総 説

[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
衛生化学 (1994)
40 (5) 399-413

—Reviews—

ディーゼル自動車排気ガスによる気管支喘息ならびに肺がんの発症と
活性酸素の役割

嵯峨井勝・市瀬孝道
国立環境研究所

Asthma and Lung Cancer by Diesel Exhaust

MASARU SAGAI and TAKAMICHI ICHINOSE

National Institute for Environmental Studies (NIES), Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan

Recently, diesel engine powered cars has been increasing steadily in Japan, because diesel engine is powerful and the fuel is less expensive. Diesel exhausts emit some 2 to 20 times more nitrogen dioxide and some 30 to 100 times more particles than do gasoline engine cars. The exhausts are main cause of air pollutants in urban area, and people are anxious about that the exhausts may cause lung diseases such as asthma and lung cancers. There are clinical and epidemiological studies on relationship between asthma and diesel exhausts. However, it is not yet confirmed with experimental study. Here, I will introduce recent experimental data that essential features of asthma such as chronic inflammation with eosinophil-infiltration, mucus hypersecretion and airway hyperresponsiveness has been caused by diesel exhaust particles, and that the active oxygens generated from diesel exhaust particles may play an important role to cause asthmatic symptoms. The other hand, it is well established that diesel exhausts can cause lung tumors experimentally using F-344 rats. In this case, it is considered that carcinogens contained in benzene extract-fraction of the diesel exhaust particles are important. However, it has been found that diesel exhaust particles washed out sufficiently with organic solvent can also cause lung tumors. Therefore, the significance of carcinogens in diesel exhaust particles on the actual carcinogenesis is also introduced.

Keywords — Diesel exhausts (DE); diesel exhaust particles (DEP); asthma; chronic inflammation; lung cancer

1. はじめに

近年、東京や大阪をはじめとする大都市部の大気環境は悪化傾向をたどっており、これは、主に自動車の排気ガスによると考えられている。例えば、東京都内では NO_x 総排出量の約 5-7 割が自動車に由来する。一方近年、燃料が安くて馬力があるという理由からディーゼル車が増えており、大気汚染の主な汚染源になっている。ディーゼル車は NO_x 排出量がガソリン車の 2-20 倍も多く、また排気微粒子はガソリン車より 30-100 倍も多い。また、ディー

ゼル排気ガスによるヒトの肺がんのリスク評価も試みられ、¹⁾ 無視しえない値が報告され、その健康影響については多くの人々が危惧の念をい込んでいる。

ディーゼル排気ガス (diesel exhaust, DE) あるいはその中の微粒子 (diesel exhaust particles, DEP) の健康影響に関しては、実験動物に肺がんを発生させること²⁾ とアレルギー性鼻炎の原因と考えられる IgE 産生を高めるアジュバンド効果を示すこと³⁾ が報告されている。一方、気管支喘息についてみると、DE が気管支喘息を引き起こすという臨床

あるいは疫学報告⁴⁾があるが、その実験的証明はいまだになされておらず、その因果関係には多くの疑問が残されている。また、DEPの発がんメカニズムについても、DEP中のベンゾ[*a*]ピレンやニトロアレン等の発がん物質がDNAと付加物を作り、遺伝情報を攪乱することによって考えられてきた。しかし最近、発がん物質を全く含まないカーボンブラック(CB)や酸化チタン(TiO_2)をラットに2年間吸入させたところ、DEの発がん率とほとんど同じかそれ以上であったという結果が報告され、⁵⁾DEP中発がん物質が実際の発がんに及ぼす寄与の程度が議論を呼んでいる。本稿ではディーゼル排気の汚染状況と健康影響、特に気管支喘息及び肺がんに及ぼす影響について紹介する。

2. 日本の大気汚染の変遷と現状

2.1. SO_2 から NO_2 への変遷 昭和30年代から40年代は日本経済の復興期にあたり、この頃日本の重化学工業は著しい発展を遂げた。その反面、工場排気による SO_2 や粒径 $10\mu\text{m}$ 以上の降下ばいじんを主とする激しい大気汚染をまねき、四日市喘息に象徴される公害被害が続発した。その後、大気汚染防止法と公害健康被害補償法がそれぞれ昭和47年および49年に成立し、国をあげて大気汚染防止努力が払われた。これにより SO_2 や降下ばいじん汚染

Fig. 1. Twin-Peak Distribution of Suspended Particulate Matters (SPM) in Japanese Urban City

は著しく改善された。しかし、昭和50年代に入ると、工場排気に替わって、大都市部における NO_2 と粒径 $10\mu\text{m}$ 以下の浮遊粒子状物質(SPM, suspended particulate matters)を中心とする自動車による大気汚染が深刻になってきた。特に昭和50年代後半になると、ディーゼル車の普及が一段と進み、その桁違いな NO_2 やDEPを排出する特性の為に、この2つの汚染物質の健康被害が問題になってきた。

2.2. 浮遊粒子状物質(SPM, suspended particulate matters)の粒径分布、季節変動及び発生源寄与率 SPMは沈降速度が小さいために大気中に比較的長時間滞留し、ほとんどの大都市部ではFig. 1に示すように、二山分布を示す。SPMについては環境基準値(1日平均 $0.1\text{mg}/\text{m}^3$)が定められているが、約 $2\text{--}10\mu\text{m}$ で平均粒径が $4\text{--}5\mu\text{m}$ の粒子は粗大粒子と呼ばれ、主に土壌由来のものや黄砂などであり、ヒトの健康にそれほど深刻な物質は含まれていない。一方、微小粒子は $2\mu\text{m}$ 未満で、平均粒径が $0.4\text{--}0.5\mu\text{m}$ で、主に自動車から排出されるもので、その中でもディーゼル車によるものが圧倒的に多い。ベンゾ[*a*]ピレンをはじめとする多くの発がん物質が含まれており、ヒトの健康に対して深刻な影響を与える物質が多数含まれている。また、この微小粒子は小さい為肺の深部(肺胞腔)まで入り、約半分はそこに沈着して呼吸器に悪影響を及ぼす。 SO_2 や NO_2 の光化学反応で生じる硫酸や硝酸のミストもこの微粒子の中に含まれる。Fig. 2の発生源寄与率から、SPM中に占めるディーゼル排気由来微粒子(DEP)の寄与が著しく多いことがわかる。また、微小粒子は秋や冬に多くなる傾向がみられる。⁶⁾喘息発症は秋から冬に多いことからDEPと喘

Fig. 2. Contribution Ratio of Original Generation of Coarse Particles and Fine Particles in the Suspended Particulate Matters (SPM) in Tokyo and Seasonal Variation

息発症との関連が疑われている。そのため、SPM については環境基準値（1日平均0.1 mg/m²）が定められている。しかし、各地のSPM汚染濃度と喘息発症率との間の相関性を示した報告はほとんどない。

