

〔原著〕

二酸化窒素およびタバコ煙暴露の 呼吸器におよぼす影響に関する 実験的研究

河野俊彦* 大和田英美* 林 豊*

(平成3年2月22日受付, 平成3年3月7日受理)

要 旨

大気汚染物質の NO_2 とタバコ煙の複合影響による呼吸器の病理組織学的変化について明らかにする目的で, Wistar 系雄ラットを10ppm NO_2 に連続暴露し, 同時に週4回タバコ煙の複合暴露を行ない, 52週まで経時的に屠殺し, 病理組織学的, 電顕的に検索した。タバコ煙暴露群では主に気管, 気管支に変化がみられ, 線毛細胞の扁平化や線毛の短縮化(2週), 気管, 気管支壁の浮腫性膨化, 膠原線維の増生, リンパ濾胞の著明な増加とともに, 細気管支における無線毛上皮細胞の腫大を認める。しかし, 肺泡領域における変化は明らかではない。 NO_2 暴露群では早期から肺泡領域が障害され, 肺泡上皮細胞の空胞変性や肺泡壁間質の水腫を生じ, 20週以後では肺泡壁の肥厚がみられ, 一部に線維性肥厚も認められた。複合暴露群では, 気管, 気管支の障害と肺泡の障害がいずれも単独暴露群よりも早期に起こることが明らかであった。さらに, 8~16週に末梢の細気管支から肺泡にかけて上皮細胞の腫大と増生が認められた。しかし, 20週以後は腫大, 増生は軽度となり, 36週では線維の軽度の増生を伴っていた。複合暴露による細気管支上皮細胞の増生は, 現実喫煙と大気汚染物質が重複して生体に影響を及ぼす可能性を示唆している。

Key words: 二酸化窒素, タバコ煙, ラット, 肺, 病理組織学的検索

I. はじめに

大気汚染物質のうち, 最も一般的に存在する二酸化窒素(NO_2)は酸化性の強い物質として知られ, その動植物に与える影響に関する研究は数多く報告されている^{1,2)}。一方, 気道系における上皮の増殖性変化と喫煙との関連についても多くの報告³⁻⁶⁾がある。しかし, 実験的に喫煙により動物に腫瘍を発生させることは特殊な条件の下で行なわれた研究^{7,8)}を除いて, 成功していない。われわれはこれまで NO_2 の呼吸器に及ぼす影響について, 高濃度短期間あるいは低濃度長期間等, 種々の

濃度での検討をすすめてきたが, 上皮の増殖性変化はいずれの条件によっても認められなかった⁹⁻¹¹⁾。そこで, ラットを NO_2 とタバコ煙の両者に暴露し, それらの複合作用による呼吸器の変化について, 病理組織学的な検索を行なった。

II. 実験材料と方法

Wistar 系雄ラット(実験開始時100g)330匹を用い, 次の4つの実験群に分けた。

I群: ハンブルグII型吸入装置により, 週4回のタバコ煙暴露を行なった群(80匹)

* 千葉大学医学部肺癌研究施設病理研究部門

Toshihiko KOHNO, Hidemi OHWADA and Yutaka HAYASHI: Experimental and Histopathological Studies on the Respiratory Organ of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide and Tobacco Smoke. Division of Pathology, Institute of Pulmonary Cancer Research, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received February 22, 1991. Accepted March 7, 1991.

