

200924044A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

たばこ規制枠組条約に基づく
有害化学物質等の国際標準化試験法及び
受動喫煙対策を主軸とした革新的ながん予防に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲葉 洋平

平成22(2010)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- たばこ規制枠組条約に基づく有害化学物質等の国際標準化試験法及び
受動喫煙対策を主軸とした革新的ながん予防に関する研究 …………… 1
稲葉洋平

II. 分担研究報告

1. アジア太平洋たばこ研究 日本人喫煙者、非喫煙者の
ストレスマーカーの測定法の改良及び喫煙行動との関連性評価 …………… 1 3
稲葉洋平, 竹田真由
2. 尿中 1-Hydroxypyrene の測定法の改良および喫煙・非喫煙者の尿試料への適用 …………… 2 4
後藤純雄
3. 0.01、0.05 mg ニコチンたばこを喫煙した喫煙者の曝露量推計 …………… 3 0
稲葉洋平, 鈴木元, 緒方裕光
4. たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン測定法の確立
及び日本産たばこでの適用 …………… 4 0
稲葉洋平, 樺田尚樹
5. 煙草から発生するアクロレイン等 α , β -不飽和アルデヒドの分析 …………… 5 5
内山茂久
6. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原性 …………… 6 5
遠藤治
7. 地域における受動喫煙曝露の実態に関する検討 第一報 …………… 7 9
井埜利博, 矢野公一, 吉見逸郎

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 8 5

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

たばこ規制枠組条約に基づく有害化学物質等の国際標準化試験法及び受動喫煙対策を主軸とした
革新的ながん予防に関する研究

研究代表者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

研究要旨

本研究は、喫煙者及び受動喫煙者のたばこ煙による影響を評価する手法として生体試料中に含有されるたばこ由来の曝露マーカー及び影響マーカーの測定法を開発するとともに、たばこ煙中の粒子・ガスに含有される有害化学物質の測定法開発および定量を行い、これらの生体への影響評価を行なう。さらに、WHO たばこ研究室ネットワークに参加することにより国際協力研究に貢献でき、加えて、国内のたばこ対策・がん予防に資する科学的情報を発信し、総合的な研究の推進を行なうことを目的とした。

1) バイオマーカーによる喫煙の曝露・影響評価

日本人喫煙者・非喫煙者の尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 測定法を改良し、測定を行ったところ、喫煙者の尿で高い 8-OHdG 値が得られ、特に低ニコチンたばこ喫煙者においては、総吸煙量と相関を認めた。また、多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の Pyrene の代謝物である 1-Hydroxypyrene (1-OHP) の固相抽出カラムによる新たな抽出・測定法を開発し、喫煙本数と 1-OHP に良好な相関が得られた。

2) たばこ煙中有害物質の測定手法開発・定量

先行研究でニコチン表示量が 0.6 mg 未満のたばこ喫煙者は、カナダ保健省が推奨する喫煙方法 (HCI 法) に近いことを報告している。今回、HCI 法とパッケージ表示用の ISO 法の両喫煙法で主流煙の捕集を行った。超低ニコチンたばこ (0.01, 0.05 mg) においては表示ニコチン量が 10 倍以上違っても、HCI 法で捕集したタール・ニコチン・一酸化炭素量は、ほぼ同じ測定結果であった。また、発がん性の高い主流煙中のたばこ特異的ニトロソアミン (TSNA) の測定法の確立及び国産たばこの測定を行なった。その結果と過去に旧厚生省が実施した測定結果と比較したところ、同銘柄であっても TSNA 量は、1/3 から 1/2 に低減されていた。また、パッケージの表示量と TSNA 量との間に関連性が確認されなかった。さらに、主流煙中のアクロレイン等 α,β -不飽和アルデヒドの分析法を開発し、紙巻たばこばかりでなく、最近 FDA 等で懸念が表明されている電子たばこ蒸気中濃度を定量し高値を認めた。

3) 国際共同研究 (WHO TobLabNet 参画)

WHO たばこ研究室ネットワーク (TobLabNet) のラウンドロビン研究にて、主流煙のたばこ特異的ニトロソアミン (TSNA) 測定に参加している (継続中)。今後、アルデヒド類の分析法も検討予定であり、開発した測定法を提案する計画である。

4) 地域における受動喫煙対策やがん予防の効果的な普及啓発の検討

変異原性試験を実施し、副流煙は主流煙よりも多種多様で強い変異原を有する結果が示唆された。受動喫煙の曝露実態把握を行ったところ、半数を超す児の尿からコチニンが検出された。この結果から地域での小児における受動喫煙曝露が広範である実態が明らかとなった。改めて受動喫煙についての周知を通じて、意識の向上が必要と考えられた。本研究によって、確立したバイオマーカー測定法及び喫煙因子との関連性や、主流煙中の有害化学物質測定結果とたばこのパッケージ表示との関連性などを明らかにし、今後のたばこ対策に有用なエビデンスが得られたと考えている。

| 研究分担者 | 所属施設名 | 職名 |
|-------|-----------------------|-------|
| 稲葉洋平 | 国立保健医療科学院 生活環境部 | 主任研究官 |
| 遠藤 治 | 麻布大学 | 准教授 |
| 後藤純雄 | 麻布大学 | 教授 |
| 鈴木 元 | 国際医療福祉大学 | 教授 |
| 樺田尚樹 | 国立保健医療科学院 生活環境部 | 部長 |
| 緒方裕光 | 国立保健医療科学院 研究情報センター | センター長 |
| 内山茂久 | 国立保健医療科学院 生活環境部 | 室長 |
| 井埜利博 | 群馬パース大学 | 客員教授 |
| 矢野公一 | 札幌市衛生研究所 | 所長 |
| 竹田真由 | 東北福祉大学 | 助手 |
| 吉見逸郎 | 国立保健医療科学院 研究情報センター | 室長 |

A. 研究目的

本研究では、喫煙者および受動喫煙者のたばこ煙による影響を評価する手法として尿など生体試料中に含有されるたばこ由来の曝露マーカー及び影響マーカーの測定法を開発するとともに、たばこ煙中の粒子・ガスに含有される有害化学物質の測定法開発および定量を行い、これらの生体への影響評価を行なう。さらに分析や実態把握にとどまらず、WHO たばこ研究室ネットワークに参加することにより国際協力研究に貢献でき、加えて、国内のたばこ対策・がん予防に資する科学的情報を発信し、総合的な研究の推進を行なう。

本研究は、下記の4本柱を中心に推進している。

1. バイオマーカーによる喫煙の曝露・影響評価
2. たばこ煙中有害物質の測定手法開発・定量（主流煙・副流煙及び環境たばこ煙）
3. 国際共同研究（WHO TobLabNet 参画）
4. 地域における受動喫煙対策やがん予防の効果的な普及啓発の検討

B. 研究方法

1. 日本人喫煙者、非喫煙者の酸化ストレスマーカー測定法の改良及び喫煙行動との関連性の解明

1.1 試料採取

本研究の被験者は、先行研究（アジア太平洋たばこ研究）によって公募し、最終的に101名の喫煙者を得た。呼気中CO濃度測定は101名分、喫煙行動パターンの計測は100名分、唾液中コチニン量の測定は94名分、そして尿試料は98名分を得た。なお、唾液中コチニン量の測定、呼気中CO濃度の測定、喫煙行動パターンの計測については先行研究において終了している。さらに、尿試料採取のため非喫煙者の公募を行なったところ、最終的に47名の参加者を得た。本研究は、国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認を受けて行われた。

1.2 8-OHdG の測定

尿中8-OHdGの前処理は、2種類の固相抽出用のカラム（逆相、陽イオン交換）の組み合わせで実施した。得られた試料溶液を高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器（HPLC-ECD）に供し、8-OHdGの定量を行った。喫煙者と非喫煙者の尿中8-OHdG濃度について一元配置分散分析を行った。さらに、尿中8-OHdG濃度と喫煙行動に關係する因子については単回帰分析も行った。

