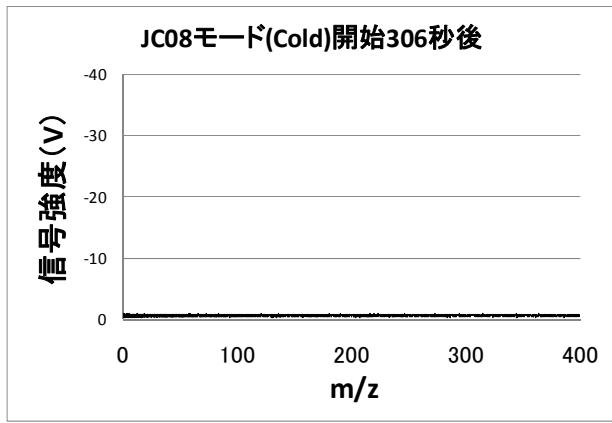


Fig. 4.1.3.26 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08 モード\_Cold)

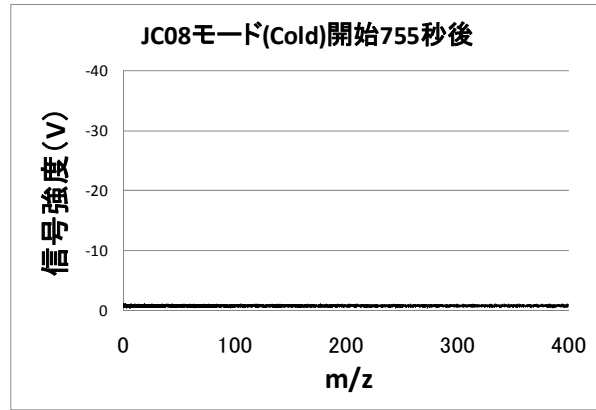
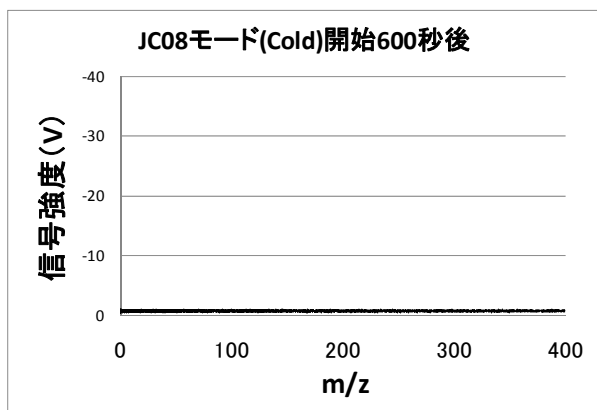
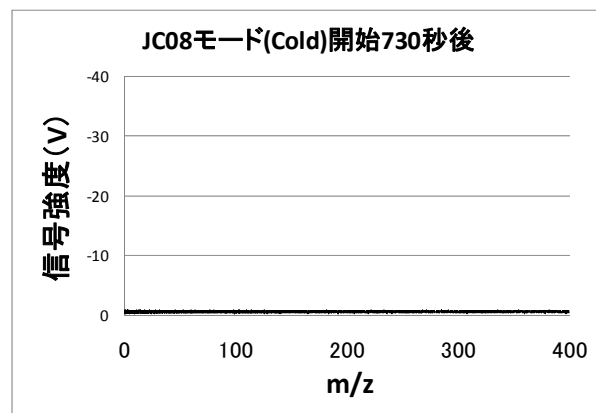
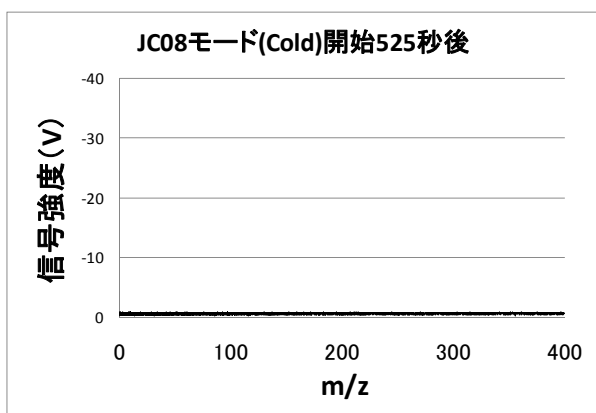
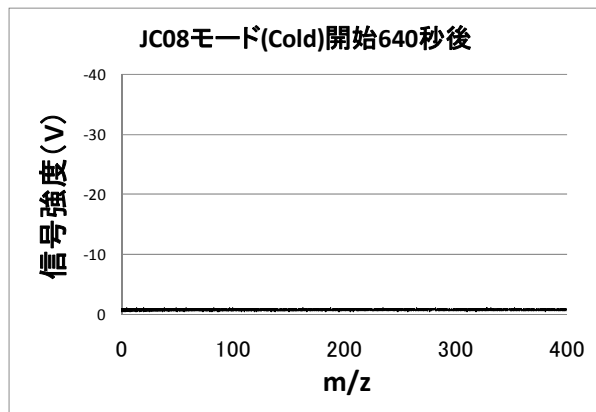
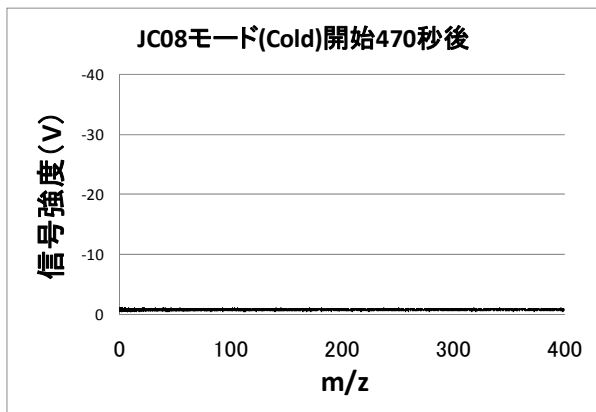


Fig. 4.1.3.27 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08 モード\_Cold)

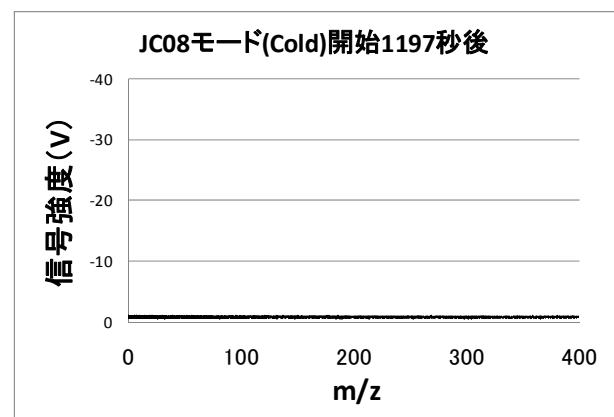
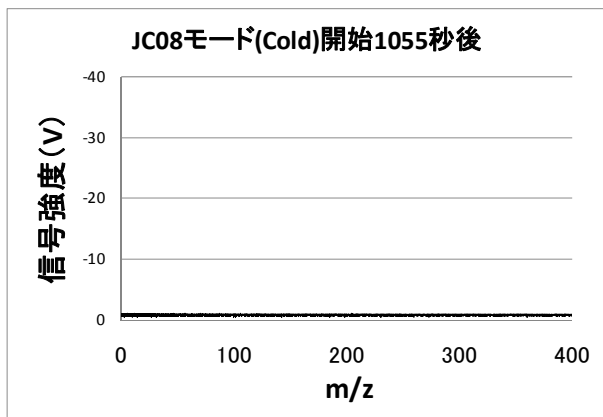
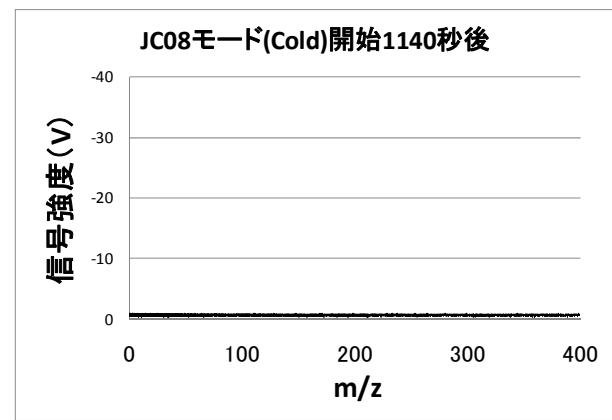
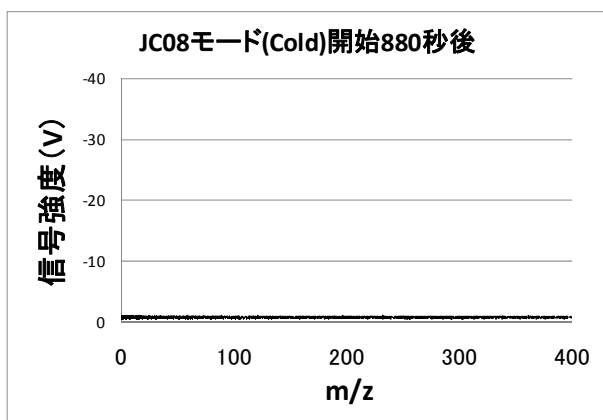
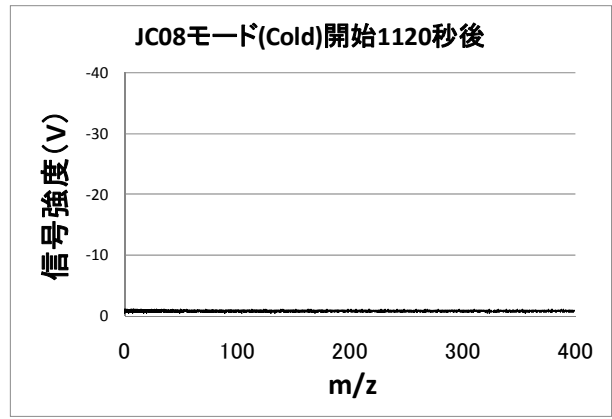
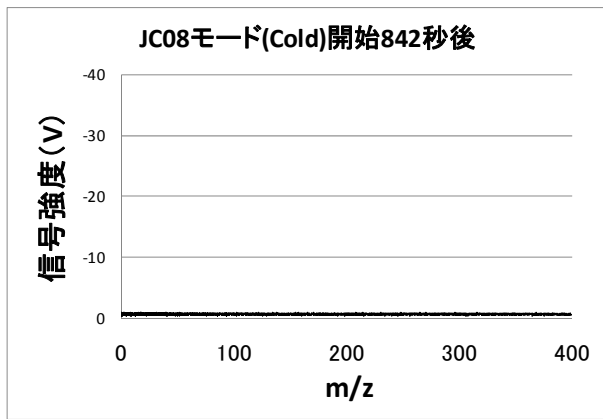