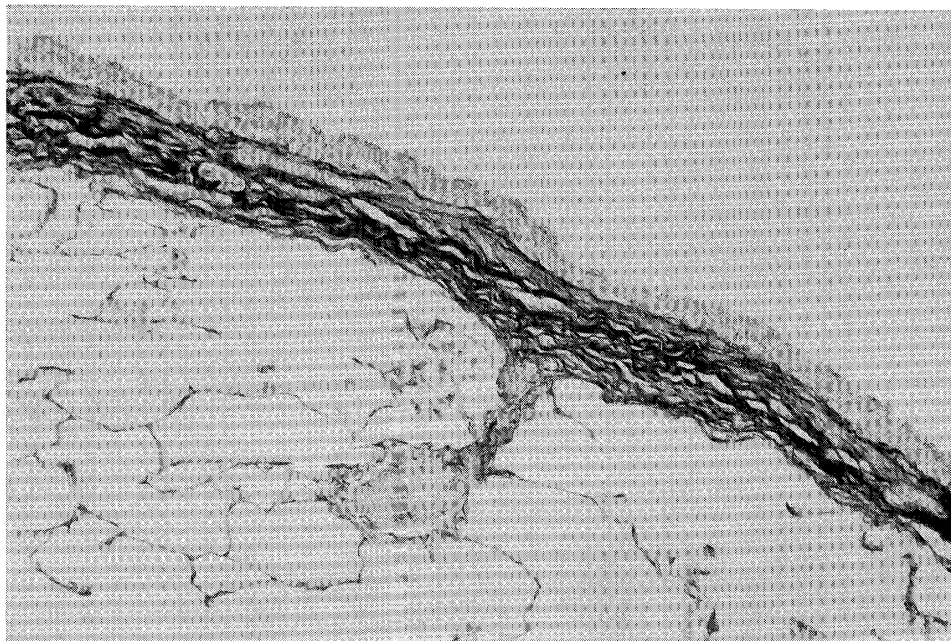


図 1. タバコ煙暴露24週後：気管支壁の線維増生（鍍銀染色 ×200）

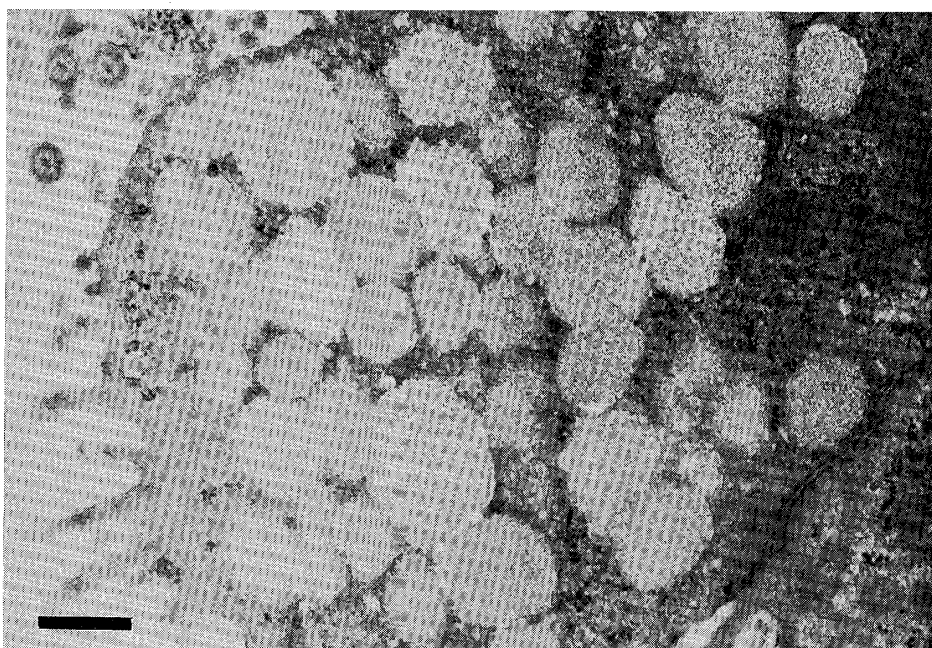


図 2. 10ppm NO₂ 暴露 2 週後：気管支における杯細胞 Bar = 5 μm

Ⅱ群：10ppm NO₂ のみ週 7 日連続暴露した群（76匹）

Ⅲ群：10ppm NO₂ を週 7 日連続暴露し、同時に週 4 回
タバコ煙暴露を行なった群（117匹）

Ⅳ群：対照群（57匹）

これらの条件を実験期間中継続して行ない、各群の動物を 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 52 週に屠殺した。屠殺後速やかに開胸し、気管から 2.5% グルタルアルデヒドを注入して肺と心臓を一塊に取り出して固定後、組織片を 1% オスミウム酸にて二次固定を施し、エポン包埋を行なって電顕的に観察した。また、

別に 10% ホルマリンにて再固定後、パラフィン包埋切片を作製し、病理組織学的試料とし、組織学的な検索を行なった。

タバコ煙の吸入はハンプルグⅡ型吸入装置を用いて、ラット 10 匹当たり 60 本のフィルターの付いていないハイライトのタバコ煙に暴露した。

10ppm NO₂ 暴露は、標準ガス発生器（スタンダードテクノロジー社、SGGU-60HN 型）で、N₂ ガス、NO ガス、O₂ ガスを混合して NO₂ ガスを発生させ、連結されたチャンバー（容積約 400L、KIMOTO 製）内でラ