2. 尿中1-Hydroxypyreneの測定法の改良および喫煙・非喫煙者の尿試料への適用

2.1 尿試料の採取

2009年に神奈川県相模原市の麻布大学の学生及び職員のうち喫煙者及び非喫煙者（各10名）合計20名に協力を募り被験者とした。なお、本調査研究は国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認を受けた。

2.2 前処理法

2.2.1 ブルーレーヨンによる1-OHPの抽出

尿試料とβ-glucuronidaseの反応を行い、グルクロン酸の脱抱合を行った。脱抱合反応後、ブルーレーヨンに1-OHPを吸着させた。このブルーレーヨンにメタノール/アンモニアを加え、振盪抽出を行った。抽出液を濾過後、減圧濃縮器で1-2 mLに減容し更に窒素気流下で溶媒を留去した。さら

に、抽出液を固相抽出カラムによりクリーンアップを行った。

2.2.2 固相抽出カラムを用いた 1-OHP の抽出

脱抱合反応後の尿試料を固相抽出カラムに導入し、メタノール/水で洗浄、メタノールで溶出を行った。

2.3 HPLC/蛍光検出法による 1-OHP の分析

1-OHP の分析は、HPLC/蛍光検出法で行った。

3. 0.01、0.05 mg ニコチンたばこを喫煙した喫煙者の曝露量推計

3.1 たばこ試料

4 種類の韓国産たばこ (ESSE 0.1、ESSE 0.5、The One 0.1 と The One 0.5) と 2 種類の日本産たばこ (Mild Seven One、Mild Seven Original) の計 6 種類のたばこ試料を評価対象とした。

3.2 たばこ主流煙の捕集

たばこ煙の捕集は、Borgwaldt LM1 喫煙装置 (独 Borgwaldt KC 社製) を用いた。主流煙の捕集法は、ISO 法とカナダ保健省の提案する喫煙法 (HCI) に準じた。

3.3 タール、一酸化炭素、ニコチンの測定

ニコチン濃度はガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 法により測定を行った。また、水分量はガスクロマトグラフィー熱伝導度検出器 (GC/TCD) を用いて測定した。ニコチン、水分を定量後、粗タール量からニコチン、水分量を差し引いた値をタール量とした。

3.4 多環芳香族炭化水素 (PAH) の測定

得られた主流煙抽出液は、固相抽出によってクリーンアップした。次に、得られた試料に内部標準を添加し、GC/MS 測定に供した。GC/MS 測定は選択イオン検出法 (SIM 法) を用い、内部標準法により定量を行った。

3.5 変異原性試験

変異原性測定には、Ames らのプレインキュベーション法を用いた。菌株には、サルモネラ菌 TA98、TA100 及び YG1024 の 3 種類を用い、S9mix による代謝活性化を行った場合と行わなかった場合の両条件下で実施した。

4. たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン (TSNA) 測定法の確立及び日本産たばこでの適用

4.1 たばこ試料及び捕集

たばこ試料として国産主要 10 銘柄を試験に供した。たばこ煙の捕集は、Borgwaldt LM1 喫煙装置 (独 Borgwaldt KC 社製) を用いた。主流煙の捕集法は、ISO 法に準じた。

4.2 TSNA の抽出

たばこ主流煙を捕集したフィルターを三角コルベンに入れ、TSNAs-d 溶液を添加した後、100 mM 酢酸アンモニウム溶液を 40 mL 加え、振盪抽出を行った。振盪後、抽出液 10 mL を固相抽出カラムに供した。抽出液を 10 mL 導入し、10%メタノール 5 mL で洗浄後、70%メタノール 5 mL で溶出した。溶出液は窒素気流下にて溶媒留去し、1 mL 以下とした。溶媒留去後、100 mM 酢酸アンモニウム溶液で 1 mL 容メスフラスコに定容した。この溶液を濾過フィルター (0.2 μ m、13 mm、Millipore 社製) で濾過した後、高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) に供した。

5. 煙草から発生するアクロレイン等 α, β -不飽和アルデヒドの分析

5.1 装置

HPLC は、送液ポンプを 2 台、フォトダイオードアレイ検出器を使用した。分離カラムは Ascentis Express RP-Amide (2.7 μ m particle size、150 mm \times 4.6 mm i.d.、Supelco 社製) を用いた。自動喫煙装置は Borgwaldt KC 社製を使用し、ISO 法に準じた。

5.2 DNPH-cartridge および HQ-cartridge の作製

DNPH-cartridge : 高濃度測定用と低濃度測定用の二種類の DNPH-cartridge を作製した。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩を、低濃度測定用の場合は 0.25 g、高濃度測定用の場合は 1 g をアセトニトリル 100 mL に溶かす。この溶液を洗浄シリカに添加した後、ロータリーエバポレーターでアセトニトリルを留去した。この DNPH-silica をレゾリアンチューブに充填して DNPH-cartridge とした。

HQ-cartridge : ハイドロキノン を 0.05 g 秤量し 50 mL のアセトニトリルに溶かす。この溶液を上記と同様の手法で作製し、この HQ-silica をレゾリアンチューブに充填して HQ-cartridge とした。

5.3 主流煙および空気試料の捕集

DNPH-cartridge の前段に HQ-cartridge を接続し HQ-DNPH-cartridge を作製し、自動喫煙装置に接続した。試料煙草を自動喫煙装置に取り付け、着火した後、直ちに、たばこ主流煙の測定を開始した。空気試料の測定の際には、HQ-cartridge 側から空気を 0.1-1000 mL/min の流速で一定時間吸引した。捕集を終えた HQ-DNPH-cartridge は DNPH-cartridge 側から、1%のリン酸を含むアセトニトリル溶液 8 mL で溶出する。10 分間放置した後、エタノールを 2 mL 添加し、HPLC で分析した。

6. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原性

6.1 たばこ試料

2006 年度国内販売実績上位国産 10 銘柄を用いた。同一銘柄 3 ロットを測定するため、各銘柄とも少なくとも東京地区 3 箇所で購入した。

6.2 喫煙装置によるたばこ煙の捕集

たばこ煙の捕集には、魚尾状煙突を備えた ISO 対応型の Borgwaldt LM1 喫煙装置 (独 Borgwaldt KC 社製) を用いた。発生させた副流煙のうち、ガラス繊維ろ紙に捕集した総粒子状物質 (TPM ; 粗タール) を変異原性試験試料とした。捕集法は、ISO 法と HCI 法で実施した。

6.3 抽出

変異原性試験用試料は、TPM 秤量後、DMSO を用いて室温で 20 分間静かに振盪抽出を行った。

6.4 変異原性試験

変異原性試験は、プレインキュベーション法により試験した。菌株はサルモネラ TA100、TA98 及び YG1024 の 3 種類を用い、S9mix による代謝活性化を行った場合と行わなかった場合の両条件下で実施した。

7. 地域における受動喫煙曝露の実態に関する検討

国内複数地域において、1) 調査票、2) バイオマーカー (尿中コチニン) を用いて、特に小児を対象として受動喫煙曝露の状況を検討した。

具体例として、神奈川県においては、保健福祉事務所を経由して、市町村の母子保健事業 (健診) を活用した質問票と尿中コチニン測定による調査協力を依頼し、4 市町より協力を得た。3 歳児 (地域によっては 3 歳 6 か月児 : 以下「3 歳児」とする) 健診の残余尿検体を用い尿中コチニン測定を行った。

受動喫煙曝露について、下記により判断した。

- 1) 当該キットによる尿中コチニンの検出限界 (0.12 ng/mL)
- 2) 暫定的に設定したカットオフ値 (5 ng/mg creatinine)

集計は、背景・趣旨を書面で説明し、質問票回収のあったものを対象とした。

なお本研究は、それぞれの地域で、書面での説明と同意をもって実行する疫学研究である。研究は、公的な競争的研究資金によって行われ、各地域で実施する部分に関して、適宜倫理委員会において審査が行なわれ承認を得た。