SPMの汚染濃度と喘息発症率との間に相関性が認められていないことは、これまで、一般大気測定局あるいは自動車排気ガス測定局でSPM濃度の測定が行われてきたが、健康影響に違いのある粗大粒子と微小粒子とが混ざったまま測定されてきたためと思われる。そもそも、大都市部でも田園地域でもSPM濃度にはあまり大きな違いはないのである。しかしながら、次節に紹介するマウスを用いた実験的研究^{7,8)}でDEPが強い肺毒性を示し、かつ気管支喘息をも引き起こす可能性があることが判明するに及んで、行政的には粗大粒子と微小粒子を分けて測定する必要性が理解されつつある。

3. ディーゼル排気微粒子 (DEP) の活性酸素産生能と肺毒性

3.1. DEPからのO₂⁻と・OHの産生 DEP中には約2000種類の化学物質が含まれているが、ベンゼンで抽出される発がん性物質群以外の報告はきわめて限られている。それ故、変異原性や発がん性以外の細胞毒性等はほとんど不明なままである。

Voglら⁹⁾はディーゼル車の排気パイプから集めたDEPがシステインとH₂O₂の存在下で・OHを生成することを報告し、この・OHが細胞傷害を起こす可能性を指摘している。ただ、この反応はH₂O₂を加えなければ起こらないので、彼らのDEPは鉄のリザーバーとして働いているものと考えられる。さらに、sulfiteイオンの存在下で多核白血球のO₂⁻

産生能が低下し、SH化合物の存在でこの毒性が軽減されることがHippelら¹⁰⁾やLiら¹¹⁾によって示されている。一方筆者らは、DEPがそれ自身の化学反応によってO₂⁻を産生していることをチトクロームC還元法で調べた。⁷⁾このO₂⁻産生は試験管内では1週間以上も続くが、SODを加えると全く認められない。Fig. 3に示すように、このDEPを様々な有機溶媒で分画して、各画分のO₂⁻産生能を調べたところ、*n*-ヘキサン画分に9%存在し、ベンゼン画分に20%、及びメタノール画分には58%存在し、さらに残渣のDEP中にも14%ほどの活性が認められた。なお、*n*-ヘキサン画分には主に6—25個の炭素からなる直鎖型の脂肪族炭化水素が、量的には全体の約28%含まれており、ベンゼン画分はベンゾ[*a*]ピレン等の発がん物質が主で量的には約12%、及びメタノール画分はポリフェノール、キノン、カルボン酸あるいはアルデヒド等を約25%含む。これらのことから、O₂⁻は主にメタノール画分中に存在が知られているポリフェノールやキノン系化合物の自動酸化反応によって生じていることが推測される。また、DEPはそれ自身の自動酸化反応でO₂⁻を生成し、これがH₂O₂に変化した後に、DEP中に含まれている鉄、銅等の遷移金属の触媒によるフェントン反応によって・OHを産生することもESR等を用いた実験で明らかにされた。⁷⁾さらに、DEPの中には鉄が126 ppm、銅が12 ppm、クロームが6 ppm、マンガンが2 ppm、その他の微量金属も含まれていることが判明した。これらのことから、DEPからのO₂⁻及び・OHの産生メカニズムをFig. 4のように推測した。⁸⁾

3.2. DEPの気管内投与によるマウスの死亡率とSODの死亡率抑制効果

筆者らはDEPの肺

Fig. 3. Chemical Composition in Diesel Exhaust Particles (DEP) and Their Superoxide (O₂⁻)-Producing Ability (by Y. Kumagai)

Fig. 4. Possible Mechanism of the Active Oxygen Generations Such as Superoxide (O₂⁻) and Hydroxyl Radical (·OH) from Diesel Exhaust Particles (DEP)

Fig. 5. Mortality Curve of ICR Mice by Intratracheal Instillation of Diesel Exhaust Particles (DEP)

DEP, diesel exhaust particles; SOD, superoxide dismutase; Washed-DEP, the rest parts of DEP washed out sufficiently with methanol.

に及ぼす毒性を調べる為に、DEPを0.05%のTween 80を含むリン酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁し、ICR系マウスに気管内投与し、24時間以内の死亡率を調べたところ、Fig. 5に示すように、LD₅₀が0.6 mgで、0.9 mg投与では100%のマウスが死亡した。⁷⁾このマウスの死因は血管内皮細胞傷害による肺水腫であった。DEPを気管内投与する前に、O₂を代謝するスーパーオキシドジスムターゼ(体内半減期を長くするため、ポリエチレングリコールを結合させたSOD, PEG-SOD)を尾静脈から投与することにより、全てのマウスが死亡する量のDEPでも、死亡率は30%以下に低下した。この結果はDEP毒性の本体はO₂あるいはそれから派生する・OH等の活性酸素であることを示唆している。

一方、DEPをメタノールで充分洗浄して有機画分を除いた残渣のDEPを1 mg以上投与した場合、DEPを貪食した多数のマクロファージの遊走が認められたが、マウスの死亡例は一例もなかった。これより、肺水腫の原因になる血管内皮細胞傷害は、肺胞マクロファージがDEP貪食時に放出するO₂によるのではなく、DEP自身が産生する活性酸素による可能性が示唆される。⁷⁾

4. DEPによる喘息様病態の発症

4.1. 気管支喘息の3つの基本病態と定義の変化
気管支喘息は複雑な疾病であるが、その基本病態を要約するとTable Iに示す3つが挙げられる。¹⁰⁾これまで、喘息とは「気道過敏性の亢進であり、可逆的な気道狭窄が起こることである」とされてきたが、最近その定義は大きく変わってきている。例えば、

TABLE I. Three Essential Features of Asthma

1. 粘液質の過剰分泌：たんの原因物質の粘液が多量に気管支内に分泌されること。それにより、気道狭窄が起こる。
2. 炎症細胞の浸潤：好中球や好酸球等の炎症細胞が血管から気管支粘膜下組織へ漏れでて、気管支を傷害すること。
3. 気道の過敏性：ちょっとしてガスや冷氣等を吸っただけで、気管支周囲の平滑筋が収縮して気道が塞がること。

1992年に米国NIHでまとめた「喘息の診断と管理のための国際委員会」報告¹¹⁾の定義によると「気道閉塞、可逆性、気道過敏性という観点からのこれまでの喘息の定義では喘息の機序がよく理解できない為に不十分なものとなっている」としてうえで、「喘息は肥満細胞や好酸球など多くの細胞が関係する気道の慢性的炎症傷害である」としている。このような定義の変化は喘息の治療法にも大きな変化をもたらした。これまでの定義では、気道の過敏性とか気道の可逆的狭窄を重視していたため、治療は気道を拡張する薬剤の使用に重点が置かれ、炎症を抑えるステロイド薬などは、最終的にしか使わないようにされていた。このような治療法は喘息本態の治療ではなく、対症治療法であったと言わなければならない。今日、喘息の本態は炎症であると理解されるようになったことで、ステロイド系抗炎症薬は早いうちに使い、炎症を抑えることが治療の基本になってきている。