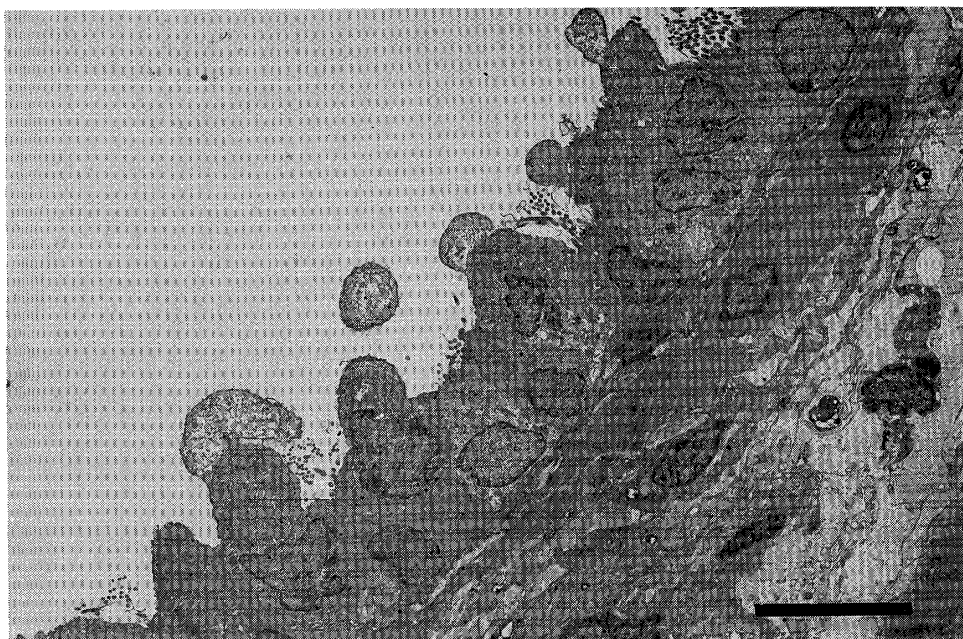


図 3. タバコ煙暴露 6 週後：細気管支におけるクララ細胞の著明な突出 Bar=10 μ m

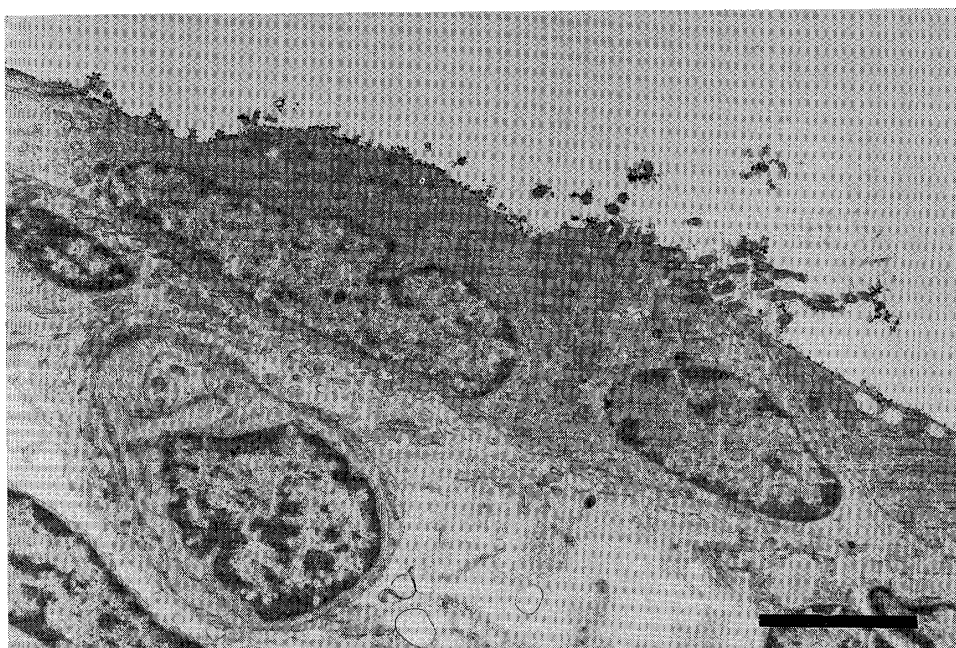


図 4. タバコ煙暴露 8 週後：細気管支におけるミトコンドリアに 富む 扁平な無線毛上皮細胞や線毛上皮細胞 Bar= 5 μ m

ットに24時間連続暴露した。なおⅢ群におけるタバコ煙暴露時には、二酸化窒素の暴露を一時中断した。

III. 実験結果

1. 気管、気管支の所見

I 群：光顕的には2週間後から、杯細胞の増生が明らかで、気管の上皮細胞は局所的にその高さを減じたところがみられた。4 週後には気管、気管支壁の結合織の軽度の浮腫性の膨化を生じ、8 週後では小円形細胞浸潤と

軽度の膠原線維の増生を伴っていた。これを電顕的にみると気管の上皮細胞は一部で脱落し、線毛細胞の線毛は小短化したり、消失したりしているのがみられた。8 週後の気管、気管支壁には不規則な配列の膠原線維と線維芽細胞がみられ、16週ではさらに線維の増生が明らかであった。24週後では肺内の小気管支壁の線維の増生が認められ、壁の厚さが明らかに増加していた（図1）。この線維の増生は実験期間の52週まで認められた。