C. 研究結果

1. 日本人喫煙者、非喫煙者の酸化ストレスマーカー測定法の改良及び喫煙行動との関連性の解明

尿中には、無数の測定検出器の電極と反応する化合物が含まれている。そこで、HPLC-ECDの移動相に0.05% Cyclopentyl Methyl Ether (CPME)を添加することにより、8-OHdGの分離向上を図った。

得られた喫煙者98名の尿試料について8-OHdGの測定を行ったところ、平均値が 4.85 ± 2.54 ng/mg creatinineであった。一方、非喫煙者47名の尿中8-OHdG濃度平均値は、 3.58 ± 1.90 ng/mg creatinineであった。喫煙者と非喫煙者の尿中8-OHdG濃度の有意確率は、 $p = 0.03$ であった。たばこのパッケージ表示ニコチン量から、喫煙者をUltra low、Low、Medium、Highの4群に分け分析した結果、表示ニコチン量と尿中8-OHdG濃度は無関係であることが確認された。さらにアジア太平洋たばこ研究で得られた結果をもとに解析を行ったところ、尿中8-OHdG濃度は、有意確率 $p < 0.001$ で1日あたりの喫煙本数と正の相関($r = 0.331$)を示した。また、有意確率 $p = 0.005$ でブリンクマン指数(喫煙指数)と正の相関($r = 0.280$)を示した。さらに、有意確率 $p < 0.001$ で1日あたりの総吸煙量と正の相関($r = 0.384$)を示した。

2. 尿中1-Hydroxypyreneの測定法の改良および喫煙・非喫煙者の尿試料への適用

先行研究で汎用されていた1-OHPの励起波長242 nmと今回評価を行った347 nmのそれを比較した。その結果、励起波長を242 nmとした場合には多くのピークをもつ複雑なクロマトグラムとなったが、励起波長を347 nmとするとピークが少なくなり1-OHPのピークを含む良好なクロマトグラムが得られた。この条件で1-OHPの標準溶液を測定したところ検出下限値は0.02 ng/mL ($S/N = 5$)、定量下限値は0.05 ng/mLとなり高い検出感度が得られた。

次に、ブルーレーヨン及び固相抽出法の検討を実施した。その結果、ブルーレーヨン抽出では平均で73%と比較的良好な回収率が得られたが、固

相抽出では更に高い回収率95.7%が得られ、この回収率から求めた変動係数も2.7%となり極めて良好であった。本固相抽出法を用いて非喫煙者10名及び喫煙者10名の尿試料を測定した。得られた結果から、非喫煙者の尿中1-OHP濃度と喫煙者のそれらとの差が認められ、喫煙者尿の1-OHP濃度は $0.07 - 0.51$ $\mu\text{g/g creatinine}$ (平均値: 0.21 $\mu\text{g/g creatinine}$)となり、非喫煙者の $0.04 - 0.24$ $\mu\text{g/g creatinine}$ (平均値: 0.09 $\mu\text{g/g creatinine}$)よりも2倍程度高い値となった。さらに、1日のたばこ喫煙本数と1-OHP濃度との直線回帰を行ったところ、相関係数 $r = 0.664$ と良好な値が得られた。

3. 0.01、0.05 mg ニコチンたばこを喫煙した喫煙者の曝露量推計

ISO法に準拠した捕集サンプルでは、タール、ニコチン量共にほぼパッケージ表示と同じ値であった。一方、HCl法により捕集を行ったサンプルでは、0.01、0.05、0.1、1 mg ニコチンたばこのタール量は、それぞれの平均値が、12.84、12.94、14.20、24.98 mg/cig.であった。また、ニコチン量についても1.03、1.09、1.14、2.01 mg/cig.であり、パッケージ表示よりも高い値を示した。一酸化炭素(CO)については、それぞれ24.40、24.76、23.7、23.4 mg/cig.であり、COに関しては、パッケージ表示から考えられる差は無く、測定結果はほぼ一定となった。

主流煙のPAHは、ISO法による捕集では超低ニコチン・タールたばこの、The One 0.5以外のたばこでは検出されなかった。一方、HCl条件で捕集した試料は、超低ニコチン・タールたばこであってもPAH類の定量が可能であった。また、その濃度は、パッケージ表示から類推される比率とは異なり、濃度差はほとんど認められなかった。

たばこ試料の変異原性は、銘柄に関わらずフレームシフト型の突然変異を検出する菌株(TA98とYG1024)に対して認められた。特に、YG1024のS9mix添加条件下で強い活性を示した。HCl条件で捕集された韓国産たばこ(タール表示量; 0.1、0.5 mg)の変異原活性平均値が、YG1024株の+S9条件下で30,000、27,800 revertants/cig.、また日本産たばこ(タール表示; 1、10 mg)の同値が、

66,600 と 109,900 revertants/cig. であり、ISO 法で捕集したたばこ試料の変異原性に比べて、1.9–62.8 倍と高い値を示した。一方、S9mix 無添加条件下 (–S9) では同様の傾向は認められなかった。

4. たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン(TSNA)測定法の確立及び日本産たばこでの適用

固相抽出時における洗浄及び溶出条件の検討を行なった。測定結果から、メタノール濃度が 5–20 %では TSNA、TSNA-*d* は溶出しなかったが、30%で NNK、NNN と NNK-*d*₃ と NNN-*d*₄ の一部が溶出し、50–70%では TSNAs、TSNAs-*d* の全てが溶出した。また、TSNA、TSNA-*d* が溶出したメタノール濃度 50 及び 70%における回収率はそれぞれ 102.0–112.8%、99.8–106.8%であり、ともに高い回収率を示した。上記の結果から、10%メタノールを洗浄液とし、70%メタノールを溶出液とした。次に、抽出液の試料導入量を評価したところ、5–20 mL の範囲内で行なうことが望ましいと考えられ、また固相抽出時間を考慮した場合、導入液量は 10 mL で行なうこととした。

確立した測定方法を用いて、国産銘柄 10 銘柄の測定を行った。なお、LC/MS/MS による TSNAs の検出下限は、0.5 ng/mL であり、定量下限は、2 ng/mL であった。日本産たばこ主流煙の範囲は、NNN が 6.7–49.4 ng/cig.、NNK が 5.6–31.4 ng/cig.、NAT が 11.9–53.8 ng/cig.、最後に NAB が 2.5–16.7 ng/cig. であった。

5. 煙草から発生するアクロレイン等 α, β -不飽和アルデヒドの分析

アクロレイン捕集時の分解は DNPH-cartridge 中で起こる。そこで、アクロレインを DNPH と隔離して捕集すれば分解を防げる。まず、アクロレインの重合や分解を防ぐため、ラジカル捕捉剤であるヒドロキノンシリカゲルに含浸させた HQ-silica を充填した HQ-cartridge を作製し、アクロレイン捕集管とした。

HQ-cartridge と DNPH-cartridge を直列に接続した 2 連カートリッジ HQ-DNPH-cartridge に、HQ-cartridge 側から 20 ppm のアクロレイン標準ガ

スを 100 mL/min の流速で 10 分間吸引した後、各種操作を行い、HPLC で分析を行った。その結果、ACR-D の付加物は検出されず、8 時間以上 ACR-D は一定の値を示した。

捕集を終えた HQ-DNPH cartridge を溶出する時、HQ-cartridge に吸着したアクロレインは、連結した DNPH-cartridge の DNPH と一緒に溶出されるため、溶出液中で誘導体化反応が起こる。リン酸を添加すると、濃度の増加に伴いアクロレインの誘導体化速度は速くなる。最も効果的なリン酸添加量は 1%であり、5 分で反応は完了した。

