

### 3.1.2. 発がん影響に関する動物実験

#### 3.1.2.1. 発がん実験

##### A. DEP

##### 1) 吸入実験【表 3-3】

吸入実験は1980年代に始められ、当初はグループ間の統計学的な比較に十分な動物数が用いられず、高濃度曝露での検討例が多くみられる。その後、希釈による濃度段階の設定、十分な動物数を使用した大規模な研究が日本、アメリカ、ドイツ、スイスで実施された。

DEを実験動物に長期間にわたって吸入曝露し、その影響を検討した最初の報告は、Karagianesら(1981)によるもので、Wistarラット雄に粒子濃度 $8.3\text{mg}/\text{m}^3$ 、6時間/日、5日/週の条件で20ヶ月の吸入曝露を行った。生存した6例中1例に肺腫瘍(腺腫)を認めたが、DEの影響とは結論づけられない例数であった。

Orthoferら(1981)は、A系マウスに粒子濃度 $6.4\text{mg}/\text{m}^3$ 、20時間/日、7日/週、7週間吸入曝露し肺腫瘍発生を観察した。肺腺腫発生率は、対照群に比べて曝露群で高くなかった。しかし、ウレタンを投与して肺腫瘍発生を促進したマウスでは、曝露群の肺腺腫発生率が高くなった。吸入実験のうち、肺腫瘍好発系のA系マウスなどを用いた実験では、曝露群に肺腺腫の発生を認めているものの、対照群との差はみられない。同様に肺での腫瘍発生をウレタンで促進した系での検討でも、DE曝露の影響は対照群に比較して極めて小さいか差がみられてない(Kaplan(1982), Repelko(1983))

Heinrichら(1982)は、Syrianハムスター(雌、8週齢)にDEやその除粒子排気を吸入させ、その毒性と発がん性を検討した。ジベンゾ[a,h]アントラセン(DbahA)の経気道肺内投与やジエチルニトロサミン(DEN)の皮下投与とを併用すると除粒子排気群より全排気群での肺組織の増殖性変化や腫瘍発生率は高いと報告した。Heinrichら(1985)は、NMRIマウスにDbahAを皮下投与後、排気を曝露し肺腫瘍発生率に差はないが、個体あたりの肺腺腫数は曝露群で有意に高かったとし、さらに、NMRIマウスに粒子濃度 $4\text{mg}/\text{m}^3$ で、19時間/日、5日/週、30ヶ月曝露し、対照群に比べて高い肺腺腫、腺がん発生を観察したが、粒子成分を除いた除粒子群でも高く、この群と全排気群との差はなかった(Heinrichら(1986))

Brightwellら(1986)は、ラット、ハムスターに2年間のDE曝露を行い、肺腫瘍発生には量-反応関係がみられ、除粒子排気で有意な増加はなく、雄の高用量で71例中16例(23%)、中用量72例中3例(4%)、低用量72例中1例(1%)、雌の高用量で72例中39例(54%)、中用量で72例中11例(15%)、低用量で72例中0(0%)、対照群の雄では140例中3例、雌では142例中1例の肺腫瘍を観察した。除粒子排気曝露では、肺腫瘍の増加はなかった。ハムスターにDENを皮下投与後に曝露を行い、気管に乳頭腫の発生を認めたが曝露群と対照群に有意差はなかった。

Stöber(1986)は、DEまたは除粒子排気をハムスター、マウス、ラットに長期間曝露し、腫瘍の発生を観察した。全排気群、除粒子群は対照群に比べて腺がんを発生した動物の割合が高く、除粒子排気群と対照群には過形成、化生、腺腫、扁平上皮腫瘍の発生が観察されないが、排ガス群には観察された。

Mauderlyら(1986)は、F344ラットにDEを $0.35, 3.5, 7.1\text{mg}/\text{m}^3$ の粒子濃度で1日7時間、週5日、

表3-3 発がん実験（吸入曝露）

動物種	性 / 使用数	曝露物質	粒子濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	曝露時間・期間	併用など	曝露後観察	腫瘍型・発生率	補足	報告
ラット/Wista	雄, 40 雄, 40	清浄空気 全排気	0 8.3	6時間/日, 5日/週, 20ヶ月	なし	なし	腺腫 0/6 (0) 1/6 (16.6)		Karagianes ら (1981)
ラット/F344	雄 30 雄 30 雄 30 雄 30	清浄空気 全排気 全排気 全排気	0 0.25 0.75 1.5	20時間/日, 7日/週, 15ヶ月	なし	8ヶ月	気管支-肺胞がん 0/30 (0) 1/30 (3.3) 3/30 (10.0) 1/30 (3.3)		Kaplan ら (1983) White ら (1983)
ラット/Wista	雌, 96 雌, 92 雌, 95	清浄空気 除じん排気 全排気	0 0 4	19時間/日, 5日/週, 35ヶ月	なし	なし	腺腫 0/96 (0) 0/92 (0) 8/95 (8.4) がん 0/96 (0) 0/92 (0) 0/95 (0) 扁平上皮腫瘍 0/96 (0) 0/92 (0) 9/95 (9.4) 全腫瘍 0/96 (0) 0/92 (0) 17/95 (17.8)		Heinrich ら (1986a,b) Mohr ら (1986)
ラット/F344	雌, 24 雌, 24 雌, 24	清浄空気 除じん排気 全排気	0 0 4.9	8時間/日, 7日/週, 24ヶ月	なし	なし	腺腫 1/22 (4.5) 0/16 (0) 3/19 (0) 腺がん 0/22 (0) 0116 (0) 3/19 (15.8) 大細胞 扁平上皮がん 0/22 (0) 0/16 (0) 2/19 (10.5) 全腫瘍 1/22 (4.5) 0/16(0) 8/15(42.1)		Iwai ら (1986)
ラット/F344	雌 12 雌 21 雌 15 雌 18	清浄空気 清浄空気 全排気 全排気	0 0 2-4 2-4	4時間/日, 4日/週, 18-24ヶ月	なし DIPN なし DIPN	なし	腺腫 0/12 (0) 10/21 (47.6) 0/15 (0) 12/18 (66.7) がん 0/12 (0) 4/21 (19) 0/15 (0) 7/18 (38.9)		Takemoto ら (1986)
ラット/F344	雄 + 雌, 230 雄 + 雌, 223 雄 + 雌, 221 雄 + 雌, 227	清浄空気 全排気 全排気 全排気	0 0.35 3.5 7.1	7時間/日, 5日/週, 30ヶ月	なし	なし	腺腫 (0) (0) (2.3) (0.4) 腺がん (0.9) (1.3) (0.5) (7.5) squamous 扁平上皮がん (0) (0) (0.9) (4.9) 全腫瘍 (0.9) (1.3) (3.6) (12.8)		Mauderly ら (1986)
ラット/F344	雄 + 雌, 123 雄 + 雌, 123 雄 + 雌, 125 雄 + 雌, 123 雄 + 雌, 124	清浄空気 全排気 全排気 全排気 全排気	0 0.5 1.0 1.8 3.7	16時間/日, 6日/週, 30ヶ月	なし	なし	腺腫 0/123 (0) 0/123 (0) 0/125 (0) 0/123 (0) 0/124 (0) 腺がん 1/123 (0.8) 0/123 (0) 0/125 (0) 4/123 (3.3) 6/124 (4.8) 扁平上皮がん 0/123 (0) 1/123 (0.8) 0/125 (0) 0/123 (0) 2/124 (1.6) 全腫瘍 1/123 (0.8) 1/123 (0.8) 0/125 (0) 4/123 (3.3) 8/124 (6.5)	Heavy duty (JARI)	Ishinishi ら (1988)
ラット/F344	5 8 11 5 9 11	全排気	0.1 0.1 0.1 1.1 1.1 1.1	16時間/日, 6日/週, 12ヶ月	なし	6ヶ月 12ヶ月 18ヶ月 6ヶ月 12ヶ月 18ヶ月	腺腫 0/5 (0) 0/8 (0) 0/11 (0) 0/5 (0) 0/9 (0) 0/11 (0) がん 0/5 (0) 0/8 (0) 0/11 (0) 0/5 (0) 0/9 (0) 0/11 (0) 全腫瘍 0/5 (0) 0/8 (0) 0/11 (0) 0/5 (0) 0/9 (0) 0/11 (0)	Light duty (JARI)	Ishinishi ら (1988)
ラット/F344	5 9 11 5 6 13	全排気	0.5 0.5 0.5 1.8 1.8 1.8	16時間/日, 6日/週, 12ヶ月	なし	6ヶ月 12ヶ月 18ヶ月 6ヶ月 12ヶ月 18ヶ月	腺腫 0/5 (0) 0/9 (0) 0/11 (0) 0/5 (0) 0/6 (0) 0/13 (0) がん 0/5 (0) 0/9 (0) 0/11 (0) 0/5 (0) 0/6 (0) 1/13 (0) 全腫瘍 0/5 (0) 0/9 (0) 0/11 (0) 0/11 (0) 0/6 (0) 1/13 (0)	Heavy duty (JARI)	

表3-3 発がん実験（吸入曝露）

動物種	性 / 使用数	曝露物質	粒子濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	曝露時間・期間	併用など	曝露後観察	腫瘍型・発生率	補足	報告			
ラット/F344	雄 + 雌, 260	清浄空気	0	16 時間/日, 5 日/週, 24 ヶ月	なし	なし	肺腫瘍 3/260 (1.2)		Brightwell ら (1989)			
	雄 + 雌, 144	除じん排気 (medium exposure)	0				0/144 (0)					
	雄 + 雌, 143	除じん排気 (high exposure)	0				0/143 (0)					
	雄 + 雌, 143	全排気	0.7				1/143 (0.7)					
	雄 + 雌, 144	全排気	2.2				14/144 (9.7)					
	雄 + 雌, 143	全排気	6.6				55/143 (38.5)					
ラット/Wista	雌	清浄空気	0	19時間/日, DPN	なし	なし	扁平上皮がん (4.4)	全肺腫瘍 (84.8)	Henrich ら (1989)			
		全排気	4.2	5 日/週, 6.25mg/kg/週, 25週			(46.8)	(83.0)				
		除じん排気	0	30 ヶ月			(4.4)	(67.4)				
		清浄空気	0	19時間/日, DPN			(16.7)	(93.8)				
ラット/F344	雄 + 雌, 288	清浄空気	0	7時間/日, DPN	なし	なし	腫瘍なし	0/192 (0)	Lewis ら (1989)			
		全排気	2	5 日/週, 24 ヶ月			0/192 (9)					
		清浄空気	0	19時間/日, DPN			(16.7)	(93.8)				
		全排気	4.2	5 日/週, 12.5mg/kg/週, 25週			(31.3)	(89.6)				
ラット/F344	雄 + 雌, 123 雄 + 雌, 123 雄 + 雌, 125 雄 + 雌, 123 雄 + 雌, 124	清浄空気	0	16 時間/日, 6 日/週, 30 ヶ月	なし	なし	腺腫	腺がん + 腺扁平上皮がん	扁平上皮がん	全腫瘍	Light duty(JARI) Takaki ら (1989)	
		全排気	0.1				1/23 (0.8)	2/123 (1.6)	1/23 (0.8)	4/123 (3.3)		
		全排気	0.4				1/23 (0.8)	0/125 (0)	1/23 (0.8)	3/123 (2.4)		
		全排気	1.1				1/25 (0.8)	0/125 (0)	1/125 (0.8)			
		全排気	1.1				0/23 (0)	5/123 (4.1)	0/123 (0)	5/123 (4.1)		
		全排気	2.3				1/24 (8.1)	2/124 (1.6)	0/124 (0)	3/124 (2.4)		
ラット/F344	雌, 48 45 42 49	清浄空気	0	15時間/日, 3日/週 6 ヶ月 12 ヶ月 24 ヶ月	なし	なし	発生数 (率)	腫瘍数 (がん)	Kawabata (1994)			
		4.7	5/48(10)				6(0)					
		4.7	1/45(2)				1(1)					
		4.7	8/42(19)				9(2)					
ラット/Wista	雌 220 雌 200 雌 200 雌 100 雌 100 雌 100	清浄空気	0	18 時間/日, 5 日/週, 24 ヶ月	なし	6 ヶ月	腺腫	腺がん	扁平上皮がん	良性扁平上皮腫瘍	Heinrich ら (1995)	
		全排気	0.8				0/217 (0)	1/217 (<1)	0/217 (0)	0/217 (0)		
		全排気	2.5				0/198 (0)	0/198 (0)	0/198 (0)	0/198 (0)		
		全排気	7				2/200 (1)	1/200 (<1)	0/200 (0)	7/200 (3.5)		
		カーボンブラック	11.6				4/100 (4)	4/100 (4)	2/100 (2)	14/100 (14)		
		TiO <sub>2</sub>	10.0				13/100 (13)	13/100 (13)	4/100 (4)	20/100 (20)		
ラット/F344	雄 + 雌, 214 雄 + 雌, 210 雄 + 雌, 212 雄 + 雌, 213 雄 + 雌, 211	清浄空気	0	16 時間/日, 5 日/週, 24 ヶ月	なし	6 週	腺腫	腺がん	扁平上皮がん	腺扁平上皮がん	他の新生物	Nikula ら (1995)
		全排気	2.5				1/214 (<1)	1/214 (<1)	1/214 (<1)	0/214 (0)	0/214 (0)	
		全排気	6.5				7/210 (3)	4/210 (2)	3/210 (1)	0/210 (0)	0/210 (0)	
		全排気	6.5				23/212 (11)	22/212 (10)	3/212 (1)	1/212 (<1)	0/212 (0)	
		カーボンブラック	2.5				3/213 (1)	7/213 (3)	0/213 (0)	0/213 (0)	1/213 (<1)	
		カーボンブラック	6.5				13/211 (6)	21/211 (10)	3/211 (1)	2/211 (<1)	0/211 (0)	
ラット/F344	雌, 121 雌, 108 雌, 153	清浄空気	0	なし 48-56 時間/週 48-56 時間/週	なし	なし	5/121 (4%)	61.3% 腺腫, 25.8% 腺がん, 2.2% 良性扁平上皮腫瘍, 7.5% 扁平上皮がん, 3.2% 腺扁平上皮がん	Iwai ら (1997)			
		除じん空気	0				2/108(4%)					
		全排気	3.2-9.4				53/153(35%)					
ラット/F344	雌 50 雌 48 雌 48 雌 48 雌 48	清浄空気	0	17 時間/日, 3 日/週, 3,6,9,12 ヶ月	なし	なし	肺腫瘍発生率 (%)	Iwai ら (2000)				
		全排気	3.5				0					
		全排気	3.5				14.0					
		全排気	3.5				40.4					
		全排気	3.5				22.7					

表3-3 発がん実験（吸入曝露）

動物種	性 / 使用数	曝露物質	粒子濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	曝露時間・期間	併用など	曝露後観察	腫瘍型・発生率	補足	報告	
マウス Strong A	雄, 25	清浄空気	0	20 時間/日,	なし		3/22 (13.6)	0.13 腫瘍/マウス	Orthofer ら (1981)	
		全排気	6.4	7 日/週,	なし	26 週	7/19 (36.8)			0.63
		全排気	6.4	7週	UV照射	26 週	6/22 (27.3)			0.27
マウス/ Jackson A	雌, 60 雌, 60 雌, 60 雌, 60 雄, 429 雄, 430	清浄空気	0	20 時間/日, 7 日/週, 7 ヶ月	なし		4/58 (6.9)	0.09 腫瘍/マウス	Kaplan ら (1982)	
		清浄空気	0		ウレタン		9/52 (17.3)			0.25
		全排気	6.4		なし		14/56 (25.0)			0.32
		全排気	6.4		ウレタン		22/59 (37.3)			0.39
		清浄空気	0		なし		73/403 (18.0)			0.23
		全排気	6.4		なし		66/368 (17.9)			0.20
マウス/ A/J	雄 458 雄 18 雄 485	清浄空気	0	20 時間/日,	なし	6 ヶ月	肺腺腫 144/458 (31.4)	Kaplan ら (1983)		
		清浄空気	0	7 日/週,	ウレタン		18/18 (100)			
		全排気	1.5	3 ヶ月	なし		165/485 (34.2)			
マウス/ A/J	雄, 388 雄, 388 雄, 399 雄, 396	清浄空気	0	20 時間/日,	なし	なし	130/388 (33.5)	White ら (1983)		
		全排気	0.25	7 日/週,			131/388 (33.8)			
		全排気	0.75	8 ヶ月			109/399 (27.3)			
		全排気	1.5				99/396 (25.0)			
マウス/ Jackson A	雄 + 雌, 40 雄 + 雌, 40	清浄空気	0	20 時間/日,	なし	8 週	肺腫瘍 16/36 (44.4)	0.5 腫瘍/マウス	'epelkoとPeirano (1983)	
		全排気	6.4	7 日/週, 8週			11/34 (32.3)			0.4
マウス/Senca 雄 + 雌, 260		清浄空気	0	15 ヶ月	なし	なし	腺腫 (5.1)	がん (0.5)	全腫瘍 (5.6)	
		清浄空気	0		BHT (12.2)		(1.7)	(2.8)		
		清浄空気	0		ウレタン (8.1)		(0.9)	(9.0)		
		全排気	12		なし (10.2)		(1.0)	(11.2)		
		全排気	12		BHT (5.4)		(2.7)	(8.1)		
		全排気	12		ウレタン (8.7)		(2.6)	(11.2)		
マウス/ Strain A	雄 + 雌, 90	清浄空気	0		なし	なし	全腫瘍 21/87 (24)	0.29 腫瘍/マウス	'epelkoとPeirano (1983)	
		清浄空気	0		Exposure		59/237 (24.9)			0.27
		全排気	12		Exposure		10/80 (12.5)			0.14
		全排気	12		(darkness)		22/250 (24.9)			0.1
		清浄空気	0		ウレタン		66/75 (88)			2.8
		全排気	12		ウレタン		42/75 (56)			0.95
マウス/NMR	雌, 96	清浄空気	0	19 時間/日, 5 日/週, 30 ヶ月	なし		腺腫/マウス 0.075±0.054	Heinrich ら (1985)		
		清浄空気	0		5µg DB(a,h)A		0.97±0.42			
		清浄空気	0		10µg DB(a,h)A		7.8±1.74			
		全排気	4.0		5µg DB(a,h)A		1.17±0.40			
		全排気	4.0		10µg DB(a,h)A		4.16±1.15			
		除じん排気	0		5µg DB(a,h)A		1.71±0.52			
除じん排気	0	10µg DB(a,h)A	7.33±1.86							
マウス/ NMR J	雄 + 雌, 84 雄 + 雌, 93 雄 + 雌, 76	清浄空気	0	19 時間/日,	なし	なし	腺腫 9/84 (11)	腺がん 2/84 (2)	全腫瘍 11/84 (13)	
		除じん排気	0	5 日/週			11/93 (12)	18/93 (19)	29/93 (31)	
		全排気	4.0	30 ヶ月			11/76 (15)	13/76 (17)	24/76 (32)	
マウス/ ICR	雄 + 雌, 45 雄 + 雌, 69	清浄空気	0	4 時間/日,	なし	なし	腺腫	腺がん	Takemoto ら (1986)	
		全排気	2-4	4 日/週, 19-28 ヶ月			6/69 (8.7)	3/69 (4.3)		
マウス/ C57BL	雄 + 雌, 12 雄 + 雌, 38	清浄空気	0	4 時間/日,	なし	なし	3/45 (6.7)	1/45 (2.2)		
		全排気	2-4	4 日/週, 19-28 ヶ月			6/69 (8.7)	3/69 (4.3)		