リンパ組織は気管から肺内の小気管支までの気道に増

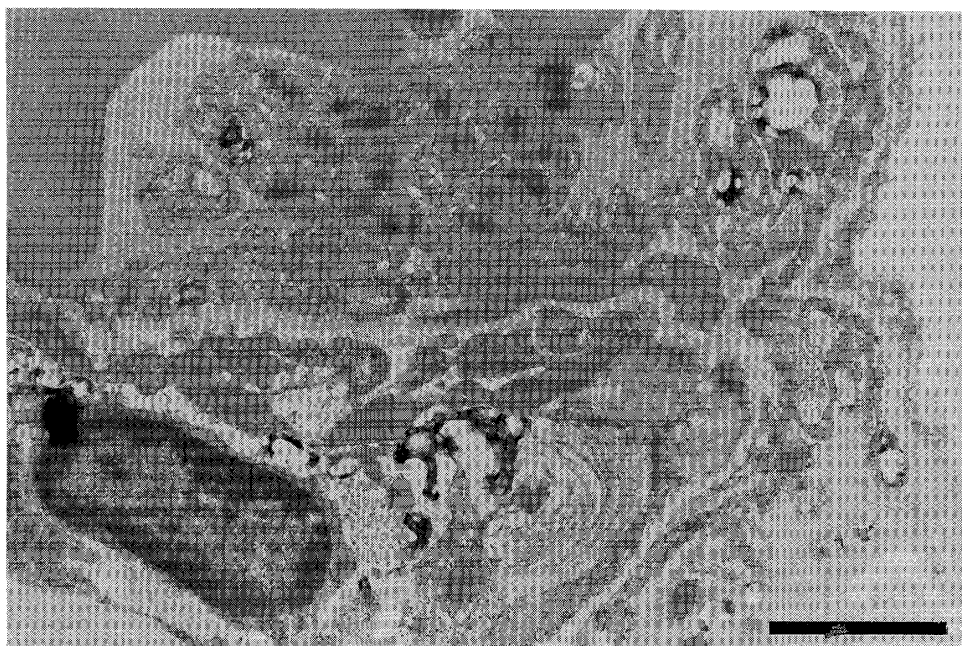


図 5. 10ppm NO₂ 暴露 2 週後：肺胞壁毛細血管内皮細胞の空胞変性 Bar = 2 μm

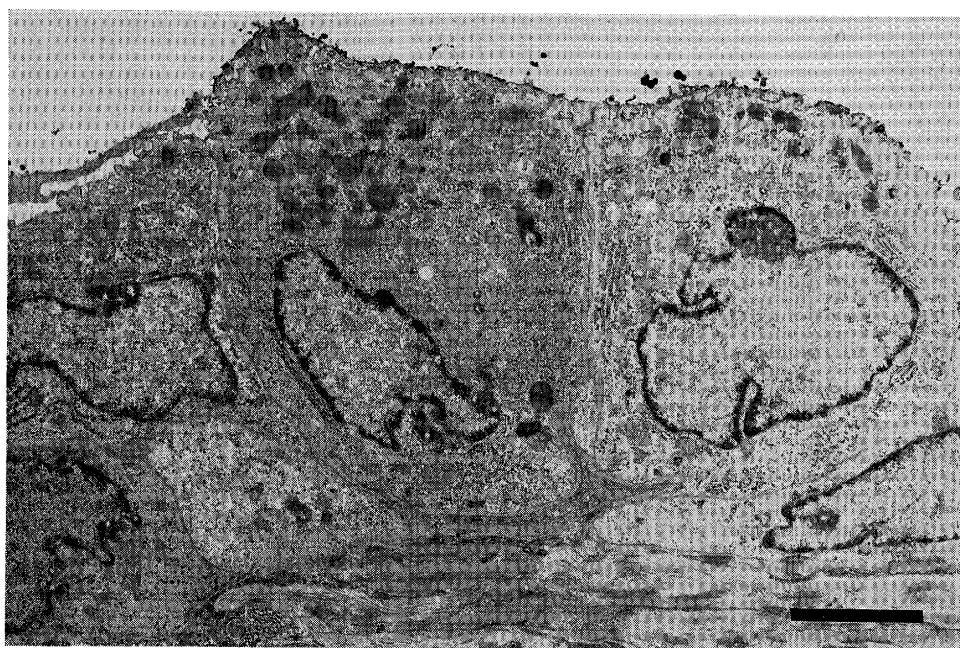


図 6. 10ppm NO₂ 暴露 16 週後：細気管支における細胞内小器官に富む無線毛上皮細胞 Bar = 3 μm

生が明らかで、リンパ濾胞が気管支内腔へ結節状に突出している所見や、小気管支周囲全周を取り囲んでいるものなどもみられた。また、線毛上皮細胞の増生は局所的にわずかに認められた。

Ⅱ群：光顕的に 2 週後から杯細胞の増生が著明に認められ、粘液が放出された空胞様にみられるものもあった。4 週後の例では肺内の小気管支周囲にリンパ組織の増生があり、8 週例では気管、気管支壁の軽度の水腫が認められ、局所的に小円形細胞浸潤を伴っていた。

電顕像では 2 週後の増生した杯細胞の原形質内に多量の粘液顆粒を持つものや顆粒の放出像がみられた（図 2）。8 週後では気管上皮細胞の線毛の短小化や一部の上皮細胞の基底膜からの脱落がみられたが、16 週以後には著明な変化は認められなかった。

Ⅲ群：前記Ⅰ群、Ⅱ群にみられた諸変化とほぼ同様の変化が観察されたが、やや早期に認められ、1 週、2 週例ですでに気管、気管支炎を起こす例が多くみられた。しかし、16 週以後はⅠ群の変化とほぼ同様であった。

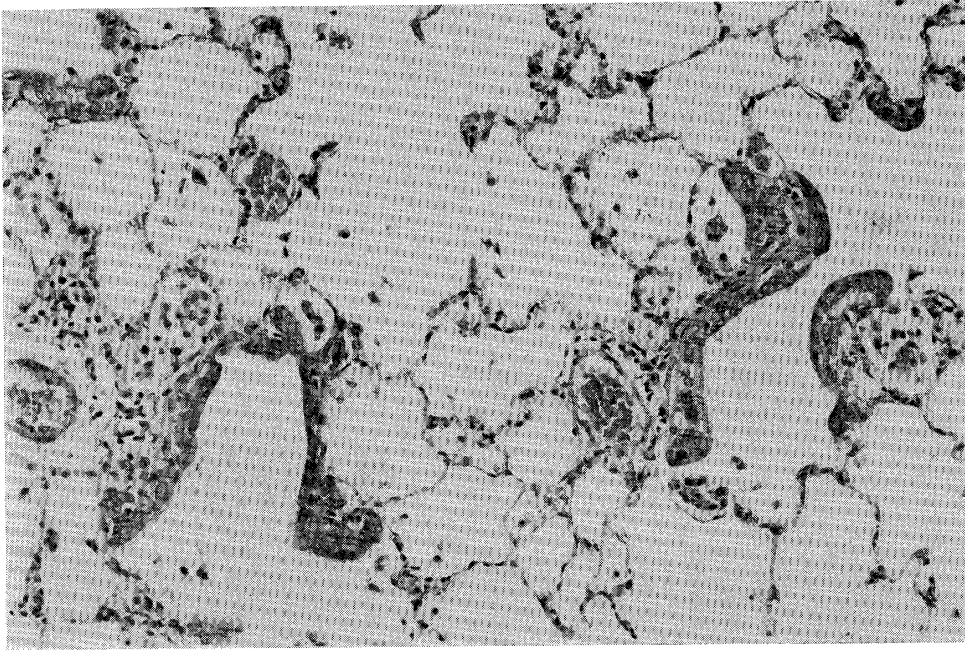


図 7. 複合暴露 8 週後：細気管支から肺胞へかけての上皮の増巢生 (HE 染色×100)

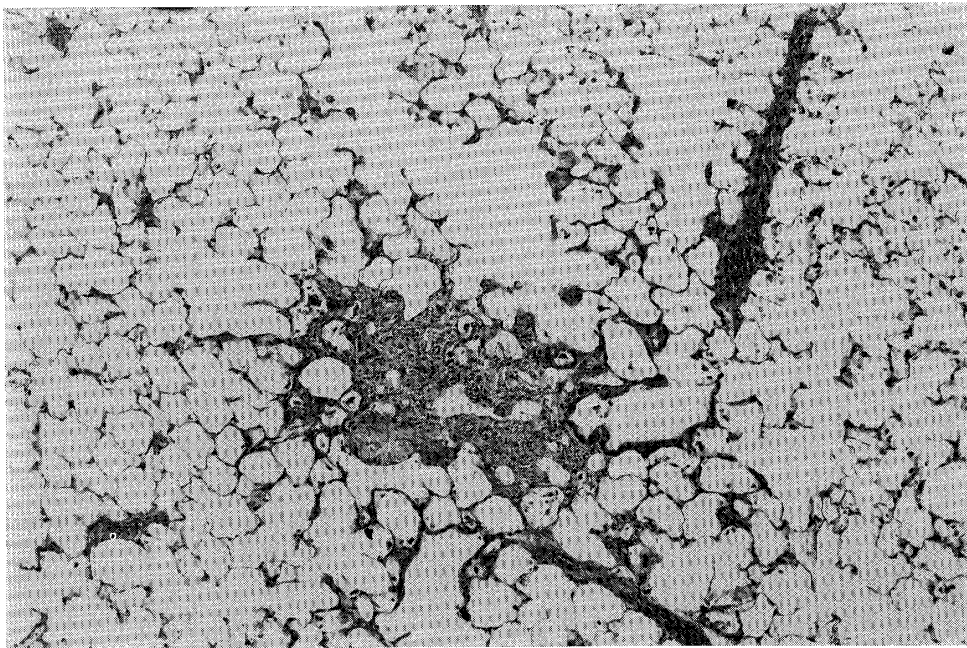


図 8. 複合暴露 24 週後：線維化を伴う増生巣 (HE 染色×100)