しかし、1%のリン酸を含む溶出液中では ACR-D が分解しやすい。そこで、分解を阻止する方法を検討した。溶液中における ACR-D の分解は、エタノールを添加することで抑制することが出来た。一般に、エタノールのような非プロトン性の極性溶媒中では、付加反応が起こりにくいため、分解を抑制できたことが考えられる。エタノールの添加により溶出液が希釈されることを考慮すると、エタノールの添加量は 20%程度が適当である。確立したアクロレイン測定法をたばこ主流煙及び電子たばこに適用し測定を行った。詳細は、考察に後述する。

6. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原性

たばこ主流煙の変異原性が主に TA98 及び YG1024、S9mix 添加条件下で認められるのに対し、副流煙は試験を実施した 3 菌株に対して、S9mix 添加の有無にかかわらず、良好な用量–反応関係を示した。さらにたばこ副流煙は、試験に供した全 60 試料で変異原性が認められた。特に、YG1024 株では、S9mix 添加の有無にかかわらず、すべての銘柄、捕集条件、製品ロットで明瞭な変異原性陽性であった。この YG1024 の親株で、同じくフレームシフト型の突然変異を検出する TA98 株に対しても、S9mix 添加条件下では 60 試料すべて明瞭な変異原性陽性、S9mix 無添加条件下では 60 試料中 59 試料が変異原性陽性、1 試料のみ擬陽性であった。一方、塩基対置換型の突然変異を検出する TA100 株に対しては、S9mix 無添加条件下では被験 60 試料中、陽性 51 例、擬陽性 9 例であった。

また S9mix 添加条件下では、陽性 56 例、擬陽性 4 例であった。陰性と判断されたものは一例もなかった。60 試料中最も高い活性を示したものは銘柄 H/製品ロット II/ISO 条件の試料であった (YG1024+S9 で 249,000 revertants/cig.)。

7. 地域における受動喫煙曝露の実態に関する検討

神奈川県対象 4 市町の 3 歳または 3 歳半の児の健診の機会を利用し、質問票及び尿中コチニン測定のためのろ紙を回収した。質問票、コチニン測定のある 927 件を解析対象とした。

児の性別は、男児 51%、女児 49%、親の年齢 (±標準偏差) は、質問票の回答者である母親は 33 (±6 歳)、父親 36 歳 (±6 歳) であった。父母の喫煙状況については、父のみ喫煙が 29%、母のみ喫煙が 4%、父母喫煙が 10%、父母非喫煙が 57% であった。よって、父の喫煙は 39%、母の喫煙は 14% となる

- 1) 当該キットによる尿中コチニンの検出限界 (0.12 ng/mL) 以上の検体は、481 件 (51.9%) であった。
- 2) 暫定的に設定したカットオフ値 (5 ng/mg creatinine) 以上の検体は、269 件 (29.0%) であった。

次に、父母の喫煙状況と尿中コチニン量についての中央値は、父母非喫煙では検出限界以下が半数以上を占め、父のみ喫煙では 3.07 ng/mg creatinine、母のみ喫煙では、12.34 ng/mg creatinine、両親喫煙では 16.2 ng/mg creatinine であった。

D. 考察

1. 日本人喫煙者、非喫煙者の酸化ストレスマーカー測定法の改良及び喫煙行動との関連性の解明

本研究で得られた非喫煙者・喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度は、先行研究と近い結果が得られた。次に、日本人喫煙者における尿中 8-OHdG 濃度と各種要因との単回帰分析を行った結果、関係性が認められた因子は喫煙本数、ブリンクマン指数と総吸煙量の 3 つであった。なかでも総吸煙量が、高い相関 ($r = 0.384$) であった。また、パッケージに表示されたニコチン量との関係性は認められなかった。このことから、喫煙者の尿中 8-OHdG 量は、パッケージに表示されるタールおよびニコチン量ではなく、喫煙本数を中心とした因子に影響を受けると考えられる。喫煙者を Ultra low/Low たばこ喫煙者と Medium/High たばこ喫煙者の 2 つのグループに分けて単回帰分析を行った。その結果、Ultra low/Low たばこ喫煙者において喫煙因子との関連が認められた。一方で、Medium/High たばこ喫煙者の尿中 8-OHdG は、どの因子とも関連性が認められていない。喫煙本数において有意差が $p = 0.054$ という結果であったことから考えると総吸煙量と関連性が認められなかった理由として、Medium/High たばこ喫煙者は吸煙量が低い人数が多く、この測定結果の精度が低いため、有意差が認められなかった可能性も考えられる。さらに、尿中 8-OHdG 濃度と喫煙の曝露因子である唾液中コチニンおよび呼気中 CO との関連性は認められていない。このことから、たばこ主流煙に含まれる、酸化ストレスの発生成成分であるラジカル/ガス成分/間接的にラジカルを発生させる可能性のある化合物等の更なる詳細な調査研究が望まれる。

2. 尿中 1-Hydroxypyrene の測定法の改良および喫煙・非喫煙者の尿試料への適用

これまでの 1-OHP 分析法の検討では、標準溶液では励起波長 242 nm が最も検出感度が高くなることから同波長が尿試料でも採用されてきた。しかしながら今回の検討のように尿の実試料の測定では夾雑物のピークとの重なりが多いため低濃度

の 1-OHP のピーク検出に難点を伴っていたと思われる。今回の検討ではこの励起波長を長波長にシフト (347 nm) したところ、明瞭なピークが検出でき 1-OHP の検出能を上げることが可能となった。今回検討したオクタデシルシリカ系の固相抽出では、試料尿量が 5 mL 程度となりブルーレーヨンを用いる手法の約 1/5 量に削減可能となった。また、抽出時間も 1 時間程度と短く、夾雑物の洗浄では物性の差を利用して、50%メタノールで簡易に除去可能となった。各 10 名の喫煙者・非喫煙者の尿試料を対象としてパイロット調査した結果、1-OHP 濃度の差異及び喫煙本数との関連も示唆された。

今後、尿中の複数の PAH 代謝物の測定や他のたばこ喫煙マーカーとの関連などについて検討していく予定である。

3. 0.01、0.05 mg ニコチンたばこを喫煙した喫煙者の曝露量推計

今回測定を行った韓国産超低タールたばこの喫煙者は、代償性補償喫煙行動を起こすと考えられる。先行研究では、ニコチン表示が 0.6 mg/cig.未満たばこの喫煙者が、1 回の吸煙量が 58.4 mL で HCl 法の喫煙量に近いことを報告している。この結果を踏まえるとさらにニコチン表示の低い今回のたばこ銘柄は、喫煙者が HCl 法に近い喫煙を行うことが推測される。そこで、本研究における HCl 条件で捕集した主流煙中の各測定結果は、パッケージ表示が 0.1 mg たばこの変異原活性平均値は 30,000 revertants/cig.であり、0.5 mg たばこの 27,800 revertants/cig.と同程度の活性であった。さらに、1、10 mg たばこは、66,600、109,900 revertants/cig.となり、0.1 mg たばこの活性と比較するとそれぞれ 2.2、3.6 倍となった。同様に 1、10 mg たばこの変異原活性平均値を 0.5 mg たばこの同値と比較したところ、2.4、4.0 倍となった。このことから変異原性試験の結果では、パッケージ表示から考えられる曝露量の差は、認められなかった。次に、タール、ニコチン及び PAH のうち Pyrene については、HCl 条件下でパッケージ表示タール量が 10 倍異なる 0.1 と 1 mg たばこであっても同程度の濃度であり、さらに 100 倍異なる 0.1

と 10 mg たばこであっても 2 倍以下の差であった。一方、CO の測定結果は全たばこ試料とも、20 mg/cig.強とほぼ同値になり、パッケージ表示量に依存しない結果となった。本研究の測定結果は、パッケージ表示量が低いたばこを喫煙することが必ずしも生体への影響を低減することに繋がらないことを示唆している。特に、パッケージ表示がタール 1 mg、ニコチン 0.1 mg 以下のたばこは、代償性喫煙によって曝露量の変動が小さくになると考えられる。