表3-3 発がん実験（吸入曝露）

動物種	性 / 使用数	曝露物質	粒子濃度 (mg/m <sup>3</sup> )	曝露時間・期間	併用など	曝露後観察	腫瘍型・発生率			補足	報告	
マウス/ C57BL/6N	雌, 120	清浄空気	0	18時間/日,	なし	6ヶ月	1/12 (8.3)	0/12 (0)	5.1% 腫瘍発生率			
	雌, 120	全排気	4.5	5日/週,			8/38 (21.1)	3/38 (7.9)	8.5%			
	雌, 120	除粒子排気	0	21ヶ月					3.5%			
マウス/NMR1	雌, 120	清浄空気	0	18時間/日,	なし	9.5ヶ月	腺腫 (25)	腺がん (15.4)			Heinrichら (1995)	
	雌, 120	全排気	4.5	5日/週,			(21.8)	(15.4)				
		カーボンブラック TiO <sub>2</sub>	11.6 10	13.5ヶ月			(11.3)	(10)	(11.3) (2.5)			
マウス/NMR1	雌, 120	清浄空気	0	18時間/日,	なし	なし	(25)	(8.8)				
	雌, 120	全排気	4.5	5日/週,			(18.3)	(5)				
	雌, 120	除粒子排気	0	23ヶ月			(31.7)	(15)				
マウス/CD-1	雄 + 雌, 157	清浄空気	0	7時間/日,	なし	なし	多発 腺腫	多発 がん	腺腫/ がん	肺胞/ 細気管支腺腫	肺胞/ 細気管支がん	Mauderlyら (1996)
	雄 + 雌, 171	全排気	0.35	5日/週,			1/157 (0.6)	2/157 (1.3)	1/157 (0.6)	10/157 (6.4)	7/157 (4.5)	
	雄 + 雌, 155	全排気	3.5	5日/週,			2/171 (1.2)	1/171 (0.6)	1/171 (0.6)	16/171 (9.4)	5/171 (2.9)	
	雄 + 雌, 186	全排気	7	24ヶ月			0/155 (0)	1/155 (0.6)	0/155 (0)	8/155 (5.2)	6/155 (3.9)	
						0/186 (0)	0/186 (0)	0/186 (0)	10/186 (5.4)	4/186 (2.2)		
ハムスター/ Syrian	48	清浄空気	0	8時間/日 5日/週 2年	なし	なし	乳頭腫(喉頭/気管)	巣状過形成	肺腫瘍			Heinrichら (1982)
	48						なし	0	0			
	48						DB(a,h)A 2mg	0	0			
	48						DB(a,h)A 6mg	6	0			
	48						Pyrene 2mg	2	0			
	72						DEN 1.5mg/kg	13.4	0	0		
	48	DEN 4.5mg/kg	44.7	2	0							
	48	全排気	3.9	8時間/日 5日/週 2年	なし	なし	なし	13	0	0		
	48							なし	31	0		
	48							DB(a,h)A 2mg	30	0		
	48							DB(a,h)A 6mg	16	0		
	48							Pyrene 2mg	8	1		
	57							DEN 1.5mg/kg	72	13	0	
	48	DEN 4.5mg/kg		0	0							
48	除じん排気						10	0	0			
48							なし	17	1			
48							DB(a,h)A 2mg	10	0			
48							DB(a,h)A 6mg	2	0			
48							Pyrene 2mg	66	4	0		
48							DEN 1.5mg/kg					
48	DEN 4.5mg/kg											
ハムスター/ Syrian	雄 + 雌, 96	清浄空気	0	19時間/日	なし	なし	腺腫	腺がん	扁平上皮腫瘍	全腫瘍	Heinrichら (1986)	
	雄 + 雌, 96	除じん排気	0	5日/週			0/96 (0)	0/96 (0)	0/96	0/96(0)		
	雄 + 雌, 96	全排気	4.0	30ヶ月			0/96 (0)	0/96 (0)	0/96	0/96(0)		
ハムスター / Syrian Golden	雄 + 雌, 202	清浄空気	0	16時間/日,	なし	なし	原発肺腫瘍				Brightwellら (1989)	
	雄 + 雌, 104	清浄空気	0				DEN	7/202 (3.5)				
	雄 + 雌, 104	除じん排気(medium dose)	0				DEN	4/104 (3.8)				
	雄 + 雌, 104	除じん排気(high dose)	0				DEN	9/104 (8.7)				
	雄 + 雌, 101	全排気	0.7				5日/週,	DEN	2/101 (2.0)			
	雄 + 雌, 102	全排気	2.2				24ヶ月	DEN				
	雄 + 雌, 101	全排気	6.6					DEN	6/102 (5.9)			
	雄 + 雌, 204	除じん排気(high dose)	0					DEN	4/101 (3.9)			
	雄 + 雌, 203	全排気	6.6					なし	1/204 (0.5)			
				なし	0/203 (0)							

BHT: Butylated hydroxytoluene, DB(a,h)A: Dibenzo[a,h]anthracene, DEN: Diethyl nitrosamine, DIPN: Di isopropanol nitrosamine, DPN: Dipentyl nitrosamine.

30 ヶ月曝露し、肺腫瘍発生率は、それぞれ 1.3, 3.6, 12.8% で明確な量-反応関係が観察した。

Ishinishi ら(1986) は、F344 ラットに重量級または軽量級 DE を 30 ヶ月吸入させた。肺腫瘍は、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、軽量級では濃度に関わらず発生し、重量級では濃度に依存して発生し、 $3.7\text{mg}/\text{m}^3$  でのみ対照に対し有意な差であった。ガス成分による気管や気管支上皮の繊毛の短縮や欠損がみられ、濃度や期間に伴い増加した。 $0.4\text{mg}/\text{m}^3$  以下では肺胞の変化はなく、それ以上でもわずかである。

Takemoto ら(1986) は、DE を F344 ラット、ICR および C57Bl マウスに長期間曝露し、肺腫瘍発生を観察した。ラットでは、DE 単独群に肺腫瘍の発生が観察されなかったが、ジイソプロパノールニトロサミン(DIPN) の投与と排気曝露を併用した群で、DIPN 単独群と比べ高い肺腫瘍発生率を観察した。また、出生 24 時間以内からのマウス(C57Bl および B6C3F1) 新生仔期から曝露を開始し、28 ヶ月までの継続曝露および 9 ヶ月までの曝露から清浄空気で 30 ヶ月まで飼育し、対照群に比べ肺腫瘍発生率が高くなることを観察した。

Takaki ら(1989) は、軽量級 DE を  $0.1, 0.4, 1.1, 2.3\text{mg}/\text{m}^3$  の粒子濃度で 16 時間/日、5 日/週、30 ヶ月の曝露を行い、肺腫瘍を観察した。曝露群の肺に腺腫、腺がん、腺扁平上皮がん、扁平上皮がんの発生を認めたと、対照群との明らかな差はなく、量反応関係もみられなかった。しかし、肺の過形成は曝露濃度に依存して病変の存在が高くなった。

Heinrich ら(1989) は、ハムスターへの DE、除粒子曝露、 $\text{NO}_2 + \text{SO}_2$  の曝露、DEN との併用群を設定し、DEN 高用量、排気曝露群で上部気道腫瘍の増加を認めたものの、他の群では排気曝露の影響はみられなかった。

Brightwell ら(1989) は、ラット、ハムスターに 2 年間 DE を曝露し、肺腫瘍発生を観察した。ラットでは腫瘍発生率に量-反応関係がみられ、特に雄よりも雌で顕著に増加した。除粒子群には有意な肺腫瘍の増加はない。ハムスターでは明らかな腫瘍増加はなく、DEN 投与後に曝露を行ったが対照群との有意差はない。

Kawabata ら(1994) は、F344 ラット雌の 4 週齢時から DE を 6, 12, 18 ヶ月曝露し、その後 30 ヶ月までに発生した肺腫瘍を観察し、曝露群に肺腫瘍を観察したが、曝露期間の延長と発生率に関連の低いことが示唆され、早期の曝露、もしくは曝露後の期間が影響していることを示した。

Heinrich ら(1995) は、Wistar ラットと NMRI マウスに DEP、 $\text{TiO}_2$ 、カーボンブラックを吸入曝露し、肺腫瘍発生を観察した。高濃度の DE、 $\text{TiO}_2$ 、カーボンブラック曝露によってラットに肺腫瘍発生がみられたものの、一方、マウスでは腫瘍発生率に曝露の影響はみられなかった。

Nikula ら(1995) は、DE 中に含まれる有機化合物のラット肺腫瘍に与える能力を調べるために、DE とカーボンブラックを F344 ラットに曝露した。高粒子濃度  $6.5\text{mg}/\text{m}^3$  の DE およびカーボンブラックによる肺腫瘍発生率は両群で近い値で、Squamous cysts の発生割合、生存率がともに類似していた。その結果から、DE に含まれる有機化合物は、ラット肺腫瘍発生への寄与は小さいと述べている。

Mauderly ら(1996) は、F344 ラットで肺腫瘍についての量-反応関係を見いだした吸入実験と同じ条件で CD-1 マウスへの  $0.35$  から  $7\text{mg}/\text{m}^3$  の粒子濃度で、7 時間/日、5 日/週の曝露を 24 ヶ月間吸入

入実験を実施した。肺の腺腫、腺がんの発生率は全群で有意な差がなく、量-反応関係も観察されず、マウスに対して DE の発がん性は示されなかった。

Iwai ら(1997) は、DE を F344 ラットに吸入曝露し、6 ヶ月後から II 型上皮や気管支上皮の増殖性病変が出現し、この病変は曝露期間の延長にしたがい拡大したと報告した。2 年間の曝露により肺の悪性腫瘍発生率を高めた。また、除粒子排気曝露群での主な死因は全排気曝露と同様に、白血病の合併を高頻度に伴う悪性リンパ腫で対照群の頻度より有意に高かった。乳腺腫瘍、皮膚の線維腫、繊維肉腫も曝露群で高く、重複がんの発生は曝露群でのみ観察された。リンパ腫が除粒子群で多いのはガス成分の作用であり、肺腫瘍は排気粒子の作用と異なる発がん機構の存在について考察している。

Iwai ら(2000) は、F344 ラットに若齢時から、粒子濃度  $3.5\text{mg}/\text{m}^3$ 、17 時間/日、3 日/週で 3、6、9、12 ヶ月の DE 曝露を行い、30 ヶ月までの肺腫瘍発生を観察した。腫瘍発生率は、9 ヶ月曝露で最も高く 40.4%、ついで 12 ヶ月 22.7%、6 ヶ月 14.0%、3 ヶ月 0%、対照群 2%となった。これは、曝露期間の延長は肺腫瘍の発生率上昇に反映せず、曝露時期の影響が大きいか、あるいは、曝露期間延長に伴う障害の修復あるいは腫瘍発生を抑制的な反応の存在について言及している。

発がん性検討のための長期吸入実験は、曝露濃度  $0.1 \sim 9.4\text{mg}/\text{m}^3$ 、曝露時間 4 ~ 17 時間/日、曝露日数 3 ~ 7 日/週、曝露期間 3 ~ 35 ヶ月の条件で実施された。それらの条件に加えて、曝露曝露後の放置観察期間を設定した例や既知の発がん物質を併用した例が報告されている。ラットを対象とした吸入実験のほとんどで肺腫瘍の発生増加を観察している。DE 中のガス状成分の影響を評価するために除粒子曝露群を設定し観察した報告によると、清浄空気の群と肺腫瘍発生率の差を認めないでない。観察された肺腫瘍の組織型は腺腫、腺がんの率が高く、扁平上皮がんは少ない。病理学的な判定の基準は、吸入実験に限らず肺発がん実験の結果を比較するうえで重要な点であるが、特に類表皮嚢腫 (Epidermoid cyst, squamous cyst, cystic keratinizing epithelioma あるいは benign squamous tumor の一部) は、加齢したラットの肺に自然発生する変化として知られているが、発がん性に関わる病理変化として取り扱う報告と含めない報告とがみられる。最近のこの病変の分類に関するワークショップでは、この病変が発がん実験で観察された場合には、それぞれの試験の独自性に応じて判断し、総合的に生物学反応の一部としてみなしていくとしている。もし、この病変だけが発がん性の根拠となる場合には、ある物質または粒子のヒトに対する安全性の評価において重要であるとは判断できない。類表皮嚢腫は、扁平上皮がんまたは扁平上皮化生との判別では病理判定者によって異なる場合があることも理由の一つである。また、発がん性における意義については、意味のある病変として評価はできるが、ある群にこの病変のみが観察された場合には、定量的な評価に用いることに関しては疑問が提示されている。発がん性の強さを吟味する場合のこの病変の扱いは、さらに疑問である。

現在のところ、吸入曝露実験は、職業環境あるいは大気中吸入物質のヒトへの外挿に最も適している手法であり、多くの種類の職業性曝露化学物質に対して必要な情報が提供されている。DE は、これらの化学物質とは異なり、燃焼生成物として多様な成分を含有し、物理学的な特性にも大きな差があるため、多くの検討例があるものの結果にもある程度の差がみられる。多くの吸入実験が実施さ

施されてきたが、粉じん濃度以外には、DEP の性状および成分、ガス状成分に関して詳細なデータを記載している報告は多くはなく、それらの結果を比較または補正して判断することは容易ではない状況である。他の投与方法による検討でも同様であるが、DE あるいは DEP は、多様な成分を含有し、それらはエンジンの形式、燃料によって異なり、さらに運転条件によって変動することは良く知られている。また、吸入実験においては、排気の希釈方法が成分や性状に影響を与えることも報告されている。したがって、ここにまとめた吸入実験の成績は、すべて DE への曝露影響ではあるものの、不特定の質的な差については評価していない。今後、ディーゼルエンジンおよび排気系統が改良されていくと予想される中で、これらの吸入実験成績や今後の有用な研究を実施するために、曝露成分に関するデータの蓄積は有効である。

## 2) 経気道肺内投与実験【表 3-4】

Shefner ら(1982)は、DEP をハムスターに気管内投与したところ、ハムスターに腺様化生増殖や腺腫を観察した。過形成、化生性病変が正常組織に戻るのか、あるいは腫瘍になるのか明らかにできなかった。

Kawabata ら(1986)は、F344 ラット雌に 1mg/0.2ml の DEP または活性炭を週 1 回、1、4、8 週間、経気道投与し、時間の経過とともに増殖性病変が増加することを確認した。肺の悪性腫瘍は、DEP 群で 42 例中 20 例、活性炭群で 23 例中 11 例認めた。また、F344 ラット雌に DEP を 4 段階(0.125、0.5、2.0、8.0mg/rat)の用量で経気道肺内投与(1 回/2 週、8 週間)し、投与量と肺腫瘍発生率に量-反応関係見いだした。投与量の少ない群では、肺に粒子の存在をわずかに認めるが肺病変は認められなかった。投与量の中程度の群では、肺間質に粒子、軽度の肺炎を認めた。投与量の多い群では、43%に肺腫瘍を認め、組織型は主に腺腫と腺がんであった。また、投与量の多い群を実験開始から 2 年経過後に、肺腫瘍の発生割合を観察したところ先に観察したときよりも 55%と高かった。これは、粒子の肺に対する影響の量反応関係を示すものと述べている(Iwai (1991), Kawabata (1993))

Dasenbrock ら(1996)は、ラットに DEP とカーボンブラック、およびそれらの洗浄粒子や BaP 処理粒子を経気道投与し、腫瘍発生を観察を行った。DEP による腫瘍発生は 48 例中 8 例であったのに対し、その洗浄粒子で 48 例中 2 例であった。洗浄カーボンブラックの発がん性はその粒径や表面積に依存している。BaP 処理した DEP による腫瘍発生(8%)は、BaP 含量は少ないものの様々な PAH を含む本来の DEP(17%)よりも低かった。

Ichinose ら(1997)は、ICR マウスへの DEP、洗浄 DEP、二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )の経気道肺内投与を実施し、肺腫瘍は DEP 投与群に最も高い発生率であったが、洗浄 DEP および  $\text{TiO}_2$  の投与でも肺腫瘍が発生し対照群よりも高かったと報告している。

Iwai ら(1998)は、軽油中の硫黄含量の異なる軽油を燃料とした DE から粒子を回収し、それをラットに経気道肺内投与して 30 ヶ月後まで病理組織学的観察を行った。その結果、通常軽油群と低硫黄軽油群との肺腫瘍発生率は、2mg 投与群で 4.1%と 2.1%、4mg 群で 8.0%と 22.4%、8mg 群で 25.0%と 42.9%となった。低硫黄軽油群での肺腫瘍発生率は通常軽油に比べて高いが、低硫黄軽