Fig. 4.1.3.28 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08 モード\_Cold)



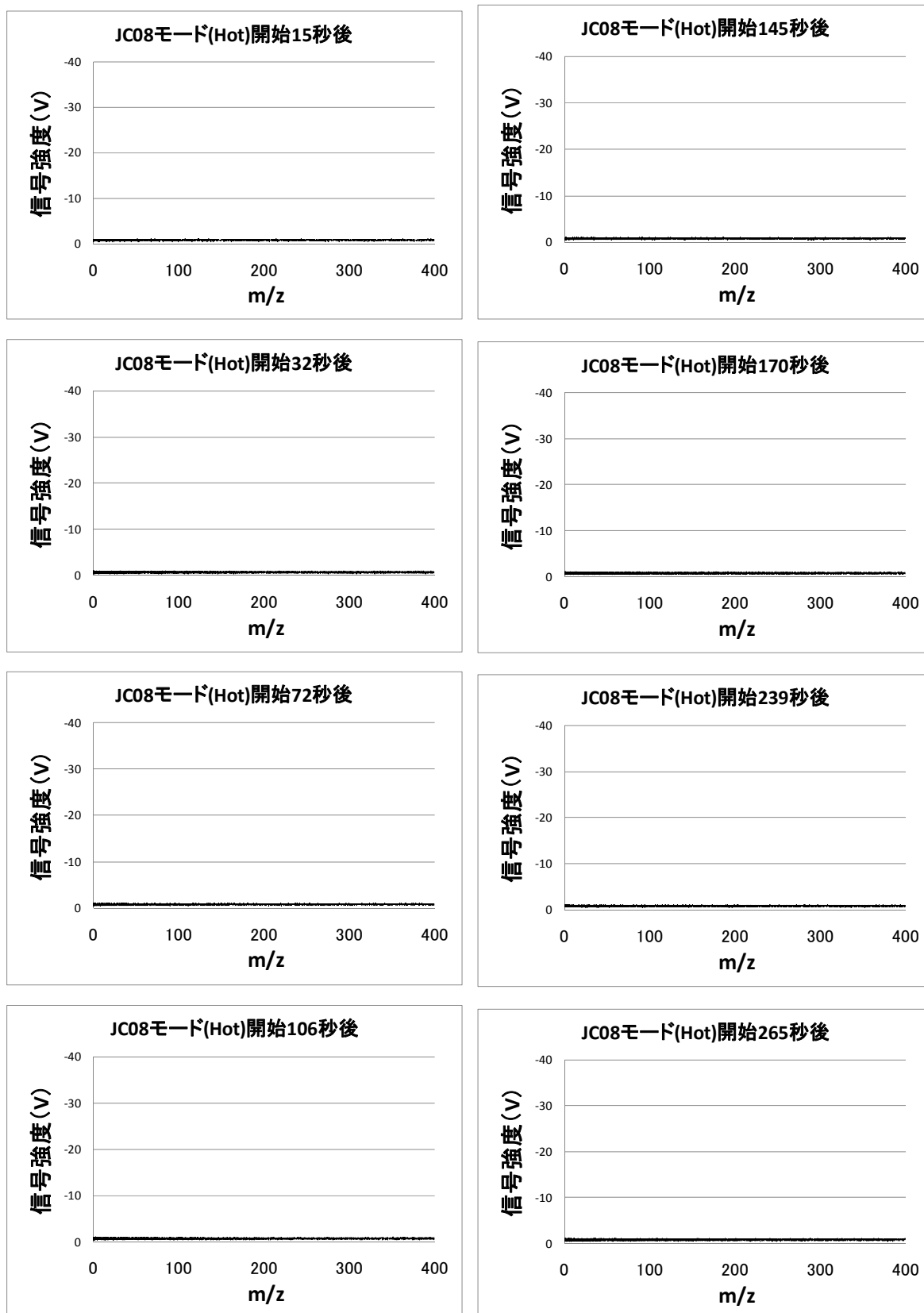


Fig. 4.1.3.29 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル (JC08モード\_Hot)

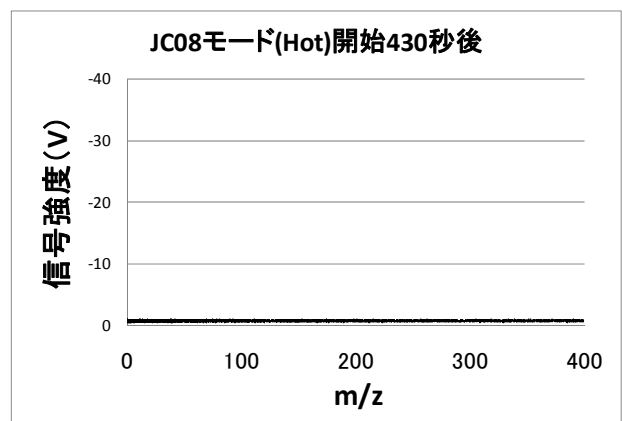
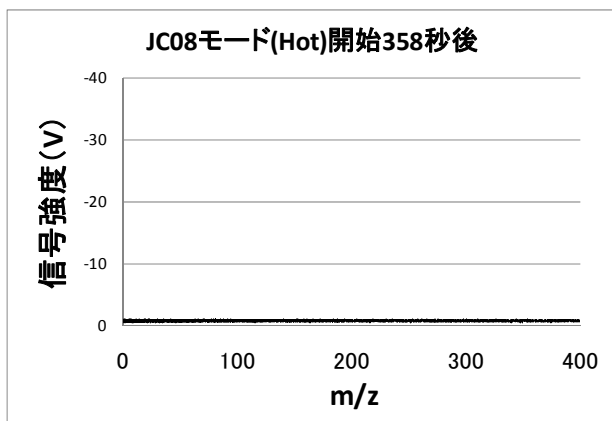
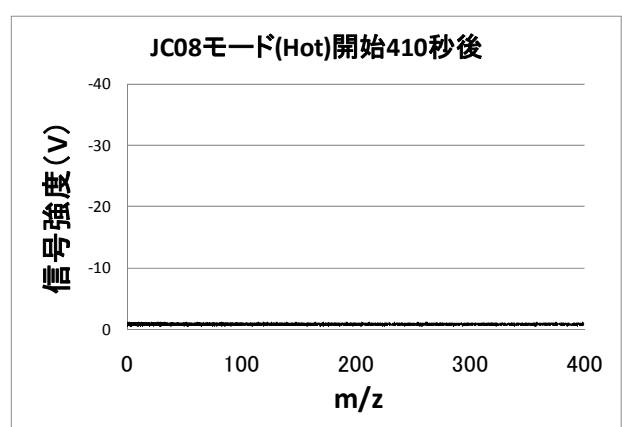
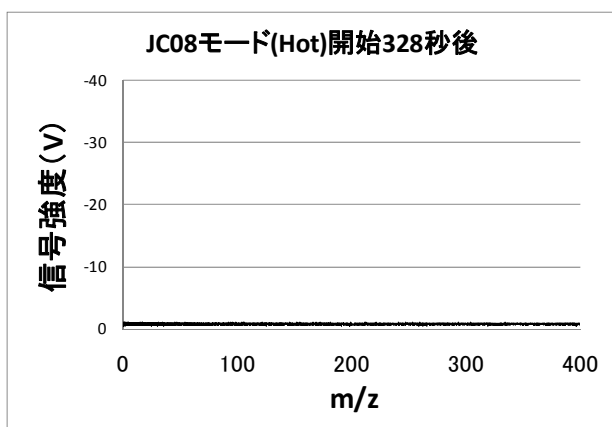
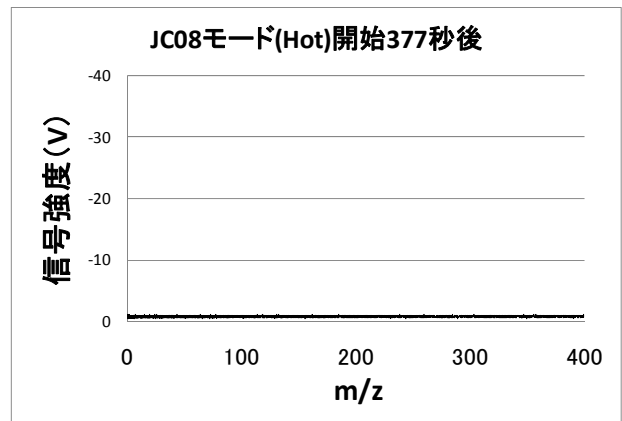
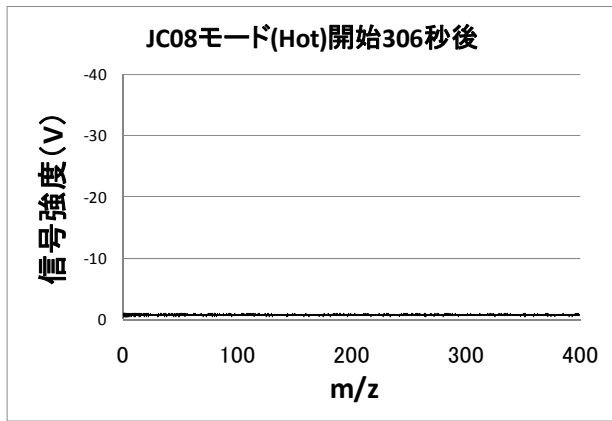


Fig. 4.1.3.30 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08モード\_Hot)

