

# ディーゼル排気粒子中の強変異原3-ニトロベンズアントロンの 発がん性とタバコ副流煙との複合曝露の影響

溝井美穂・安達修一

Effect of combined exposure to side stream of cigarette smoke and 3-nitrobenzanthrone,  
a potent mutagen in diesel exhaust particulates on the development of lung cancer

MIZOI Miho · ADACHI Shuichi

**Abstract :** The age adjusted death rate of lung cancer has evidently increased recent four decades in Japan. It is generally suggested that cigarette smoking is the most reasonable factor for this trend. This trend has been observed not only in males but also in females, however, we should not underestimate the risk of environmental factors including inhalable particulate matters. Especially, it is important to establish the risk assessment which considers the synergistic effect in combined exposure to cigarette smoke and other environmental carcinogens. Aim of this study is to demonstrate a hypothesis that the combined effect of multiple exposures produced the recent trend of lung cancer. As an example of the combined exposures, we focus on diesel exhaust and the environmental tobacco smoke.

Regarding the combined exposure to diesel engine exhaust and environmental tobacco smoke, male F344 rats administered 3-nitrobenzanthrone (3-NBA, a strong mutagen in diesel exhaust) were exposed to side stream cigarette smoke. Comparison of the lung tumor incidence among the exposure groups demonstrated the mutual interaction of 3-NBA as the initiator and cigarette smoke as the promoter in carcinogenesis. These results suggest that cigarette smoke exposure has modified the risk of an environmental carcinogen regarding the recent trend of lung cancer in Japan.

---

**Key words :** environmental tobacco smoke (ETS), 3-nitrobenzanthrone (3-NBA), lung cancer, diesel exhaust

## I. 目的

現在のわが国における3大死因である悪性新生物、心疾患、脳血管疾患を合わせると総死亡数の6割を占めている。人口の高齢化に従って増加しているが、年齢調整死亡率からみても増加傾向にある。これらの疾患が生活習慣と関わりがあることが明らかになるにつれて、一次予防に対する考え方が重視されている。1970年代以降、脳血管疾患は着実に減

少しているが、悪性新生物は一貫して増加の傾向にあり、年齢調整死亡率を部位別にみると、男女ともに胃がんは減少し、大腸がん、肺がんは増加している。胃がんや大腸がんは食生活に因ることが多く、肺がんは喫煙に因ることが認識されている。しかし、男性に比べると、女性の喫煙率は低く職業環境などの外因の関与が小さいにも関わらず増加していることから喫煙以外の要因も考えなければならぬ。そこで、本研究では、代表的な都市大気中の環

境発がん因子と喫煙が、それぞれ肺発がんの多段階プロセスのどの段階に影響を及ぼすかを観察するとともに、実験動物における肺腫瘍発生状況を解析することによって、肺がん増加の要因は複合的であるという仮説を検証することが目的である。

## II. 方法

実験動物および飼育条件：F344/Nslcラット 4 週齢雄を 1 週間の予備飼育後、実験に使用した。飼育は、ポリカーボネート製ケージに各 5 匹とし、標準飼料（CE-2、日本クレア）及び飲料水は濾過（オルガノ製PFフィルター）した水道水を自由摂取とした。飼育室内は新鮮ろ過空気に保ち、12時間の明暗サイクルで、気温 $23 \pm 1$ ℃、湿度 $50 \pm 10\%$ に維持した。

3-NBA経気道肺内投与：3-NBAは鈴木、高村（京大院・理）が合成し供与された。F344/Nslcラット 4 週齢雄75匹を使用し、予備飼育後 1 群25匹、3 群に分け、2 群に3-NBA の 5 mg/ml 懸濁液0.1ml を経気道肺内投与した。残りの 1 群には溶媒のみを投与した。2 回目以降の投与は 2 週間隔で計 5 回

の投与を実施した。総投与量は 1 匹あたり2.5mg となった。

タバコ副流煙曝露：3-NBA投与開始16週後から、透明プラスチック製の曝露チャンパー（0.35 m<sup>3</sup>）内で間欠的に副流煙（マイルドセブンスーパーライト）を発生させ、1日4時間、週3回、12か月間曝露した。（写真1）曝露への馴化のため、タバコ本数2本の自然燃焼から開始し、毎回2本ずつ増やして1回あたり20本までとした。その時のチャンパー内粉じん濃度は最大30mg/m<sup>3</sup>、曝露直後のラット血液中のCO-Hb濃度は10~15%であった。