表3-4 発がん実験（吸入曝露以外の投与・曝露）

動物種	性, 使用数	投与方法	投与物質	用量 (mg)	投与回数・期間	結果	報告
ラット						悪性肺腫瘍	
F344	雌,31	経気道投与	活性炭	1	1/週, 1,4,10週間	7/23	Kawabataら (1986)
			DEP	1		20/42	
			未処置			0/44	
			溶媒のみ			1/23	
Osborne Mendel	雌,35	胸腔埋込	親水成分	6.7		腺腫 1	Grimmerら (1987)
			疎水成分	20.0		扁平上皮がん 5(14.2%)	
			非芳香族炭化水素 + PAHs	19.2		腺腫 1	
			PAHs (4環以上)	0.2		扁平上皮がん 6(17.1%)	
			極性PAHs	0.3		0	
			二ト口PAHs	0.2		扁平上皮がん 1(2.8%)	
			希釈疎水成分	19.9		扁平上皮がん 7 (20%), 腺腫 1	
			未処置			0	
			担体			腺腫 1	
			BaP	0.03		扁平上皮がん 3(8.6%)	
	0.1	扁平上皮がん 11(31.4%)					
	0.3	扁平上皮がん 27(77.1%)					
F344	雌,50	経気道投与	DEP	0.125	1/2週, 8週間	1/48	Kawabataら (1993)
				0.5		1/48	
				2		3/47	
				8		24/56	
				0		2/48	
Wistar	雌,40	経気道投与	DEP 34 m <sup>2</sup> /g	3	×15	65	Pottら (1994)
			70 m <sup>2</sup> /g	3	×10	60	
			70 m <sup>2</sup> /g	3	×20	66	
			カーボンブラック 270 m <sup>2</sup> /g	3	×15	65	
			活性炭860 m <sup>2</sup> /g	3	×10	27	
			生理食塩水	0.4ml	×15	0	
			生理食塩水	0.4ml	×20	0	
Wistar	雌,48	経気道投与	DEP	1	×15	65	Heinrichら (1994)
			DEP (トルエン抽出物)	2	×15	23	
				1	×15	4	
			カーボンブラック (トルエン抽出 270)	1	×15	21	
			カーボンブラック (トルエン抽出 22)	1	×15	8	
			生理食塩水			0	
CrI:(WI)BR	雌,50	経気道投与	DEP (original)	total 15		17	Dasenbrockら (1996)
			洗浄粒子	30		21	
			洗浄粒子	15		4	
			洗浄Printex	15		21	
			洗浄Lamp Black	15		8	
			BaP	30		90	
			BaP	15		25	
			洗浄粒子 + BaP170μg	15		8	
			洗浄Printex90 + BaP443μg	15		27	
			溶媒のみ			0	
F344	雌,50	経気道投与	DEP (低硫黄軽油)	total 2	1/2週, ×1	1/48	Iwaiら (1998)
				4	×2	11/49	
				8	×4	22/49	
			DEP (通常軽油)	2	×1	2/49	
				4	×2	4/50	
				8	×4	12/48	
F344	雄,158	経気道投与	カーボンブラック粒子 (CBP)	0.2	1/週, 4週間	5/24	Ohyamaら (1999)
			DEP抽出物被覆CBP (DEcCBP)			0/29	
			DEcBP+SO <sub>2</sub>			5/30	
			DEcBP+NO <sub>2</sub>			6/24	
			DEcBP+SO <sub>2</sub> +NO <sub>2</sub>			3/28	
			溶媒のみ			0/23	

表3-4 発がん実験（吸入曝露以外の投与・曝露）（続き）

動物種	性, 使用数	投与方法	投与物質	用量 (mg)	投与回数・期間	結果	報告
ハムスター							
			DEP	1.25 2.5 5.0	1/週, 15週間	報告なし 1 腺腫 0	Shefnerら (1982)
Syrian golden	雄,50	経気道投与	DEP+Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2.5/週 5.0	1/週, 15週間	1 腺腫 1 未分化悪性腫瘍	
			抽出物+Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2.5/週 5.0	1/週, 15週間	2 未分化悪性腫瘍 1 腺腫	
	雄,62 雄,62 雄,62 雄,59 雄,62	経気道投与	ジクロロメタン抽出物	0.1 0.5 1.0	1/週, 15週間	1.7 0 2.3	Kunitakeら (1986)
Syrian golden			溶媒のみ			1.7	
			BaP	0.5		88.2	
			抽出物+BaP	0.1+0.5	1/週, 15週間	91.2	
マウス							
C57Bl	雄,12 雌,40	皮膚塗布	アセトン抽出物	0.5ml	3/週, 生涯	別表3-2A	Kotin (1955)
Strain A	雄,50 雌,25	皮膚塗布	アセトン抽出物	0.5ml	3/週, 生涯		
				0.1 0.5 1.0 2.0 4.0	1/週, 50-52週間	別表3-2B	Nesnowら (1982,1983)
Sencar	雄,40 雌,40	皮膚塗布	ジクロロメタン抽出物				
				10 25 50 100 200 500	1/週, 5週間		Kunitakeら (1986)
C57Bl/6N	15~30	皮下投与	DEP (オリーブ油ケン濁) 5% DMSO含有				
				0.1	1/週, 10週間	9/26	Ichinoseら (1997)
ICR	雄	経気道投与	DEP				
			洗浄DEP			7/27	
			TiO <sub>2</sub>			5/27	
						3/27	

油の DEP は粒径が小さいために肺内への貯留粒子量も多いことが影響していると考察している。

Ohyama ら(1999) は、ラット肺がん発生に与える DEP 抽出物の影響および NO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>のプロモーション作用を検討した。F344 ラット雄にカーボンブラック粒子(CBP), DEP 抽出物被覆カーボンブラック粒子(DECcBP)を 0.2mg, 計 4 回経気道投与し、その後 NO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>を曝露した。DECcBP 群では肺腫瘍は観察されなかったが、CBP 投与群 2.1%, DECcBP 投与後 SO<sub>2</sub> 曝露群 17%, DECcBP 投与後 NO<sub>2</sub> 曝露群 25%, DECcBP 投与後 SO<sub>2</sub> + NO<sub>2</sub> 曝露群 11%の肺腫瘍発生を認めた。

## B. DEP の成分についての検討結果

### 1) DEP 抽出成分

Kotin ら(1955) は、DEP を暖機(負荷なし)または荷重運転時に DEP を回収し、そのアセトン抽出物をマウスの皮膚に塗布し腫瘍の発生を観察した。暖気運転時の DEP 抽出物塗布で C57Bl マウスに 13 ヶ月後に 2 例の乳頭腫、荷重運転時の DEP 抽出物塗布では、A 系マウス雄に 4 例の腫瘍(組織型不明)、A 系マウス雌に 17 例(組織型不明)の腫瘍発生を認めた(別表 3-4A)。

Nesnow ら(1983) は、DEP、ガソリンエンジン排気、石炭オープン、屋根用タールをマウスの皮膚に塗布し、腫瘍イニシエーター、完全発がん物質(complete carcinogen)、腫瘍プロモーターの作用について検討した。その結果、石炭オープンと屋根用タールは腫瘍プロモーター、イニシエーター、完全発がん物質としての作用を、A 社製ディーゼルエンジンの DEP と F 社製ディーゼルエンジンの排気は腫瘍イニシエーターとしての作用を有していた。マウスあたりの乳頭腫数を非直線ポアソンモデルに当てはめると、乳頭腫発生に対する作用は、石炭オープン>A 社製ディーゼルエンジン>屋根用タール>C 社製ディーゼル=F 社製ガソリンエンジンであった(別表 3-4B)。

Depass ら(1982) は、DEP とそのジクロルメタン抽出液を 1 群 40 匹のマウス皮膚に塗布した。いずれの試験でも腫瘍発生の有意な増加はなく、発がん性、プロモーション作用、イニシエーション作用はほとんどない。

Kunitake ら(1986) は、ICR、C57Bl マウス、ハムスターに DEP タール(DET)を皮膚塗布や皮膚投与後、皮膚腫瘍が有意に発生して発生率や時期に量-反応関係を認めた。イニシエーターとして ICR に DET および DET+BaP:45, 15, 5mg, タバコ煙濃縮物(CSC): 4mg, BaP: 18μg 皮膚塗布後、週 3 回 25 週 TPA 塗布、C57Bl に DET と CSC: 10, 25, 50, 100, 200, 500mg/kg 週 4 回、5 週皮下投与し、18 ヶ月観察した。ICR では、皮膚乳頭腫の発生率は低いが量-反応関係を認め、C57Bl では、DET は最高用量で有意差を認めた。CSC は全群で有意差がみられた。発生時期は用量に依存していた。ICR と C57Bl 新生仔には、2.5, 5, 10mg DET と 0.5mg CSC 皮膚塗布し、24 ヶ月観察したが、ICR と C57Bl 新生仔では、雄で対照群より肝腫、リンパ腫、肺腫瘍が高い傾向だが有意差はなかった。皮膚腫瘍は発生しなかった。ハムスターに DET: CSC: BaP = 3 : 5 : 6 の混合物を経気道投与、週 1 回、15 週の経気道投与、また、ハムスターに、DET 15, 7.5, 1.5mg, BaP 7.5mg+DET 1.5mg, BaP 7.5mg, BaP 0.03 μg, CSC 15mg を経気道投与し、腫瘍発生を観察した。ハムスターへの経気道投与で腫瘍発生は認めたが明らかな傾向はなく、各群間に有意差はみられなかった。

Grimmer ら(1987, 1991) は、DEP 中に含まれる種々の燃焼生成物について芳香族炭化水素

別表3-4A DEP(アセトン)抽出物マウス皮膚塗布実験

動物数	系統/性	被験物質	最初の腫瘍が 出現した時期 (月)	最初の腫瘍が 出現するまで の生存率	腫瘍数
52	C57BL/40 雌 C57BL/12 雄	暖機運転中に回収したDEPの抽出物	13	33	2
50	Strain A/雄	荷重運転時に回収したDEP抽出物	15	8	4
25	Strain A/雌	荷重運転時に回収したDEP抽出物	13	20	17

(出典)

別表3-4B 燃焼生成物(ジクロロメタン)抽出物(Sencar)マウス皮膚塗布による発がん作用の検討

試料	発がんイニシエーション		完全発がん	発がんプロモーション
	乳頭腫	がん	がん <sup>b</sup>	乳頭腫 <sup>a</sup>
ベンゾ[a]ピレン	+/+ <sup>c</sup>	+/+	+/+	+/+
Topside coke oven	+/+	-/+	ND <sup>d</sup>	ND
Coke oven main	+/+	+/+	+/+	+/+
Roofing tar	+/+	+/+	+/+	+/+
A社製ディーゼルエンジン	+/+	+/+	-/-	ND
B社製ディーゼルエンジン	+/+	-/-	-/-	ND
C社製ディーゼルエンジン	+/+	-/-	I <sup>e</sup>	ND
D社製ディーゼルエンジン	+/-	-/-	ND	ND
E社製ディーゼルエンジン	-/-	-/-	-/-	ND
Residential furnace	-/-	-/-	ND	ND
F社製ガソリンエンジン	+/+	-/+	ND	ND

a:6カ月で評価

b:1年後の累積評価

c:雄/雌

d:ND = 検討せず

e:I = 不完全

(出典) : Nesnowら (1982, 1983)

(PAH)と極性成分ほかで発がん性を比較しそれぞれの関与の程度を見積もっている。Osborne Mendel ラット雌の胸腔に2~3環持つPAHと非芳香族炭化水素,4環以上持つPAH,極性PAH,ニトロ化PAHのサブ画分に分けた被験物質をビーズワックス法で埋込み,肺腫瘍発生を観察した。PAHは35例中6例に,ニトロ化PAHは35例中1例に,扁平上皮がんの発生を認めた。DEP抽出物のうち,疎水成分,さらにPAHsの発がん性への関与はおおよそ80%と見積もられ,ニトロ化PAHの影響はあるが大きくはないことを示した。

## 2) 炭素粒子

Kawabataら(1986,1988)は,F344ラットに1mg/0.2mlの活性炭またはDEPを週1回,10週間,経気道投与した結果,肺腫瘍は,活性炭投与群で11腫瘍/23匹,DEP投与群で31腫瘍/42匹を観察した。活性炭のみでラットに肺腫瘍が発生することを初めて報告し,ラットにおける粒子過剰負荷(Particle overload)と腫瘍発生に関連について注目されるようになった。Heinrichら(1992,1995)は,Wistarラット雌に,カーボンブラック,TiO<sub>2</sub>を11.6mg/m<sup>3</sup>,100mg/m<sup>3</sup>で18時間/日,5日/週,24ヶ月間曝露し,肺腫瘍発生を観察した。その結果,7mg/m<sup>3</sup>で同様に曝露を行ったDE以上の肺腫瘍発生を認めた。

Nikulaら(1995)は,F344ラット雌雄にカーボンブラックを2.5mg/m<sup>3</sup>,6.5mg/m<sup>3</sup>で16時間/日,5日/週,24ヶ月曝露で肺腫瘍の発生を観察し,同じ濃度のDEと比較した。2.5mg/m<sup>3</sup>ではDE曝露による肺腫瘍に高い傾向があったが,6.5mg/m<sup>3</sup>ではほぼ同等の肺腫瘍発生であった。肺に貯留した粒子量を測定してみるとDE曝露の方が高い傾向があり,これを基準とした肺腫瘍発生率をカーボンブラックとディーゼルとで比較すると,ほぼ同等の発がんであった。

Pottら(1994)は,DEPに近い材料として種々の炭粉をWistarラット雌に経気道肺内投与し,腫瘍発生を観察した。粒子表面積の異なる炭粉などで比較したが,ほぼ同等の肺腫瘍発生率で,最も表面積の大きい活性炭では肺腫瘍発生率は低かった。

Heinrichら(1994)によると,Wistarラット雌へのDEP,有機溶媒洗浄DEP,カーボンブラック(有機溶媒洗浄)投与実験の結果では,洗浄されたDEPでも肺腫瘍発生を観察し,カーボンブラックでは表面積の大きな種類が高い肺腫瘍発生率であったと報告した。

Dasenbrockら(1996)は,ラットにDEPとカーボンブラック,およびそれらの洗浄粒子やBaP処理粒子を経気道投与し,肺腫瘍発生を800日まで観察した。肺腫瘍発生は,洗浄DEP30mg(2%),DEP15mg(17%),Printex9015mg(21%),BaP処理Printex9015mg(27%)はBaP15mg(2%)で,未処理のDEPが洗浄粒子より高かった。洗浄カーボンブラックの発がん性はオリジナルのサイズや特異表面積に依存しているとした。洗浄カーボンブラックの発がん性はオリジナルのサイズや特異表面積に依存した。

Ichinoseら(1997)は,ICRマウスへのDEP,洗浄DEP,TiO<sub>2</sub>の経気道肺内投与を実施し,洗浄DEPおよびTiO<sub>2</sub>の投与で肺腫瘍が発生し対照群よりも高かったと報告した。Ohyamaら(1999)は,F344ラット雄にカーボンブラック粒子(CBP)を0.2mg,計4回経気道投与し21%の肺腫瘍発生を認めた。

肺腫瘍誘発における肺粒子負荷の重要性は、ラットの吸入および経気道肺内投与によって立証されている。DEあるいはカーボンブラック粒子を24ヶ月間吸入させた検討では、肺腫瘍発生は同様に増加した。また、PAHsを含まないカーボンブラックの肺内投与後にも肺腫瘍を誘発した。カーボンブラックと、生体内における吸着有機化合物の溶出後のDEPの極めて広い表面積は、腫瘍発生のメカニズムに関わっていると考えられる。

粒子表面積と肺腫瘍発生率との関連性は、ディーゼルおよびその他の粒子の吸入研究の発表論文の評価により検討されている(Oberdörsterら(1990))ラットにおける腫瘍誘発は、PAH含有量に関係なく、粒子質量、粒子容積、粒子数などよりも、肺内に滞留した粒子の表面積に最も高い関連性を示した。この結果より、DEに曝露されたラットの腫瘍反応においては、粒子の表面積(臨界表面積: Critical surface)およびその特性が決定的な役割を果し、吸着されたPAHsの関与は少ないと示唆されている。DEPは、ラットにおいて特異的な発がん影響を発現せず、むしろ粒子自体の非特異的影響が大きいと考えられる。

### 3) PAHs

種々のPAHの実験動物における発がん性は、すでに多くの知見がまとめられている。DEP中のPAH含有量に基づいて、発がんへの関与の大きさを評価することは可能である。一方で、DEPとして吸入沈着した場合には、PAH単独の曝露とは動態に違いがあることも予想される。この点に注目した検討が報告されている。

PAHs含有の空気に曝露されたラットにおける肺腫瘍発生率は、排気ガスのPAH濃度のみでなく、担体の粒子の組成(有機物吸着層に対する炭素核の質量比)、粒子付着の有機化合物の溶解、滞留半減期、肺内での担体粒子の細胞毒性影響のようなパラメーターにも依存する(Heinrichら(1991))BaP50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ とその他のPAHを含み、炭素核のないタールピッチの濃縮物エアロゾル $2.6\text{mg}/\text{m}^3$ を10ヶ月間曝露されたラットにおいて、肺腫瘍発生率は39%であった。また、同量のタールピッチ蒸気を粒子表面に濃縮させたカーボンブラックの2および $6\text{mg}/\text{m}^3$ では、約2倍の腫瘍発生率(89および72%)を示した。抽出可能な有機物質をほとんど除いたカーボンブラック $6\text{mg}/\text{m}^3$ への曝露は18%の肺腫瘍を発生し、タールピッチとカーボンブラック粒子の組み合わせ曝露後では72%の腫瘍発生率を示した。これは、PAHsとカーボンブラックとの相乗効果を示している。タールピッチ中のBaPのレベルはDE中より約3桁以上高く、発がんにおけるDEP中のPAHsの役割は無視し得る程度であろうとしている。しかし、DEP中のPAHは、強い変異原性や発がん性を持つニトロPAHsや、タールピッチには存在しない特性解明の不十分な変異原物質を含むため、その作用特性はタールピッチ中のPAHとは全く異なる(Heinrichら(1994), Nikulaら(1994))

DEP抽出物は、水溶および脂質溶解性成分に分離され、さらに、後者はカラムクロマトグラフィーにより、PAHを含む成分と、含まない成分、極性成分に分離された。これらの成分は、もとのDEの組成と対応する用量で、Osborne Mendelラットへの肺内移植において検討された。腫瘍の発生は、水溶性成分では認められず、PAHを含まない脂質溶解性成分では0%、PAH含有成分では25%、極性成分では0%であった。これより、トータル抽出物の重量のわずか1%を構成するPAH含有成分が