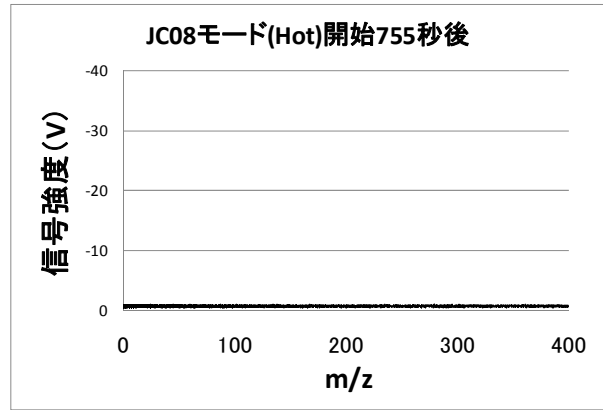
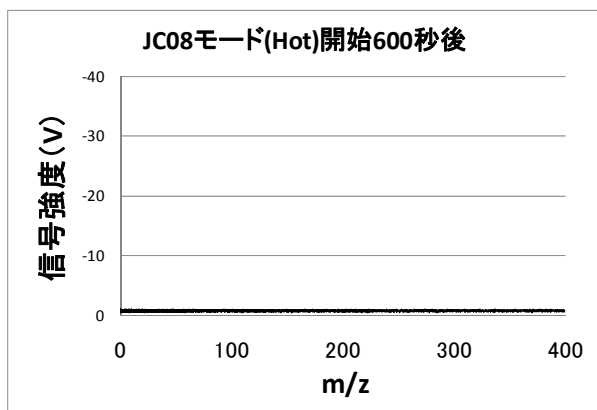
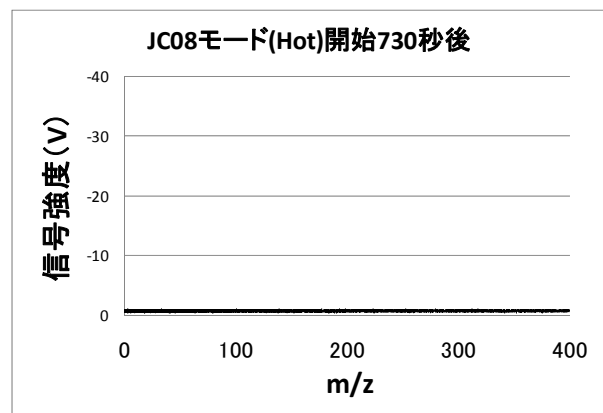
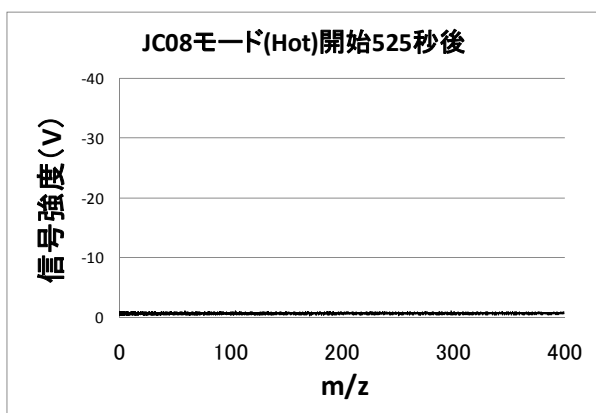
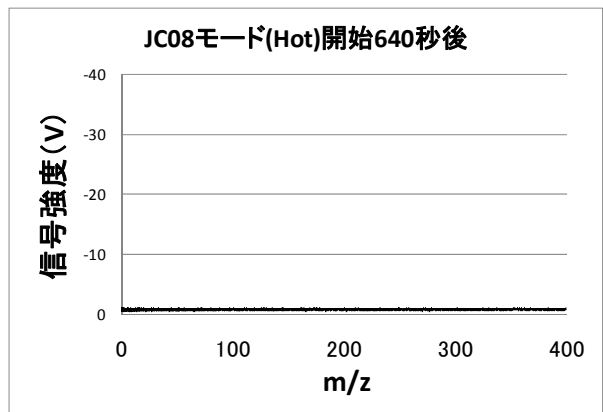
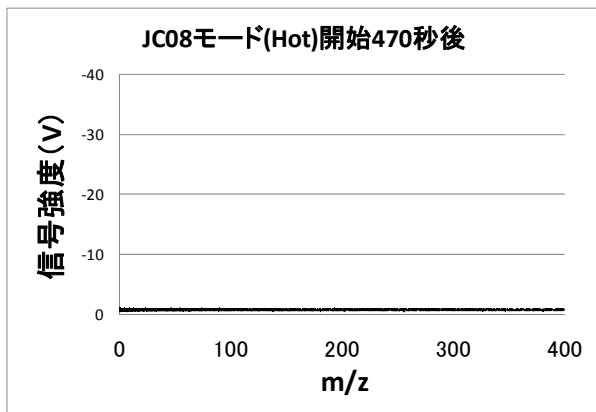


Fig. 4.1.3.31 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル  
(JC08 モード\_Hot)

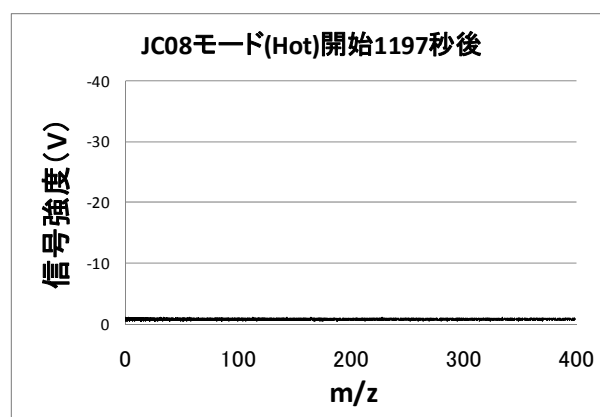
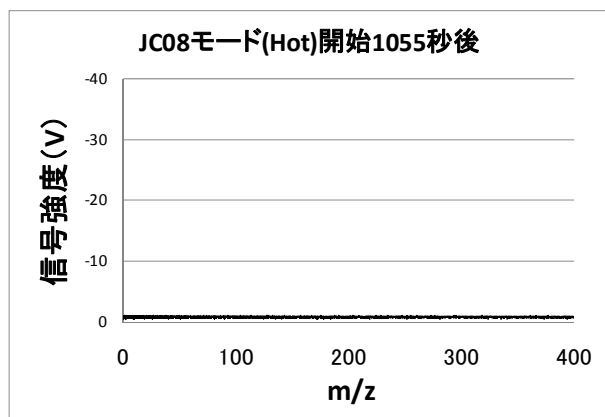
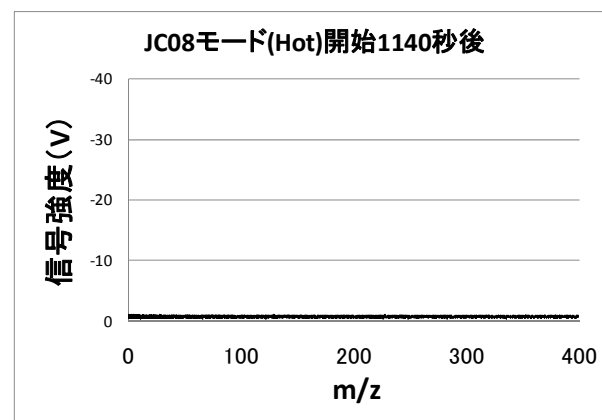
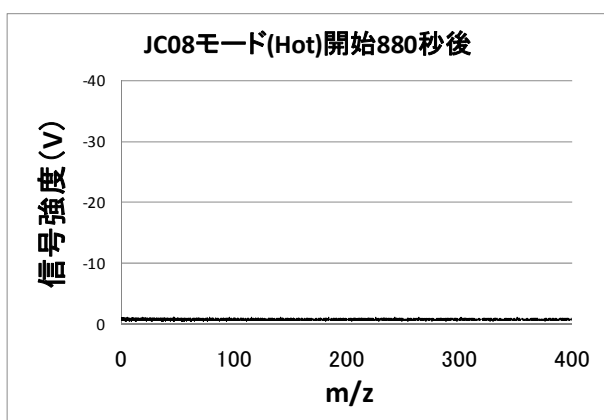
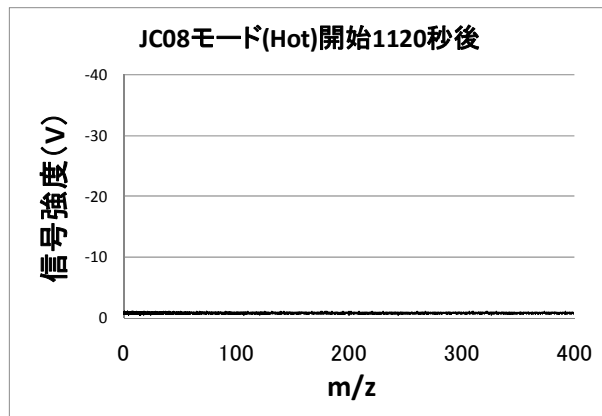
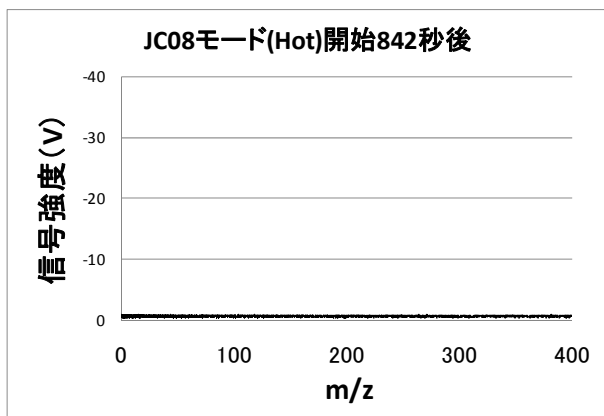


Fig. 4.1.3.32 NEDO 開発車両の直接排出ガスの質量スペクトル (JC08 モード\_Hot)

#### 4.1.3.3 小括

レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置を用いて、NEDO 開発エンジンおよび車両排出ガスの評価を行った。評価試験では、当該エンジン、車両に加え対照となるエンジン・車両についても併せて計測をおこなった。その結果、対照エンジン（長期規制対応）において、減速時に単環～4環の芳香族が検出され、これらの成分の濃度は数～数十 ppb であると推察された。一方で、対照エンジン・車両（新長期規制対応）および NEDO 開発エンジン・車両からは、芳香族炭化水素の信号は観測できず、検出限界以下であった。