2. 細気管支、肺胞の所見

I 群：光顕的に 4 週後までは明らかな組織学的変化は観察されず、6 週以後の例で細気管支における無線毛上皮細胞の突出が対照群に比してやや顕著になった。36 週および 52 週の例では、細気管支壁の肥厚がみられるものがあり、軽度の気腫性変化が認められた。肺胞の変化はいずれの時期においても明らかではなかったが、8～12 週以後の例において、肺胞壁の軽度の膨化とうっ血を呈する動物がみられた。しかし、20 週以後の例では肺胞壁の変化は認められなかった。また、いずれの時期にも胸

膜の肥厚は観察されなかった。

電顕像でみると 4～8 週後の細気管支上皮細胞には数種の異なった型の細胞がみられ、クララ細胞の細気管支内腔への突出があり (図 3)、その原形質中に分泌顆粒を多数有するものや豊富なミトコンドリアあるいはライソゾームを有するものがあつた。また、微絨毛とともに少数の線毛をもつ扁平な細胞があり、細胞内小器管に富み比較的電子密度の高いものや、さらに小空胞を示すものなどが観察された (図 4)。12～16 週例では肺胞における II 型上皮細胞の膨隆と層状封入体の膨化や空胞化がみら

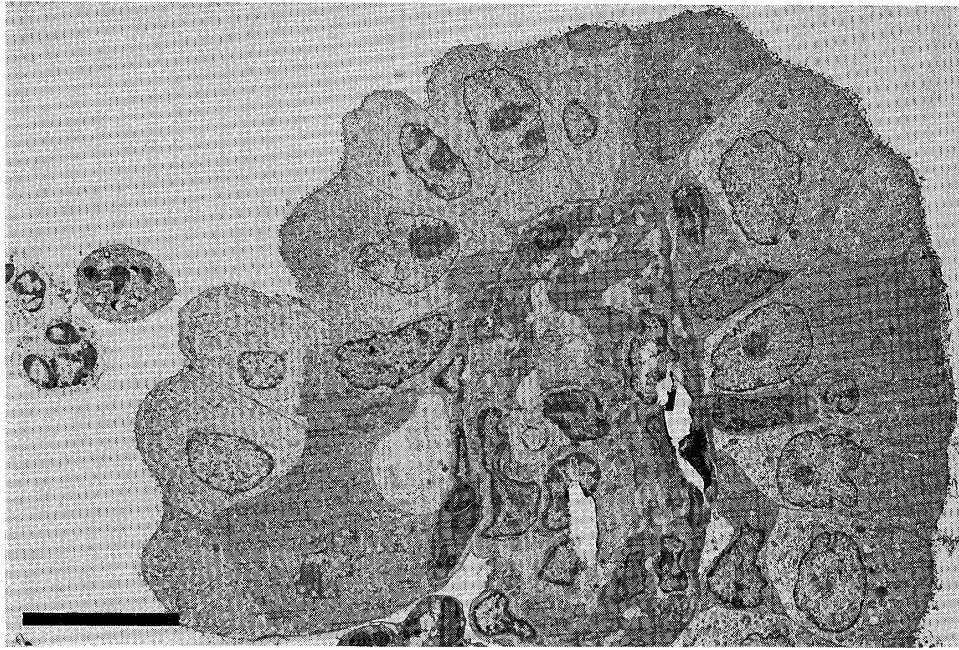


図 9. 複合暴露 8 週後：増生巣の電顕像 Bar=10 μ m

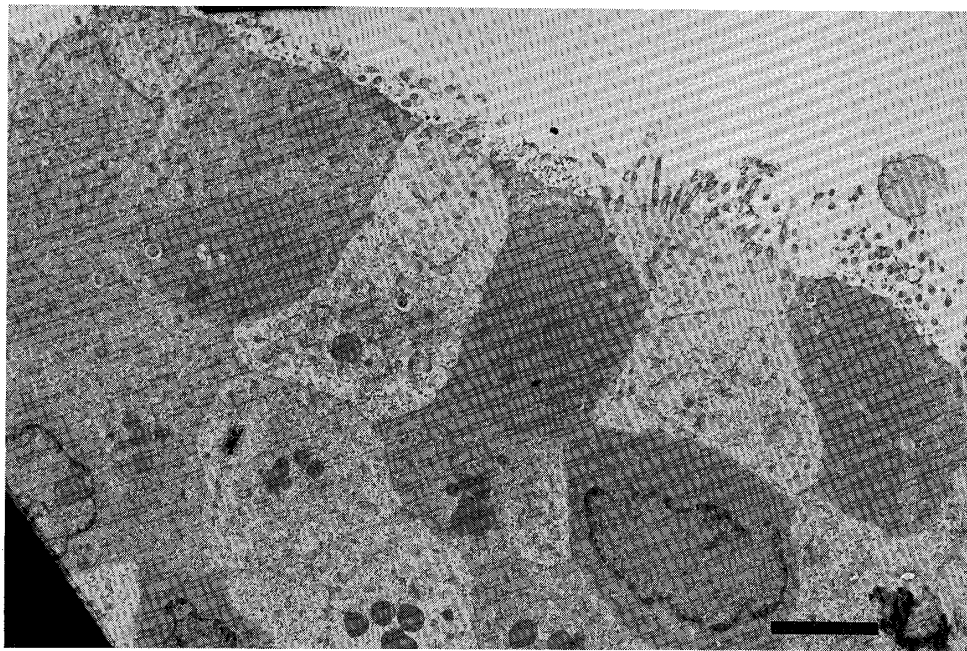


図 10. 複合暴露 8 週後：増生巣における無線毛上皮細胞および線毛上皮細胞 Bar= 5 μ m

れたが、20週以後には著明な変化は認められなかった。

Ⅱ群：光顕的に2週後から肺胞壁の膨化、肥厚がみられ、肺胞腔内に脱落した上皮細胞や遊走細胞と思われる細胞が認められた。しかし6週後の例では、肺胞壁の肥厚はみられるものの肺胞腔内の細胞は比較的少なかった。20週後では肺胞壁の肥厚が増し、多数の単核の細胞の増加が認められた。また、一部に線維性肥厚も認められた。24週後ではこの肥厚部にリンパ球の浸潤も加わり、27週までに死亡する動物が多くみられた。52週まで生存した2匹においては膠原線維の増生が明らかに認め

られた。

電顕的にみると、1週後の例では肺胞のⅠ型上皮細胞の障害像は著しく、原形質内に空胞変性がみられたり、囊胞状に膨大した像を示したり、基底膜から剝離している所見がみられた。Ⅱ型上皮細胞はその数の増加とともに原形質内に著明な空胞を示し、2週後では細胞内小器官の消失や核の濃縮などがみられた。また、肺胞壁間質の毛細血管内皮細胞の空胞変性が高度となり、基底膜から剝離したり(図5)、内皮細胞相互間の接合部が離開し、そこから赤血球の漏出している像も認められた。肺胞壁

間質の水腫も明らかで4週例では不規則に配列した膠原線維の増生も認められた。その後、6～16週例では上記の障害像が続いて観察されるが、肺胞腔内への脱落した細胞は減少し、肺胞上皮細胞の障害像もやや軽度であった。なお、肺胞に変化が強いにもかかわらず、細気管支上皮では12～16週例において、無線毛上皮細胞のわずかな増加がみられるのみであった。これらは電顕的には突出した遊離縁にわずかの微絨毛を有し、ミトコンドリアに富んでおり(図6)、それらのあるものには少数の顆粒や小空胞が認められた。