病理組織学的検索：衰弱例および実験開始から18ヵ月まで生存した例は、解剖後各臓器組織を中性ホルマリンにて固定し、HE染色等を施して腫瘍の検索を行った。

## III. 結果

肺腫瘍および腹膜中皮腫の発生を表1にまとめた。肺腫瘍は3-NBA群で2例の腺がんと2例の扁平上皮がん2例の計4例、3-NBA + 副流煙曝露（SSCS）群では腺がん2例と扁平上皮がん4例の計

表1 F344ラットへの3-NBA経気道肺内投与と副流煙曝露による腫瘍発生

Group	N	No. of rat with lung tumor	No. of rat with mesothelioma
3-NBA	25	4	4
3-NBA+SSCS	25	6	1
Control	25	0	0

写真1 副流煙曝露

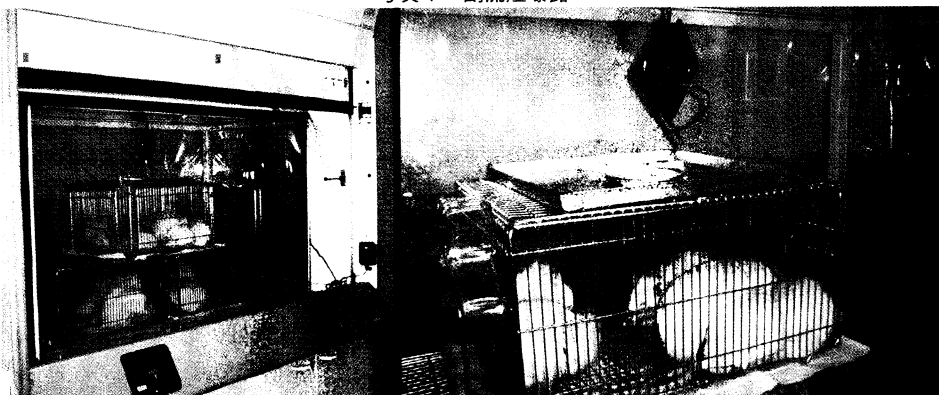
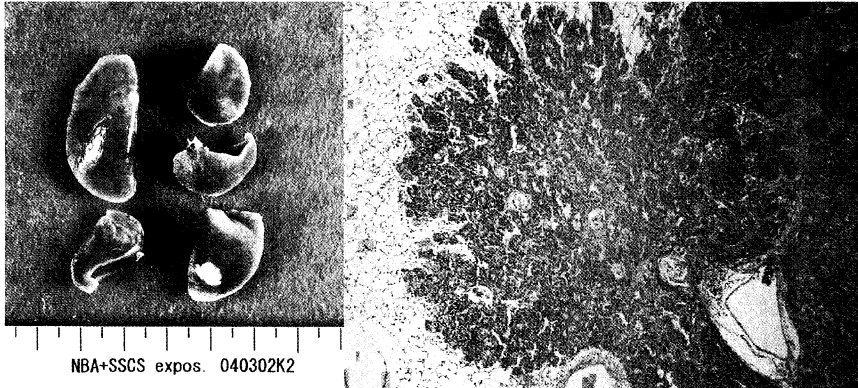


写真 2 A, B 3-NBAと副流煙曝露により発生した肺の扁平上皮がん



A : 肺腫瘍  
(3-NBA 2.5mg投与+副流煙曝露10ヵ月)

B : 扁平上皮がん (同左) H & E, X50

6例の発生を認めた。実験開始から412日目に解剖した3-NBA+SSCS群に見つかった肺腫瘍（腺がん）が最も早い発生で、解剖時までには3-NBA群で1例、3-NBA+SSCS群で4例が発生した。（写真2 A, B）