よって、NEDO 開発エンジン・車両ともに、新長期規制対応レベルと同等あるいはそれ以下の過渡排出であり、NEDO 開発エンジン・車両は過渡運転時でも特異的な排出増加がないことが明らかになった。

## 4.2 健康影響評価

### 4.2.1 緒言

従来、自動車排気の影響は実験動物を用いた曝露試験で評価されてきた。近年では自動車排気低減装置の開発や新燃料の導入が活発化しているため、新しい技術を用いた自動車排気の影響リスクの早期検出あるいは安全性の確認が求められている。しかしながら、複数の技術により構成されたエンジンシステムから排出される排気の安全性を動物実験によって確認するためには、膨大な技術の組み合わせパターンについて網羅的に解析することとなり、莫大な費用、時間、労力が必要とされ、ほとんど不可能である。そこで様々な評価対象物質について効率的に解析する方法として、*in vitro* 試験が挙げられる。*In vitro* 試験は医薬品の研究開発などにおいて広く活用されており、膨大な数の化合物の中から医薬品として有効であり、かつ毒性が低いと予測される化合物を篩い分け(スクリーニング)、開発候補化合物として数化合物に絞り込むための手法であり、時間・費用のかかる動物/人における薬効・毒性評価に進む前段階において不可欠な手法とされている。同様に多種多様の自動車排気の影響を確認するために、*in vitro* 試験を活用し、簡便に迅速に評価できれば非常に有益である。

JARIでは *in vitro* 試験として、1) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析、2) 細胞毒性試験、3) 変異原性試験 (エームス試験)、を保有している。エームス試験は変異原性を評価するための試験法であり、長い歴史があり、信頼性も高く、医薬品の開発等においても1次スクリーニング系として今なお活用されている代表的な *in vitro* 試験である。しかしながら、エームス試験は重要な試験法ではあるものの変異原性試験であることから、当然のことながら変異原性以外の悪影響を検出することはできない。*in vitro* 試験は生体の機能を局所的に取り出した実験系であり、個々の試験法のみで包括的に健康影響を評価することはできない。自動車排気の影響に対する関心は肺がんのみに留まらず、気道炎症をはじめとして様々な影響を考慮する必要がある。そのため、JARIではエームス試験のみならず、できる限り多様な試験を取り入れている。細胞毒性試験はエームス試験同様、代表的な *in vitro* 試験であり、多くの有害物質を検出可能である。また、遺伝子発現解析は様々な役割を担う遺伝子の発現を網羅的に解析することが可能であり、より多面的な自動車排気の影響評価が実施可能である。JARIではこれらの3つの *in vitro* 試験を中心に自動車排気の影響評価を進めている。

本研究では、排ガス改善技術の有効性を確認することを目的に、細胞曝露装置 (CULTEX システム) を利用した *in vitro* 試験 (DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析、細胞毒性試験、変異原性試験)、さらに排気粒子抽出物のエームス試験を実施し、エンジンおよび車両試験の排気の影響を評価した。

### 4.2.2 細胞曝露試験

#### 4.2.2.1 目的

自動車排気の影響については粒子について注目されており、ディーゼル排気粒子を用いた *in vitro* 研究が広く報告されている。しかしながら、自動車排気の影響として NO<sub>2</sub> や

揮発性有機成分等のガス状成分を無視することはできない。また、人の肺上皮細胞は呼吸により空気に曝されており、ガス状成分の影響を受けやすいことは容易に想像される。そこで、自動車排気の第一標的器官である肺への影響を、ヒト肺上皮細胞株を用いた *in vitro* 試験によりエンジンおよび車両試験の排気の影響を評価することを目的に、細胞曝露装置である CULTEX システムを用い、1) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析、2) 細胞毒性試験、を実施した。

#### 4.2.2.2 方法

##### 1) 細胞および培養方法

培養細胞はヒトⅡ型様肺上皮細胞株 A549 (ATCC 株を使用) を用いた。培地は 10% FBS を含む DMEM/F12 培地 (10 µg/ml ゲンタマイシンを含む) を使用し、定期的に 0.25% トリプシン/1 mM EDTA 液 (インビトロジェン社) でフラスコ底面に付着した細胞をはがした後、継代した。

##### 2) CULTEX システムを用いたガス状物質の曝露

CULTEX チャンバー (Vitrocell, ドイツ, Fig.4.2.2.1) を用い、細胞へ排気を曝露した。曝露排気の流量は培養細胞曝露装置 (柴田科学) で調整した。

6 穴フォーマットのセルカルチャーインサート (FALCON) のメンブラン上に播種した  $3 \times 10^6$  個のヒト肺上皮細胞 A549 を CULTEX チャンバーに固定し、メンブランの下部を血清を含まない DMEM/F12 培地に浸した。混合管圧 (CULTEX チャンバー内圧) は 50Pa、試料供給流量を 8.3 SCCM に調整し、ディーゼル排気は JE05×2 回、ガソリン車排気は JC08×2 回を曝露した。また、ガソリン車については、Cold start+JC08×1 回の曝露も実施した。曝露時の主要排出ガス濃度を表 4.2.2.1 に示す。曝露終了後、セルカルチャーインサートを 6 穴セルカルチャープレートに移し、セルカルチャーインサート内に 2ml の 10% FBS を含む DMEM/F12 培地を加え、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。



Fig.4.2.2.1 CULTEX チャンバー

表 4.2.2.1 培養細胞曝露試験時の希釈排出ガス濃度

エンジン試験

	CULTEX 試験項目	CO (ppm)	CO2 (%)	THC (ppmC)	NOx (ppm)	NO (ppm)	NO2 (ppm)	PM (mg/m3)
希釈空気 対照エンジン(長期)	遺伝子解析	0.39	0.04	2.27	0.02	0.00	0.02	0.00
	遺伝子解析	11.27	0.33	4.76	19.12	15.81	3.31	1.38
	細胞毒性	11.45	0.33	4.83	19.11	15.83	3.29	1.39
希釈空気 対照エンジン(新長期)	遺伝子解析	0.07	0.04	2.20	0.01	0.00	0.01	0.00
	遺伝子解析	0.34	0.34	2.02	4.68	2.78	1.91	0.25
	細胞毒性	0.31	0.34	1.99	4.83	3.16	1.68	0.19
希釈空気 NEDOエンジン	遺伝子解析	0.66	0.04	2.46	0.06	0.00	0.06	0.00
	遺伝子解析	0.69	0.35	2.44	1.09	0.10	0.99	0.00
	細胞毒性	0.69	0.35	2.41	0.74	0.09	0.65	0.01

車両試験

	CULTEX 試験項目	CO (ppm)	CO2 (%)	THC (ppmC)	NOx (ppm)	NO (ppm)	NO2 (ppm)	PM (mg/m3)
対照車両	希釈空気	0.31	0.07	2.80	0.05	0.04	0.02	0.00
	JC08H	0.00	0.70	3.76	2.86	2.21	0.65	0.00
	JC08H	0.00	0.70	3.72	2.37	1.85	0.52	0.00
	希釈空気	0.29	0.06	2.84	0.17	0.16	0.01	0.00
	JC08C	0.61	0.75	4.18	8.68	7.18	1.50	0.09
	JC08C	0.76	0.74	4.12	8.47	7.00	1.47	0.03
NEDO車両	希釈空気	0.21	0.07	2.58	0.01	0.01	0.00	0.00
	JC08H	0.00	0.35	7.51	0.07	0.04	0.03	0.00
	JC08H	0.00	0.35	7.20	0.04	0.03	0.01	0.00
	希釈空気	0.46	0.06	2.84	0.05	0.05	0.00	0.00
	JC08C	4.79	0.40	14.04	0.15	0.12	0.03	0.01
	JC08C	6.88	0.40	14.71	0.11	0.09	0.02	0.00

3) DNA マイクロアレイ法 – 遺伝子抽出～ハイブリダイゼーション～洗浄～画像読取 –

4 時間処置後、細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (キアゲン社) を用いて、total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、260 nm と 280 nm の吸光度を測定することにより濃度を求め、マイクロチップ型電気泳動装置 (アジレントテクノロジーズ社) を用いて品質を確認した。



0.8 µg の total RNA を Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit を用いて、cDNA とした後、Cyanine3 (Cy3) -標識 cRNA を合成した。不要な cDNA や cRNA に取り込まれなかった蛍光色素を RNeasy Mini Kit を用いて除去し、解析に使用する標識 cRNA とした。

Cy3-標識 cRNA をハイブリダイゼーション溶液とし、Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイとガスケットスライド (アジレントテクノロジーズ社) の間に封入し、マイクロアレイハイブリダイゼーションチャンバー (アジレントテクノロジーズ社) 内に装着し、ハイブリダイゼーション用恒温装置 (UVP 社) でインキュベートした。17 時間後、ハイブリダイゼーションチャンバーからオリゴ DNA マイクロアレイを取り出し、洗浄した。

洗浄した Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイは DNA マイクロアレイスキャナ (アジレントテクノロジーズ社) および Agilent Scan Control ソフト (アジレントテクノロジーズ社) を用いて画像化した。得られた画像から Feature Extraction ver.9.5 (アジレントテクノロジーズ社) を用いて、蛍光強度を数値化した。遺伝子発現の評価は GeneSpringGX ver.10.1 (アジレントテクノロジーズ社) を用いて行った。

#### 4) DNA マイクロアレイ法による個別の遺伝子発現解析

ディーゼル排気およびディーゼル排気粒子により変動することが知られている代表的な遺伝子について任意に抽出し、各物質による発現の強度を示した。抽出した遺伝子を表 4.2.2.2 に示す。抽出した理由は以下に示す。

チトクローム P450 (CYP) は薬物代謝酵素であり、CYP1A1、CYP 1A2、CYP1B1 は多環芳香族炭化水素 (PAH) により発現が亢進することが知られており、ディーゼル排気曝露や粒子の処置により発現が誘導される。これらの酵素による代謝産物は発がん性を示すことが知られており、発がんに係わる遺伝子としても注目する必要がある。

ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は酸化ストレスにより誘導されることが知られている。ディーゼル排気曝露および粒子の処置により誘導されることがよく知られており、酸化ストレスマーカーとして解析されている。また、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) は、生体内において異物をグルタチオンに結合させる作用を持つ Phase II 解毒酵素の一つである。酸化ストレスおよび NO ストレスに対する細胞応答の過程で起きるタンパク質の S-グルタチオニル化反応において中心的な役割を果たしている。また、近年、GST 自体がレドックス制御を受けること、細胞内 GST が酸化ストレスに応答して核内に移行すること、GST の核内移行を阻害すると酸化ストレスによるアポトーシスが増加することが報告され、細胞内レドックス制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

マトリックス分解酵素 (MMP) は、細胞外マトリックスを分解する酵素であり、生理学的及び病理的な組織破壊に重要な役割を果たしている。細胞外マトリックスの IV 型コラーゲンやラミニンを分解する MMP-2 および MMP-9 は炎症反応や癌の浸潤に関連することが知られている。

エピジェネティクスは、クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることに起因する遺伝学あるいは分子生物学の研究領域であり、DNA メチル化とヒストンの化学修飾による遺伝子発現変化が知られている。DNA のメチル化により、がん抑制遺伝子の

発現が抑えられることが指摘されており、近年では突然変異と並ぶ、重要な発がん機構として認知されている。また、ヒストンアセチル化および脱アセチル化による転写制御が炎症に重要であることも知られている。

また、大気およびディーゼル排気の影響の一つとして炎症反応が重要である。それらの刺激により、肺上皮細胞において発現が亢進することが指摘されている炎症性サイトカイン、好酸球遊走活性を持つケモカインおよび接着分子を選出した。

**Fig. 4.2.2.3** において遺伝子発現が 1 以上の発現が亢進した遺伝子をオレンジ色で示し、-1 以下の発現が抑制した遺伝子を水色で示した。

表 4.2.2.2 発現の変動が予想される遺伝子

遺伝子種		略称	
代謝酵素 (化学物質応答)	PAH	チトクローム P450 1A1	CYP1A1
		チトクローム P450 1A2	CYP1A2
		チトクローム P450 1B1	CYP1B1
酸化ストレス応答	ヘムオキシゲナーゼ-1	HO-1	
	グルタチオン S トランスフ ェラーゼ M1	GSTM1	
	グルタチオン S トランスフ ェラーゼ P1	GSTP1	
マトリックス分解酵素	マトリックスポロテイナー ゼ 2	MMP2	
	マトリックスポロテイナー ゼ 9	MMP9	
エピジェネティクス	DNA メチル化	DNA メチル化酵素 1	DNMT1
		DNA メチル化酵素 3A	DNMT3A
		DNA メチル化酵素 3B	DNMT3B
	ヒストン脱アセチル 化酵素	ヒストン脱アセチル化酵 素 2	HDAC2
		ヒストン脱アセチル化酵 素 5	HDAC5
		ヒストン脱アセチル化酵 素 8	HDAC8
ヒストンアセチル基 転移酵素	ヒストンアセチルトラン スフェラーゼ 1	HAT1	
炎症反応	シクロオキシゲナーゼ 2	PTGS2	
	サイトカイン	腫瘍壊死因子 $\alpha$	TNF
		インターロイキン 1 $\beta$	IL1 $\beta$
		インターロイキン 6	IL6
		インターロイキン 6 受容体	IL6R
		インターロイキン 8	IL8
	ケモカイン	EOTAXIN1	CCL11
		EOTAXIN2	CCL24
細胞間接着分子 1	ICAM1		

5) DNA マイクロアレイ法による遺伝子群の発現変動の解析

個別の遺伝子発現を解析する一方で、解析可能な全遺伝子、特定の機能／疾患に関連する遺伝子群の発現変動を解析することを目的に、遺伝子群の発現の標準偏差、亢進/抑制した遺伝子数を比較した。解析した遺伝子群とその理由を表 4.2.2.3 に示す。

表 4.2.2.3 選択した項目 (JARI 分類) とその理由

遺伝子群	Keyword	解析理由
全遺伝子		予想していない遺伝子発現変動を検証可能にするため
化学物質曝露	P450	自動車排気粒子に含まれている化学成分により、P450 関連の酵素が活性化することが知られている
抗酸化酵素	GST, SOD, HO	自動車排気粒子の酸化ストレスに防御的に産生される酵素
癌関連	Cancer, Carcino*, Tumor	自動車排気の影響の一つとして癌に着目
炎症関連	Interleukin , Chemokine	自動車排気の影響の一つとして炎症に着目

6) 細胞毒性試験

本項 2) で処置した細胞について、以下の手順で細胞生存率を評価した。

- ・細胞株                    ヒト肺上皮細胞 A549
- ↓
- ・細胞調整                 $5.56 \times 10^4$  cells/ml
- ↓
- ・播種液量                90  $\mu$ l/well    ( $0.5 \times 10^4$  cells/well)                    96 穴プレート
- ↓
- ・培養                      24 時間
- ↓
- ・最終細胞濃度           $1.0 \times 10^4$  cells/ml
- ↓
- ・処置                      100 倍希釈した被験物質を添加(1 濃度当たり 3well)                    DMSO 最終濃度 0.1%
- ↓
- ・処置時間                48 時間
- ↓
- ・試薬処理                細胞計数試薬 WST-8 を 1well あたり 10  $\mu$ l 添加
- ↓
- ・反応時間                1 時間静置
- ↓
- ・吸光度測定             450nm で測定し、細胞生存率を評価
- ↓
- ・評価法                    細胞生存率を 50%に抑える濃度(IC50)により細胞毒性を評価

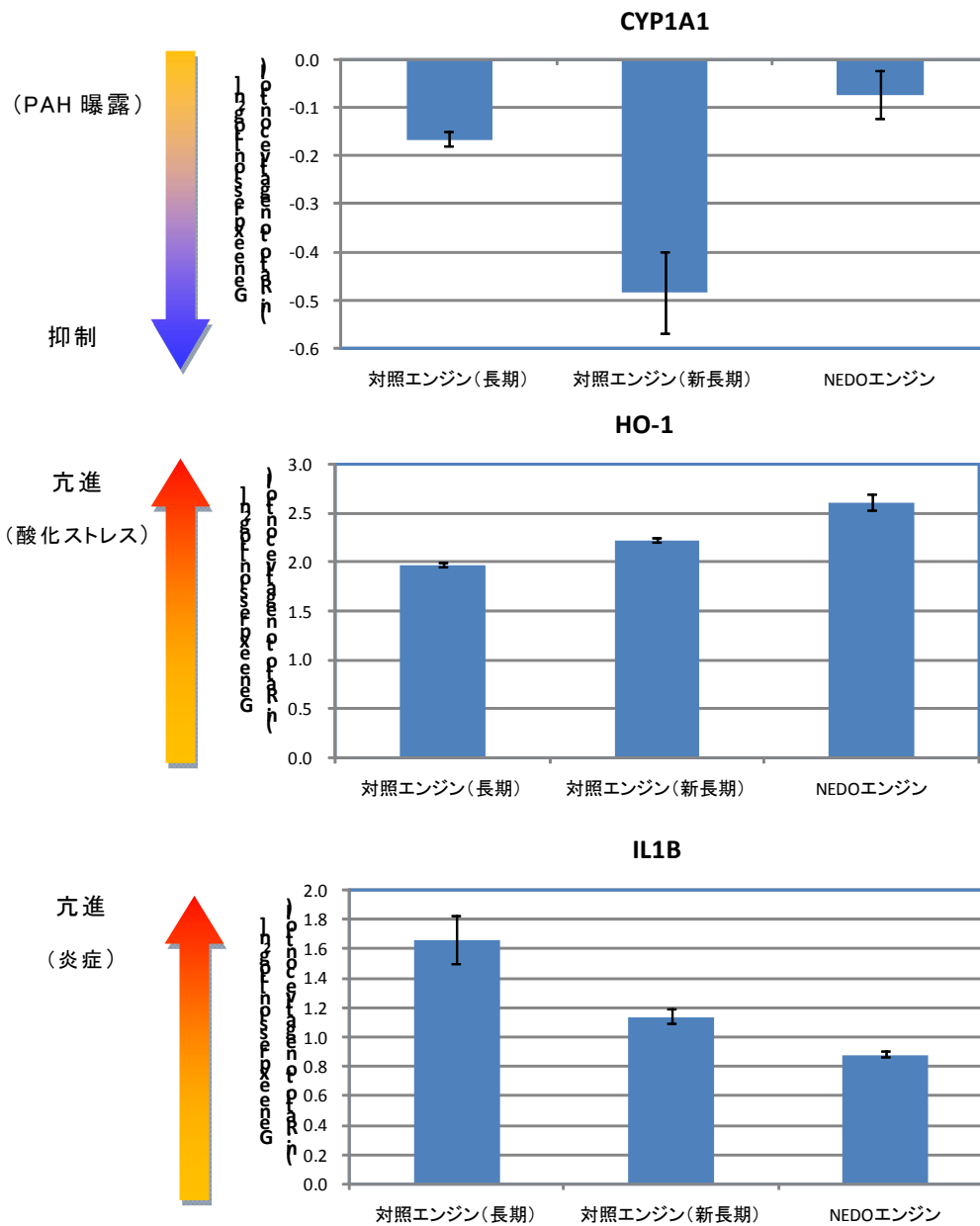
4.2.2.3 結果

1) DNA マイクロアレイ – エンジン試験 –

(1) 個々の遺伝子の発現比較

対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）および NEDO エンジン排気の人肺上皮細胞 A549 への曝露が遺伝子発現に及ぼす影響を **Fig.4.2.2.2** に示す。PAH により発現が亢進することが知られている CYP1A1 を化学物質曝露マーカーとして、HO-1 を酸化ストレスマーカーとして、炎症マーカーとして IL-1 $\beta$  にとくに着目した。CYP1A1 はいずれの排気でも抑制傾向が示された。HO-1 はいずれの排気でも発現が亢進したが、NEDO エンジンが他の 2 つのエンジン排気よりも強い作用を示した。IL-1 $\beta$  はいずれの排気でも発現が亢進したが、NEDO エンジン、対照エンジン（新長期）、対照エンジン（長期）の順番で作用が弱かった。