Ⅲ群：肺胞壁の膨化は1週後から光顕的にも認められ、電顕的には早期に肺胞上皮細胞の腫大と空胞変性がみられ、肺胞腔内には脱落したⅠ型、Ⅱ型上皮細胞が多数認められた。細気管支では電顕的にクララ細胞の空胞変性が認められ、この群にのみ顕著な変化は、暴露8週後の例の細気管支上皮における上皮細胞の腫大と、さらに肺胞側への増生であった(図7)。これらの変化は16週後まで認められた。また、12～16週例では増生巣に器質化が伴うものも認められ、24週では線維化を伴う例もみられた(図8)。36週では線維化はさらに明瞭となり上皮細胞はやや扁平化して一層となるものが多くみられた。

増生巣における細胞を電顕像(図9、10)でみると、分泌顆粒をもったクララ細胞に似た細胞の他に、線毛を有する細胞、封入体を持ちⅡ型上皮細胞に類似した細胞、電子密度が比較的高くミトコンドリアに富んだ細胞、あるいは電子密度が低くライソゾームに富み、空胞をもっている細胞など、さまざまな細胞が観察された。また、これらの細胞間接合部には junctional complex が存在し、デスモゾームも認められた。

IV. 考 案

二酸化窒素とタバコ煙を同時に暴露した実験報告はみられていないが、各々単独の暴露実験についての報告は多数みられている。

Freeman et al.¹²⁻¹⁵⁾ は NO₂ 長期暴露による肺の変化を報告しているが、ラットを用いた1964～1969年の一連の実験によると、2～20ppm の影響による肺の変化は概ね次のようなものである。すなわち、肺重量の増加、気管支、細気管支上皮の肥厚と増殖、杯細胞増加、終末細気管支と肺移行部の結合組織増加、肺胞上皮の肥大などである。これらの結果はわれわれの行なった NO₂ 10 ppm の実験結果とほぼ同様の変化であるといえる。

10ppm の連続暴露による2週間までの変化¹⁰⁾ では、Ⅰ型肺胞上皮細胞の変性脱落や、Ⅱ型肺胞上皮細胞の増加と空胞変性が著明で、肺炎で死亡するものが多くみら

れた。しかし、より長期にわたる暴露では障害像と修復像がともにみられ、生体は抵抗力を獲得しつつ生存するものと考えられる。

長期にわたる障害と修復は、肺の線維化を引き起こすが、光顕的にも肺胞に線維の増加を認め得たことは、Freeman et al.¹⁵⁾ が18ppm 20週暴露ラットの肺に膠原線維や弾力線維の増加を認めたことと一致するものと思われる。また線維化が1年後でもみられたとも報告している。

NO₂ 長期暴露による腫瘍の発生に関して、マウスを用いた実験において、10ppm NO₂ を1日6時間、週5日、6カ月間暴露して、わずかに促進されたと報告している(Adkins et al., 1986)¹⁶⁾。また嵯峨井ら¹⁷⁾ は DH PN を0.5g/kg 投与したラットに、4ppm NO₂、1日24時間、連続17カ月間暴露したところ、40匹中5匹に腫瘍が生じ、この5匹中の1匹は腺癌であったと報告している。これらの結果は NO₂ が腫瘍発生に微弱ではあっても何らかの機転によって、肺癌の発生を促進する作用を有しているものと考えられる。その理由のひとつとして、NO₂ の化学的反応性が発癌を促進したり、修飾する可能性を持つと指摘されている¹⁸⁾。これには oxidative stress をひきおこして腫瘍促進効果に関連すること^{19,20)}、マクロファージや白血球に含まれるスーパーオキシド(O₂⁻)の異性化によって生じる過酸化水素(H₂O₂)との反応による水酸基(・OH)がDNAにプロモーションとして働くこと^{21,22)}、さらに肺に過酸化脂質を生じさせプロモーション作用を示すこと^{23,24)}などが考えられている。このように間接的証拠として NO₂ の発癌促進作用の可能性が論じられている。しかし、NO₂ 単独暴露では、長期暴露実験においても上皮の増生はまったく認められなかった。