分が発がん性の原因であることが示された(Grimmer ら(1991))

4 種類のディーゼル車, 1 種類のガソリン車の粒子排出物から, それらのジクロロメタン抽出物を作製し, 腫瘍形成力について, コークス炉排出物および屋根用タールとの比較が, Sencar マウスを使って検討された。その結果, BaP 含有量のみでは, この混合物の腫瘍発症作用は説明できないとの結論が下された(Nesnow ら(1982, 1983))

#### 4) 芳香族ニトロ化合物【表 3-5, 表 3-6】

CD-1 マウスへの生後 1, 8, 15 日目腹腔内投与では, 1,3-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレンには有意な腫瘍発生を認めず, 1,6-ジニトロピレン, 7-ニトロベンゾ[a]アントラセン, 6-ニトロベンゾ[a]ピレン, 6-ニトロクリゼン, 1-ニトロピレン, 4-ニトロピレンでは肺または肝臓の腫瘍発生が有意に高いことを認めている(Wislocki(1986)) ICR マウスへの生後 1, 8, 15 日目腹腔内投与では, 6-ニトロクリゼンで高い肺, 肝の腫瘍発生を観察したが, 1-ニトロクリゼン, 2-ニトロクリゼン, 3-ニトロクリゼンでは低い発生率であった(El-Bayoumy(1992)) ICR マウスへの同様の実験では, A 系マウスは, 6-ニトロクリゼン, 3-ニトロフロランテンについて有意な肺腫瘍の増加を認めしたが, 6-ニトロベンゾ[a]ピレン, 1-ニトロピレンについては差がなかったと報告している。(Busby(1989)) 肺腫瘍好発系の A 系マウスへの 1-ニトロピレン腹腔内投与で, 高用量群で有意に高い肺腫瘍の個数を観察している(El-Bayoumy (1984))

BALB/c マウスへの皮下投与では, 1,3-ジニトロピレン, 1-ニトロピレンによる腫瘍発生はなく, 1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレンで投与部位に腫瘍発生を認め, 1,8-ジニトロピレンの方が低用量での腫瘍発生を観察している(Tokiwa(1984), Otofujii(1987))

El-Bayoumy(1982)は, 被検物質の皮膚塗布とさらにプロモーターである TPA を反復塗布することでニトロアレン類の発がんイニシエーション作用を比較した。6-ニトロクリゼンと 3-ニトロペリレンでの皮膚腫瘍(主に乳頭腫)は TPA 塗布の対照群と統計学的に有意に高い発生率であったが, 6-ニトロベンゾ[a]ピレンと 1-ニトロピレンでは差はなかった。

アメリカ National Cancer Institute(1978)が実施した B6C3F1 マウスを使用した試験では, 6 週齢より 78 週まで餌に 1-ニトロナフタレン を 0.06 ~ 0.12% 混合して飼育し, さらに 20 週間飼育して観察した。腫瘍は, 呼吸器, 消化器, 内分泌器官に観察されたが, 対照群と有意な差は認めていない。

マウス(系統, 性, 週数不明)を使って膀胱内に 2-ニトロナフタレンを含有するコレステロールペレットを埋め込む試験によって, 膀胱内に良性および悪性腫瘍を観察したが, 対照群のコレステロールペレットだけを埋め込んだマウスとの間に統計学的な差は認めていない(Bryan (1964))

Tokiwa(1987, 1994)は F344 ラット雄への皮下投与によって, ジニトロベンゾ[a]ピレンとジニトロフロランテン異性体について検討し, 1,6-ジニトロベンゾ[a]ピレンでは腫瘍発生はないが, 3,6-ジニトロベンゾ[a]ピレン, 3,7-ジニトロフロランテン, 3,9-ジニトロフロランテンでは高率で腫瘍発生を認めている。同様に F344 ラット雄への投与によって, 1,3-ジニトロピレン, 1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレンによる投与部位の腫瘍発生を観察し, 1-ニトロピレンでは認められなかった(Ohgaki (1982 年の報告では腫瘍発生を記載しているが, 1985 年の報告では純度の高い試料で再検討し否定している)) ①または F344 ラット新生仔への投与を行い, 1,6-ジニトロピレン, 1,8-ジニトロピレンで投与部位の肉腫

表3-5 多環芳香族ニトロ化合物の発がん性に関する動物実験成績

投与物質	系統・性・数	投与量	結果	報告者
<b>マウス腹腔内投与</b>				
1,6-ジニトロピレン	CD-1, newborn, n=90 (雄), 100 (雌)	58.7mg (200nmol)	有意な肝腫瘍発生	Wislockiら (1986)
1,8-ジニトロピレン	CD-1, newborn, n=90 (雄), 100 (雌)	58.7mg (200nmol)	NS	Wislockiら (1986)
7-ニトロベンゾ[a]アントラ	CD-1, newborn, n=90 (雄), 100 (雌)	0.8mg	7/25 雄 肝腫瘍	Wislockiら (1986)
6-ニトロベンゾ[a]ピレン	CD-1, newborn, n=90 (雄), 100 (雌)	0.17mg (560nmol)	8/29 肝腫瘍 P<0.05	Wislockiら (1986)
6-ニトロベンゾ[a]ピレン	ICR, newborn	14mg, 70mg	NS 肺腫瘍	Busbyら (1989)
1-ニトロクリセン	ICR, newborn, n=25 (雄), 27 (雌)	Total 100nmol (at 1,8,15日間)	雄:8.3%肺,8.3%肝,雌:5.4%肺,2.7%肝:NS	El-Bayoumyら (1992)
2-ニトロクリセン	ICR, newborn, n=35+26	Total 100nmol (at 1,8,15日間)	雄:2.9%肺,0%肝,雌:3.8%肺,0%肝:NS	El-Bayoumyら (1992)
3-ニトロクリセン	ICR, newborn, n=39+25	Total 100nmol (at 1,8,15日間)	雄:5.1%肺,4.0%肝,雌:5.1%肺,0%肝:NS	El-Bayoumyら (1992)
6-ニトロクリセン	Swiss-Webster BLU-Ha, newborn, n=22 (雄), 29 (雌)	38.5mg	高率の肺腫瘍発生	Busbyら (1985)
6-ニトロクリセン	CD-1, newborn, n=90 (雄), 100 (雌)	0.77mg (2800nmol)	肝と肺腫瘍高率	Wislockiら (1986)
6-ニトロクリセン	ICR, newborn, n=38+24	Total 100nmol (at 1,8,15日間)	雄:100%肺,64.1%肝,雌:95.8%肺,0%肝	El-Bayoumyら (1992)
6-ニトロクリセン	ICR, newborn	7.7mg	肺腫瘍の有意な増加	Busbyら (1989)
3-ニトロフロランテン	ICR, newborn	63mg, 315mg	肺腫瘍の有意な増加	Busbyら (1989)
1-ニトロピレン	A/J, n=28, 32	175, 525, 1575mg/kg	高用量群での有意な肺腫瘍増加	El-Bayoumyら (1984)
1-ニトロピレン	CD-1, newborn, n=90 (雄), 100 (雌)	173, 692mg:at 1,8,15日間	高用量群での有意な肝細胞がん増加	Wislockiら (1986)
1-ニトロピレン	ICR, newborn	21mg, 105mg	NS 肺腫瘍	Busbyら (1989)
4-ニトロピレン	CD-1, newborn, n=90 (雄), 100 (雌)	692mg:at 1,8,15日間	肝細胞がん高率, 肺腫瘍 (多発)	Wislockiら (1986)
<b>マウス皮下投与</b>				
1,3-ジニトロピレン	BALB/c, 雄	0.05×20=1mg	局所の腫瘍なし	Otofujira (1987)
1,6-ジニトロピレン	BALB/c, 雄, n=20	0.1×20=2mg	10/20 局所の腫瘍 (50週)	Tokiwaら (1984)
1,8-ジニトロピレン	BALB/c, 雄	0.05×20=1mg	6/15 局所の腫瘍 (60週)	Otofujira (1987)
1-ニトロピレン	BALB/c, 雄, n=20	0.1 × 20=2mg	投与部位の腫瘍なし	Tokiwaら (1984)
<b>マウス皮膚塗布</b>				
6-ニトロベンゾ[a]ピレン	CD-1,F	0.05mg + TPA	5/20 皮膚腫瘍, NS	El-Bayoumyら (1982)
6-ニトロクリセン	CD-1,F	1mg + TPA	12/20 乳頭腫, P<0.01	El-Bayoumyら (1982)
3-ニトロペリレン	CD-1,F	1mg + TPA	8/20 皮膚腫瘍, P<0.01	El-Bayoumyら (1982)
1-ニトロピレン	CD-1,F	1mg + TPA	3/20 皮膚腫瘍, NS	El-Bayoumyら (1982)
1-ニトロピレン	SENCAR, n=40 (雄), 40 (雌)	0-3mg+TPA	NS	Nesnowら (1984)
<b>マウス経口投与</b>				
1-ニトロナフタレン	B6C3F1, n=50 (雄), 50 (雌)	0.06-0.12% diet	NS	NCI (1978)
<b>マウス膀胱内埋込</b>				
2-ニトロナフタレン	n=41, 76, 80	Unspecified	2/41, 2/76, 7/80 乳頭腫	Bryanら (1964)
<b>ラット皮下投与</b>				
1,6-ジニトロベンゾ[a]ピレン	n=11 (それぞれ)	8, 40, 200, 1000mg/rat	0 局所の肉腫	Tokiwaら (1994)
3,6-ジニトロベンゾ[a]ピレン	n=21, 21, 21, 20	8, 40, 200, 1000mg/rat	1,5,8,14 局所の肉腫	Tokiwaら (1994)
3,7-ジニトロフロランテン	F344, 雄, n=21	0.05×20=1mg	全例に局所の腫瘍 (50週)	Tokiwaら (1987)
3,9-ジニトロフロランテン	F344, 雄, n=11	0.05×20=1mg	局所の腫瘍10/11 (50週)	Tokiwaら (1987)
1,3-ジニトロピレン	F344, 雄, n=10	0.2×20=4mg	全例に局所の腫瘍 (169-347日間)	Ohgakiら (1984)
1,3-ジニトロピレン	CD, newborn, 雌, n=43	6.3mmol	P<0.005 腹腔悪性線維組織球腫	Imaidaら (1995)
1,6-ジニトロピレン	F344, 雄, n=10	0.2×20=4mg	全例に局所の肉腫 (103-123 日間)	Ohgakiら (1985)

表3-5 多環芳香族二口化合物の発がん性に関する動物実験成績(続き)

投与物質	系統・性・数	投与量	結果	報告者
ラット皮下投与(続き)				
1,6-ジニトロピレン	CD, newborn, 雌, n=46	6.3mmol	P<0.0001 腹腔悪性線維組織球腫, P<0.05 白血病	Imaidaら(1995)
1,8-ジニトロピレン	F344, 雄, n=10	0.2×20=4mg	全例に局所の肉腫(113-127日間)	Ohgakiら(1984)
1,8-ジニトロピレン	F344, 雄, n=10+10	0.002, 0.02mg	全例に局所の肉腫(高用量, 123-156日間) 9/10(低用量, 213-320日間)	Ohgakiら(1985)
1,8-ジニトロピレン	CD, newborn, 雌, n=37	6.3mmol	P<0.0001 腹腔悪性線維組織球腫, P<0.005 白血病	Imaidaら(1995)
1-ニトロピレン	F344, 雄, n=20	2mg×20	8/17 局所の腫瘍	Ohgakiら(1982)
1-ニトロピレン	F344, 雄, n=20	2mg×20	局所の腫瘍なし	Ohgakiら(1985)
1-ニトロピレン	SD derived CD, n=31(雄), 32(雌)	25mg/kg×8	局所の腫瘍に量反応関係	Hiroseら(1984)
1-ニトロピレン	CD, newborn, 雌, n=49	6.3mmol	P<0.05 乳腺腫瘍	Imaidaら(1995)
1-ニトロピレン	CD, newborn, 雌, n=48	63mmol	P<0.005 乳腺腫瘍	Imaidaら(1995)
1-ニトロピレン	F344, newborn, 雌, n=27	40mmol	NS 乳腺腫瘍	Imaidaら(1995)
4-ニトロピレン	CD, newborn, 雌, n=27	75mmol	P<0.005 乳腺腫瘍	Imaidaら(1995)
ラット経口投与				
1,3-ジニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	NS 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
1,6-ジニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	NS 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
1,8-ジニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	P<0.05 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
2-ニトロフルオレン	Minnesota, n=6(雄), 3(雌)	500mg/kg diet(total 756mg/rat)	1 乳腺腫瘍, 1 耳腫瘍	Morrisら(1950)
2-ニトロフルオレン	Holtzman, n=9(雄), 9(雌)	342mg/kg diet	ほとんどの例に前胃の扁平上皮がん, 4 乳腺腫瘍	Millerら(1955)
1-ニトロナフタレン	F344, n=50(雄), 50(雌)	0.05-0.18% diet	NS	NCI(1978)
1-ニトロピレン	F344, 雌, n=40, 40, 46	5, 10, 20mg/kg, 2/週×55週	有意な乳がん, 陰核腺腫瘍, 白血病	Odagiriら(1986)
1-ニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	NS 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
1-ニトロピレン	CD, 雌, n=30	Total 400 mmol/rat	有意な乳腺腫瘍	El-Bayoumyら(1995)
ラット腹腔内投与				
1,3-ジニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	P<0.01 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
1,6-ジニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	P<0.0001 腹腔悪性線維組織球腫, NS 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
1,8-ジニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	P<0.0001 腹腔悪性線維組織球腫, NS 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
1-ニトロピレン	CD, weanling, 雌, n=36	10mmol/kg×3×4週	P<0.0001 乳腺腫瘍	Imaidaら(1991)
2-ニトロピレン	CD, 雌	16.5mg/kg×3×4週	NS 乳腺腫瘍	Imaidaら(1985)
4-ニトロピレン	CD, 雌	16.5mg/kg×3×4週	P<0.001 乳腺腫瘍	Imaidaら(1985)
ラット胸腔内投与				
3,7-ジニトロフロランテン	F344, 雄, n=22	200mg	12 肺腫瘍	Horikawaら(1991)
3,9-ジニトロフロランテン	F344, 雄, n=10+10+21	50, 100, 200mg	1,7,19 肺腫瘍	Horikawa(1991)
1,6-ジニトロピレン	F344, 雄, n=28	0.15mg	21 扁平上皮がん, 2 肺がん(未分化)	Maedaら(1986)
1,6-ジニトロピレン	F344, 雄, n=135	0.003~0.15mg(5doses)	0,13,42,85,67% 肺腫瘍	Iwagawara(1989)
3-ニトロフロランテン	F344, 雄, n=20	1000mg	1 肺腫瘍	Tokiwaら(1991)
1-ニトロピレン	F344, 雄, n=32	1.5mg in beeswax	扁平上皮がんなし	Maedaら(1986)
ラット経気道肺内投与				
3-ニトロベンズアントロン	F344, 雌, n=100	1.5~6mg	11扁平上皮がん, 2腺がん	Adachiら(2001)
3-ニトロベンズアントロン	F344, 雄, n=30	1.5mg	3扁平上皮がん	Adachiら(2001)
その他				
1,6-ジニトロピレン	ハムスター(Syrian golden) n=10(雄), 10(雌)	経気道投与 0.5mg×26=13mg	10/10, 9/10 肺腺がん	Takayamara(1985)
1-ニトロピレン	ハムスター(Syrian golden, 雄) n=34	経気道投与 2mg×15週	2/21 肺腺腫	Yamamotoら(1987)
2-ニトロナフタレン	サル(Macaca mulatta) n=1	経口 242mg/kg, 6/週, 54月	膀胱乳頭腫	Conzelmanら(1970)

または乳腺腫瘍の高い発生率を認め、1,3-ジニトロピレン、1-ニトロピレン、4-ニトロピレンでも腫瘍発生があるものの、観察されたのは高投与量群か、あるいは発生率は低いと報告している (Imaida (1995))

1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレン、1,8-ジニトロピレン、1-ニトロピレンを CD 系ラット雌に経口投与し、1,8-ジニトロピレンにのみ高い乳腺腫瘍発生率を認めた。(Imaida (1991))1-ニトロピレンについて有意な乳腺腫瘍の増加を報告しているが、投与した 1-ニトロピレンには、0.61%のジニトロピレンが混合しており、その影響を否定できないとしている(Odagiri (1986), H-Bayoumy (1995))

CD ラット雌に 1,3-ジニトロピレン、1,6-ジニトロピレン、1,8-ジニトロピレン、1-ニトロピレン、2-ニトロピレン、4-ニトロピレンを腹腔内投与し、1,6-ジニトロピレン、1,8-ジニトロピレンで腹腔内に Malignant fibrous histiocytoma(悪性線維性組織球腫)発生が有意に高いことを報告しているが、1,3-ジニトロピレン、1-ニトロピレンには有意な発生は認めていない(ただし、1-ニトロピレンについては再検討した結果である) 乳腺腫瘍については、1,3-ジニトロピレン、1-ニトロピレン、4-ニトロピレンで有意に高いが、1,6-ジニトロピレン、1,8-ジニトロピレン、2-ニトロピレンでは対照群との差がない(Imaida (1991))

F344 ラット雄を使い胸腔内への埋込(Stanton の方法)によって投与部位での腫瘍発生を観察し、3,7-ジニトロフロランテン、3,9-ジニトロフロランテン、1,6-ジニトロピレン、3-ニトロフロランテンで用量依存性に肺腫瘍発生を認めたと、3-ニトロフロランテン、1-ニトロピレンでは腫瘍発生はほとんどない(Tokiwa(1991), Maeda(1986), Iwagawa(1989), Horikawa (1991))

F344 ラット雌雄に対して 3-ニトロベンズアントロンを経気道肺内投与した結果、肺の扁平上皮がんと腺がん発生を認めている(Adachi(2001))