今回の研究において、測定対象成分が主にタールに含まれる粒子状成分であり、ガス成分としては CO のみであった。この CO 測定結果は曝露量がパッケージ表示に依存しなかった。このことを踏まえ、今後はガス成分で発がん性のあるとされているホルムアルデヒドをはじめとするアルデヒド類を中心に測定を実施する計画である。

4. たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン (TSNA) 測定法の確立及び日本産たばこでの適用

本研究で確立した手法を用いて国産たばこを測定した結果と過去に旧厚生省が実施した測定結果と比較したところ、同銘柄であっても TSNA 量は、1/3 から 1/2 に低減されていた。この傾向は海外でも同様な報告があり、この低減化された結果をもとに、今後、喫煙者の曝露評価を行う必要があると考えられる。たばこ銘柄をタール・ニコチンのパッケージ表示により Ultra low、Low、Medium、High の 4 つの範囲に区分けを行い、本研究で得られた測定結果をもとに発がん性のある NNN と NNK の含有量を合計し、測定結果の平均化を行った。最も高い濃度であったのは、タール・ニコチン量 Medium 範囲における 75.2 ng/cig. であった。さらに Low および High の測定結果は、ほぼ同濃度であった。以上の結果より、TSNA 濃度は、たばこパッケージに表示されているタール・ニコチン量から推測される曝露量とは異なる傾向が認められた。Ultra low の測定結果は、他の範囲と比較すると低い濃度であった。しかし、Ultra low のたばこ喫煙者は、先行研究によると代償性補償喫煙を行う。そのためたばこ 1 本あたりの吸煙量が

増加し、実際の曝露量は高くなると考えられる。今後は、カナダ保健省が提案する喫煙法でたばこ主流煙を捕集し、TSNAsの測定を継続する必要があると考えている。

5. 煙草から発生するアクロレイン等 α, β -不飽和アルデヒドの分析

自動喫煙装置にHQ-DNPH-cartridgeを取り付け、ISO法に従って、主流煙を採取した。この時、DNPH-cartridgeは高濃度測定用を使用した。捕集後、グラジェントモードのHPLCで分析した。

3銘柄の煙草（マルボロライト、マルボロ、マイルドセブン）の主流煙から発生したカルボニル化合物の測定を行った。また、捕集後のHQ-DNPH-cartridgeを分割し、HQ-cartridgeには未使用のDNPH-cartridgeを接続して、個別に溶出することによって、各捕集管にトラップされた物質を測定した。その結果、アセトアルデヒドを除く全てのカルボニル化合物はHQ-cartridgeに吸着(>99%)し、DNPH-cartridgeには検出されなかった。そして、アセトアルデヒドは89%がHQ-cartridgeに吸着したが、11%はHQ-cartridgeを通過してDNPH-cartridgeにトラップされていることが明らかになった。

次に電子たばこについて測定を行った。電子たばこは、香港に所在する北京SBT如煙科技發展有限公司が2003年に世界で初めて開発したとされ、現在、世界各国に普及している。専用カートリッジ内の液体を電氣的に霧状化し、その微粒子を吸引することでたばこの代替とする製品である。HQ-DNPH cartridgeに電子たばこを取り付け、500 mL/minで10分間吸引を行った。なお、HQ-DNPH cartridgeのDNPH-cartridgeは低濃度測定用を使用した。比較として、従来のDNPH-cartridge単一カートリッジでも同時に捕集を行った。電子たばこから発生するガスには、アクロレインを含む様々なカルボニル化合物が検出された。HQ-DNPHカートリッジを用いた場合は、大きなACR-Dのピークが検出されたが、従来のDNPHカートリッジではACR-Dのピークがほとんど消滅した。アクロレインの測定値を除いて、HQ-DNPH法とDNPH法はよく一致している。しかし、DNPH法で測定したア

クロレインの値はHQ-DNPH法の1/30程度まで減少してしまうので、非常に大きな測定過誤を引き起こしてしまう。

今後は、確立した手法を用いて、国産たばこ及び電子たばこに適用して評価を進める計画である。

6. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙DMSO抽出物の変異原性

たばこ副流煙は、試験に供した全60試料に変異原性が認められた。特に、YG1024株(±S9mix)、TA98+S9mixの3条件下では、銘柄、捕集条件、製品ロットにかかわらず、試験に供した60試料すべて明瞭な変異原性陽性であった。TA98及びYG1024に対してはすべてS9mix添加条件下の方が高い(数倍-10数倍)活性を示した。平成20年度に実施したたばこ主流煙の変異原性試験結果では、主にTA98及びYG1024に対して、S9mix添加条件下で変異原性が認められ、S9mix無添加条件下あるいはTA100(±S9mix)では陰性例が多く認められた。これらの結果から、副流煙には主流煙よりも多種多様な変異原性物質が発生していることや、菌株(特にTA100株)によっては、銘柄のみならずロットによる差が認められることが示唆された。ISO条件、HCl条件の国産たばこ主要10銘柄の主流煙および副流煙のDMSO抽出物の変異原比活性(YG1024株S9mix添加条件下)は、ISO条件で主流煙の変異原性はパッケージに表示されたタール量にほぼ比例しているが、副流煙では低タール表示のたばことレギュラータイプのたばこに大差がなく、パッケージに表示されたタール量にかかわらず、いずれの銘柄も強い変異原性が認められた。HCl条件の変異原性は、主流煙も副流煙もパッケージに表示されたタール量との比例関係は認められなかった。たばこ副流煙の変異原性については、これまでもいくつかの報告がある。いずれも主流煙と比較して変異原性が高いことが報告されている。また、たばこ煙の有害物質についても、主流煙と比較して、副流煙の方が多量であることが報告されている。本研究結果においても、副流煙の変異原性は主流煙よりも高く、また多種多様な変異原性物質が発生していることが示

唆された。前述のように、今回はガラス繊維ろ紙に捕集されたTPMのみを対象として変異原性試験を実施したので、魚尾状煙突に付着した成分も合わせると、その毒性はさらに増すことが予想される。これについては、魚尾状煙突に付着した成分の試料調製法も含めて、今後検討していく必要があると考えている。また、吸煙の仕方によって変異原性が左右されることも示唆されており、変異原性に及ぼす喫煙パラメータの影響についても、より詳細な検討が必要であると思われる。さらに実際のヒトへの変異原性物質の曝露実態を明らかにするために、バイオマーカー（尿中変異原など）を指標とした検討も進めていくことが重要であると考えられる。

7. 地域における受動喫煙曝露の実態に関する検討

本研究によって地域での小児における受動喫煙曝露が広範である実態が明らかとなった。地域における小児の受動喫煙曝露状況は、質問票調査により間接的に把握されることが多いが、バイオマーカーを用いて評価することができた。

地域在住の「3歳児」において、半数以上から本来は検出されないはずの尿中にコチニンが検出され、明らかな受動喫煙曝露についても4人に1人以上において認められた。背景として、地域での小児の受動喫煙曝露についての意識が不十分であることが懸念される。受動喫煙についての普及啓発があっても一層の対策が求められることが明らかとなった。母子保健にまつわる機会を通じて、改めて受動喫煙についての周知を通じて、家族はじめ地域関係者、広く地域の意識の向上が必要と考えられた。

今後、他地域の受動喫煙曝露状況を把握しつつ比較するとともに、明確な受動喫煙ありと判断できる水準の検討や、関連する要因の検討などを進めていくことに意義があると考えられた。