一方、ラットを用いたタバコ煙の暴露実験による肺の変化は、1～3カ月では線毛細胞の線毛の脱落と杯細胞の増生および肺胞上皮細胞の増生、マクロファージの増加などが主なものである。Heckman et al.²⁵⁾ は2年間に及ぶタバコ煙暴露により肺胞壁における線維の増加や、肺気腫を認めている。これらの変化は暴露条件が多少異っているものの、概ねわれわれの実験結果と同様である。

1カ月の連続暴露実験(Betts et al., 1981)²⁶⁾ では気管支上皮細胞の増生と杯細胞の増生がみられ、50日(Mesurier et al., 1981)²⁷⁾ ではⅡ型肺胞上皮細胞が扁平化し、Ⅰ型への移行像がみられたという。12週間(Cogins, 1980)²⁸⁾ では気管支における線毛の脱落と杯細胞の増加、さらに肺胞内におけるマクロファージの増加を

みている。以上の変化はわれわれの実験においても同様にみられた変化で、さらに長期においてもくり返しみられており、障害と修復をくり返す変化であろうと思われる。

マウスを用いたタバコ煙暴露実験も多数みられており、Wynder and Hoffmann²⁹⁾はタバコ煙暴露のみで気道上皮の扁平上皮化生および過形成を認めたが、その変化は可逆性であったと報告している。また、長期のタバコ煙暴露によって腺腫を認めたとする報告^{7,30)}もあるが、ほとんどの報告は気道上皮の変化はいずれも可逆性であったとされている。馬場ら³¹⁾はマウスに6カ月間微量タバコ煙暴露を行ない、末梢気管支上皮細胞の肥大と増生を認め、呼吸細気管支では上皮細胞の肺胞側への増生、侵入像を認めている。これらの変化はわれわれのラットによる実験結果に比してやや強い変化であると思われる。これは暴露方法の違いによるものであろう。しかし、これらのマウスの変化は暴露中止後30日で可逆性変化を示したと報告していることから、動物の相違によるものであり、いずれも一過性の変化であるといえよう。

タバコ煙と二酸化窒素の両者を複合暴露した動物実験の報告は得られていないが、両者の複合暴露により、気管、気管支の障害と肺胞の障害がいずれも単独暴露群よりも早期に起こることが明らかであった。ことに細気管支上皮細胞の腫大と肺胞側への増生は複合暴露群に特徴的な所見であった。この部位における変化が著明におこるのは NO₂ が肺胞領域を中心に細気管支領域までを障害し、さらにタバコ煙粒子は 0.6 μ m 以下であり³²⁾、比較的末梢気道に沈着されるため³³⁾、両者の影響部位が重なることによるからであろうと考えられる。

増生した細胞はクララ細胞に似た細胞や線毛を有した細胞などさまざまな構造をもった細胞であることから、細胞の分化もまた多様的であることが予測され、肺癌発生の原因を有していることが考えられる。しかし、今回の実験条件においては、20週以後で増生巣の上皮細胞は縮小し次第に線維化していくことから、肺癌発生と直接的に結びつけることは困難であろうと思われる。

NO₂ や O₃ をはじめ大気汚染物質は年々増加の傾向にあり、本実験でみられた複合暴露による上皮細胞の増生は、現実喫煙と大気汚染物質が重複して生体にさまざまな影響を及ぼす可能性を示唆しているといえよう。

稿を終えるに臨み、本実験の実施にあたり御援助賜った千葉大学医学部公衆衛生学教室、吉田亮教授（現千葉大学学長）および安達元明教授に感謝いたします。また、長期にわたる暴露実験に終始ご協力下さった同教

室、渡辺寿直技官、並びに肺癌研究施設病理部門の諸氏にお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第16回国際病理学会議（Wien, Austria, 1986）、第75回日本病理学会総会（1986）、第28回日本肺癌学会総会（1987）にて発表した。

Summary

Effects of exposure to tobacco smoke, and nitrogen dioxide (NO₂) on rats were studied. Wistar male rats were exposed to tobacco smoke utilizing Hambrug II smoking machine 4 times a week and continuously to 10 ppm NO₂.

Tobacco smoke affected mainly the epithelium of the trachea, bronchi and bronchioles. Flattening and shortening of cilium of the tracheal epithelium were clearly observed (2 weeks). There were also edema (4 weeks), round cell-infiltration, and fibrosis (8 weeks) in the submucosal layer.

Rats exposed to NO₂ showed vacuolar degeneration and swelling of type I and type II alveolar cells, vacuolar degeneration of capillary endothelial cells, and edema of alveolar septa as the early histological changes. The alveolar walls were thickened 20 weeks after the first exposure.

In the group of combined exposure, bronchiolar epithelial cells were hypertrophic and proliferated along the alveolar walls at 8 weeks, and these findings became more remarkable at 16 weeks. The changes later regressed leaving slight alveolar fibrosis at 24 weeks. Epithelial proliferation became stationary at 36 weeks.

These findings suggest that the exposure of NO₂ causes some enhancement of the effect of tobacco smoke.