ハムスターへの経気道肺内投与によって 1,6-ジニトロピレンと 1-ニトロピレンの発がん性を検討した結果について、Takayama(1985)は 1,6-ジニトロピレンについて全例に肺腫瘍発生を認め、Yamamoto(1987)はそれよりも高用量の 1-ニトロピレンでは肺腫瘍発生率が低いと報告している。サルに 2-ニトロナフタレンのゼラチンカプセルを 54 ヶ月間経口投与して解剖した結果、膀胱の乳頭腫を観察している(Conzelman(1970))

同じ投与経路、投与量で複数の物質について検討された結果を表 3-6 にまとめた。各実験方法には、標的臓器や感受性などの違いがあり、一概に論じることができないが、1,6-ジニトロピレン、1,8-ジニトロピレンについては多くの報告で相対的に高い発がん性を確認している。それに対して、1-ニトロピレンでは投与部位の腫瘍などの発生では有意な差を認めた報告が少なく、発がん性ありとするいくつかの報告も、混在するジニトロピレンの影響を無視できない。

肺を標的にして検討されている例は多くはなく、吸入実験は行われていない。わずかに経気道肺内投与で 1,6-ジニトロピレン、1-ニトロピレン、3-ニトロベンズアントロンについて検討されているのみである。Stanton が開発したビーズワックスと混合して胸腔内へ埋め込む方法に倣って、1,6-ジニトロピレンなどが肺扁平上皮がんを発生させることが報告されているものの、経気道的に侵入沈着した粒子と胸腔内局所に貯留させた場合とは、発がんに至る病理組織学的な過程は異なると考えられる。

一般的には、動物実験による化学物質の発がん性評価法として、経口、腹腔内、皮下投与など

表3-6 多環芳香族ニトロ化合物の実験動物における発がん性（報告者別成績）

物質名 \ 判定	強	中	低	陰性
1,6-ジニトロベンゾ[a]ピレン				T <sub>2</sub>
3,6-ジニトロベンゾ[a]ピレン		T <sub>2</sub>		
3,7-ジニトロフロランテン	T <sub>2</sub> , Tg			
3,9-ジニトロフロランテン	T <sub>2</sub> , Tg			
1,3-ジニトロピレン		Oh	I <sub>1</sub> , I <sub>3</sub>	I <sub>2</sub> , Ot
1,6-ジニトロピレン	I <sub>1</sub> , I <sub>3</sub> , Oh, Tg	T <sub>1</sub>	W	I <sub>2</sub>
1,8-ジニトロピレン	I <sub>1</sub> , I <sub>3</sub> , Oh, Tg	Ot	I <sub>2</sub>	W
7-ニトロベンズ[a]アントラセン			W	
6-ニトロベンゾ[a]ピレン			W	B, E <sub>2</sub>
1-ニトロクリセン				E <sub>1</sub>
2-ニトロクリセン				E <sub>1</sub>
3-ニトロクリセン				E <sub>1</sub>
6-ニトロクリセン		B, E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> , W		
3-ニトロフロランテン		B	Tg	
3-ニトロペリレン			E <sub>2</sub>	
1-ニトロピレン		E <sub>1</sub> , W	I <sub>1</sub> , I <sub>3</sub>	B, E <sub>2</sub> , I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , Oh, T <sub>1</sub> , Tg
2-ニトロピレン				I <sub>3</sub>
4-ニトロピレン	W		I <sub>1</sub> , I <sub>3</sub>	

B: Busbyら（1989）

E<sub>1</sub>: El-Bayoumyら（1986）, E<sub>2</sub>: El-Bayoumyら（1992）

I<sub>1</sub>: Imaidaら（1995）, I<sub>2</sub>: Imaidaら（1991）, I<sub>3</sub>: Imaidaら（1985）

Oh: Ohgakiら（1985）, Ot: Otofujira（1987）,

T<sub>1</sub>: Tokiwaら（1984）, T<sub>2</sub>: Tokiwaら（1987）, Tg: Tokiwa group（Horikawara（1991）, Tokiwaら

W: Wislockiら（1986）

は標的臓器などに関するデータの蓄積も多く、手技の面でも経気道肺内投与に比べ容易で、投与量の違いによる個体差が発生しにくいことなどの理由から広く行われている。しかし、DEP による発がん過程でどの程度ニトロアレン類が関与しているかを評価するためには、主要なニトロアレン類の経気道曝露による発がん性検討は、今後の課題として重要である。

### 3.1.2.2. 発がんの機序に関する検討結果（DNA 付加体）DEP の成分についての検討結果

#### 1) <sup>32</sup>P ポストラベリングによる検出

DE により肺組織内に形成された DNA 付加体が、発がんに関与するかを検証するための検討が実施されてきた。<sup>32</sup>P post labeling 法では、主として、PAH が代謝活性化を受け DNA 塩基と結合した DNA 付加体を検出する。

Wong ら(1986)は、F344 ラットに粒子濃度 7.1mg/m<sup>3</sup> で DE の曝露を 31 ヶ月続け、肺内の DNA 付加体が増加することを報告した。Bond ら(1988)は、呼吸器内の DNA 付加体の位置を決定するため、F344 ラットに粒子濃度 10mg/m<sup>3</sup> で 12 週間曝露し、呼吸器の部位別に DNA 付加体を分析した。DNA 付加体は、末梢の肺組織と鼻部組織で検出され、その量は 18/10<sup>9</sup> NN であった。Wolff ら(1989)は、ベンゾ[a]ピレンをカーボンブラックに吸着させ(20mg/g)、これをラットに吸入させた。この肺組織から抽出した DNA から、デオキシグアノシンのジオールエポキシドの付加体を検出した。

Bond ら(1990)は、F344 ラットに、0.35, 7.0, 10mg/m<sup>3</sup> の粒子濃度で 12 週間の曝露を行い、それらの DNA 付加体量には大きな差のないことを報告した。肺の DNA 付加体生成は、低濃度で飽和状態に達している可能性が考えられる。また、Bond らは、同じく F344 ラットに粒子濃度 7mg/m<sup>3</sup> で 12 週間まで曝露させ、開始から 2, 4, 8, 12, 14, 16 週目の DNA 付加体量を測定したところ、曝露期間の延長にしたがい増えた。そして曝露終了後には、速やかに減少し 4 週後には対照群との間に有意の差がみられなくなった。さらに Bond らは、炭素粒子曝露による DNA 付加体形成を、0, 35, 10mg/m<sup>3</sup> でカーボンブラックに 12 週間ラットを曝露し、炭素粒子への高度曝露によっても DNA 付加体が増加するとした。

ラットでは、DEP 曝露によって気道及び肺組織の DNA 付加体生成が示されたが、他の動物種について、ラットやサルで DNA 付加体が検出される条件で、B6C3F1 マウス、ハムスターに曝露を行い同様に分析しても増加は認められなかった(Bond ら(1989, 1990))

Gallagher ら(1993, 1994)は、Wistar ラット雌への粒子濃度 7.5mg/m<sup>3</sup> の DE および 11.3mg/m<sup>3</sup> のカーボンブラックに 24 ヶ月間曝露を行い、肺内の DNA 付加体を測定した。これらの 2 群の平均付加体量に大きな差はなく、対照群との間にも有意な差はみられなかった。DE 曝露によるラットの肺内 DNA 付加体量は、曝露 24 ヶ月後では同じく 2 または 6 ヶ月後よりも低い量であった。

Borm ら(1997)は、ラット肺の細胞株(RLE-6TN)と BaP を酢酸ミスチン酸ホルボールエステル(PMA) 刺激好中球(PMN)を反応させ、BaP による DNA 付加体と 8-OH-dG の変化を調べ、炎症下での BaP 曝露が DNA 付加体生成を促進することから、PAH を含有する粒子曝露によるリスク評価では炎症を考慮する必要があると述べている。

Ohyama ら(1999)は、ラット肺がん発生に与える DEP 抽出物の影響および NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> のプロモー

シオン作用を検討した。DNA 付加体は、DEP 抽出物被覆カーボンブラック粒子(DECcCBP)を投与し NO<sub>2</sub>あるいは SO<sub>2</sub>を曝露した群では観察されたが、DECcCBP 投与群では観察されなかった。NO<sub>2</sub>あるいは SO<sub>2</sub>の曝露は DEP による肺がん発生を促進すると述べている。

Iwai ら(2000)は、F344 ラットへの DE 曝露を 1, 3, 6, 9, 12 ヶ月間実施し、肺組織の DNA 付加体を測定した。その結果、DE 曝露に特異的な 2 種類の DNA 付加体を検出した。その量は、曝露後 1 ヶ月で最も高く、その後は曝露時間が長くなるにしたがい徐々に減少していく傾向がみられた。

## 2) 8-ヒドロキシグアニン(8-OH-dG)

8-ヒドロキシグアニン(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-OH-dG, 8-oxo-dG)は、DNA の酸化損傷によって生成する損傷塩基の一つで、酸化損傷の指標として発がんとの関連性が検討されている。

Sagai ら(1993)は、DEP と仔牛胸腺 DNA を反応させると 8-OH-dG が生成することを見だし、DEP には活性酸素種を介した発がん性を示唆した。同様に Seto ら(1994)も試験管内試験での 8-OH-dG 生成を観察している。Ichinose ら(1997)は、DEP をマウスに経気道肺内投与し肺腫瘍発生を観察したが、発がん過程での活性酸素種の関与を明らかにするため、脂肪量の異なる餌を与え検討した。その結果、餌の脂肪量は肺腫瘍数に促進的な影響を与え、肺組織 8-OH-dG 量と肺腫瘍数との間に高い相関性を観察した。Arimoto ら(1999)は、L1210 を使った試験管内試験での観察から、DEP による 8-OH-dG 生成に活性酸素が関与していることを報告した。

Tsurudome ら(1999)は、F344 ラットへの DEP 経気道投与後に肺組織の 8-OH-dG 量と修復酵素であるオキソグアニングリコシレース(OGG1)の変化を調べた。8-OH-dG は投与後速やかに上昇し、1 週間以内に対照と同程度に低下した。OGG1 の mRNA は、投与後、徐々に活性が低下するものの 5 日目には対照のレベルとなった。これは、DEP による 8-OH-dG の変化には、活性酸素種の生成だけでなく、修復酵素の低下が関わっていると示唆している。

Iwai ら(2000)は、F344 ラットへの DE 曝露を 1, 3, 6, 9, 12 ヶ月間実施し、肺組織の 8-OH-dG を測定した。その結果、曝露期間の延長にしたがって 8-OH-dG 量は増加すると報告した。同時に分析した PAH によって形成される DNA 付加体の変化は対照的に、前述の如く曝露期間の延長に伴い減少した。この結果は、ラットにおける粒子過剰負荷による肺がん機構について示唆するものとして著者らは言及している。

Sato ら(2000)は、Big Blue ラット(*lambda/lacI* 遺伝子導入)を使って DE 曝露後の肺組織について変異頻度と変異スペクトルを調べた。1 または 6mg/m<sup>3</sup> の DE に 4 週間曝露した。6mg/m<sup>3</sup> DE への曝露後では、肺における変異頻度は、コントロールより 4.8 倍高かったが、1mg/m<sup>3</sup> DE 曝露では増加がみられなかった。6mg/m<sup>3</sup> DE 曝露では 69 の変異が同定された。主要な変異は、A:T → G:C (8 変異)と G:C → A:T (19 変異) transition であった。とくに、*lacI* 遺伝子の 221 における G → T transversion は、DE に引き起こされた hot spot で、6mg/m<sup>3</sup> DE 曝露では、重複変異がみられた。DE によって形成された DNA 付加体は、<sup>32</sup>P-post-label TLC 法と、8-OHdG は高速液体クロマトグラフィーで測定した。付加体の量は、コントロールのそれぞれ 3 倍および 2.2 倍増加した。Northern blot による

cytochrome P450<sub>1A1</sub> mRNA のレベルは、6mg/m<sup>3</sup> DE 曝露で 5.5 倍増加した。これらの結果から、DE がラット肺において genomic DNA に対する変異原として作用すると結論づけている。

#### まとめ(発がん影響に関する動物実験)

経気道的な曝露を想定した多くの検討が実施された。動物実験で観察された腫瘍の多くは、呼吸器に発生したもので、他の臓器に発生した腫瘍について記載されている報告でも、DEまたはDEP曝露と肺以外の臓器組織に発生した腫瘍との関連を認めている例はほとんどみられない。

DEの吸入またはDEP経気道投与によって、ラットでは明らかな肺腫瘍の増加が観察されているが、他のマウス、ハムスター等では肺腫瘍との関連を示唆する一致した知見がない。DEPの成分として、固形成分の炭粉と有機溶媒可溶成分の各々について検討されている。炭粉または有機溶媒で洗浄したDEPの吸入または経気道投与によってラットに肺腫瘍の発生が確認されているが、DEまたはDEP曝露による肺腫瘍発生率との差はないこと、また、生物学的には不活性である二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)粒子曝露によっても同様の肺腫瘍発生状況であったことなどから、粉じんの過剰曝露(overload exposure)によるラットに特異的な反応であるとの指摘もある。有機溶媒可溶成分は、マウスへの皮膚塗布などにより発がん性が認められ、含まれるPAHとニトロPAHが肺発がんの原因として重視すべきであることを示した。ガス状成分に関しては本報告の検討対象ではないが、一部に肺発がんの促進作用を示唆する報告があるものの、除粒子吸入実験の成績はガス状成分が肺発がんの主要な原因とはならないことを示唆している。

DNA付加体等の発がんに関わるDNA損傷に関する検討では、DEPまたは不活性粒子(炭粉、TiO<sub>2</sub>)をマウス、ラットへ曝露することによって、肺組織のDNAに酸化的損傷の指標である8-OH-dGが増加することが報告されている。一方、DEあるいはDEP曝露によって、PAHやニトロPAHと肺組織DNAが結合したDNA付加体の形成も認められており、DEPによる発がん機構の複雑さが示唆されている。

動物実験の結果は、DEPの発がん性を示唆するに十分なものである。ただし、その機構は、成分と同様に複雑であり、ヒトにおいては、実験に比べてかなり低濃度での曝露が、しかし、長期間継続すると考えられることから、動物で観察されているものとは異なる機構での影響を考慮する必要がある。また、今後のエンジンおよび燃料の改良は、曝露量を軽減すると予想されるが、一方でDEPの質的な変化をもたらす可能性が高い。したがって、それらの状況の変化に対応したDEPのリスクアセスメントを行うためには、DEPに含有される発がん成分に基づいたリスクアセスメント手法の開発なども有効となっていくと考えられる。

### 3.1.3. 遺伝子傷害性(変異原性)

#### 3.1.3.1. DEPの変異原性

1978年、サルモネラ菌による復帰突然変異試法がAmesら(1975)によって報告されて以来、DEPの変異原性や変異原物質の検出など多方面から検討されてきた。ディーゼル車は変異原物質など

有害物質を多く含む粒子の排出が多い。DEPの採取は希釈トンネルを使用し、採取中に吸着したガス状成分との二次生成反応による変異原物質の生成を避けるため、ガス状物質等の吸着能の低いテフロンをコートしたガラス繊維製フィルターまたは石英繊維製フィルターを使用し行われている。テフロンをコートしたガラス繊維製フィルターを使用前にジクロロメタンで抽出した抽出物に変異原性が認められたことを Houk ら(1987) が報告している。一方、DE 中のガス成分は排出された時点では高温であるが、採取される時点では大気温度近くまで冷却されている。ガス成分は粒子成分を除去した後、XAD-2、ウレタンフォーム、TENAX、Chromosorb で採取されている。Schuetzle ら(1983) はガソリン車の排出ガスをアンバーライト XAD-2 樹脂を用いて 2~4 環の PAHs を採取し、排気粒子と排気ガス成分に分配される比率(37%、相対湿度 20%、希釈率 1/15)、比率;アントラセン+フェナントレン, 0.14~0.27,フルオランテン, 0.81~1.13,ピレン, 0.60~0.91,ベンゾ[a]アントラセン+異性体, 1.05~1.40, BaP, 15~27, コロネン, 20~32) を求めた。

生物学的短期アッセイ法による DE(ガス状物質, 粒子, 粒子抽出有機成分) の変異原性について多く報告されており, 表 3-7 に示す。

ディーゼル車とガソリン車排気粒子のアセトン抽出物と水溶性物質の n-ペンタン抽出物の変異原性を比較した Lofroth ら(1981) の報告では代謝活性化なしで TA98, TA100 両菌株に対し突然変異を誘発し, ディーゼル車の方がガソリン車より約 10 倍高い変異原性を示す。表 3-8 に Claxton ら(1981) の報告を示す。全体的に直接変異原性が高く, 4 社製の DEP 抽出物の間に変異原活性に大きな相違がみられる。各々のエンジンにより排気される変異原物質の種類, 生成量等が異なるものと思われる。DEP の変異原活性は比較試料としたタバコ煙やコークス炉排気粒子の変異原活性と比べてもかなり高い。また Clark ら(1981) の報告では 6 種のディーゼル車の比較から, 排気される粒子量と抽気される有機物量に相違があり, 各ディーゼル車間で抽出有機物質量当りの変異原活性と走行距離当りの変異原活性が異なる。Ohnishi ら(1982) の報告では代謝活性化のもとではディーゼル車, ガソリン車排気粒子抽出物の変異原性は TA98, TA100 菌株に対して陽性を示すが, 復帰突然変異コロニー数はガソリン車の方が多かった。また, Zweidinger ら(1982) の報告では, 有鉛ガソリン車(4 種), 無鉛ガソリン車(15 種), ディーゼル車(6 種)の排気粒子抽出物の変異原性を比較すると, 走行距離当りの復帰突然変異コロニー数はディーゼル車の方が多く, 有鉛ガソリン車では BaP の含有量が, ディーゼル車では 1-ニトロピレンの含有量が多い。希釈トンネルを用いた Salmeen ら(1982) の DEP の変異原性試験によると, 表 3-9 に示すように, ジクロロメタン抽出物の TA98 菌株(-S9mix) に対する復帰突然変異コロニー数は粒子 1 $\mu$ g 当たり 16.9 及び 23.2 を報告している。同様に, Sasaki ら(1983) は, ディーゼル車はガソリン車より変異原性がかなり強く, ディーゼル車は TA98, TA100 両菌株(-S9mix) に強い直接変異原性を示すこと, 車種によって変異原性発現のパターンが異なること, さらに代謝活性化のもとでの間接変異原性もディーゼル車の方が強いことを報告している。