さらに、母子保健にまつわる機会を通じ、家族や地域に普及啓発を行う上で、効果的な方法の模索も必要と考えられた。

E. 結論

1. 日本人喫煙者、非喫煙者の酸化ストレスマーカー測定法の改良及び喫煙行動との関連性の解明

本研究は日本人喫煙者98名と非喫煙者47名の尿中8-OHdGの測定及び喫煙に関する因子との解析を行った。喫煙の有無による影響評価において、非喫煙者と喫煙者の尿中8-OHdG濃度は、 3.58 ± 1.90 、 4.85 ± 2.54 ng/mg creatinineであり、喫煙者の濃度が有意に高いことが認められた。この結果は、従来のELISA法と比較して精度の高い機器分析法を用いたことによる成果だと考えられる。次に、日本人喫煙者における尿中8-OHdG濃度と各種要因との単回帰分析を行った。その結果、関係性が認められた因子は喫煙本数、ブリンクマン指数と総吸煙量の3つであった。一方、パッケージに表示されたニコチン量との関係性は認められなかった。日本人喫煙者の8-OHdG濃度は、たばこのタール・ニコチン表示量に関連することなく、1日の総吸煙量に関連性が認められた。特に、この傾向は、0.6 mg/cig未満のニコチンたばこ喫煙者に確認された。一方、唾液コチニン量、呼気中CO濃度との関連性は認められなかった。

一般的に、8-OHdGは酸化ストレスマーカーとされることが多い。本研究の結果からは、尿中8-OHdGが喫煙の影響を評価するのに有効な間接的なマーカーであることが示唆された。

2. 尿中1-Hydroxypyreneの測定法の改良および喫煙・非喫煙者の尿試料への適用

本研究では有機物の不完全燃焼に伴って発生するPAHの尿中曝露マーカー1-Hydroxypyrene(1-OHP)を取り上げ、そのHPLC分析法について蛍光検出(励起)波長と前処理抽出法について検討した。その結果、従来の励起波長242 nmを347 nmとすると良好なクロマトグラムが得られること、ブルーレーヨン抽出から固相抽出に変更すると試料量の低減(1/5)や抽出時間の節約が可能となること、測定の変動係数も良好(2.7%)となることなどを認めた。この固相抽出法-HPLC分析法を非喫煙者10名及び喫煙者10名の尿試料に適用した結果、喫煙者の1-OHP濃度は0.07-

0.51 µg/g creatinine (平均値 : 0.21 µg/g creatinine) となり、非喫煙者の濃度 0.04–0.24 µg/g creatinine (平均値 : 0.09 µg/g creatinine) よりも 2 倍程度高い値を示すことや喫煙本数と尿中 1-OHP 濃度間の良好な相関 ($r = 0.664$) が認められた。このことから、たばこ喫煙などの PAH の曝露実態の基礎資料作成に本固相抽出法—HPLC 分析法が有効であると考えられる。

3. 0.01、0.05 mg ニコチンたばこを喫煙した喫煙者の曝露量推計

韓国産低ニコチン・低タールたばこの主流煙の化学成分の評価を行い、変異原性試験も合わせて実施した。また、低ニコチン・低タールたばこ喫煙者は、喫煙者が代償性補償喫煙を行い、HCl 法に近い喫煙になることから、喫煙法も ISO 法と HCl 法の両手法で主流煙の捕集を行った。現在、日本国内で販売されているたばこの最もタール・ニコチン表示量が低いものは、1、0.1 mg である。このたばこ今回測定を実施したタール・ニコチン表示量が、それぞれ 0.01、0.1 mg 及び 0.05、0.5 mg たばこの曝露量は、変異原性活性以外のタール、ニコチン、Pyrene、CO において差は認められなかった。さらには、10 mg タール表示たばこも CO については差が無かった。

4. たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン(TSNA)測定法の確立及び日本産たばこでの適用

日本銘柄たばこ主流煙 TSNA を機械喫煙にて ISO 法により捕集・測定し、数少ないデータを開示した。TSNAs の前処理では、新たな固相抽出法を確立した。この手法を実施することにより、日本産たばこ主流煙中 TSNAs を測定した。過去に旧厚生省が実施した測定結果と比較したところ、同銘柄であっても TSNAs 量は、1/3 から 1/2 に低減されていた。この結果は、たばこの測定法に起因するものではないと考えている。今後、喫煙者の TSNAs を曝露評価する場合、低減化されていることを踏まえて慎重に実施する必要がある。また、日本産のたばこは、同銘柄であってもその成分量に変化していることを示唆している。

今後は、カナダ保健省が提案する喫煙法でたばこ主流煙を捕集し、TSNA の測定を継続する必要があると考えている。これにより、今後、低タールたばこ喫煙者の曝露評価が推定できると考えられる。

5. 煙草から発生するアクロレイン等 α, β -不飽和アルデヒドの分析

本研究では、アクロレイン等 α, β -不飽和アルデヒドを精度よく分析する方法を開発した。まず、DNPH カートリッジの前段にアクロレイン吸着用のカートリッジを取り付け、DNPH と隔離してアクロレインの捕集を行うことを検討した。一段目のカートリッジには、アクロレインの重合を防ぐために重合禁止剤ヒドロキノロン (HQ) を含浸させたシリカを充填し、二段目のカートリッジにはカルボニル化合物の誘導体化試薬 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を含浸させたシリカゲルを充填した。空気試料や煙草煙は最初に HQ を含浸させたシリカゲル (HQ-silica) を通過してから、二段目の DNPH を含浸させたシリカゲル (DNPH-silica) を通過する。空気試料や煙草煙中のアクロレイン等 α, β -不飽和アルデヒドは一段目の HQ-silica に完全に捕捉される。一方、アセトアルデヒドの一部は HQ-silica を通過するが二段目の DNPH-silica に完全に捕捉される。溶出は DNPH-silica 側から行われる。溶出液中には HQ-silica に捕捉されたアクロレインを含むカルボニル化合物と未反応の DNPH が含まれ、誘導体化反応が開始する。煙草煙中の全てのカルボニル化合物は DNPH と反応し対応するヒドラゾン誘導体を生成する。これらのヒドラゾン誘導体は高速液体クロマトグラフィーで分析することが可能である。また、本研究で開発した HQ-DNPH 法は、アクロレインなどの α, β -不飽和アルデヒドばかりでなく、広範囲のカルボニル化合物も同時に分析できる。本法を用いて電子煙草から発生するカルボニル化合物を測定したところ、アセトアルデヒド 11 mg/m³、アクロレイン 9.3 mg/m³、ホルムアルデヒド 8.3 mg/m³、プロパナール 8.0 mg/m³、メチルグリオキサール 4.5 mg/m³、アセトン 2.9 mg/m³、ブタナール 1.5 mg/m³、グリオキサール 1.3

mg/m³等の有害な物質を発生していることが明らかになった。

6. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原性

主流煙の変異原性が主に TA98 及び YG1024 株 S9mix 添加条件下で認められたのに対し、副流煙は菌株・S9mix 添加の有無にかかわらず殆どすべてが変異原性陽性であった。また、最も高い活性を示した銘柄はマイルドセブンオリジナル (ISO 条件・YG1024+S9 で 249,000 revertants/cig.) で、殆どの試料で主流煙より副流煙の方が高い活性を示した。主流煙と副流煙の変異原性の相関は、ISO 条件では認められたが、実際のヒトの喫煙に近いとされる HCI 条件では認められず、これらの結果から、副流煙は主流煙よりも多種多様で強い変異原を有すること、副流煙の毒性は吸煙の仕方によって左右されることなどが示唆された。

7. 地域における受動喫煙曝露の実態に関する検討

地域における受動喫煙曝露の実態について、特に小児を対象とし、ニコチン代謝物等バイオマーカーを用いて定量的に把握すること、及び、その結果を地域にフィードバックすることで、地域での受動喫煙に対する意識の向上を図ることを目的とした調査を行った。

国内複数地域において、1) 調査票、2) バイオマーカー (尿または唾液) を用いて、特に小児を対象として受動喫煙曝露の状況を検討した。札幌市、熊谷市 (埼玉県)、神奈川県下 4 市町、においてそれぞれ調査を計画・実施した。神奈川県下 4 市町では、半数を超す児の尿からニコチンが検出された。この結果から地域での小児における受動喫煙曝露が広範である実態が明らかとなった。改めて受動喫煙についての周知を通じて、意識の向上が必要と考えられた。