4.2. 大気汚染と気管支喘息との間の因果関係論

これまで、大気汚染に関わる公害訴訟等における因果関係論争で、喘息の原因として、常に喫煙やアレ

Fig. 6. Mechanism of Asthma Mediated by Type I Allergy via IgE Production (Right Side) and by Other Type via Superoxide Generation (Left Side)

ルギー体質の問題があげられてきた。これらのうち、気管支喘息の発症機構として最もよく知られているのは、Fig. 6に示すように、IgE産生亢進とそれに続く肥満細胞からのヒスタミン等の化学伝達物質の遊離を介して起こるI型アレルギー反応によるものである。大気汚染と気管支喘息との因果関係を考えるとき、その発症メカニズムがアレルギー反応によるものとするならば、喘息患者のIgE値は高くなければならない。言い換えれば、遺伝的にIgE抗体を沢山作るアレルギー素因の高い人が喘息になりやすいのであり、喘息と大気汚染とは関係ないことになる。しかし、大気汚染地域に住んでいる喘息患者のIgE値は健常者と比較して決して高くはないことがすでに四日市、川崎、大阪などにおける調査で報告されている。¹²⁾これらの知見から、少なくとも大気汚染地域に居住する喘息患者は、アレルギー素因の高い人だけが喘息になったわけではないことが分かる。なお、気管支喘息の発症には、このようなIgE産生を介する他にも、ウィルス等の感染による発症も多いことが知られている。しかし、現時点では大気汚染地域住民の喘息発症と感染等との因果関係は不明である。筆者らは最近、大都市部の浮遊粒子状物質(SPM)の中の圧倒的部分を占めるDEPが肺にきわめて強い毒性を示し、同時に上記3つの喘息の基本病態のすべてを発現すること^{7,8)}を見いだしたので紹介したい。

4.3 ディーゼル排気微粒子 (DEP) による喘息様基本病態の証明 4.3.1. 気管支粘膜下組織への好酸球等炎症性細胞の浸潤——0.1 mgあるいは0.2 mgのDEPを繰り返しマウスの気管内に投与すると、気道の粘膜下組織に好中球、好酸球あるいはリンパ球などの炎症性細胞が浸潤しているのが認められた。^{7,9)}これは気管支喘息の重要な病態の一つであり、特に喘息の定義の項で述べた如く、好酸球の浸潤は最も重要な病態である。¹³⁾この病理標本の気管支粘膜下組織の炎症性細胞をディフクイック染色液で染め分け、好酸球と好中球の数をかぞえ、その結果をFig. 7に示した。DEP投与初期には、まず好中球が増え、その後減少し、逆に好酸球数が増加してきて、典型的な慢性的炎症症状が認められた。また、DEP投与前にPEG-SODを前投与したマウスでは、リンパ球の著しい浸潤が認められたが、好酸球の浸潤は完全に抑制されていた。なお、このPEG-SODのみの前処理は好中球の浸潤には影響を与えなかった。このことと、次項に述べるPEG-SOD前処理マウスでは気道過敏性も認められなくなった事

Fig. 7. The Periodical Changes on the Numbers of Neutrophils and Eosinophils in Submucosal Layer of Bronchi and Bronchioles of the Mice by Repeatedly Instilled Diesel Exhaust Particles (DEP)

a) $p < 0.05$

b) $p < 0.01$

c) $p < 0.001$

から、気管支喘息における好酸球の関与はきわめて大きいことが理解される。さらに、これら炎症性細胞は、光学顕微鏡観察だけでなく、電子顕微鏡でも好中球、好酸球、リンパ球等が多数確認され、線維芽細胞等も観察された。また、肥満細胞も認められたが極めてまれであり、この喘息様病態の発現に肥満細胞はあまり関与せず、IgE抗体産生増加も伴わない発症機序が存在する可能性を示唆している。⁸⁾このことは、遺伝的に肥満細胞を欠損しているw/w-系マウスでも同等の好酸球の浸潤が認められたことから支持された。

4.3.2. DEP気管内投与による粘液の過剰分泌——DEPを、上記と同様に、繰り返し気管内に投与するとマウスの気道は過敏になり、粘液を多量に分泌するようになった。また、DEPの投与前にPEG-SODを投与しておくと、初期には粘液の合成・分泌が抑制される傾向を示した。このことは、気道での粘液の合成・分泌はO₂によって促進されていることを報告したAlderら¹⁴⁾の培養細胞系の結果を*in vivo*で示した結果といえる。彼らはこの粘液の合成・分泌にはプロスタグランジン (PG) F₂αが重要な因子であることを示している。また、DEPの繰り返し投与マウスでは大—中等大気管支上皮の線毛細胞が減少し、PAS染色で赤く染まる粘液を多量に含んだ分泌細胞が著しく増成していることが認められた (Fig. 8)。また、11—16回投与により粘液分泌細

Fig. 8. The Changes of the Epithelial Cells and Connective Tissue of the Bronchus of Mice Repeatedly Instilled Diesel Exhaust Particles (DEP)

a: 対照マウスの気管支周囲($\times 100$), b: 0.2 mgDEPを8回投与したマウスの気管支周囲($\times 100$); 気管支上皮の肥厚と好中球の浸潤が認められる。c: 0.2 mgDEPを11回投与したマウスの気管支周囲($\times 100$); 気管支上皮はほとんど杯細胞に置きかわり, しかも何層にも肥厚し細胞の脱落もみられる。d: 0.2 mgDEPを16回投与したマウスの気管支周囲($\times 50$); 杯細胞の増殖で気道の閉塞が見られ, 肺胞壁は肥厚化している。気管支粘膜下組織には炎症細胞やリンパ球の浸潤が見られる。

胞が気道を閉塞してしまうこともあることが認められた。

4.3.3. 気道過敏性の亢進——DEPの繰り返し投与による気道過敏性の亢進については, 0.1 mgあるいは0.2 mgのDEPを1週間に1回ずつ, 16週間にわたって気管内投与したマウスを使って, 麻酔下でアセチルコリンを気道収縮刺激薬として用い, その濃度を段階的に上げてゆき, どの濃度で気道抵抗が増加するかを調べた。⁸⁾ その結果, 対照マウスの気道抵抗が1.5倍に増加するために要するアセチルコリン濃度は約2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが, 0.1 mg DEP投与マウスの気道抵抗が1.5倍になるのは約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 及び0.2 mg DEP投与では約20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。これらの値は10倍及び100倍の差であり, 十分に気道が過敏になっていることを示している。ちなみに, ヒトの場合は正常者でアセチルコリンが20000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で気道抵抗が亢進するのに対して, 喘息患者では600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で亢進する