Clark ら(1982) はシャーシーダイナモメーターを用いて各種走行パターン, すなわちハイウェイ(平均速度 50 マイル/時), 都市(平均速度 20 マイル/時), 渋滞時の都市(平均速度 7 マイル/時) の 3 種のパターンで DEP の変異原活性を比較検討した。粒子の排気率と粒子の抽出画分

表3-7 生物学的短期アッセイ法によるDEの変異原性

試験生物	発現影響	排気ガス	粒子	抽出物	文献
<b>変異原性</b>					
<b>細菌</b>					
サルモネラ菌	点突然変異 (his)			+	Crebelliら (1995)
サルモネラ菌	点突然変異 (his)			+	Ballら (1992)
サルモネラ菌	点突然変異 (his)		+	+	Keaneら (1991)
サルモネラ菌	点突然変異 (his)		+	+	Wallaceら (1990)
サルモネラ菌	点突然変異 (his)			+	Rasmussenら (1990)
サルモネラ菌	点突然変異 (his)			+	Wallaceら (1987)
サルモネラ菌	点突然変異 (his)			+	Bechtoldら (1986)
サルモネラ菌	点突然変異 (his)			+	Salmeenら (1984)
サルモネラ菌, 大腸菌	点突然変異 (his)			+	Crebelliら (1991)
大腸菌	点突然変異 (his)			+	Lewtasら (1983)
<b>哺乳類細胞</b>					
L5178Yマウスリンパ腫細胞	点突然変異 (tk)			+	Lewtasら (1983)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	点突然変異 (hprt)			+	Liら (1982)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	点突然変異 (hprt)			+	Mitchellら (1981)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	点突然変異 (hprt)		+	(+)	Chescheirら (1981)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	点突然変異 (hprt)			(+)	Castoら (1981)
ヒトリンパ芽細胞TK6細胞	点突然変異 (hprt)			+	Barfknechtら (1981)
Balb/c3T3マウス繊維芽細胞	点突然変異 (ATPase)		+	(+)	Currenら (1981)
<b>DNA損傷</b>					
ヒト肺胞上皮細胞 A549	DNA鎖切断			+	Careroら (2001)
シリアン・ハムスター胚細胞	DNA鎖切断			-	Castoら (1981)
ラット主要肝細胞	不定期DNA合成			+	Lewtasら (1983)
<b>染色体影響</b>					
チャイニーズハムスター卵巣細胞	姉妹染色分体交換			+	Lewtasら (1983)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	染色体異常			+	Lewtasら (1983)
チャイニーズハムスター胚V79細胞	染色体異常		+		Hasegawaら (1988)
チャイニーズハムスター胚V79細胞	姉妹染色分体交換		+		Hasegawaら (1988)
チャイニーズハムスター胚V79細胞	姉妹染色分体交換		+		Keaneら (1991)
ヒトリンパ細胞	染色体異常			+	Lewtasら (1983)
ヒトリンパ細胞	姉妹染色分体交換			(+)	Tuckerら (1986)
ハムスター胚繊維芽細胞	小核			+	Schiffmannら (1992)
<b>細胞形質転換</b>					
Balb/c3T3マウス繊維芽細胞	細胞形質転換		(+)		Hasegawaら (1988)
Balb/c3T3マウス繊維芽細胞	細胞形質転換		(+)		Currenら (1981)
ハムスター肺上皮細胞	細胞形質転換			+	Mohrら (1992)
ハムスター胚繊維芽細胞	細胞形質転換			+	Schiffmannら (1992)

his : histidine independence (ヒスチジンの影響なし), trp : tryptophane independence

hprt : ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリルトランスフェラーゼ

ATPase : Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, tk : チミジンキナ - ゼ

+: 陽性, (+) : 弱陽性

表 3-8 自動車排気粒子抽出物(100μg 当たり)の変異原活性

試料	S9:	TA98		TA100	
		+	-	+	-
(ディーゼル車)					
A社製		59.3	65.9	115.2	167.8
B社製		1,367.1	1,225.2	881.7	1,270.1
C社製		318.7	614.8	169.9	247.5
D社製		297.5	399.2	426.0	641.6
(ガソリン車)					
E社製		341.9	137.8	228.0	196.5
(比較試料)					
煙草煙		98.2	陰性	?	陰性
コークス炉排気粒子		251.6	164.1	265.6	259.4
タール		98.7	陰性	420.0	陰性
(陰性対照)					
BaP		15,202.3		26,438.0	

(出典) Claxton ら (1981)

表 3-9 DEP 抽出物の変異原活性と 1-ニトロピレンの寄与

試料	濃度 1-NP (ppm)	revertants/μg					
		TA98 (-S9mix)			TA100 (-S9mix)		
		粒子 (rev./μg)	1-NP (rev./μg)	寄与率 (%)	粒子 (rev./μg)	1-NP (rev./μg)	寄与率 (%)
EPA	2,030 ± 220	16.9 ± 0.60	1,987 ± 51	24	23.6 ± 0.7	945 ± 41	9
		23.3 ± 1.0	2,617 ± 280	23			
A 社製	150 ± 30	2.24 ± 0.02	1,987 ± 51	13	3.37 ± 0.22	945 ± 41	4
		1.83 ± 0.02	1,459 ± 97	12			
B 社製	55 ± 11	0.68 ± 0.06	2,037 ± 85	16	4.59 ± 0.22	474 ± 180	~1

Revertants/μg: 復帰突然変異コロニー数/μg

寄与率: [(1-NP の復帰突然変異コロニー数/μg) × (1-NP 濃度 × 10<sup>-6</sup>) / (DEP 抽出物の復帰突然変異コロニー数/μg)] × 100%

出典: Salmeen ら (1982)

量では相違がみられるが、排気粒子中の変異原物質の推定量と粒子抽出物の変異原活性の間には明らかな相違はみられない。また、外気温の影響を検討するため実験室温度を 25, 50, 75, 100°F に変えても変異原性には影響を与えなかった。

Schuetzle ら(1983)は、実験室ではシャーシダイナモメータ/希釈トンネルにより排気粒子を採取するが、実際の路上を走行しているディーゼル車の場合は実験室の条件と比べ、希釈率が大きく、低温であり、大気中に長く滞留し、大気中の他の汚染物質と反応する可能性があるため低いのではないかと推察した。実際に使用されているトンネル内の排気粒子を採取した試料では、重量ディーゼル車の排気粒子量はガソリン車排気粒子量の約 100 倍であった。TA98 菌株、S9mix、に対する変異原活性は粒子抽出量当たりではガソリン車の方が高く、走行距離当たりではディーゼル車の方が約 5 倍高い値であった。実験室でのガソリン車と重量ディーゼル車の走行距離当たりの変異原性を求めると、路上走行の場合より、各々1.8 倍及び 1.5 倍高い値であった。

Crebelli ら(1995)のイタリア製軽トラックに用いられているディーゼルエンジンからの排気粒子の変異原性に対する燃料組成の影響の研究では、TA98 菌株に対する変異原性の強さは概ね燃料中の芳香族炭化水素の含有量に依存しており、PAHs 含有量の多い燃料ほど、排気粒子は高い変異原活性を示す。一方、ナフテン化合物を添加した燃料を用いたときの排気粒子には誤差範囲程度の変異原活性しか認められなかった。代謝活性化のもとでは変異原性は大幅に減少した。

Bunger ら(2000a)は、4 種の燃料、2 種のバイオディーゼル燃料といわれているナタネ油メチルエステル(RME)やダイズ油メチルエステル(SME)と 2 種の化石ディーゼル燃料(通常の燃料(DF)と低硫黄含量の燃料(LS-DF))を用いた DEP 中の PAHs 含有量と変異原性について比較検討した。DEP は 5 種の異なるスピードと負荷をかけたテストエンジンの排気を希釈、冷却してフィルターに捕集し、ジクロロメタンのソックスレー抽出成分と不溶性物質に分離した。可溶性有機成分中の PAHs を分析し、変異原性試験はサルモネラ菌株 TA98,TA100 を用いて行った。DF と比べ、LS-DF,RME,SME の排気粒子炭素核からなる不溶性物質は少なく、DF や SME の PAHs の総濃度は LS-DF や RME と比べ 2 倍である。TA98 菌株に対し、フルスピードで走行しているエンジンでは、全ての燃料の可溶性有機成分の変異原性が増加し、DF では復帰突然変異コロニー数は SME、LS-DF や RME と比較して 2~10 倍であった。TA100 菌株においても、DF や LS-DF の一部のサンプルでは変異原性が上昇した。それらの結果から、SME、RME や LS-DF は黒炭や総 PAHs 量が少なく、DF と比べ変異原性も低いこと、また、高硫黄含量の燃料、高スピードや負荷は DEP の変異原性を増加させることを指摘している。さらに、Bunger ら(2000b)は、通常の化石ディーゼル燃料(DF)とナタネ油メチルエステル(RME)の DEP 抽出物の in vitro における細胞毒性と変異原性を比較した。RME を燃料としたときの抽出物は DF のそれより、アイドリング運転でマウス繊維芽細胞に 4 倍も強い毒性を引き起こすが、規定状態では引き起こさない。変異原性については DF が RME より TA98 菌株に対し 4 倍、TA100 菌株に対し 2 倍高い変異原性を示した。これは RME 燃料では PAHs の生成量が低いこと、毒性が高いのはカルボニル化合物や未燃の燃料によるものとしている。

血清成分等の生体成分による粒子中の変異原物質の抽出についても検討されている。

Kingら(1981)はDEPをジクロロメタンで抽出し、血清中に移行するか否かを検討するため、ヒト血清及び肺の細胞質画分で再抽出した成分の変異原活性を検討した。ジクロロメタン抽出物の変異原活性の79~85%が溶出される。しかし血清は変異原性をほとんど示さず、血清と同時にプロテアーゼを添加すると変異原活性が上昇することから、変異原物質の大部分は血清や肺細胞質蛋白と結合しているため、Ames試験で検出できなかったものと考えている。

細菌を用いた試験以外でも検討されている。

Liら(1983)のChineseハムスター細胞株(CHO-K1-BH4)を用いた卵巣細胞突然変異試験ではディーゼル車よりガソリン車の方が排気粒子当たりの変異原活性は高いが、走行距離当たりの変異原活性はディーゼル車の方が高く、排気される変異原物質の量はディーゼル車の方が多い。

Castoら(1981)によるSyrianハムスター胎児細胞によるアデノウイルス形質転換への増強効果の検討では、ディーゼル車(3社)とガソリン車(1社)ともに陽性を示し、増強効果にも差異が認められる。また、Chineseハムスター細胞(CHO)の体細胞突然変異試験でもディーゼル車(2社)とガソリン車(1社)ともに陽性であるが、Syrianハムスター細胞でのDNA鎖切断ではガソリン車のみ陽性の効果を示している。

また、Sofuniら(1986)はディーゼル車(3種)、ガソリン車(1種)についての体細胞突然変異試験(L5178Y)では代謝活性化の有無にかかわらずディーゼル車の変異原性が強い傾向にあること、CHOを用いた姉妹染色分体交換(SCE)では代謝活性化の有無にかかわらず有意なSCEの増加が認められることを示した。DEP中には、直接染色体異常やSCEを誘発する物質が含まれていることから、さらに代謝活性化されて染色体異常及びSCEをより効果的に誘発するものが含まれているものと考察している。また、培養細胞による試験では陽性の結果が得られたのに対し、動物個体による小核試験では明らかな陽性の結果は得られなかった。

Careroら(2001)は、ヒト肺胞上皮細胞A549並びにヒト単球細胞THP-1に対するカーボンブラック粒子(CB)、DEP、大気浮遊粒子(SPM)及びそれらの抽出物の遺伝毒性影響を検討した。CB(100nm)、DEP(400nm)とSPM(2 $\mu$ m)粒子は細胞毒性を示さなかったが、2つの細胞にレベルは異なるものの、DNA損傷を起こしたTHP-1細胞に対し、CBの洗浄した粒子(16ng/ml)とDEP抽出物はDNA損傷を引き起こした。影響に対するこの違いは粒子の径、構造、組成の違いによるものとしている。これらの結果はCB、DEP及びSPMはDNA損傷を引き起こすことができ、肺がんの原因となりうることを推察している。

以上の様に、DEPの変異原性についてはサルモネラ菌株を用いるAmes法による研究が多く、概ね同様な結果が得られている。Ames法以外では系統的な方法で行われていなく、またAmes法の結果と異なる場合がある。総合的には、ガソリン車が代謝活性化を必要とする間接変異原物質を排気する傾向があるのに対し、ディーゼル車は代謝活性化を必要としない直接変異原物質をより多く排気し、強い変異原活性を有している。

### 3.1.3.2. DEP 中の変異原物質

自動車排気の影響に関する重要な化学物質として、PAHs, その中でも特に BaP が研究の対象となってきた。PAHs は化石燃料の燃焼や排気過程で生成するため、その排気量の検討は燃焼機関の評価、改良等のために重要なことである。

一方、Pitts ら(1978) がピレリンや BaP が少量の硝酸の存在下で、二酸化窒素の反応によって、ラット肝ミクロゾーム画分による代謝活性化を必要としない直接変異原物質であるニトロ化合物が生成することを見出して以来、多くの芳香族ニトロ化合物が研究されてきた。また Pitts ら(1982) は DEP 抽出物中から 1-ニトロピレン、6-ニトロベンズ[a]ピレン、9-ニトロアントラセン、及び 5H-フェナントロ[4,5-bcd]ピラン-5-オンを検出した。DEP 抽出物の変異原性試験(Ames 試験)では、TA98 及び TA100 菌株に対し直接、間接変異原性を示し、ガソリン車が代謝活性化を必要とする間接変異原物質を排気するのに対し、ディーゼル車は代謝活性化を必要としない直接変異原物質をより多く排気し、強い変異原性を示す。

芳香族ニトロ化合物の多くが代謝活性化を必要としない直接変異原性を示すことから、DE の変異原性発現物質として取り組まれてきた。Xu ら(1982) は高速液体クロマトグラフィー(HPLC) - 分取型 HPLC - 質量分析計を用いて DEP の抽出物からおよそ 50 種の芳香族ニトロ化合物を分析し、それらの化合物の大部分は燃焼過程で生成したものと推察している。

Crebelli ら(1991) がイタリアのローマ市で、有鉛ガソリン車、ディーゼル車及び大気浮遊粒子を捕集し、ジクロロメタンでソックスレー抽出(24 時間)を行い、さらに抽出物の溶媒分画を行った(表 3-10) 有鉛ガソリン車排気粒子中の有機成分含量が多いこと等は日本のガソリン車と比較できないが、抽出物の溶媒分画では中性及び酸性画分に高い変異原活性が認められた。また、Manabe ら(1985) の DEP 抽出物の溶媒分画では全抽出物の変異原活性(TA98, -S9mix) に対し中性画分が 58.7%、酸性画分が 26.7%となり中性及び酸性画分の変異原活性が高い結果と一致している。

表 3-10 ガソリン及び DEP 抽出物の分画と変異原活性

画分	粒子	TA98		TA98/1,8-DNP <sub>6</sub>		
		S9: -	+	-	+	
酸性	大気浮遊粒子		585	370	70	0
	ガソリン車		430	4,000	140	4,300
	ディーゼル車		2,250	1,340	500	300
中性	大気浮遊粒子		660	870	90	310
	ガソリン車		600	6,140	450	6,500
	ディーゼル車		2,330	810	2,430	560
塩基性	大気浮遊粒子		110	645	0	100
	ガソリン車		160	1,210	190	1,280
	ディーゼル車		340	410	60	90

変異原活性; Revertants /mg ( 復帰突然変異コロニー数/mg )

出典: Crebelli ら(1991)

### 3.1.3.3. DEP 中の芳香族ニトロ化合物

芳香族ニトロ化合物には、後述するように、ジニトロピレンやニトロベンズアントロンのような強い直接変異原性を示すものが多いばかりでなく、その種類も多い。DEP 中の芳香族ニトロ化合物の分析については GC/MS を主として行われてきた。表 3-11 に分析例を示す。その中で注目されてきたのは、1-ニトロピレンである。Salmeen ら(1982) は 1-ニトロピレンの含有率とその変異原活性及び排気粒子の総変異原活性から総変異原活性の 12~15% は 1-ニトロピレンによるものと推定している。Tokiwa ら(1986) は 1-ニトロピレンの検出と同時に強変異原性を示す 1,3, 1,6 及び 1,8-ジニトロピレンを DEP から検出している。また、Manabe ら(1985) は 1-ニトロ-3-アセトキシピレン及び 1-ニトロ-3-ヒドロキシピレンを DEP から検出している。

Rosenkranz(1982) は DEP(1g) 中の 1-ニトロピレンの含量を 93 $\mu$ g とすると TA98 菌株 (-S9mix) に対する 20% が 1-ニトロピレンによるものと推定している。一方 Gibson (1983) は DEP の 6 回(1978~1982) の測定から、1-ニトロピレンの排気量は少なく、TA98 菌株 (-S9mix) に対し総変異原活性の 1.9~8.1% であり、1,3, 1,6 及び 1,8-ジニトロピレンは各々 0.2~4% であると報告している。

大気浮遊粒子抽出物を分取型 HPLC で分画すると、中程度の極性物質の溶出する画分の TA98 菌株 (-S9mix) に対する変異原活性が高く、また、Helmig ら(1992) は大気浮遊粒子からニトロベンゾピランを検出している。これらの結果から、酸化生成物である芳香族ケトン類等のニトロ化合物の生成が予測され、多環芳香族ケトン類と二酸化窒素の反応について検討した。多環芳香族ケトンの一つであり、大気浮遊粒子に多く含まれるベンズアントロン、7H-ベンズ[d,e]アントラセン-7-オン、と二酸化窒素の反応により強変異原性を示すニトロベンズアントロンが見出された(Enya ら(1997)) 強い直接変異原性を示す 3-ニトロベンズアントロンはディーゼル車エンジンへの負荷が増すにつれて排気量が増え、ディーゼル車の過積載状態では 3-ニトロベンズアントロンが排気されやすいことを示している。

DEP の直接変異原性に占める寄与の多くは強変異原物質を多く含む芳香族ニトロ化合物によることは明らかである。芳香族ニトロ化合物の生成には燃焼過程、排気過程、排気ガス成分の濃縮過程、大気反応による生成(二次生成)等多くの可能性があり、詳細な検討が必要である。