その他の注目される遺伝子について **Fig.4.2.2.3** に示す。CYP1A2、CYP1B1 も CYP1A1 同様に発現の抑制傾向が認められた。MMP、GST、DNMT は排気による発現変動の違いはほとんど認められなかった。抗炎症作用に関連する HDAC5 遺伝子は対照エンジン（長期）で発現が強く亢進したが、対照エンジン（新長期）、NEDO エンジンでは同様の発現亢進作用は認められなかった。炎症関連遺伝子については、対照エンジン（新長期）、NEDO エンジンに比較し、対照エンジン（長期）による遺伝子発現の亢進作用が強かった。CCL11 と 24 については対照エンジン（新長期）による発現亢進作用が目立ったが、CCL11 については値のバラツキが大きかった。



**Fig.4.2.2.2** 対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）および NEDO エンジン排気のヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が CYP1A1、HO-1 および IL-1 $\beta$  遺伝子発現に及ぼす影響

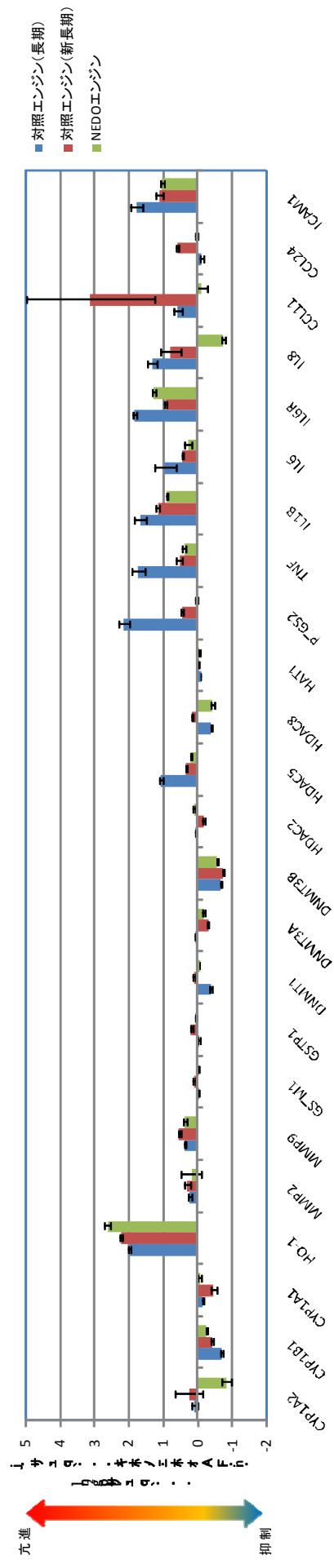


Fig.4.2.2.3 対照エンジン(長期), 対照エンジン(新長期)および NEDO エンジン排気の人肺上皮細胞 A549 への曝露が遺伝子発現に及ぼす影響

(2) 全遺伝子の発現変動比較

対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）および NEDO エンジン排気へのヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が全遺伝子の発現変動に及ぼす影響を Fig.4.2.2.4 に示す。各排気曝露による全遺伝子の発現変動として、①全遺伝子発現の標準偏差、②2 倍以上発現が亢進した遺伝子数、③0.5 倍以下発現が抑制した遺伝子数、に着目した。

①標準偏差の比較では、対照エンジン（新長期）の変動が他よりわずかに大きい傾向であったが、ほとんど差はなかった。②発現亢進遺伝子数の比較では、対照エンジン（長期）に比べ、対照エンジン（新長期）の方が亢進遺伝子数は少なく、さらに NEDO エンジンでは対照エンジン（長期）の 5 分の 1 以下であった。③発現抑制遺伝子数の比較では、対照エンジン（長期）に比べ、対照エンジン（新長期）の方が明らかに抑制遺伝子数は少なく、さらに NEDO エンジンでも対照エンジン（長期）より明らかに抑制遺伝子数が少なかった。

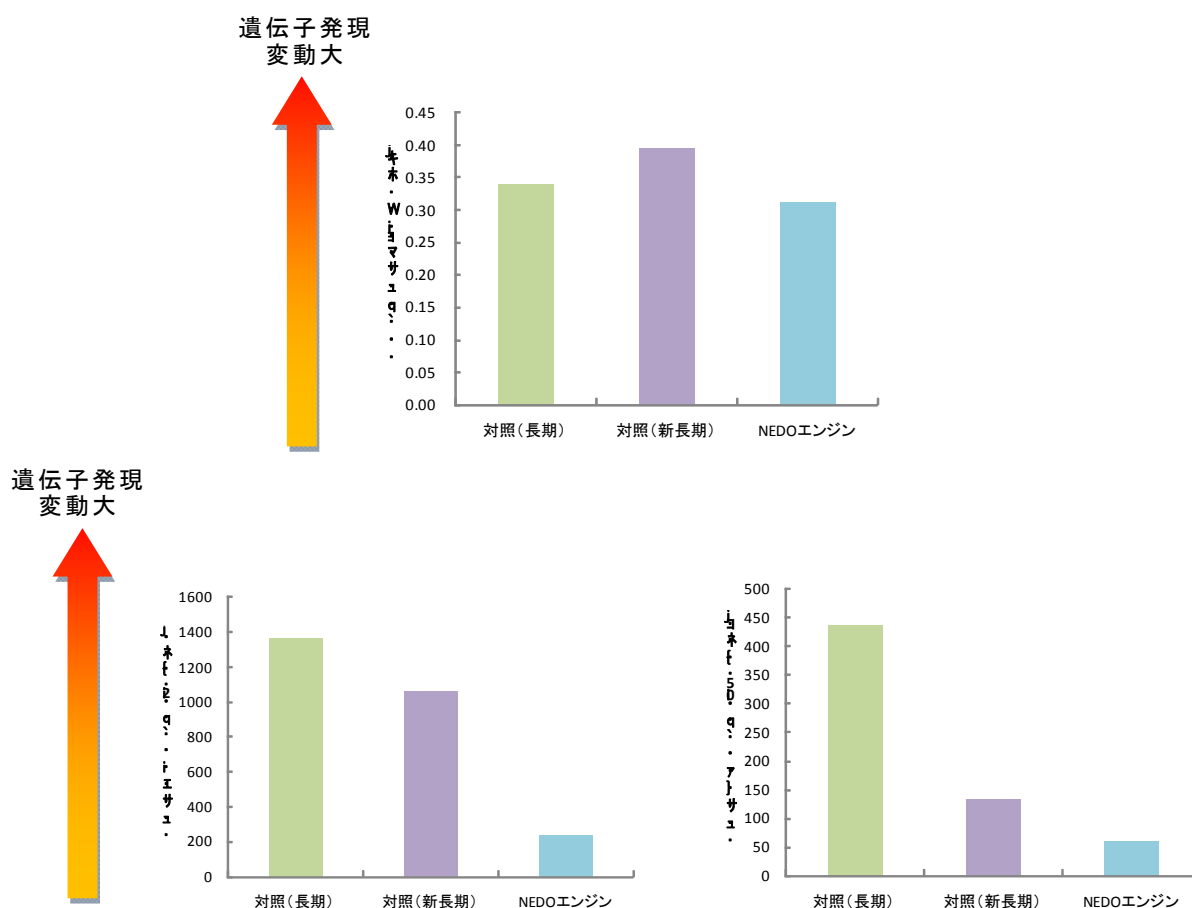


Fig.4.2.2.4 対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）および NEDO エンジン排気へのヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が全遺伝子の発現変動に及ぼす影響



(3) 特定遺伝子群の発現変動比較

対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）および NEDO エンジン排気へのヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が特定の遺伝子群の発現変動に及ぼす影響を Fig.4.2.2.5 に示す。薬物代謝酵素、抗酸化酵素、炎症関連、発癌関連の各遺伝子群の発現変動として標準偏差を指標にそれぞれの排気の影響を比較した。

薬物代謝酵素については、対照エンジン（新長期）の変動が他の 2 条件よりも大きかった。抗酸化酵素についてはいずれの排気でもほとんど差は認められなかった。炎症関連については、対照エンジン（長期）の発現変動が他の 2 条件よりも大きかった。発癌関連については、対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）、NEDO エンジンの順で変動が大きかった。

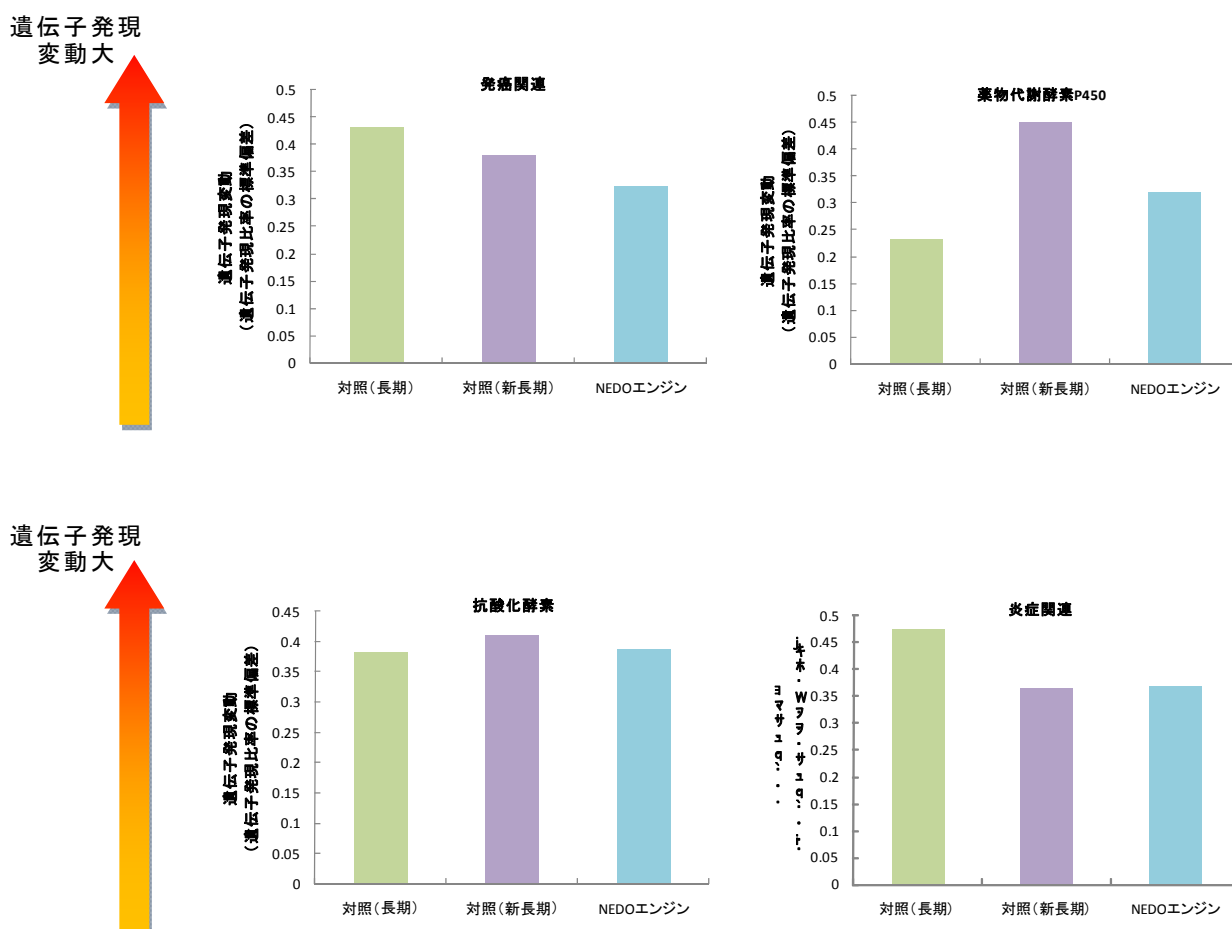


Fig.4.2.2.5 対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）および NEDO エンジン排気へのヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が特定の遺伝子群の発現変動に及ぼす影響