といわれ,¹⁵⁾ 30倍以上の差がある。喘息患者ではさらに100倍から200倍も違う例もあり, この値は喘息の状態によって大きく変動する。また, PEG-SOD前処理後DEPを投与し続けたマウスの気道抵抗性は対照マウスのそれとほとんど変わらず, PEG-SOD前処理が気道過敏性の抑制に効果的であり, 気道過敏性の発現に活性酸素が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。このような例として, ネコにタバコを吸わせたり, Xanthine/xanthine oxidase由来の O_2^- 産生液を吸入させた時に気道が過敏になるが, SODの前投与で抑制されることが報告されている。¹⁶⁾

4.4. ディーゼル排気微粒子(DEP)による気管支の喘息様病態の発現メカニズム これまで述べたように, 少量のDEPを繰り返し気管内投与することにより, 気管支での粘液分泌が増加し, 喘息の最も重要な病態である炎症細胞, とりわけ好中球, 好酸球やリンパ球の浸潤が起こり, これらが様々な化

Fig. 9. Mechanism on Onset of Asthmatic Symptoms Such as Eosinophil Infiltration and Airway Hyperresponsiveness by Diesel Exhaust Particles (DEP)

学伝達物質やサイトカイン等を遊離して慢性炎症を引き起こして (Fig. 6 参照), 気道を過敏にしたり, 気道狭窄を起こすものと考えられる。

この気道過敏性が起こるメカニズムについて考えると, Fig. 9 に示すように, DEP から生じた活性酸素が血管内皮細胞や気管支上皮細胞を傷害する結果, まず気管支粘膜下組織への好中球浸潤が起こり, 続いて好酸球が浸潤してくる。好酸球は, 本来外から侵入してきた細菌, ウィルスあるいは体内の寄生虫等に対する生体防御手段である major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP) や eosinophil peroxidase (EPO) 等の細胞毒性の強いタンパク質を放出する。これらタンパク質が, 自分自身の気管支上皮細胞を傷害し, この上皮細胞の底面に分布している知覚神経を露出させ, これによって気道が過敏に反応するようになったものと思われる。¹⁰⁾

5. ディーゼル排気による肺がんの発生

5.1. 日本人の肺癌による死亡率の増加傾向とその原因 日本人のがんによる死亡率のうち, 肺が

Fig. 10. Annual Changes of Death-Ratio by Cancer on Each Tissue per 100000 Persons

Fig. 11. Relationship between Tumor Incidences and Exposure Levels of Diesel Exhaust Particles (DEP)

Results on tumor incidence by the exposure of diesel exhausts for about 2 years in the six institutes.

Fig. 12. Metabolic Activation of Benzo(a) pyrene and the Formation of DNA-Adducts

TABLE II. The Recent Tendency on the Incidence of Each Type of Lung Cancer

肺癌の種類	発生率	喫煙リスク	最近の傾向
腺癌	40.0%	±	増加
扁平上皮癌	27.7%	≡	減少
小細胞癌	18.6%	≡	減少
大細胞癌	8.8%	+	

1961—1978年の18年間の肺癌患者640症例(男474,女166)の肺癌の組織型別発生率, 土屋ら, 癌の臨床, 28, (1982).

んによる死亡率は Fig. 10 に示すように年々増加の一途をたどっており, 昨年のデータでは死亡率第一位の胃がんを追い越した.¹⁷⁾ 近年の肺癌の型別死亡率をみると, Table II に示すように, 喫煙の関与が最も高い扁平上皮癌は減少傾向にあり, 逆に喫煙の関与が最も低い腺癌の割合が増加している.¹⁸⁾ このような事から, 肺がんによる死亡率増加の原因の一

つとして, 喫煙の他に大気汚染物質の関与が考えられている。その根拠として, 近年ディーゼル車が急増していること, その排気中の DEP が肺がんの発生に関与していることを示す実験的研究¹⁹⁾ が多くの研究者によって報告されており, さらに, ディーゼル排気中のヒトの発がんに対するリスクの計算²¹⁾ でも大都市部の肺癌死亡率の 3—8% はディーゼル排気によるかもしれないという無視しえない値が報告されていること等の理由があげられよう。一方, この肺がん死亡率の増加には喫煙や大気汚染物質の他にも多くの環境因子が関与しており, 中でも疫学的研究から, 高脂肪, 高カロリー食への食生活の変化が大きな要因になっていることが指摘されている。²⁰⁾ 高脂肪食や高カロリー食ががんの発生を高める理由は, それらが生体内で活性酸素や過酸化脂質を増やしたり, 発がんに関与するプロスタグランジン類を活性化することなどによると考えられている。²¹⁾ このようなことから, ディーゼル排気微粒子

Fig. 13. Structural Form of Nitroarene

1-NP, 1-nitropyrene; 1,3-diNP, 1,3-dinitropyrene; 3-NF, 3-nitrofluorantene; 3,7-diNF, 3,7-dinitrofluorantene; 1,6-diNBP, 1,6-dinitrobenzo(a)pyrene

(DEP) によるヒトの発癌リスクを評価する場合には、ヒトの脂肪やカロリー摂取量に近いレベルの実験にもとづいてその評価を行なう必要がある。一方、 β -カロチンやビタミン A, E, C やセレンウム等の抗酸化物質を多量摂取する人口集団には肺がん発生率が低いという疫学的研究報告²²⁾が多く、それらの中でも、特に β -カロチンの有効性を示す報告が多い。

5.2. ディーゼル排気 (DE) 暴露による発がん実験 (世界 6 施設からの報告) ラットを用いた実験でディーゼル排気が肺がんを発生させることは米、独、スイス、日本等の 6 つの研究機関から報告されている¹⁹⁾ (Fig. 11)。DE 暴露期間はどの研究機関も約 2 年間であるが、図の横軸は 1 週間当りの DEP の暴露濃度と暴露時間をかけた 1 週間当りの総暴露量を表わしている。データ間にかんりのばらつきがあるが、全体的に見ると、一定の量-反応関係が認められ、星印 (*) を附けた 7 つの実験データについては統計的有意差も認められており、ディーゼル

排気の発がん作用は疑いないものと思われる。なお、このディーゼル排気中には NO_2 を主とする多くのガス成分も含まれているが、DEP を除いたガスだけの暴露群では発がんは認められなかったという。しかしながら、 NO_2 はそれ自身に肺がんを発生させる作用は無いが、発がんを促進する作用があることが知られている。²³⁾

5.3. DEP 中の変異原性及び発がん性物質
5.3.1. 変異原性——上に述べたディーゼル排気 (DE) による発がんのメカニズムは、一般的には Fig. 12 に示すように、DEP 中に含まれる発癌物質と核酸とが反応して DNA-付加物を生成し、これによって細胞の遺伝情報が攪乱されて発がんにいたると考えられている。