精巣付近を原発部位とする腹膜中皮腫は3-NBA群で4例、3-NBA+SSCS群では1例発生した。対照群には肺腫瘍、腹膜中皮腫ともに発生を認めなかった。

これらの腫瘍発生について3-NBA群と3-NBA+SSCS群の2群間に統計学的な有意差は認められなかった。

#### IV. 考察

3-NBAはディーゼル排気粒子中に存在し、ニトロアレン類の中でも極めて強い変異原性を示すことがHisamatsuらによって報告され注目された。発がん性に関する検討はAdachiらが動物実験の途中経過から、強い組織障害性と1mg程度の投与にもかかわらず短期間に肺胞上皮や気管支上皮に化生性変化や乳頭腫を発生し、扁平上皮がんの発生も認めていることから、肺発がん性が示唆される。一方、タバコ煙の主流煙を実験動物に曝露して肺腫瘍の発生を認めた報告はほとんど知られていない。また、副流煙曝露を曝露し発がん性を検討した例はない。したがって、ヒトの疫学で明らかになっている喫煙と肺がんの因果関係は、実験動物での十分な根拠が得ら

れていない。この理由として、曝露期間の短さやヒトとげっ歯類との解剖学的な差でも示唆されているが、タバコ煙には変異原物質も含まれて発がんのイニシエーター作用があるものの強いものではなく、習慣的な喫煙が発がん促進的にプロモーターとして作用しているのではないかと考えられる。

本実験の結果は副流煙への曝露は、3-NBA投与によって発生する肺腫瘍を統計学的に有意ではないがわずかに促進し、腹膜中皮腫に対し有意差はないが抑制的に作用するという結果であった。今回の副流煙曝露は密閉空間でタバコを自然燃焼させるため、高濃度で短時間の曝露でとなった。肺腫瘍発生時期を早め、発生率を上昇させた結果は、発がん因子への複合曝露がリスクを相乗的ではないにしても、加算的以上に増やしうることを推察させるものと考えられる。中皮腫は、一般にはアスベスト曝露によって特異的に発生するが、雄のF344ラットでは精巣を原発として数%の率で自然発生することが知られている。雌F344ラットでの自然発生はない。本研究での3-NBA投与群における発生率は自然発生率よりも高く、3-NBAによって誘発されたと考えられる。これが副流煙曝露によって、どのような機構で抑制されたかは不明であるものの、中皮腫に対する抑制因子がほとんど知られていない現状では、さらに検討すべき知見である。

喫煙が健康に及ぼす影響は1950年代の疫学調査により指摘され、喫煙者の肺がんをはじめとする種々

のがんや虚血性心疾患、呼吸器疾患等の罹患率が高いことや、非喫煙者の肺がんと受動喫煙の関連も報告されている。喫煙と肺がんの関係は疫学的検討では量-反応関係も明らかであるが、数多くの喫煙曝露実験例にもかかわらず肺腫瘍発生を認めた報告はきわめて少ないことも認識されている。

肺がん発生に対して複数の曝露因子が加算的に作用する例として、石綿曝露と喫煙が職業性曝露者についての疫学調査により明らかになり広く知られている。これを実験的に証明した報告もある。これらは、複合的な曝露による肺がんのリスクは、それぞれのリスクを加算するだけでは低く見積もる可能性があることを示すだけでなく、疫学調査と動物実験のデータによるリスクアセスメントでは喫煙曝露の有無が無視できない誤差の原因となりうることを示唆している。大気中の肺を標的とする発がん物質については、石綿と同様に疫学的に検討されリスク評価されているものもあるが、動物実験のデータに基づいている物質も少なくない。大気環境は、種々の対策によって改善の傾向にあり、発がん物質の濃度も低下している。一方で浮遊粒子状物質 (SPM) の濃度はディーゼル排気粒子 (DEP) の影響もあり、比較的高いレベル推移し、また、微粒子化によってより広域に拡散する傾向がある。したがって、肺がんリスクアセスメントの重要性は高まっており、低濃度でも多様な物質への複合的な曝露の影響を評価しなければならない。とくに大気中の因子と喫煙あるいは環境タバコ煙 (ETS) との相互作用を明らかにすることは、複合曝露のリスクを正しく評価するのに必要なものの一つであると考えらる。