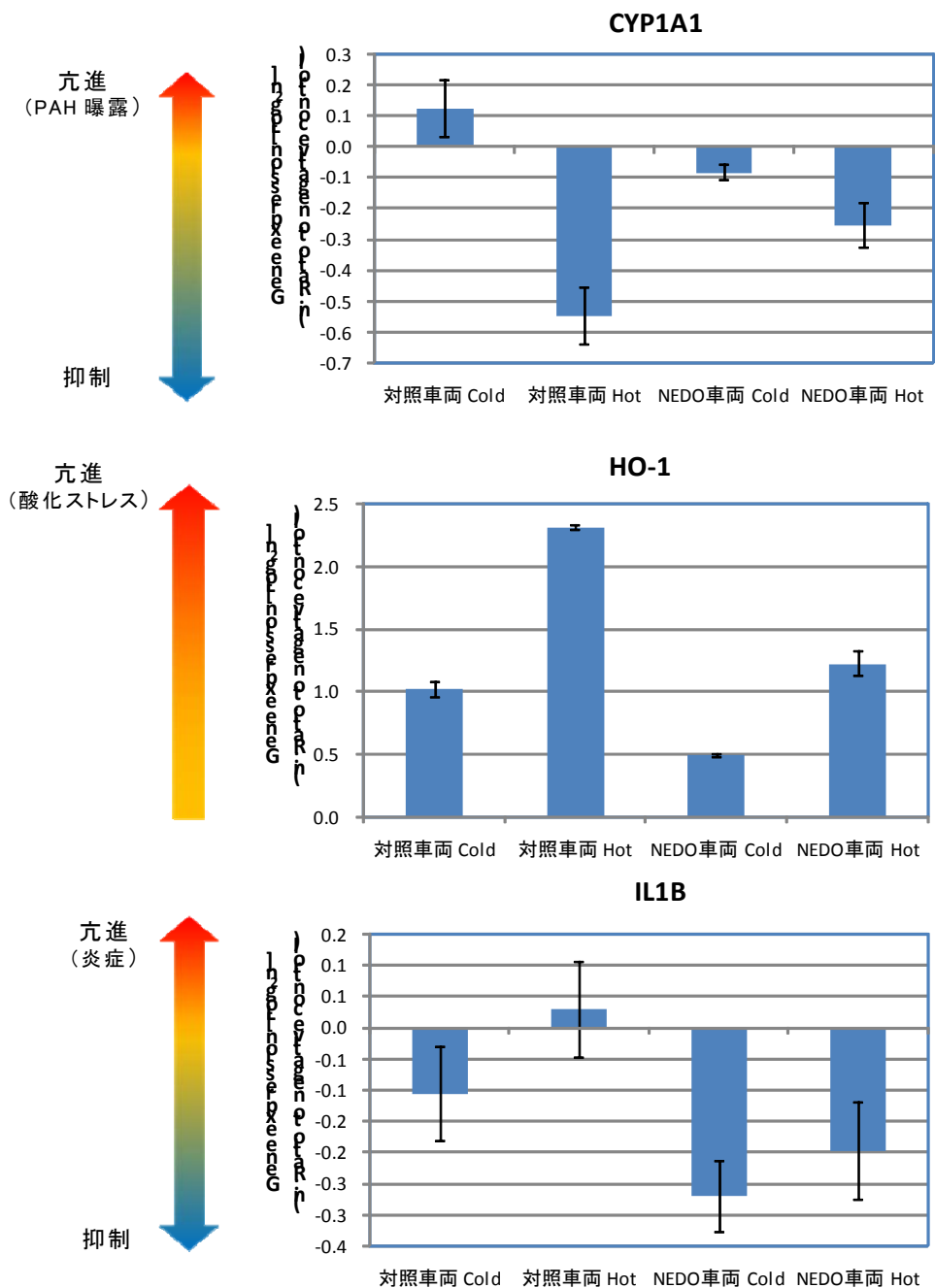
## 2) DNA マイクロアレイ – 車両試験 –

### (1) 個々の遺伝子の発現比較

対照車両および NEDO 車両の Cold および Hot スタート排気のヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が遺伝子発現に及ぼす影響を **Fig.4.2.2.6** に示す。CYP1A1 遺伝子はいずれの排気でもほとんど亢進作用を示さず、両車両の Hot スタート排気で抑制する傾向が認められた。HO-1 遺伝子はいずれの車両とも Cold よりも Hot スタート排気で強く発現が亢進し、対照車両と比較し、NEDO 車両排気では発現の亢進作用は弱かった。IL-1 $\beta$  遺伝子は発現亢進がほとんど認められず、NEDO 車両では抑制作用が強かった。

その他の遺伝子については車両および Hot/Cold の違いに伴う発現変動はほとんど認められな

かった。PTGS2 および IL-8 といった炎症に関連する遺伝子がいずれの条件でも抑制傾向を示すことが特徴的であった。



**Fig.4.2.2.6** 対照エンジン（長期）、対照エンジン（新長期）およびNEDOエンジン排気のヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が CYP1A1、HO-1 および IL-1 $\beta$  遺伝子発現に及ぼす影響

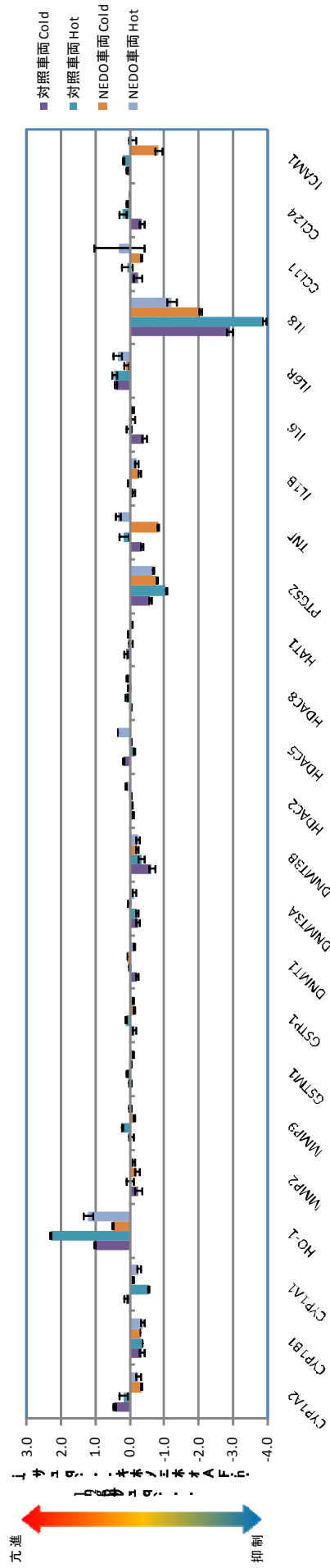


Fig. 4.2.2.7 対照車両および NEDO 車両排気の人肺上皮細胞 A549 への曝露が遺伝子発現に及ぼす影響

(2) 全遺伝子の発現変動比較

対照車両およびNEDO車両のColdおよびHotスタート排気のヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が全遺伝子発現変動に及ぼす影響を Fig.4.2.2.8 に示す。エンジン排気の比較同様、①標準偏差、②亢進遺伝子数、③抑制遺伝子数、を指標に各車両排気の影響を比較した。

①標準偏差の比較では、対照車両よりもNEDO車両による変動が、Hot/Cold いずれにおいても小さかった。②発現亢進遺伝子数の比較では、対照車両に比べ、NEDO車両ではHot/Cold いずれにおいても明らかに亢進遺伝子数が少なかった。③発現抑制遺伝子数の比較についても亢進遺伝子数の比較同様、NEDO車両において発現抑制遺伝子が少なかった。