その発癌性の指標の一つとして、DEP 中の多環芳香族炭化水素、特にその中でもニトロアレン類の突然変異原性が広く調べられている。復帰変異原性 (TA 98, -S 9 mix) を調べた結果を Table III に示

TABLE III. Comparison on Mutagenicity of Nitroarene

構 造	ニトロアレン	T98,-S9mix* 復帰変異コロニー/nmol
	<i>o</i> -(<i>m</i> - or <i>p</i> -)ニトロトルエン	0.00
	2,4-ジニトロトルエン	0.06
	2,6-ジニトロトルエン	0.02
	3,4-ジニトロトルエン	0.00
	<i>o</i> -ニトロアニソール	0.00
	<i>m</i> -(or <i>p</i> -)ニトロアニソール	0.02
	<i>p</i> -ニトロビフェニール	0.01
	<i>m</i> -ニトロビフェニール	0.05
	1-ニトロナフタレン	1.05
	1,5-ジニトロナフタレン	3.19
	1,8-ジニトロナフタレン	7.9
	1,3,6,8-テトラニトロナフタレン	0.2
	2-ニトロフルオレン	17.5
	2,7-ジニトロフルオレン	5 180
	2,4,7-トリニトロ-9-フルオレノン	2 125
	2,4,5,7-チトラニトロ-9-フルオレノン	860
	2-ニトロアントラセン	892
	9-ニトロアントラセン	0.3
	2-ニトロフェナントレン	128
	9-ニトロフェナントレン	<0.5
	1-ニトロフルオランテン	74
	3-ニトロフルオランテン	8 182
	7-ニトロフルオランテン	544
	8-ニトロフルオランテン	11 125
	1-ニトロピレン	453
	2-ニトロピレン	2 225
	1,3-ジニトロピレン	144 760
	1,6-ジニトロピレン	183 570
	1,8-ジニトロピレン	254 000
	1,3,6-トリニトロピレン	40 700
	1,3,6,8-テトラニトロピレン	15 590
	2-(or 5-)ニトロクリセン	<0.6
	6-ニトロクリセン	269
	7-ニトロベンゾ(a)アントラセン	0.3
	6-ニトロベンゾ(a)ピレン	0.00
	1-(or 3-)ニトロベンゾ(a)ピレン	1 567
	5-ニトロアセナフテン	6.1

した。²⁴⁾ これらの中で、復帰コロニー数が nmol 当り 5000 個以上の物質は発癌性があるとみなされている。また、ピレンにニトロ基が2つ付加した1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレン及び1,8-ジニトロピレンの3つは復帰変異コロニー数形成が10万個以上でスーパーミュータージェンと呼ばれており、これらは発癌性も極めて強い。

5.3.2. 発がん性——各種のニトロアレンによる長期発がんテストの結果を Table IV にまとめ

た。²⁵⁾ また、その中の代表的なものの構造式を Fig. 13 に示した。これらのニトロアレンの中で、最も代表的な1-ニトロピレン (1-NP) はその発癌性の有無について多くの議論を呼んだ物質である。当初、皮下投与では全く発がん性は認められなかったが、その後腹腔内投与で乳腺腫瘍 (腺癌、肉芽腫) が相当高頻度に発生することが判明した。²⁵⁾ 1-NP は変異原性 (Table III) が453 個/nmol であり、一般の発がんボーダーラインの5000 個/nmol よりかなり低

いことを考えると、発がん物質の投与ルートが非常に重要であることが分かる。DEP 中の発がん物質は本来経気道的に肺に入るものであるもので、肺に投与する実験を行うか、吸入実験の結果で評価されるのが望ましい。皮下接種による陰性の結果は、恐らく 1-NP の活性化に必要な酵素が皮下には存在しないため、局所での代謝が不十分であったものと考えられている。

一方、1,3-,1,6-,1,8-ジニトロピレンのようなスーパーミュータージェンと呼ばれる物質は皮下接種でも腫瘍(悪性繊維性組織球)を誘発する。²⁶⁾ また、1,6-ジニトロピレンをビーズワックス/トリカプリリンと共にラットの肺に直接接種すると、わずか 10 μg で 13%, 30 μg で 42%, 100 μg で 85% となり 150 μg では 67% の動物に肺がんを発生するという。²⁶⁾ なおこの時、同じ投与方法で B(a)P の発がん率を調べると、30 μg で 3%, 100 μg で 23%, 300 μg で 76% となり、1000 μg では 69% になったという。いずれも、投与量が多いと発がん率が低下していることは興味深い。

3,7-,3,9-ジニトロフロランテンも 1 mg を BALB/c マウスに皮下投与すると、ジニトロピレン系化合物と同じ皮下腫瘍が発生する。²⁶⁾ さらに、これらの物質を上記と同様に、ビーズワックス/トリカプリリンと共に F 344 ラットの肺に投与すると 30-70 週後に、3,9-ジニトロフロランテンは 50 μg

で 10%, 100 μg で 30%, 200 μg で 44% の、いずれも扁平上皮癌が発生した。²⁶⁾ 3,6-,1,6-ジニトロベンゾ[a]ピレンについても F 344 ラットを用いて実験されており、類似の結果が得られている。²⁶⁾ このように、肺に投与した場合に比較的低濃度で腫瘍を発生することはニトロアレン化合物の代謝還元系に關与する酵素の存在の重要性を強く示唆している。これらのことから、ニトロアレン化合物の動物に対する発がん性は微生物系で測定した変異原性強度に比較的良好に相関することがわかった。

5.4. DEP の活性酸素産生を介した肺がんの発生

5.4.1. 肺がん発生と活性酸素との関連
— これまでのディーゼル排気の生体影響に関する研究は、その圧倒的な部分は上に述べたように、DEP 中のベンゾピレンやニトロアレン等の変異原性と発がん性に関するものに集中していた。一方、厳密な比較データはないが、動物の発がん実験のときに用いられているニトロアレン類の投与量は吸入で体内に取り込まれる時の量に比べると著しく高濃度である (Table IV)。このようなことから、吸入による発がんの場合に DEP 中の発がん物質と DNA との反応による DNA-付加物の生成がどの程度関与しているのかに疑問が投げかけられている。こうした中で最近、化学物質によってあるいは生体内で生じる活性酸素も発がんに関わっていることが知られるようになってきた。²⁷⁾ DEP による発

TABLE V. Relationship among the Formation of Active Oxygens and Free Radical and Carcinogenicity of Aromatic-amine