## V. 参考文献

- 1) Hammond EC, Selikoff IJ, Seidman H. Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann NY Acad Sci* 1979 ; 330 : 473-90.
- 2) Yoshimura H, Takemoto K. Effect of cigarette smoking and/or N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) on the development of lung and pleural tumors in rats induced by administration of asbestos. *Jpn. J. Ind. Health.* 1991 ; 33 : 81-93.
- 3) Enya T, Suzuki H, Watanabe T, Hirayama T, Hisamatsu Y 3-Nitrobenzanthrone, a powerful mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates. *Environ Sci Technol*, 1997, 31, 2772-2776.
- 4) Tang N, Taga R, Hattori T, Tamura K, Toroba A, Kizu R, Hayakawa K. Determination of atmospheric nitrobenzanthrones by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Anal Sci.* 2004 Jan ; 20(1) : 119-23.
- 5) Lamy E, Kassie F, Gminski R, Schmeiser HH, Mersch-Sundermann V. 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. *Toxicol Lett.* 2004 Jan 15 ; 146(2) : 103-9.
- 6) Bieler CA, Arlt VM, Wiessler M, Schmeiser HH. DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in V79 cells expressing human cytochrome P450 enzymes. *Cancer Lett.* 2003 Oct 8;200(1) : 9-18.
- 7) Watanabe T, Hasei T, Takahashi Y, Otake S, Murahashi T, Takamura T, Hirayama T, Wakabayashi K. Mutagenic activity and quantification of nitroarenes in surface soil in the Kinki region of Japan. *Mutat Res.* 2003 Jul 8 ; 538(1-2) : 121-31.
- 8) Arlt VM, Stiborova M, Hewer A, Schmeiser HH, Phillips DH. Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH: cytochrome p450 reductase. *Cancer Res.* 2003 Jun 1 ; 63(11) : 2752-61.
- 9) Adachi S, Kawamura K, Takemoto K, Hisamatsu Y, Nagy E, Möller L. Carcinogenicity of 3-nitrobenzanthrone, A strong direct mutagen identified in particulate matter from diesel exhaust. 9<sup>th</sup> International Inhalation Symposium (2003)
- 10) Iwai, K., Udagawa, T., Mizuno, S., Kawabata,

- Y., Sugawara, I., Goto, S., Seto, H and Adachi, S. Mutagenicity and tumorigenicity of diesel exhaust of high and low-sulfur fuels. 大気環境学会誌 (Journal of Japanese Society of Atmospheric Environment), 37, 216-229, 2002.
- 11) Adachi S, Kawamura K, Takemoto K. A trial on the quantitative risk assessment of man-made mineral fibers by the rat intraperitoneal administration assay using the JFM standard fibrous samples. *Industrial Health*, 2000 ; 39, 168-174.
  - 12) Iwai, K, Adachi, S, Takahashi, M, Möller, L, Udagawa, T, Mizuno, S, Sugawara, I. Oxidative DNA damages in diesel exhaust-exposed rats and late development of lung tumors. *Environmental Research*, 2000 ; 84 : 255-64.
  - 13) 安達修一, 竹本和夫. 肺内粉じんによるDNA損傷. *日本胸部疾患学会雑誌*, 1998 ; 35 : 180-184.
  - 14) Iwai, K., Udagawa, K., Adachi, S., Seto, H. Long-term retention, genotoxicity and tumorigenicity of particles in rat lungs in a nonoverload situation. In "Relationship Between Respiratory Disease and Exposure to Air Pollution." Mohr, U. et al eds. p.267-272, ILSI Press, Washington, D.C. 1998.
  - 15) Adachi, S., Koyama, T., Takemoto, K. Analysis of deposited particles and metals in surgically resected lung tissues. In "Relationship Between Respiratory Disease and Exposure to Air Pollution." Mohr, U. et al eds. p.309-313, ILSI Press, Washington, D.C. 1998.
  - 16) Adachi, S., Takemoto, K. Mesothelioma incidence in rats after asbestos exposure was significantly decreased by a surface modification of the fiber. In "Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases" Chiyotani, K. et al eds. p.714-718, Elsevier, Amsterdam, 1998.
  - 17) 高橋美保子, 安達修一, 永井正規, 大島晋, 高濱素秀, Möller, L. 32P-HPLC 法を用いた人肺組織中のDNA付加体分析. *大気環境学会誌*, 1998 ; 33 : 196-200.