F. 健康危機情報

FDA の電子たばこ分析結果によると、ニコチンを含有しないと表記された製品からも少量のニコチンが検出された。同時に、刺激性のあるジエチレングリコールと発がん性物質であるたばこ特異的ニトロソアミンも検出された。

情報源

FDA “FDA and Public Health Experts Warn About Electronic Cigarettes”

<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm173222.htm>

コメント

電子たばこは、さまざまな濃度のニコチン溶液をたばこに似せた本体に取り付け、純度が高く、熱した霧を作って肺へ吸収される。日本では、ニコチンを含有しないと表記のある電子たばこの販売がされている。今回の FDA の発表には、2つの危険性を含んでいる。1 つは、ニコチンを含有しないと表記された製品にもニコチンが検出されたことである。2 つめは、ジエチレングリコールと発がん性物質であるたばこ特異的ニトロソアミンも検出された。現在、日本で販売されている電子たばこは、安生性評価は行なわれておらず、無審査のまま市場で販売されている状況である。日本国内では、インターネット、大手量販店を通じて購入可能である。

G. 研究発表

1. 論文発表
各分担報告書に記載
2. 学会発表
各分担報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

内山茂久 気体分析用カルボニル化合物捕集管及び気体試料の分析方法 特願 2009-270849 2009年 11 月 27 日

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

アジア太平洋たばこ研究 日本人喫煙者、非喫煙者の酸化ストレスマーカー測定法の改良及び喫煙行動との関連性評価

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院
研究分担者 竹田真由 東北福祉大学
研究協力者 船渡忠男 東北福祉大学

研究要旨

本研究は、「より害の少ないたばこ」を定義づけるための基礎的な研究として、国際共同研究であるアジア太平洋たばこ研究の一環として実施した。本研究では、喫煙の影響によりラジカルが生成し、これにより生体内で酸化ストレスの指標物質である 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が増加すると仮説をたてた。まず、日本人喫煙者 98 名及び非喫煙者 47 名の尿中 8-OHdG を測定した。さらにアジア太平洋たばこ研究でこれまでに測定した日本人喫煙者の喫煙行動及びバイオマーカー（コチニン、一酸化炭素）との関係性を評価・検討した。非喫煙者と喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度は、 3.58 ± 1.90 、 4.85 ± 2.54 ng/mg Creatinine であり、喫煙者の濃度が有意に高いことが認められた。さらにたばこのパッケージ表示ニコチン量から、喫煙者を Ultra low、Low、Medium、High の 4 群に分け分析したところ、表示ニコチン量と尿中 8-OHdG 濃度は無関係であることが確認された。次に、日本人喫煙者における尿中 8-OHdG 濃度と各種要因との単回帰分析を行ったところ、関係性が認められた因子は喫煙本数 ($r=0.331$)、ブリンクマン指数 ($r=0.280$) と総吸煙量 ($r=0.384$) の 3 つであった。特に、この傾向は、0.6 mg/cig 未満のニコチンたばこ喫煙者に確認された。一方、唾液コチニン量、呼気中 CO 濃度との関連性は認められなかった。本研究の結果は、尿中 8-OHdG 濃度が吸煙量に依存し、喫煙の影響を評価するのに有効なマーカーであることが示唆された。

A. 研究目的

たばこ煙には、多くの有害化学物質が含まれていることが報告されており、その生体への影響が議論されている。そのため国内たばこの外箱には、たばこ 1 本当たりのニコチン、タール量が表示されている。この数値は、米国連邦取引委員会 (FTC) 及び国際標準化機構で定められた機械喫煙法 (ISO 法) と機器分析の測定結果から得られたものである。しかし、主流煙には、パッケージに表示されていない一酸化窒素、重金属をはじめとするラジカル生成因子が数多

く含まれている。また、主流煙中のタール成分の一部が、生体内でラジカルを生成させていると考えられている。喫煙による生体への影響は、たばこ煙中の有害物質のように直接的なものばかりでなく、ラジカル生成因子を原因とした間接的な影響に注目する必要がある。

また、近年、日本では低ニコチンたばこが販売されており、日本たばこ協会の統計によると低ニコチンたばこの喫煙者が増えている傾向が認められている。このたばこは ISO 法でのニコチン量などを低減させるためにフィルター

部分に多くの通気孔が設けられている。このように設計された低ニコチンたばこの喫煙者はたばこからの満足感を得るために ISO 法以上の吸い込み量、吸煙本数になると考えられる報告がされている [1]。そのため低ニコチンたばこの喫煙者の体内への曝露量は、たばこパッケージに表示されているニコチン量とタール量を反映してないと考えられ、低ニコチンたばこが害の少ないたばこであるとは言えない。これまで、喫煙者における実際の曝露量を定量的に評価する方法として、呼気や血液、尿、唾液中のバイオマーカーの測定が頻繁に用いられてきた。主なバイオマーカーとしては、呼気中一酸化炭素濃度 (CO) や血液、尿、唾液中のニコチン量及びコチニン量であった [2]。一方、喫煙を原因として生体内で発生したラジカルによる実態を評価することは可能であるが、その影響を評価することは難しい。そこで、本研究では喫煙によって生じたラジカルの生体への影響を酸化ストレスマーカーを用いて評価することを試みた。

生体内の酸化・抗酸化レベルは、活性酸素産生系とその消費系のバランスで規定され、通常はほぼ一定に保たれている。しかし喫煙以外にも薬物、放射線など、さまざまな要因でこのバランスが崩れ、酸化傾向に傾くことを酸化ストレス状態と呼ぶ。この酸化ストレス状態になることで、がん、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病になるリスクが高まると報告されている [3, 4]。酸化ストレスの指標物質 (酸化ストレスマーカー) の 1 つである 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) は細胞内において活性酸素種と DNA 内の deoxyguanosine (dG) の反応から生成される。この 8-OHdG は、その後化学修飾をうけることなく尿中へ排泄され、排泄後も尿中で安定している。この尿中 8-OHdG の定量が、生体内酸化ストレス状態の評価を可能とする。これまでの研究では ELISA 法 [5]、高速液体クロマトグラフィーカラムスイッチン

グ法 [6] による測定が多く報告されている。今回、固相抽出法を尿中 8-OHdG に対し実施し、得られた処理溶液を高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器 (HPLC-ECD) に供することで比較的簡便に測定可能となった。この手法の特徴は、固相抽出法により測定干渉物質を可能な限り除去し、8-OHdG の測定誤差を低減することを可能としている [7]。そこで本研究では、喫煙の影響によりラジカルが生成し、これにより生体内で酸化ストレスマーカーである 8-OHdG が増加すると仮説をたてた。

本研究班は、これまでに日本人喫煙者の喫煙行動を CReSSmicro 装置によって、喫煙量などの各種測定を行い喫煙行動様式の評価を行なった。さらにバイオマーカーとして同時に体内に吸い込んだニコチン、タール、ガス状物質の影響を評価するために、唾液中コチニン、呼気中一酸化炭素の測定も行なった。

本研究では、アジア太平洋たばこ研究 [8] の一環として、日本人喫煙者および非喫煙者の尿中 8-OHdG 測定を行ない、上述の他の各測定数値より得られた結果と合わせて喫煙と酸化ストレスの関係性を評価・検討した。

B. 研究方法

(1) 被験者

本研究の被験者は、アジア太平洋たばこ研究 [9] によって公募し、最終的に 101 名の喫煙者を得た。なお参加条件は、20 歳から 65 歳の常習喫煙者であり、心肺の疾病経歴が無く、国産主要 10 銘柄のたばこ (Table 1) を 3 ヶ月以上喫煙している者を対象とした。呼気中 CO 濃度測定は 101 名分、喫煙行動パターンの計測は 100 名分、唾液中コチニン量の測定は 94 名分、そして尿試料は、98 名分を得た (Table 2)。なお、喫煙習慣に関するアンケート、唾液の採取、唾液中コチニン量の測定、呼気中 CO 濃度の測定喫煙行動パターンの計測