化 合 物	H ₂ O ₂	・O ₂ ⁻	フリーラジカル生成	発がん性
N-ヒドキシアミノアゾベンゼン	+	+	+	+
N-ヒドロキシ-モノメチル-アミノアゾベンゼン	+	+	+	+
N-ヒドロキシ-1-アミノナフタレン	+	+	+	+
N-ヒドロキシ-2-アミノナフタレン	+	+	+	+
2-アミノ-1-ナフトール	+	+	+	+
1-アミノ-2-ナフトール	+	+	+	+
1-アミノ-4-ナフトール	+	+	+	-
1-ニトロナフタレン	-	-	+	±
2-ニトロナフタレン	-	-	+	±
1-アミノ-5-ナフトール	-	-	-	-
1-アミノ-6-ナフトール	-	-	-	-
1-アミノ-7-ナフトール	-	-	-	-
2-アミノ-3-ナフトール	-	-	-	-
1-ナフチルアミン	-	-	-	-
2-ナフチルアミン	-	-	-	-
1-ナフトール	-	-	-	-
2-ナフトール	-	-	-	-

TABLE IV. Comparison on Carcinogenicity of Nitroarene

ニトロアレン	動物	投与方法	投与量	発生部位及び組織像	報告者 ²⁶⁾
1-ニトロピレン	ラット	皮下	40mg/ラット	皮下に繊維性組織球腫のみ	Ohgakiら(1982) ^{a)}
1-ニトロピレン	BALB/cマウス	皮下	2mg/マウス	腫瘍なし	Tokiwa(1984) ^{b)}
1-ニトロピレン	マウス	塗布	1mg/マウス	腫瘍なし	EL-Bayoumy(1982) ^{c)}
1-ニトロピレン	A/Jマウス	腹腔		乳腺腫瘍	EL-Bayoumy(1984) ^{d)}
1-ニトロピレン	CDラット	腹腔		乳腺腫瘍	Imaidaら(1991) ^{e)}
2-ニトロフルオレン	ラット	塗布	69mg/ラット	皮下, 繊維腫	Morrisら(1950) ^{f)}
2-ニトロフルオレン	ラット	経口	1.62mM/kg飼料, 8-12カ月	前胃, 扁平上皮癌	Millerら(1955) ^{g)}
2,7-ジニトロフルオレン	ラット	経口	1.62mM/kg飼料, 8カ月	乳腺, 腺癌	Millerら(1962) ^{h)}
2,7-ジニトロフルオレン	BALB/cマウス	皮下	2mg/マウス	腫瘍	Tokiwaら(1984) ^{b)}
2-ニトロナフタレン	サル	経口	340g/kg体重	膀胱, 乳頭腺	Conzelmanら(1970) ⁱ⁾
5-ニトロアセナフテン	ラット	経口	24g/ラット	小腸, 腺癌	Takemuraら(1974) ^{j)}
3-ニトロフルオランテン	ラット	皮下	30mg/ラット	皮下, 繊維性組織球腫	Ohgakiら(1982) ^{a)}
6-ニトロベンゾピレン	マウス	塗布	0.05mg/マウス		EL-Bayoumyら(1982) ^{c)}
3-ニトロペリレン	マウス	塗布	1.00mg/マウス		EL-Bayoumyら(1982) ^{c)}
6-ニトロクリセン	マウス	塗布	1.00mg/マウス		EL-Bayoumyら(1982) ^{c)}
1,6-ジニトロピレン	F344ラット		0.03~0.15mg	皮膚, 扁平上皮癌	Iwagawaら(1989) ^{k)}
1,6-ジニトロピレン	BALB/cマウス	皮下	2mg	皮膚, 扁平上皮癌	Tokiwaら(1984) ^{b)}
1,3-ジニトロピレン	BALB/cマウス	皮下	1mg	肺腫瘍(気管内投与)	Otofujiら(1987) ^{m)}
1,8-ジニトロピレン	BALB/cマウス	皮下	1mg	皮下腫瘍	Otofujiら(1987) ^{m)}
3,7-ジニトロフロランテン	BALB/cマウス	皮下	1mg	皮下腫瘍	Tokiwaら(1987) ⁿ⁾
3,9-ジニトロフロランテン	BALB/cマウス	皮下	1mg	皮下腫瘍	Tokiwaら(1987) ⁿ⁾
3,7-ジニトロフロランテン	F344ラット	肺	200 µg	肺腫瘍	Horikawaら(1991) ^{o)}
3,9-ジニトロフロランテン	F344ラット	肺	200-50µg	肺腫瘍	Horikawaら(1991) ^{o)}
3-ニトロフルオレン	F344ラット	肺	1000 µg	肺腫瘍	Horikawaら(1991) ^{o)}
1,6-ジニトロベンゾピレン	F344ラット	皮下	1000-8µg	肺腫瘍	Horikawaら(1991) ^{o)}

がんには、DNA-付加物の生成のみならず、DEP そのものやDEPを貪食したマクロファージ等が O_2 や $\cdot OH$ 等のフリーラジカルを生成すること、及びそれらフリーラジカルによるDNA損傷を介した作用の存在も考慮されるべきかもしれない。たとえば、Table Vに示すように、芳香族アミンの発がん性は活性酸素やフリーラジカルの生成と実によく関連していることが示されている。²⁸⁾

このようなことから、DEPによる発がんも本当に活性酸素やフリーラジカルの作用と重要な関わりを持っているとするならば、DEPによる発がん実験において、活性酸素が増える条件下ではDEPの発がん率が上昇し、逆に活性酸素やフリーラジカルを消去する作用を持つ抗酸化剤等の投与によって発がん率が低下することも証明される必要がある。筆者らは、DEPの気管内投与による肺がん発生を活性酸素産生を高めることが知られている高脂肪食及び活性酸素を消去することが知られている抗酸化剤の一つの β -カロチンの影響について調べた⁸⁾ので紹介したい。

5.4.2. DEPによる肺腫瘍発生と高脂肪食の影響——マウスを1群30匹ずつ8群に分け、DEPを1匹当たり、0 mg, 0.05 mg, 0.1 mg及び0.2 mgずつ、週に1回ずつ、10週間(10回)にわたって気管内投与した後、コーン油4%を含む普通脂肪食及びコーン油16%含む高脂肪食を与え続け、1年後に屠殺し、肺腫瘍発生率を調べた。Fig. 14-Aに示すように普通脂肪食を摂取し、DEPを0 mg, 0.05 mg, 0.1 mg及び0.2 mgを投与されたマウスの肺の良性腫瘍(腺腫)発生率は0.1 mg投与群が最も高く、0.2 mg DEP投与群ではむしろ腫瘍発生率が低下していた。高脂肪食を摂取したマウスの肺の良性腫瘍発生率は普通脂肪食摂取群よりもさらに高く、0.1 mg群の腫瘍発生率が最も高かった。また、悪性腫瘍発生は高脂肪食群で明らかに多くみられた。すなわち、0.05 mg DEPを投与された普通脂肪食群では30匹中1匹で(3.3%)であったが、高脂肪食群では5倍(16.5%)に増加し、0.1 mg DEP投与群では普通脂肪食で0匹で、高脂肪食群では4匹(13.2%)に認められた。0.2 mg DEP投与群の発がん率が0.1 mg群より低下していたことに関しては、DEP自身の細胞毒性によってマクロファージや肺の細胞が死んでしまうことが別の実験で観察されていることから、DEPには肺細胞をがん化させる作用があると同時に、一定以上の濃度になるとがん化した細胞すら殺してしまうので、発がん率の上昇が抑制されるもの

Fig. 14. Lung Tumor Incidence in the Mice by Diesel Exhaust Particles (DEP)

The mice were repeatedly instilled intratracheally DEP for 10 times once per week and they were fed the four kinds of diets for one year, respectively.