### 3.1.3.4. 芳香族ニトロ化合物の変異原性

多環芳香族ニトロ化合物の *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 菌株に対する変異原性を表 3-12 に示した。ニトロフルオレン、ニトロフルオランテン、ニトロピレンやニトロベンズアントロンは TA98 菌株に対して強い変異原性を示す。

芳香族ニトロ化合物の変異原性については、化合物の縮合環数が 2 環のものは一般に TA100 菌株に変異原性を示し、塩基置換型であるが、3 環以上からなる化合物は TA98 菌株にフレームシフト型の変異原性を示す。ニトロ基が複数置換したフルオレン、ピレン等の多環芳香族ニトロ化合物はモノニトロ体より高い変異原活性を示す。一方、多環芳香族ケトンのニトロ化合物であるニトロベンズアントロンはモノニトロ体の方がジニトロ体より高い変異原活性を示す。これらはサルモネラ菌株の有

表3-11 DEP中の芳香族ニトロ化合物

化合物	試料 (車種)	濃度 (µg/g 粒子)	出典
1-ニトロナフタレン	ディーゼル車	0.3~0.7	IARC (1989)
2-ニトロフルオレン	ディーゼル車	71, 78, 186	Schuetzleら (1983)
	大気中浮遊粒子	0.03~0.7	IARC (1989)
2,7-ジニトロフルオレン	ディーゼル車	4.2, 6.0 3.0	Schuetzleら (1983)
2,7-ジニトロ-9-フルオレノン	ディーゼル車	3.0, 8.6 3.0	Schuetzleら (1983)
9-ニトロアントラセン	ディーゼル車	5~94	Schuetzleら (1983)
	ディーゼル車	81, 150, 552	Schuetzleら (1983)
	大気中浮遊粒子	0.05~0.1	Areyら (1987)
1-ニトロピレン	ディーゼル車	93	Pittsら (1982)
	ディーゼル車	70.5	Nakagawaraら (1983)
	ディーゼル車	30~150	Salmeenら (1982)
	ディーゼル車	11~55	Salmeenら (1982)
	ディーゼル車	10~75	Salmeenら (1984)
	ディーゼル車	73.4	Manabeら (1985)
	ディーゼル車	107~589	Schuetzleら (1983)
	ディーゼル車	2.0 ~ 6.9	Murahashiら (1999)
	ディーゼル車	3.9~24.5	Gibsonら (1983)
	大気中浮遊粒子	0.18~0.56	Gibsonら (1983)
	ガソリン車	4.3	Gibsonら (1983)
	大気中浮遊粒子	0.2~2.6	Tanabeら (1986)
	大気中浮遊粒子	0.2~0.6	Gibsonら (1982)
1,3-ジニトロピレン	ディーゼル車	ND~1.6	IARC (1989)
	ディーゼル車	5.6	Schuetzleら (1983)
	大気中浮遊粒子	0.005	Tanabeら (1986)
1,6-ジニトロピレン	ディーゼル車	ND~1.2	IARC (1989)
	ディーゼル車	0.95	Manabeら (1985)
	大気中浮遊粒子	0.005~0.1	Tanabeら (1986)
	大気中浮遊粒子	0.004~0.05	Gibsonら (1983)
1,8-ジニトロピレン	ディーゼル車	3.4	Nakagawaraら (1983)
	ディーゼル車	0.3~0.5	Salmeenら (1982)
	ディーゼル車	ND~0.4	Schuetzleら (1983)
	ディーゼル車	0.5	Schuetzleら (1983)
	大気中浮遊粒子	0.002~0.5	IARC (1989)
3-ニトロフルオランテン	ディーゼル車	2.0~3.0	Salmeenら (1982)
	ディーゼル車	1.2	Nakagawaraら (1983)
8-ニトロフルオランテン	ディーゼル車	1.0~2.0	Salmeenら (1982)
6-ニトロベンゾ[a]ピレン	ディーゼル車	ND~50	IARC (1989)
	ガソリン車	0.2~33	IARC (1989)
	大気中浮遊粒子	0.9~2.5	Gibsonら (1982)
3-ニトロベンズアントロン	ディーゼル車	0.65~6.61	Enyaら (1997)
1-ニトロ-3-アセトキシピレン	ディーゼル車	7.5	Manabeら (1985)
1-ニトロ-3-ヒドロキシピレン	ディーゼル車	82.8	Manabeら (1985)

表3-12 芳香族ニトロ化合物の変異原性

化合物	Revertants/nmol(-S9mix)		
	TA98	TA100	
1-ニトロナフタレン	0.33 ± 0.16	3.24 ± 1.74	
2-ニトロナフタレン	0.55 ± 0.11	2.53 ± 0.83	
1,3-ジニトロナフタレン	0.90	7.20	
1,5-ジニトロナフタレン	3.25 ± 0.05	9.40 ± 4.70	
1,8-ジニトロナフタレン	2.40	6.60	
1,3,6,8-テトラニトロナフタレン	14.3	0.3	
2-ニトロフルオレン	38.6 ± 7.6	12.1 ± 3.8	
2,7-ジニトロフルオレン	2,282 ± 1,065	64 ± 58	
2,7-ジニトロ-9-フルオレノン	1,615 ± 280	494 ± 37	
2,4,7-トリニトロ-9-フルオレノン	2,622 ± 497	190 ± 31	
3-ニトロ-9-フルオレノン	215		
9-ニトロアントラセン	3	4	
1-ニトロフルオランテン	74	124	
3-ニトロフルオランテン	6,757 ± 3,517	2,184 ± 784	
7-ニトロフルオランテン	544	989	
8-ニトロフルオランテン	11,125	396	
1-ニトロピレン	467 ± 25	119 ± 56	
2-ニトロピレン	2,225	742	
1,3-ジニトロピレン	130,215 ± 14,789	19,204 ± 10,845	
1,6-ジニトロピレン	174,842 ± 9,041	21,616	
1,8-ジニトロピレン	257,439 ± 2,873	55,420	
1,3,6-トリニトロピレン	36,985 ± 5,698	17,383	
1,3,6,8-テトラニトロピレン	15,211 ± 4,375	3,850	
6-ニトロクリセン	118 ± 77	185 ± 88	
6-ニトロベンゾ[a]ピレン	24 ± 14	4	
1-ニトロベンゾ[e]ピレン	39	45	
1-ニトロ-3-アセトキシピレン	16,700	5,150	
1-ニトロ-3-ヒドロキシピレン	992	395	
3-ニトロベンズアントロン	208,000 ± 22,000	29,700 ± 2,600	*
9-ニトロベンズアントロン	84,000 ± 6,000	3,270 ± 200	*
11-ニトロベンズアントロン	6		*
3,9-ジニトロベンズアントロン	46,000 ± 5,200	4,300 ± 400	*
3,11-ジニトロベンズアントロン	3,000 ± 450	360 ± 30	*

出典： Tokiwaら（1986） ， \* Enyaら（1997）

するニトロレダクターゼ及び *o*-アセチル転移酵素によって活性化される。すなわち、多環芳香族ニトロ化合物の活性体は、ニトロレダクターゼによってニトロノ誘導体からヒドロキシ中間体が生成し、さらにアセチル転位酵素によってさらに活性化され、ニトロニウムイオンが生成し、DNA を攻撃することが知られている。ニトロレダクターゼによる代謝過程に TA98 のニトロレダクターゼ欠損株、TA98NR、とアセチル転位酵素欠損株、TA98/1,8DNP6、が Resenkranz ら(1983)によって作成された。さらに Watanabe ら(1989)によって TA98 及び TA100 菌株にニトロレダクターゼ産生因子やアセチル転位酵素産生因子を導入した YG 株、YG1021、YG1024 等が開発された。これらの菌株は代謝系の解明や環境試料中の微量なニトロ化合物等の変異原物質の検出に用いられている。

培養細胞を用いた芳香族ニトロ化合物の検出系として、Chinese ハムスター肺細胞(CHL)や卵巣細胞(CHL)が使用されている。Nakayasu ら(1982)はジフテリアトキシン耐性をマーカーとした Chinese ハムスター肺繊維芽細胞における 1-ニトロピレンの突然変異原性を調べた。S<sub>9</sub>mix 非存在下で 10<sup>6</sup>細胞当たり、1mutant であるが、1,3-、1,6-及び 1,8-ジニトロピレンは 70~210mutant を示した。すなわち、1,6-、1,8-ジニトロピレンは最も強い変異原性を示し、1,3-ジニトロピレン及び 1,3,6-トリニトロピレンは少し弱く、メチルメタンサルフォネートや N-メチル-N-ニトロノ尿素より強いことを報告している。一方、Li ら(1983)は Syrian ハムスター細胞を使った例では 1,3-、1,6-及び 1,8-ジニトロピレンは変異原性を示すが、1-ニトロピレンは認められなかった。

また、Yamazaki ら(2000)はチトクローム P450 1A1、1A2、1B1 による 4 種の DEP 抽出物や 1-ニトロピレンやジニトロピレンなどの 9 種のニトロアレーンの遺伝毒性を検討した。1-NP、1,6-DNP、1,8-DNP、2-NF、3-NF に加えて、DEP 中に含まれている化学物質はヒト P450 1B1 によって活性化される。しかし DEP 抽出物のそれは低く、これは抽出質に含まれる未知物質の抑制作用によるものと推察している。

### 3.1.3.5. 芳香族ニトロ化合物の DNA 付加体の形成

DEP の有機溶媒抽出物はバクテリアに対し直接変異原性を示す多環芳香族ニトロ化合物を含むことから、これらの変異原物質と細胞 DNA の付加体形成の検出を行い、突然変異の立証が試みられている。

多環芳香族ニトロ化合物のバクテリアに対する変異原性の作用機序に関する研究から、Messier ら(1981)は 1-ニトロピレンの *Salmonella typhimurium* 内による代謝活性産物として、1-アミノピレンや N-アセチル-1-アミノピレンを単離している。同様に Howard ら(1983)は 1-ニトロピレンの DNA 付加体として 1-アミノピレンと 2'-デオキシグアノシンの付加物を単離している。

Enya ら(1998)は 3-ニトロベンズアントロンの活性体、N-アセトキシ-N-アセチル-3-アミノベンズアントロンと DNA の反応により付加体を形成することを報告している。

Djuric ら(1988)は 1-ニトロピレンと 1,6-ジニトロピレンをラットの腹腔内に接種し、形成された DNA の付加体を検討した。1-ニトロピレンについては DNA の付加体の形成は明確にできなかったが、1,6-ジニトロピレン接種ラットの肝臓、腎臓、膀胱や乳腺に主な DNA 付加物として N-(デオキシグアノシン-8-イル)-1-アミノ-6-ニトロピレンが検出された。3-ニトロフルオランテンについても Dietrich ら(1988)

(1988) が検討し、ウシ胸腺 DNA との反応により DNA の付加体 N-(デオキシグアノシン-8-イル)-3-アミノフルオランテンを報告している。さらに Kinouchi ら(1993) は<sup>3</sup>H] 1-ニトロピレン-4,5-オキシドと<sup>3</sup>H] 1-ニトロピレン-9,10-オキシドのグルタチオン抱合体を抗生物質で処理した及び処理しない ICR マウスの胃内に直接投与した結果、抗生物質を投与しないマウスの下部小腸粘膜に DNA 付加体が検出された。この結果は、抗生物質の投与によって腸管内常在嫌気性細菌が除菌され、1-ニトロピレン-4,5(または 9,10)-オキシドの代謝が進行しなかったのであり、1-ニトロピレンは腸管内の常在菌叢によって代謝活性化が進行し、小腸粘膜に DNA 付加体が形成されたものと考えられる。

さらに、Kawanishi ら(1998) は、3-ニトロベンズアントロンの活性体がヒト培養細胞に誘発する突然変異を supF シャトルベクター系を用いて解析した。その結果この活性体は塩基置換型突然変異を高頻度に誘発し、G:C から T:A へのトランスバージョン型塩基置換を多く引き起こすこと、supF 遺伝子塩基配列中で DNA 付加体が生成する位置と突然変異が起こる位置は一致することを報告している。また、Bieler ら(1999) は、3-ニトロベンズアントロンを種々の酵素で代謝活性化し、Calf thymus DNA に生じる DNA 付加体を<sup>32</sup>P-ポストラベル法を用いて C-C 結合した数種の DNA 付加体の生成を検出した。Kawanishi ら(2000) は 3-ニトロベンズアントロンをヒト肝がん由来細胞(HepG2 cells) に曝露し、細胞中に生じた DNA 付加体を<sup>32</sup>P-ポストラベル法を用いて解析した。その結果、ベンズアントロン環とグアニン塩基が C-C 結合した化学構造の DNA 付加体が細胞中に生じていることを報告している。

#### まとめ(遺伝子傷害性)

DEP には代謝活性化を必要としない直接変異原物質が多く含まれ、DEP 直接変異原性はより強い変異原活性を有している。細菌や哺乳類の培養細胞の研究から、DEP の直接変異原物質の大部分は強変異原性を示す物質を多く含む PAHs や多環芳香族ケトン等のニトロ誘導体であることは明らかである。DEP の有機溶媒抽出物の変異原性試験結果には運転条件、採取法、抽出法等が異なるとはいえ、排気される変異原物質に差異があることが推察される。また、哺乳動物細胞を用いる体細胞突然変異や姉妹染色分体交換など試験管内試験では、一般に陽性の結果が得られており、DEP は遺伝毒性を有していると考えられるが、動物接種による赤血球中の小核の出現等についてさらに検討することが必要である。ニトロピレン等の生体内や試験管内の試験で DNA 付加体が形成されることが認められた。これらの成果は DEP による発がんの初期過程であることが示唆される。

#### 3.1.4. 有害性(発がん影響と遺伝子傷害性)の同定のまとめ

##### 3.1.4.1. 有害性(発がん影響に関する疫学研究)の同定のまとめ

DE への曝露と発がんリスクの上昇との関連性については多くの職業上の DE 曝露と肺がんに関するコホート研究ないし症例対照研究で報告されている。肺がんについては主に運輸関係職業従事者に関して約 20 のコホート研究と 10 を超える症例対照研究がある。膀胱がんについても運輸関係職業従事者に関して 10 を超える症例対照研究がある。これらの研究は米国およびヨーロッパの複

複数の国で実施されたものである。

肺がんについてはコホート研究では概ね 1.2 ~ 1.6 倍、喫煙を調整した症例対照研究では概ね 1.4 ~ 2.5 倍のリスクの増加が示されている。鉄道労働者、トラック運転手などの職種別に相対リスクの大きさをみても、各研究で示されている相対リスクの大きさは比較的類似したものになっている。また、最近のメタアナリシスによる結果では相対リスクは 1.2 ~ 1.5 程度であると報告されている。肺がん以外では膀胱がんとの関連性についてもいくつかの研究で示されている。その中には肺がんの場合よりも大きなオッズ比を示しているものもあった。また、統計的有意性を示していない研究でもその多くで 1 ~ 2 のオッズ比を示していた。数少ない地域住民を対象とした研究では自動車排気と白血病との関連性を示唆するものがあった。これらの研究では DE 曝露との関係は必ずしも明らかではないが、示されている相対リスクは上記の職業曝露に関連して報告されているものよりも比較的大きく、今後注視すべき仮説を提示している。また、我が国の研究では肺がん死亡と自動車交通量との関連性を示唆する報告や肺がん死亡と大気汚染の関連性を報告するものがあるが、いずれも DE 曝露との関連性については明らかでなかった。

曝露評価が行われているいくつかの研究で量反応関係が示されていた。しかしながら、多くの研究では DE への曝露量の測定が不十分であった。DE 曝露に関係すると考えられる従業年数と肺がんリスク上昇との関係を報告している研究もあった (Garshick ら (1988)) 一方、この関係を否定する報告もある (HEI (1999)) 一般に、曝露から発がんに至るまでには長い年月を必要とするため、曝露と発症との時間的な関係を論ずることは難しい。曝露評価が実施された研究においては、いくつかの仮定のもとに、ある一時点の測定に基づいて長期間の曝露量の推計は行われているため、その精度については不確実性が大きいといわざるを得ない。しかしながら、これらの研究で報告されている職種別の DE への曝露濃度は、多くの疫学研究の対象となっている職種に関して実際に DE 曝露濃度に相対的な差が存在することを示すものである。

疫学研究による知見に基づいて発がんに関する因果関係を論ずる場合には交絡因子、バイアスの存在などいくつか困難な点が存在する。肺がんの疫学研究で交絡因子として最も重要な喫煙について調整した相対リスクの大きさを報告している研究では、調整後も DE 曝露によるリスクの上昇が示されていた。食事・栄養など他の要因はほとんど検討されていないため、これらの要因が交絡因子となっている可能性については否定できない。

コホート研究は症例対照研究に比べて種々のバイアスが入り込みにくいとされている。DE 曝露についても複数のコホート研究で肺がんとの関連性が示されているが、そのうちのいくつかは後向きコホート研究であり、またがん発症ではなく死亡に関する調査であるため、職業歴に関する情報の確かさ、交絡因子としての喫煙歴に関する情報の確かさ、死因分類の確かさなどの点では弱点が存在する。

以上のように、DE 曝露と肺がんとの関連性が異なる疫学手法による調査に基づいて、多くの国で、また曝露に関連する種々の職業集団で報告され、そのリスクの大きさについても類似した値を示していること、さらに肺がん以外では膀胱がんについても関連性を示すいくつかの報告があることなど、これまでに報告されている疫学的知見は DE が人に対して発がん性を有していることを強く示唆

唆していると考えられる。

#### 3.1.4.2. 有害性（発がん影響に関する動物実験）の同定のまとめ

経気道的な曝露を想定した多くの検討が実施された。動物実験で観察された腫瘍の多くは、呼吸器に発生したもので、他の臓器に発生した腫瘍について記載されている報告でも、DE または DEP 曝露と肺以外の臓器組織に発生した腫瘍との関連を認めている例はほとんどみられない。