および統計解析については、鈴木らと同様に行った[9]。さらに、喫煙者尿中 8-OHdG 量を比較するために非喫煙者の公募を行なったところ、最終的に 47 名の参加者を得た。なお、参加者の内訳は、アジア太平洋たばこ研究の参加者と同等の年代及び男女比率とした。本研究は、国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認 (NIPH-IBRA#06012 および#08014) を受けて行われた。

(2) クレアチニン測定

尿中クレアチニンの測定には、クレアチニン測定用キットである和光純薬製クレアチニン-テストワコー (Jaffé 法) を適用した。

(3) 尿中 8-OHdG の測定

尿中 8-OHdG の前処理には、タニタ製 8-OHdG 前処理キット (US-001) を使用した。なお、本測定原理は、2 種類の固相抽出用のカラム (逆相、陽イオン交換) の組み合わせで実施された。尿試料は、前処理キットの操作法に従って 8-OHdG 抽出を行い得られた試料溶液を HPLC-ECD に供し、8-OHdG の定量を行った。HPLC-ECD の分析条件は、以下の通りとした。A 液は 10mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に終濃度が 30 μ M EDTA、5%アセトニトリル、0.05% Cyclopentyl Methyl Ether (CPME) になるように調整し、また B 液は 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) に終濃度が 30 μ M EDTA、5%アセトニトリル 0.3% CPME になるように調製して、それぞれを移動相とした。送液のプログラムは、A 液 ; 0→17 min 100%、17→23 min 0%、23→65 min 100%、B 液 ; 0→17 min 0%、17→23 min 100%、23→65 min 0%とした。使用カラムは Sunrise C28 (4.6×250 mm、5 μ m、Chromanik Technologies 製)、カラム温度は 27°C、流速は 0.5 mL/min、試料注入量は 20 μ L に設定した。電気化学検出器には、ED-623B (GL サイエンス製) を使用した。

作用電極条件は、+550 mV vs Ag/AgCl に設定し測定を行なった。なお、1 試料の測定時間は 65 分であった。

(4) 統計解析

喫煙者と非喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度について一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。また、たばこパッケージ表示ニコチン量に従って Ultra low (0-0.1 mg/cig.)、Low (<0.1-<0.6 mg/cig.)、Medium (0.6-<1.0 mg/cig.)、High (= <1.0 mg/cig.) の 4 群に分けて[8, 9]、尿中 8-OHdG 濃度について一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Bonferroni 法を用いて多重比較を行った。さらに、尿中 8-OHdG 濃度と関係する因子については単回帰分析も行った。全ての統計解析は、統計解析ソフト SPSS 16.0J を用いて行った。

C. 研究結果

(1) 尿中 8-OHdG 分析条件の検討

尿中には、無数の測定検出器の電極と反応する化合物が含まれている。本研究の前処理では上記妨害物質の除去を固相抽出によって行なっているが、不十分な尿試料も存在する。そこで、移動相に CPME を添加することにより、8-OHdG の分離向上を検討した。その結果、終濃度 0.05% CPME が最適条件となった。ただしこの手法を採用することにより測定時間が 35→65 min に変更になった。しかしながら、8-OHdG の高い分離能と流速低下に伴う検出および定量感度の上昇が認められた。

(2) 喫煙及び非喫煙者の尿中 8-OHdG の測定

アジア太平洋たばこ研究において得られた喫煙者 98 名の尿試料について 8-OHdG の測定を行ったところ、平均値が 4.85 ± 2.54 ng/mg Creatinine であった (Fig. 1)。一方、非喫煙者 47 名の尿中 8-OHdG 濃度平均値は、 3.58 ± 1.90 ng/mg Creatinine であった (Fig. 1)。喫煙者と非喫煙者の尿中

8-OHdG 濃度の有意確率は、 $p = 0.03$ であった。たばこのパッケージ表示ニコチン量から、喫煙者を Ultra low、Low、Medium、High の 4 群 (Table 2) に分け分析した結果、表示ニコチン量と尿中 8-OHdG 濃度は無関係であることが確認された (Fig. 2)。以上から、喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度は非喫煙者と比較すると高く、喫煙銘柄には依存しないことが分かった。

(3) 各因子との相関関係

Table 3 は、喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度と各因子との単回帰分析の結果である。尿中 8-OHdG 濃度は、有意確率 $p < 0.001$ で一日あたりの喫煙本数と正の相関 ($r = 0.331$) を示した。また、有意確率 $p = 0.005$ でブリンクマン指数 (喫煙指数) と正の相関 ($r = 0.280$) を示した。さらに、有意確率 $p < 0.001$ で一日あたりの総吸煙量と正の相関 ($r = 0.384$) を示した。なお、年齢、BMI (body mass index)、唾液中コチニン濃度および呼気中 CO 濃度は、8-OHdG との関連性が認められなかった。次に、喫煙者を Table 1 で表記した Ultra low/Low たばこ喫煙者と Medium/High たばこ喫煙者の 2 つのグループに分けて単回帰分析を行った。その結果、Ultra low/Low たばこ喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度は、喫煙者全体の場合と同様の傾向を示した。つまり最も高い相関を示したのが、有意確率 $p < 0.001$ で一日あたりの総吸煙量 ($r = 0.567$) であった。なお、Medium/High たばこ喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度は、他の因子との関連性は認められなかった。

D. 考察

本研究で測定を行った酸化ストレスマーカー 8-OHdG は、生体内の活性酸素種的作用によって DNA より生成され尿中に排泄される安定な化合物である。そのため、喫煙による生体への影響を定量的に測定・評価することに適した化合物であるとも考えられる。しかし、喫煙以外の原因に

よっても生成されるため非喫煙者の尿中 8-OHdG 測定も加えて実施した。本研究の全参加者の尿中 8-OHdG 濃度は、 4.44 ± 2.42 ng/mg Creatinine であり、Nakano らが報告した日本人 2507 名の平均値 4.52 ± 1.86 ng/mg Creatinine [10] に近い値であった。次に、喫煙の有無による影響を評価したところ、非喫煙者と喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度は、 3.58 ± 1.90 、 4.85 ± 2.54 ng/mg Creatinine であり、喫煙者の濃度が有意に高いことが認められた。さらに先行研究と比較したところ、以下のような本研究と同様の測定結果が報告されていた。例えば Irie らは、カラムスイッチングを使用した HPLC-ECD 法によって尿中 8-OHdG の測定を実施し、喫煙者および非喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度が 3.48 および 4.38 ng/mg Creatinine であり、有意差を示した [11]。また Mizoue らは、喫煙者および非喫煙者の濃度は、 3.70 および 4.52 ng/mg Creatinine であると報告している [12]。

次に、日本人喫煙者における尿中 8-OHdG 濃度と各種要因との単回帰分析を行った結果、関係性が認められた因子は喫煙本数、ブリンクマン指数と総吸煙量の 3 つであった。なかでも総吸煙量が、高い相関 ($r = 0.384$) であった。また、パッケージに表示されたニコチン量との関係性は認められなかった。このことから、喫煙者の尿中 8-OHdG 量は、パッケージに表示されるタールおよびニコチン量ではなく、喫煙本数を中心とした因子に影響を受けると考えられる。最も相関係数が高い総吸煙量と尿中 8-OHdG 濃度の回帰直線を求めたのが Fig. 3 である。ここで回帰直線式は、 $y = 0.0001x + 3.2428$ であり、 $x = 0$ の場合が計算上では非喫煙者の数値となる。その結果は 3.24 ng/mg Creatinine となり、本研究で得られた非喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度 3.58 ± 1.90 ng/mg Creatinine と近い値となった。

喫煙者を Ultra low/Low たばこ喫煙者と Medium/High たばこ喫煙者の 2 つのグループに分