A. Lung tumor incidences in the mice fed the diet containing 4% corn oil or 16% corn oil, respectively.

B. Lung tumor incidences in the mice fed the diet containing 4% corn oil + 0.02% β -carotene and 16% corn oil + 0.02% β -carotene, respectively.

C. means the mice fed the diet containing 4% corn oil and H means the mice fed the diet containing 16% corn oil.

a) $p < 0.05$

b) $p < 0.01$

と思われる。このような結果は、ベンゾ[a]ピレンや1,6-ジニトロピレン等でも報告されている。^{26-k)}

5.4.3. DEPによる肺腫瘍発生と β -カロチン食摂取の影響—— β -カロチンは活性酸素やフリーラジカルを消去する作用を持っている。²⁹⁾一重項酸素(1O_2)のスカベンジ速度は $2 \times 10^{10} M^{-1} S^{-1}$ で最も大きい、過酸化脂質やその分解物のフリーラジカルの消去速度も相当大きい。²⁹⁾DEPを気管内投与し、前記の普通脂肪食及び高脂肪食にそれぞれ0.02% (w/w)の β -カロチンを添加した飼料を1年間与える実験を行った。Fig. 14-Bに示すように、 β -カロチン添加普通脂肪食を摂取した各DEP投与群の肺の腫瘍発生率は β -カロチン無添加群と同様に0.1 mg DEP投与群の腫瘍発生率が最も高かった。 β -カロチン添加群の普通脂肪食群と高脂肪食群の腫瘍発生率を比較すると、やはり高脂肪摂取群の方が腫瘍発生率が高かった。また、 β -カロチン無添加群(図14-A)と添加群(図14-B)の腫瘍発生率を比較すると、DEPの0 mg群と0.05 mg群では両群共に β -カロチン添加群の方が良性腫瘍発生率が若干低くなった。一方、悪性腫瘍の発生率を比較すると、 β -カロチン添加群の方が無添加群より明らかに低くなり、特に

0.05 mg DEP 群と 0.1 mg DEP 群で顕著であった。

以上のように、DEP による発がん率は高脂肪食で上昇し、 β -カロチンによって低下することが示され、この傾向は悪性腫瘍において特に顕著に示された。このことは、DEP による発がんには活性酸素、フリーラジカルが深く関与していることを示唆していると考えられる。従って、DEP 発癌のメカニズムとして、DNA-付加物の生成に加えて、活性酸素の関与も考慮すべきであると思われる。また、 β -カロチンには活性酸素消去作用だけでなく、NK 細胞やマクロファージの活性化なども知られている³⁰⁾ことから、DEP による発がんにおいて、DEP が免疫監視細胞の機能低下を起こしてはいないかどうかという面からも研究する必要がある。

6. おわりに

ディーゼル排気 (DE) あるいはディーゼル排気微粒子 (DEP) による気管支喘息と肺がんの発症に関する今日の知見を紹介した。DEP 中の発がん物質の変異原性や発がん性に関する研究は莫大すぎて、詳しい紹介は筆者の手にあまるほどである。また、DE

中の NO_2 に関する研究も莫大な量に達しているが、喘息の基本病態の、特に好酸球の浸潤を伴う慢性炎症を証明したものや気道過敏性が 30 倍以上になったことを示したものは皆無であった。

今回、DEP でそれらすべての基本病態が発現することを示したが、この DEP の投与方法は人工的な気管内投与によっている。したがって今後は、①ディーゼル排気 (DE) そのものを吸わせる、いわゆる吸入実験で上記の 3 つの基本病態が起こることを証明する必要がある。それが証明できた後、②どの程度のディーゼル排気濃度で気管支喘息が起こるのかという量-反応関係を明らかにすると同時に、これら動物実験で得られた結果と、ヒトの個人暴露量の解析に関する疫学的調査結果とを合わせて、③ヒトの健康に及ぼす危険率 (リスク) を評価するところまで進めなければ、真に問題解決に役に立つ研究を完成したことにはならない。薬学部出身者がこうした研究分野にも進出して活躍されることを期待して、終りとしたい。

引用文献

- 1) 岩井和郎, 河端美則, 宇田川忠, 佐藤秀隆, 林 祐造, 大気汚染学会誌, **27**, 289 (1992); 岩井和郎, 河端美則, 宇田川忠, 佐藤秀隆, 林 祐造, 黒岩哲生, *ibid.* **27**, 296 (1992).
- 2) a) R.O. McClellan, : *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **27**, 279 (1989); b) N. Ishinishi, A. Koizumi, R.O. McClellan, W. Stoeber (ed), *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*. Elsevier Sci. Pub., (Amsterdam) (1986).
- 3) M. Muranaka, S. Suzuki, K. Koizumu, S. Takafuji, T. Miyamoto, H. Tokiwa, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **77**, 616 (1986); 村中正治ら: 日本医事新報, No. 3180, 昭和 60 年 4 月 6 日号 p.26 (1986); S. Takafuji, *et al. J. Allergy Clin. Immunol.*, **79**, 639 (1987).
- 4) J.F. Wade, L.S. Newman, *J. Occup. Med.*, **35**, 149 (1993); J. Gamble, W. Jones, S. Minshall, *Environ. Res.*, **44**, 6 (1987).
- 5) J.L. Mauderly, M.B. Snipes, E.B. Barr, S.A. Belinsky, W.E. Bechtold, W.C. Griffith, R.F. Handerson, C.E. Mitchell, K.J. Nikula, The 9th Health Effect Insti. Annual Conference, Dec., Monterey, California. (Abstr) p.19 (1992); D.L. Dungsworth, U. Mohr, U. Heinrich, H. Ernst, B. Kittel, *Toxic and Carcinogenic Effects of Solid Particles in the Respiratory Tract*, (ed. U. Mohr, D.L. Dungsworth, G. Oberdoprster), ILSI press, Washington, DC., pp.75-98 (1994); J. Gallagher, U. Hainrich, M. George, L. Hendee, D.H. Phillips, J. Lewtas, *Carcinogenesis*, **15**, 1291 (1994).
- 6) 吉住邦雄, 渡辺武春, 石井康一郎, 吉岡秀俊, 朝来野国彦, 田村健夫, 菅 道彦, 吉野 昇: 東京都環境科学研究所年報, p.3 (1989).
- 7) M. Sagai, Y. Saito, T. Ichinose, M. Kodama, Y. Mori, *Free Radi. Biol. Med.*, **14**, 37 (1993); 嵯峨井 勝, 古山昭子, 市瀬孝道: 大気汚染学会誌, **28**, 258 (1993).
- 8) 嵯峨井勝編集, 国立環境研究所特別研究報告書 SR-14, p.3 (1994).
- 9) G. Vogl, E.F. Elstner, *Toxicol. Lett.*, **47**, 17 (1989); S.C. Hippel, E.F. Elstner, *Free Rad. Res. Comms.*, **11**, 29 (1990); A.P. Li, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 55 (1981).
- 10) P.J. Barnes, K.F. Chung, C.P. Page, *Pharmacol. Rev.*, **40**, 49 (1988).
- 11) International Consensus Report on Diagnosis and Management of Asthma, *Clin. Exp. Allergy*, **22** (suppl), 1 (1992), 日本語版は「喘息の診断と管理のための国際委員会報告」のタイトルでライ