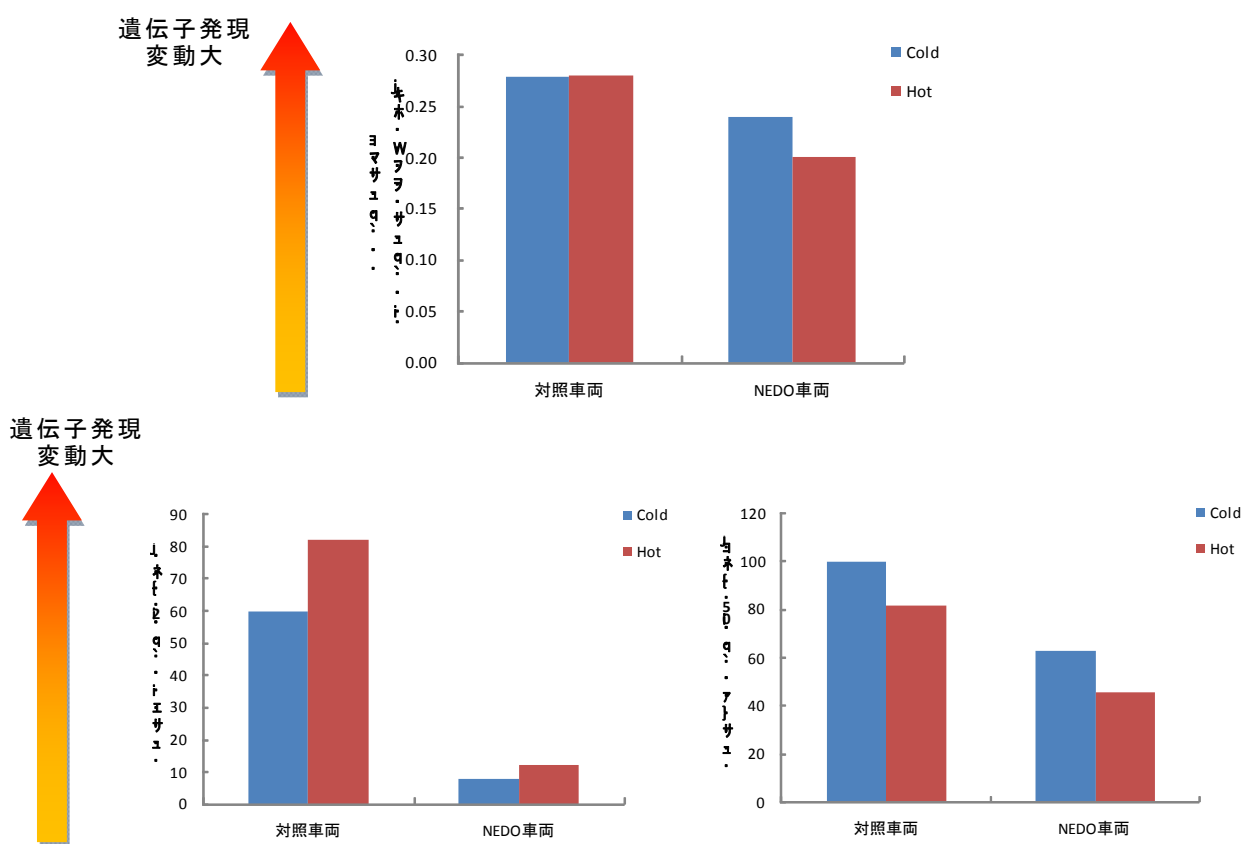


Fig.4.2.2.8 対照車両およびNEDO車両排気のヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が全遺伝子の発現変動に及ぼす影響

### (3) 特定遺伝子群の発現変動比較

対照車両および NEDO 車両のヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が特定の遺伝子群の発現変動に及ぼす影響を Fig.4.2.2.9 に示す。

薬物代謝酵素については、対照車両と比較し、NEDO 車両において Hot/Cold いずれも変動が小さかった。抗酸化酵素についても同様だった。それぞれの車両排気では Cold よりも Hot において変動が大きかった。炎症関連についても対照車両よりも NEDO 車両の方が発現変動が小さかった。発癌関連については、抗酸化酵素と似た変化が認められた。

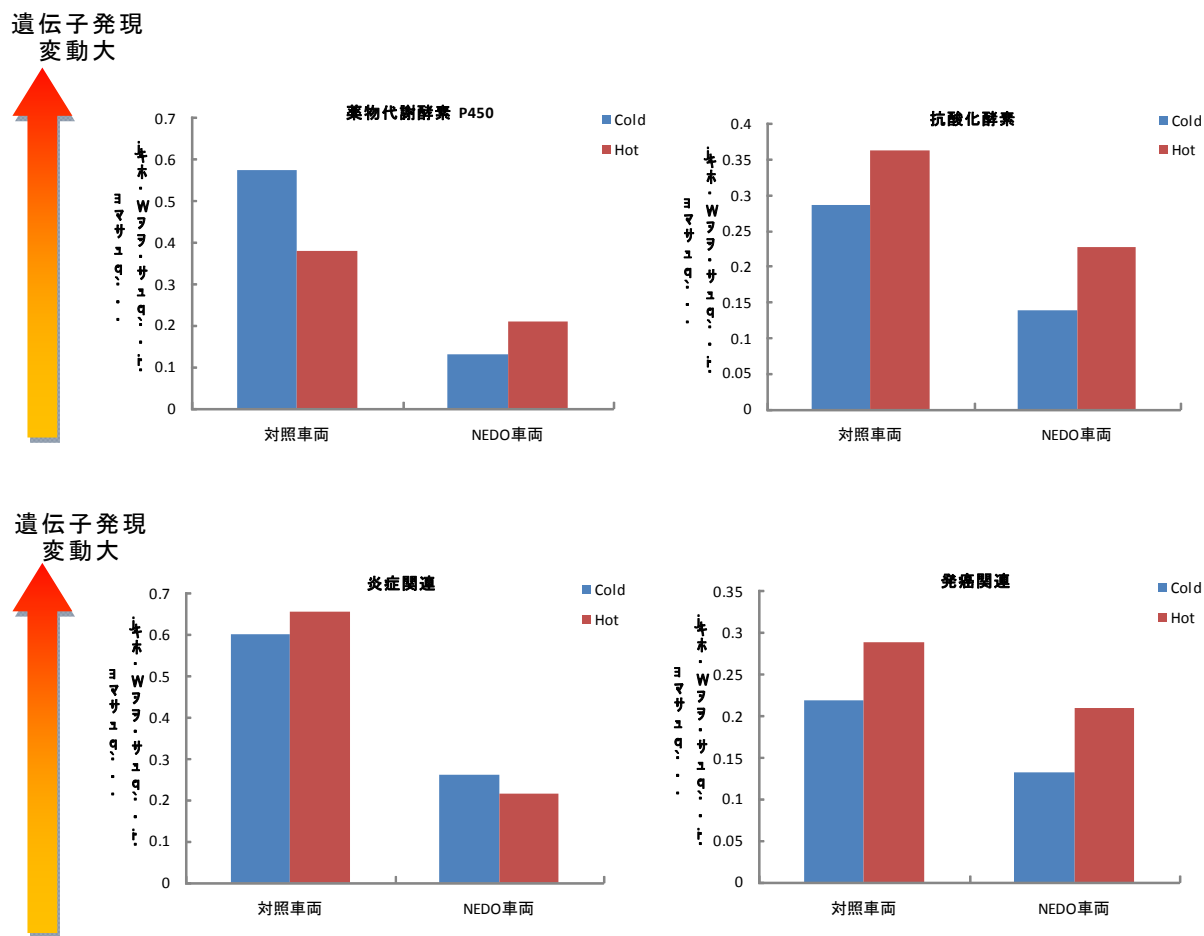
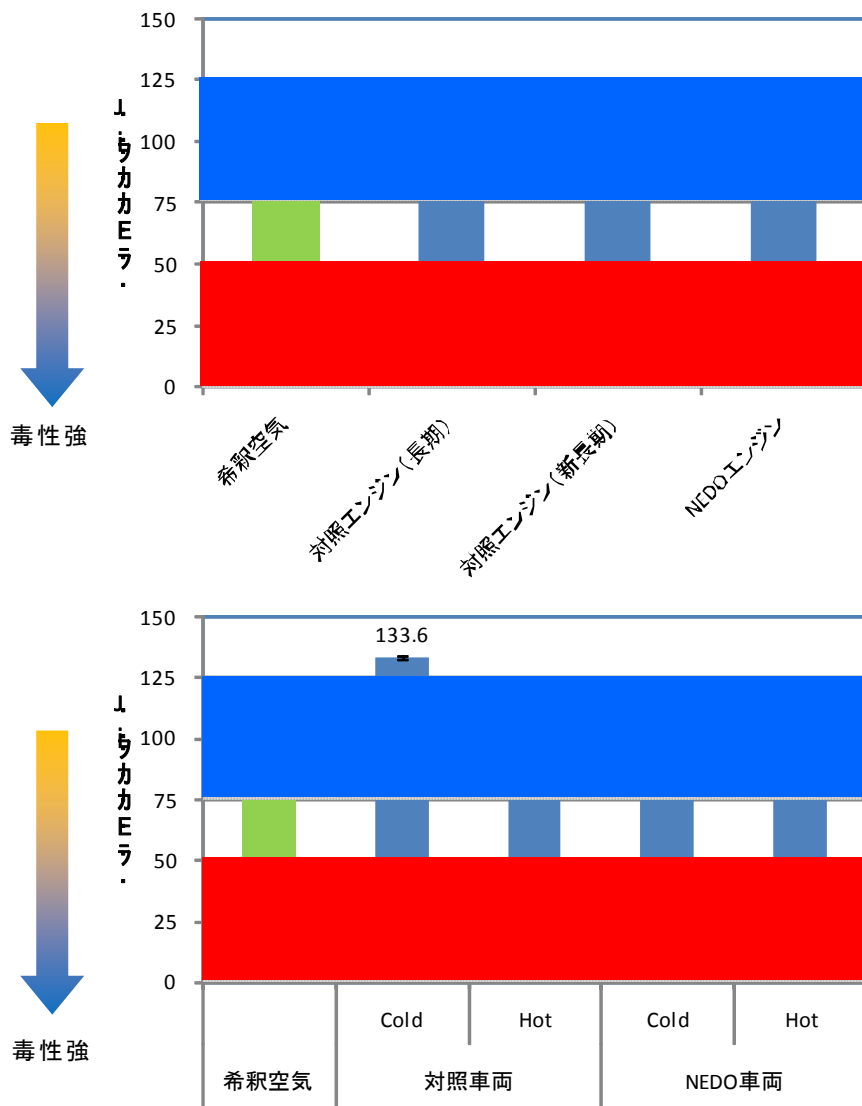


Fig.4.2.2.9 対照車両および NEDO 車両排気のヒト肺上皮細胞 A549 への曝露が特定の遺伝子群の発現変動に及ぼす影響

### 3) 細胞毒性試験

排気曝露がヒト肺上皮細胞 A549 の細胞生存率に及ぼす影響を **Fig.4.2.2.10** に示す。いずれのエンジンおよび車両排気の曝露においても細胞生存率の明らかに抑制作用(50%以上)は認められなかった。



**Fig.4.2.2.10** 排気曝露がヒト肺上皮細胞 A549 の細胞生存率に及ぼす影響  
(上：エンジン試験、下：車両試験)