DE の吸入または DEP 経気道投与によって、ラットでは明らかな肺腫瘍の増加が観察されているが、他のマウス、ハムスター等では肺腫瘍との関連を示唆する一致した知見がない。DEP の成分として、固形成分の炭粉と有機溶媒可溶成分の各々について検討されている。炭粉または有機溶媒で洗浄した DEP の吸入または経気道投与によってラットに肺腫瘍の発生が確認されているが、DE または DEP 曝露による肺腫瘍発生率との差はないこと、また、生物学的には不活性である二酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) 粒子曝露によっても同様の肺腫瘍発生状況であったことなどから、粉じんの過剰曝露 (overload exposure) によるラットに特異的な反応であるとの指摘もある。有機溶媒可溶成分は、マウスへの皮膚塗布などにより発がん性が認められ、含まれる PAH とニトロ PAH が肺発がんの原因として重視すべきであることを示した。ガス状成分に関しては本報告の検討対象ではないが、一部に肺発がんの促進作用を示唆する報告があるものの、除粒子吸入実験の成績はガス状成分が肺発がんの主要な原因とはならないことを示唆している。

DNA 付加体等の発がんに関する DNA 損傷に関する検討では、DEP または不活性粒子 (炭粉、 $\text{TiO}_2$ ) をマウス、ラットへ曝露することによって、肺組織の DNA に酸化的損傷の指標である 8-OH-dG が増加することが報告されている。一方、DE あるいは DEP 曝露によって、PAH やニトロ PAH と肺組織 DNA が結合した DNA 付加体の形成も認められており、DEP による発がん機構の複雑さが示唆されている。

動物実験の結果は、DEP の発がん性を示唆するに十分なものである。ただし、その機構は、成分と同様に複雑であり、ヒトにおいては、実験に比べてかなり低濃度での曝露が、しかし、長期間継続すると考えられることから、動物で観察されているものとは異なる機構での影響を考慮する必要がある。また、今後のエンジンおよび燃料の改良は、曝露量を軽減すると予想されるが、一方で DEP の質的な変化をもたらす可能性が高い。したがって、それらの状況の変化に対応して DEP のリスクアセスメントを行うためには、DEP に含有される発がん成分に基づいたリスクアセスメント手法の開発なども必要となっていくことも考えられる。

#### 3.1.4.3. 有害性（遺伝子傷害性）の同定のまとめ

DEP には代謝活性化を必要としない直接変異原物質が多く含まれ、DEP 直接変異原性はより強い変異原活性を有している。細菌や哺乳類の培養細胞の研究から、DEP の直接変異原物質の大部分は強変異原性を示す物質を多く含む芳香族炭化水素や芳香族ケトン等のニトロ誘導体であることは明らかである。DEP の有機溶媒抽出物の変異原性試験結果には運転条件、採取法、抽出法等が

等が異なるとはいえ、排気される変異原物質に差異があることが推察される。また、哺乳動物細胞を用いる体細胞突然変異や姉妹染色分体交換など試験管内試験では、一般に陽性の結果が得られており、DEP は遺伝毒性を有していると考えられるが、動物接種による赤血球中の小核の出現等についてさらに検討することが必要である。ニトロピレン等の生体内や試験管内の試験で DNA 付加体が形成されることが認められた。これらの成果は DEP による発がんの初期過程であることが示唆される。

## 3.2. 非発がん影響

### 3.2.1. 非発がん影響に関する人への実験的負荷研究

Linnell ら(1962)は DE をガス成分と粒子成分にわけてそれぞれの構成成分と濃度を化学的に分析し、各構成成分と臭気との関係を検討した。臭気の判定は、6 人の健康女性(パネリスト)により行われた。その結果、DE に含まれる NO<sub>2</sub> と炭化水素が臭気の大原因であると報告している。

Battigelli (1965) は健康人 13 人を対象に DE を吸入曝露あるいは眼結膜に曝露し、気道症状、眼症状、肺粘性抵抗 pulmonary resistance の変化を観察した。肺粘性抵抗は食道内バルーン法により測定した。低、中、高濃度の DE (NO<sub>2</sub> 濃度としてそれぞれ平均 1.3, 28, 62ppm。粒子濃度は測定されていない) を 60 分間吸入曝露させると、被験者が軽度の口腔違和感を自覚したのみで、気道症状の出現や肺粘性抵抗の変化はみられなかった。一方、同じ濃度の DE を眼結膜に曝露すると、結膜の違和感が 6 分以内出現し、高濃度曝露群においては 50% 以上の被験者が 10 分以内に検査を中止せざるを得なかった。この結果から、DE に対する感受性は気道よりも結膜の方が高いと結論している。

Blomberg ら(1998)は DE が気道や肺のアンチオキシダント濃度にいかなる影響を与えるかを検討するために、無作為化単純盲検クロスオーバー試験を行った。15 人の健康な非喫煙者に空気または DE (粒子濃度として 300µg/m<sup>3</sup>, NO<sub>2</sub> 濃度として 1.6ppm) を 1 時間、3 週間以上の間隔をあけて 2 回吸入させた。吸入曝露の(前)後に血液、鼻洗浄液、気道洗浄液、肺胞洗浄液を回収し、アンチオキシダント(アスコルビン酸、尿酸、グルタチオン)、過酸化脂質(malondialdehyde, MDA)、蛋白過酸化物(carbonyl protein)の濃度を測定した。鼻洗浄液中のアスコルビン酸濃度は、DE の曝露 1 時間後に 12 倍に増加したが、6 時間後には前値まで低下した。鼻洗浄液中の尿酸やグルタチオン濃度には影響がなかった。一方、血液、気道洗浄液、肺胞洗浄液中のアンチオキシダント、過酸化脂質、蛋白過酸化物の濃度には変化がなかった。以上の結果から、DE の曝露により鼻汁のアスコルビン酸が著明に増加することが示された。

Diaz-Sanchez ら(1994)は健康人(非喫煙者)11 例に対し、DEP0.30mg を鼻腔内投与し、経時的に鼻腔洗浄を行い洗浄液中の各種免疫グロブリンおよびその遺伝子発現を解析した。その結果、DEP 投与 4 日後には IgE 濃度の有意な増加が認められたが、IgG, IgA, IgM, アルブミンは不変であった。洗浄液中の IgE 産生細胞の数は 20 倍以上に増加し、また遺伝子レベルでは異なる IgE タンパクをコードする 5 種類の mRNA(CH4-M1'M2, CH4-M2', CH4-M2'', CH4S, CH4'-CH5) の発現が亢進し

が亢進した。よってこれらの所見は、DEP がアレルギー性呼吸器疾患を引き起こす可能性を示唆するものである。さらに、Diaz-Sanchez ら(1996) は健康人(非喫煙者) 14 例に対し DEP0.15mg を鼻腔内投与し、18 時間後に鼻腔洗浄を行い洗浄液中のサイトカインの mRNA およびタンパク発現を検討した。その結果、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IFN- $\gamma$ などが遺伝子およびタンパクレベルで増加した。また洗浄液中の IgE 濃度の上昇もみられた。したがって、これらのサイトカインの発現が、DEP 曝露に基づくアレルギー疾患の増加に関与している可能性がある。

Diaz-Sanchez ら(1997) は 13 名のブタクサに感作された非喫煙者に対して DEP (0.30mg) とブタクサ抗原の両者を組み合わせて、ヒトに鼻内チャレンジを行い、局所の液性免疫に与える影響を検討した。ブタクサ抗原単独のチャレンジと比較して、DEP とブタクサ抗原の組み合わせは抗原特異的な IgE の著明な増加をもたらしたが、総 IgE や IgE 産生細胞数は変化しなかった。総 IgG4 や抗原特異的な IgG4 も増加したが、総 IgG は変化しなかった。両者の相乗作用は alternative splicing による  $\alpha$ mRNA のレベルにおいても観察された。さらにブタクサ抗原単独では、低レベルのサイトカイン mRNA が検出されたにすぎなかったが、ブタクサ抗原と DEP の組み合わせは Th1 タイプのサイトカイン IFN- $\gamma$  や IL-2 の mRNA の減少をもたらし、一方、Th2 タイプのサイトカイン IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 の mRNA の増加をもたらした。DEP とアレルゲン曝露の相乗作用はアレルゲン誘導性の呼吸器疾患の増加を示唆する重要な所見と考えられる。

Rudell ら(1990, 1994) は 8 人の健康非喫煙者を対象として DE への曝露前後で broncho alveolar lavage (BALF) を検討した研究を報告している。アイドリングしているトラックから曝露チャンバー内へ、希釈した DE が導入された。DEP のサイズと形状は、排気パイプからチャンバー内への移動により変化していないことが確認された。また DE の組成を成分比、CO/NO、総炭化水素/NO、粒子状物質/NO、NO<sub>2</sub>/NO、ホルムアルデヒド/NO で表すと異なる希釈濃度でもほぼ一定であった。NO<sub>2</sub> と粒子のチャンバー内の濃度勾配は生じていなかった。希釈濃度を変化させたときに定常状態になるまでの時間は 5~7 分と短かった。この装置を用いて、8 人の健康非喫煙者を対象に 1.6ppmNO<sub>2</sub> の平均濃度になる希釈排気物を 1 時間曝露した。すべての対象で不快な臭い、目や鼻の刺激を訴えた。のどの刺激、頭痛、めまい、吐き気、疲労感、咳嗽は一部の対象で出現した。呼吸機能検査では曝露による影響は出なかった。18 時間後に BAL を採取した結果、肥満細胞の減少、好中球の増加、Leu3a / Leu2a の上昇、貪食能の減少がみられた。

Rudell ら(1996) は、呼吸機能および自覚症状に対する DE ガス吸入の急性影響を明らかにし、DEP をトラップするフィルターの使用によってそれらを軽減できるか否かを検討したものである。健康人(非喫煙者) 12 例をチェンバー内に入れ軽い運動をさせた(エルゴメーター75W) DE (CO 濃度として 27~30ppm, NO 濃度として 2.6~2.7ppm) あるいは clean air を 1 時間チェンバー内に吹送し(二重盲検法)、呼吸機能と Borg scale(自覚的運動強度)を経時的に測定した。その結果、DE に曝露した際には眼と鼻の刺激感、異臭、呼吸抵抗の有意な増加(10~15%)がみられた。次に排気筒にフィルターを装着すると粒子はそこに吸着され曝露量は 46%減少したが、上記の自覚症状および気道収縮の程度は不変であった。

Salvi ら(1999) は、気道炎症と呼吸機能に対する DE 曝露の影響を検討した。対象は 15 例の非喫

煙健常人であり、チェンバー内にてエルゴメーターで運動させながら(分時換気量 20l/min/m<sup>2</sup>)ディーゼルエンジンから排気(PM<sub>10</sub>濃度として 300µg/m<sup>3</sup>)あるいは clean air を 1 時間流入させた。次いで 6 時間後に呼吸機能, 血液検査, 気管支鏡検査を施行した。その結果, DE に曝露した際には気管支肺胞洗浄液中の好中球, Bリンパ球, ヒスタミン, フィブロネクチンの濃度が増加し, 気管支粘膜生検標本では好中球, 肥満細胞, CD4+, CD8+リンパ球の増加, 血管内皮細胞における ICAM-1 および VCAM-1 の発現の亢進, LFA-1 陽性細胞の増加などが観察された。また, 末梢血中の好中球と血小板の数も増加した。しかし, スパイロメトリーやフローボリューム曲線には明らかな影響は認められなかった。

Nitingaleら(2000)は健常者に対する DE 曝露の影響を検討した。この研究では 10 人の被検者(男性 7 人, 年齢 28 ± 3 歳)を対象とし, 二重盲検クロスオーバー法により DEP と空気を交互に吸入させて検討した。すなわち曝露室内(1.4 × 1.7 × 2.3 m)で非喫煙健常者に高濃度の DE (PM<sub>10</sub>, 200 µg/m<sup>3</sup>) または空気を 2 時間吸入させ, 吸入前および 4 時間, 24 時間後にスパイロメトリー, 心拍数, 血圧, 呼気 CO 濃度, メサコリン気道過敏性, 喀痰細胞数, 喀痰および血清中の炎症性マーカー濃度を測定した。DEP の吸入曝露により心拍数, 血圧, スパイロメトリー, 気道過敏性は変化しなかったが, 呼気中の CO 濃度は上昇していた。喀痰成分を検討すると, DEP の吸入曝露 4 時間後には好中球数とミエロペルオキシダーゼ活性が増加していた。しかし喀痰中の IL-8, TNF $\gamma$ 濃度や血中の IL-6, p-セレクトリン, TNF $\alpha$ 濃度に変化はみられなかった。以上の結果から健常者に対する DEP の急性曝露は好中球性の気道炎症を引き起こすことが示された。

DEP の曝露により抗原刺激による上気道粘膜の IgE や Th2 サイトカインの産生が亢進することが知られている。Diaz-Sanchez ら(2000a)はこのような作用が DEP による肥満細胞の活性化によるものではないかと考えた。この仮説を検証するためにダニ抗原(dust mite, Dermatophagoides pteronyssinus(Der p1))に感作された 11 人の非喫煙者(男性 6 人, 21~55 歳)を対象として二重盲検クロスオーバー試験を行った。すなわち鼻腔内に生理食塩水, DEP (0.3mg), カーボンブラック(0.3mg)のいずれかを前噴霧し, その直後に低~高濃度のダニ抗原エキス(Der p1)を噴霧曝露した。噴霧前および噴霧 5 分後の鼻症状(鼻搔痒感, 鼻閉, 鼻水, くしゃみ)と鼻洗浄液中のヒスタミン濃度を検討した。その結果, DEP を前噴霧された被験者では生理食塩水やカーボンブラックを前噴霧された被験者に比べて 1) 鼻症状のスコアが高いこと, 2) 低い濃度のダニ抗原曝露により鼻症状が出現すること, 3) 鼻洗浄液中のヒスタミン濃度が高値であることが示された。さらに培養したマウス肥満細胞(MMC-34 系)を高親和性 IgE 受容体の重合(クロスリンク)により刺激すると, DEP の存在下でヒスタミンの放出が増強した。以上の結果から DEP の曝露はアレルゲンによる鼻症状を増悪させることが明らかにされた。Diaz-Sanchez ら(2000b)はさらに DEP 曝露が鼻粘膜における CC ケモカイン産生に与える影響について検討した。健常人の鼻粘膜に DEP を曝露すると, 6 時間後および 24 時間後の鼻洗浄液に含まれる RANTES, MIP- $\alpha$ , MCP-3, ECP の各濃度が上昇し, 好中球, リンパ球, マクロファージが増加していた。しかし RANTES 濃度や好酸球数には変化がみられなかった。DEP 曝露によるケモカインの増加は炎症反応やアレルギー反応の出現に関与している可能性がある。

Salviら(2000)の過去の研究からDEを健常者に曝露すると気道内に好中球,リンパ球,肥満細胞が浸潤することが明らかにされている。本研究ではDE曝露による気道の炎症性メディエーターへの影響を明らかにするために,15人の健常非喫煙者(男性11人,平均年齢24歳)を対象に空気またはDEをクロスオーバー法により交互に曝露して検討した。すなわち各被験者に曝露室内で空気またはDE(PM10: 300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; NO<sub>2</sub>: 1.6 ppm; NO: 4.5 ppm; CO 7.5 ppm; total hydrocarbons 4.3 ppm)を1時間吸入曝露し,その6時間後に気管支鏡により気道生検および気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。DEの吸入曝露後には気道壁およびBAL細胞からのIL-8とGRO- $\alpha$ の産生亢進が認められた。気道壁におけるIL-5産生もDE曝露群で高い傾向にあったが有意差はなかった。一方,IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GM-CSFの産生はDE曝露によっても変化しなかった。以上の結果からDEを曝露された気道内ではケモカイン(IL-8とGRO- $\alpha$ )が産生されることが明らかにされた。

Nordenhallら(2000)はDEの曝露が気道炎症に与える影響を検討した。15人の健常非喫煙者(男性13人,平均年齢25歳)を対象に空気またはDEをクロスオーバー法により交互に吸入曝露した。すなわち曝露室内で各被験者に空気またはDE(PM10: 300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; NO<sub>2</sub>: 1.6 ppm)を1時間曝露し,6時間および24時間後に高調食塩水の吸入による誘発喀痰を採取した。6時間後の誘発喀痰の検討では空気吸入に比べてDE吸入被験者において好中球数,IL-6濃度,メチルヒスタミン濃度が増加していた。しかし24時間後の誘発喀痰では空気吸入,DE吸入のいずれにおいても好中球の増加が観察され,これは先行した喀痰誘発の影響と思われた。以上の結果からDEの吸入曝露は気道内の好中球,IL-6,メチルヒスタミン濃度を増加させることが知られた。一方,喀痰誘発の反復は気道炎症の解析に影響を与えたと考えられた。

### 3.2.2. 非発がん影響に関する疫学研究

#### 3.2.2.1. 急性影響に関する疫学研究

##### 職業上の曝露に関する研究

Jørgensenら(1970)はDEへ曝露されている鉄鉱山の120名の地下作業者と120名の坑外作業者のFVCとFEV<sub>1</sub>を検討している。交代勤務前後のFVCとFEV<sub>1</sub>の変化はみられず,また坑外作業者と地下作業者の差もみられなかった。気管支炎の頻度は地下作業者の方が高かったと報告している。また,地下炭鉱での曝露濃度はNO<sub>2</sub>が0.5~1.5ppm,粒子状物質が3~9mg/m<sup>3</sup>であったとしている。

Amesら(1982)は炭鉱労働者の呼吸機能に対するDE曝露の急性影響を検討している。DE曝露群として,米国ケンタッキー,ユタ,コロラド,ワイオミング州の6つの炭鉱の約1000名の炭鉱労働者のなかから60名が選ばれた。対照群はNIOSHデータベースと近隣の鉱山から90名が選ばれた。呼吸機能の測定は8時間交代勤務の前後に実施された。作業環境の測定結果は吸入性粉じん2.0mg/m<sup>3</sup>,NO<sub>2</sub>濃度0.3ppm,CO濃度12ppm,ホルムアルデヒド0.3ppmであったと報告されている。両群とも交代勤務の前後で呼吸機能(FVC,FEV<sub>1</sub>,V<sub>max50</sub>)の有意な低下がみられたが,喫煙状況を考慮してもDE曝露群と対照群間には差がみられなかったと報告している。著者らはDE濃度が低かったことや他の粉じんとDEとの相互作用の可能性について述べている。