フサイエンス出版より刊行。

- 12) 宮地一馬ら, 日本胸部臨床, **28**, 250 (1969); 河合 健ら, 日胸疾会誌, **22**, 175, (1984); 田中隆信ら, 日本公衆衛生学雑誌, **31** (特別号) 703 (1984).
- 13) E. Frigas, G.J. Gleich, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **77**, 527 (1985).
- 14) K.B. Alder, W.J. Holden-Stauffer, J.E. Repine, *J. Clin. Invest.* **85**, 75 (1990).
- 15) 佐野靖之, アレルギー疾患, p.72, 新星出版 (1993).
- 16) D.E. Dusser, T.D. Djokic, D.B. Borson, J.A. Nadel, *J. Clin. Invest.*, **84**, 900 (1989); U. Katsumata, M. Ichinose, M. Miura, K. Kimura, H. Inoue, T. Takishima, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **141**, 1158 (1990).
- 17) 厚生省統計情報部「人口動態統計月報 (1994 年 6 月号)」.
- 18) 土屋 永寿ら, 癌の臨床, **28**, 156 (1982).
- 19) W. Stoeber, *et al.* 文献 2 b) の p.421; H. White, *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* **3**, 332 (1983); J. Brightwell, *et al.* 文献 2 b) の p.471; J.L. Mauderly, *et al.*, *Fund. Appl. Toxicol.*, **9**, 208 (1987); N. Ishinishi, *et al.* 文献 2 b) の p.329; K. Iwai, *et al.* 大気汚染学会誌, **21**, 38 (1986).
- 20) K.K. Carrol, *Cancer Res.*, **35**, 3374 (1975); E.L. Wynder, G.B., Gori, *J. Nat'l. Cancer Inst.*, **58**, 825 (1977).
- 21) W.E.M. Land *et al.* *Free Radi. Biol.* (ed. W.A. Pryor), Acad. Press Inc., Vol. VI, p.39 (1984).
- 22) R.B. Shekelle, M. Lepper, S. Liu, C. Maliza, W.J. Raynor, A.H. Rossof, *Lancet*, **2**, 1185 (1981); M.S. Menkes, G.W. Comstock, J.P. Vuilleumier, K.J. Helsing, A.A. Rider, R. Brookmeyer, *New Engl. J. Med.*, **315**, 1250 (1986); N.J. Wald, S.G. Thompson, J.W. Densem, J. Boreham, A. Bailey, *Br. J. Cancer*, **57**, 428 (1988); A.M.Y. Nomura, G.N. Stemmermann, L.K. Heilbrun, R.M. Salkeld, J.P. Vuileumier, *Cancer Res.*, **45**, 2369 (1985); H.B. Stahelin, K.F. Gey, M. Eichholzer, E. Ludin, F. Bernasconi, J. Thurneysen, G. Brubacher, *Am. J. Epidemiol.*, **133**, 766 (1991); B.Y. LeGardeur, S.A. Lopez, W.D. Johnson, *Nutr. Cancer*, **14**, 133 (1990); P. Knekt, *et. al.*, *Am. J. Epidem.*, **134**, 471 (1991).
- 23) T. Ichinose, K. Fujii, M. Sagai, *Toxicology*, **67**, 211 (1991); T. Ichinose & M. Sagai, *Toxicology*, **74**, 173 (1992); 嵯峨井勝, H.P. Witschi, 大気汚染学会誌, **24**, 1 (1989).
- 24) 常盤 寛: 代謝, **20**, (臨時増刊号「癌'83」) pp.3-11 (1983).
- 25) 常盤 寛, 大気汚染学会誌, **27**, 73 (1992); H. Tokiwa, Y. Ohnishi, *CRC Critical Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60 (1986).
- 26) a) H. Ohgaki, *et al.* *Cancer Lett.*, **15**, 1 (1984); b) H. Tokiwa, *et al.*, *J. Nat'l Cancer Inst.*, **73**, 1359 (1984); c) K. El-Bayoumy, *et al.*, **16**, 333 (1982); d) K. El-Bayoumy, *et al.* *Carcinogenesis*, **5**, 1449 (1984); e) K. Imaida, *et al.* *Carcinogenesis*, **12**, 1187 (1981); f) H.P. Moris, *et al.*, *J. Nat'l. Cancer Inst.* **10**, 1201 (1950); g) J.A. Miller, *et al.*, *Cancer Res.*, **15**, 188 (1955); h) E.C. Miller, *Cancer Res.*, **22**, 1002 (1962); i) G.M. Conzelman, Gann, **61**, 79 (1970); j) N. Takemura, *et al.*, *Br. J. Cancer*, **30**, 481 (1974); k) M. Iwagawa, *et al.*, *Carcinogenesis*, **10**, 1285 (1989); l) H. Tokiwa, *J. Nat'l Cancer Inst.*, **73**, 1359 (1984); m) T. Otofiji, *et al.* *J. Nat'l Cancer Inst.*, **79**, 185 (1987); n) H. Tokiwa, *et al.*, *Carcinogenesis*, **8**, 1919 (1987); o) K. Hirokawa, *et al.*, *Carcinogenesis*, **12**, 1003 (1991).
- 27) H. Sies (ed), *Oxidative Stress*, Acad. Press, (1985), (「活性酸素と疾患」, 井上正康監修, 学会出版センターより訳本出版); B. Halliwell, J.M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford (1989) (「フリーラジカルと生体」, 松尾, 嵯峨井, 吉川 訳, 学会出版センターより訳本出版); R.A. Floyd (ed). *Free Radicals and Cancer*, Marcel Dekker, Inc., NY and Basel (1982).
- 28) 永田親義: 科学, **53** 巻, 372 (1983).
- 29) E.J. Rouseau, A.J. Davison, B. Dunn, *Free Radi. Biol. Med.*, **13**, 407 (1992).
- 30) C.A. Leslie, & D.P. Dubey, *Fed. Proc.*, **41**, 331 (1982); A. Bendich, *J. Nutr.* **119**, 112 (1989).