文 献

- 1) 和田 攻, 小野 哲, 長橋 捷: 窒素酸化物, 第2版, 文光堂, 東京, 1976.
- 2) 中馬一郎, 江上信雄, 武部 啓編「環境と人体Ⅲ」窒素酸化物, 初版, 東京大学出版会, 東京, 1984.
- 3) Ide G, Sunzef V and Cowdry EV: A comparison of the histopathology of tracheal and bronchial epithelium of smokers and non smokers. *Cancer* 12: 473-484, 1959.
- 4) Leuchtenberger C, Leuchtenberger R, Brunner T, Norlin D and Weiss S: Cytological and cytochemical alterations in the respiratory tract of mice after exposure to cigarette smoke, influenza virus and both. *Cancer Res* 23: 555-565, 1963.
- 5) Wynder EL and Hoffmann D: Tobacco

- and tobacco smoke. 1st ed, Academic Press, New York and London, 1967.
- 6) Wynder EL, Taguchi KT, Baden V and Hoffmann D: Tobacco carcinogenesis IX. Effect of cigarette smoke on respiratory tract of mice after passive inhalation. *Cancer* **21**: 134-153, 1968.
 - 7) Orr JW: Histology and histogenesis of pulmonary adenomata of mice. *Br J Cancer* **1**: 316-322, 1947.
 - 8) Essenberg JM, Leavitt AM and Gaffney E: The effect of arsenic in tobacco on primary neoplasms of the lungs of Albino mice. *West J Surg* **64**: 35-36, 1956.
 - 9) 河野俊彦, 林 豊: 二酸化窒素の呼吸器に及ぼす影響に関する実験的研究—ことに肺胞における病理組織学的変化—. *大気汚染学会誌* **16**: 313-327, 1981.
 - 10) 河野俊彦, 林 豊: 二酸化窒素の呼吸器に及ぼす影響に関する実験的研究—10ppm 暴露による病理組織学的変化—. *大気汚染学会誌* **21**: 115-122, 1986.
 - 11) Hayashi Y, Kohno T and Ohwada H: Morphological effects of nitrogen dioxide on the rat lung. *Environ. Health Perspect* **73**: 135-145, 1987.
 - 12) Freeman G and Haydon GB: Emphysema after low-level exposure to NO₂. *Arch Environ Health* **8**: 125-128, 1964.
 - 13) Freeman G, Stephens RJ, Crane SC and Furiosi NJ: Lesion of the lung in rats continuously exposed to two parts per million of nitrogen dioxide. *Arch Environ Health* **17**: 181-192, 1968.
 - 14) Freeman G, Crane SC, Stephens RJ and Furiosi NJ: Environmental factors in emphysema and a model system with NO₂. *Yale J Biol Med* **40**: 566-575, 1968.
 - 15) Freeman G, Crane SC, Stephens RJ and Furiosi NJ: The subacute nitrogen dioxide-induced lesion of the rat lung. *Arch Environ Health* **18**: 609-612, 1969.
 - 16) Adkins B, Jr. Van Stee EW, Simmons E and Eustis SL: Oncogenic response of A/J mice to inhaled chemicals. *J Toxicol Environ Health* **17**: 311-322, 1986.
 - 17) 嵯峨井勝, 市瀬孝道, 佐野友春, 村上正孝, 藤井敬二: 二酸化窒素の肺腫瘍発生促進作用に関する実験的研究. *大気汚染学会誌* **25**: 324-333, 1990.
 - 18) Witschi, H. P., 嵯峨井勝: オゾン及び二酸化窒素と肺癌—最近の知見と問題点—. *大気汚染学会誌* **24**: 1-20, 1989.
 - 19) Kensler TW and Trush MA: Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ Mutagen* **6**: 593-616, 1984.
 - 20) Cerutti PA: Prooxidant states and promotion. *Science* **227**: 375-381, 1985.
 - 21) Gray D, Lissi E and Heiklen J: The reaction of hydrogen peroxide with nitrogen dioxide and nitric oxide. *J Phys Chem* **76**: 1919-1924, 1972.
 - 22) Nagata C, Tagashira Y, Kodama M, Ioki Y and Oboshi S: Effect of hydrogen peroxide, Fenton's reagent, and irons on the carcinogenicity of 3, 4-Benzopyrene. *Gann* **64**: 277-285, 1973.
 - 23) Sagai M and Ichinose T: Lipid peroxidation and antioxidation protection mechanism in rat lungs upon acute and chronic exposure to nitrogen dioxide. *Environ Health Perspect* **73**: 179-189, 1987.
 - 24) Ochi T and Cerutti PA: Clastogenic action of hydroperoxy-5, 8, 11, 13-icosatetraenoic acids on the mouse embryofibroblasts C3H/10 T1/2. *Natl Acad Sci USA* **84**: 990-994, 1987.
 - 25) Heckman CA and Dalbey WE: Pathogenesis of lesions induced in rat lung by chronic tobacco smoke inhalation. *J. N. C. I.* **69**: 117-129, 1982.
 - 26) Betts TE, O'sullivan JP and Elson LA: Comparative lung pathology of rats after exposure to cigarette and cigar smoke. *Br J Exp Path* **62**: 429-435, 1981.
 - 27) Mesurier SML, Stewart BW and Lykke AWJ: Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res* **24**: 207-217, 1981.
 - 28) Coggins CRE, Fouillet XLM, Lam R and Morgan KT: Cigarette smoke induced pathology of the rat respiratory tract: A comparison of the effects of the particulate and vapour phases. *Toxicology* **16**: 83-101, 1980.
 - 29) Wynder EL and Hoffmann D: Experimental tobacco carcinogenesis. *Adv. Cancer Res* **8**: 249-453, 1964.
 - 30) Leuchtenberger R, Leuchtenberger C, Zeb-run W and Schaffer P: A correlated histological, cytological and cytochemical study of the tracheobronchial tree and lungs of mice exposed to cigarette smoke III. Unaltered incidence of grossly visible adenomatous lung tumors in female CF₁ mice after prolonged exposure to cigarette smoke. *Cancer* **13**: 956-958, 1960.
 - 31) 馬場雅行, 山口 豊, 岩崎 勇: 受動喫煙と肺癌発生との関連についての研究; 微量タバコ煙暴露と MNU (N-methyl-N-nitrourethane) の併用によるマウス肺癌の発生. *千葉医学* **60**: 293-303, 1984.
 - 32) Carter WL and Hasegawa I: Fixation of tobacco smoke aerosols for size distribution studies. *J Coll Interf Sci* **53**: 134-141, 1975.
 - 33) Brain JD and Valbarg PA: Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* **120**: 1325-1373, 1979.