

表13 喫煙室の実測排気風量 (m<sup>3</sup>/min)

施設	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	B-4	C-1	C-2	C-3	Mean	SD
扉面積(m <sup>2</sup> )	1.70	1.70	1.70	1.65	1.81	2.07	1.81	1.26	1.11	1.24	1.61	0.30
風速(m/s)	0.25	0.20	0.20	0.28	0.26	0.20	0.20	0.35	0.25	0.30	0.25	0.05
排気風量	25.5	20.4	20.4	27.7	28.3	24.8	21.7	26.5	16.7	22.3	23.4	3.7

表14 非喫煙場所へのETS流入を防ぐための喫煙室の必要排気風量と実際の排気風量の比較

施設	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	B-4	C-1	C-2	C-3
扉の開口部面積 (m <sup>2</sup> )	1.70	1.70	1.70	1.65	1.81	2.07	1.81	1.26	1.11	1.24
必要排気風量 (m <sup>3</sup> /min)	20.4	20.4	20.4	19.8	21.7	32.1	21.7	15.1	13.4	14.9
仕様排気風量 (m <sup>3</sup> /min)	17.9	17.9	17.9	27.7	47.2	27.7	8.3	29.0	20.4	25.0
判定	×	×	×	○	○	×	×	○	○	○
実測排気風量 (m <sup>3</sup> /min)	25.5	20.4	20.4	27.7	28.3	24.8	21.7	26.5	16.7	22.3
判定	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○

注) 判定は、仕様排気風量又は実測排気風量 > 必要排気風量の場合に○とした

表15 ETS由来の浮遊粉じん濃度を基準値以下とするための喫煙室の必要排気風量

施設	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	B-4	C-1	C-2	C-3
実測排気風量 (m <sup>3</sup> /min)	25.5	20.4	20.4	27.7	28.3	24.8	21.7	26.5	16.7	22.3
1時間平均喫煙本数	6.3	1.8	5.7	9.5	21.7	10.3	11.0	17.3	12.5	12.3
必要排気風量 (m <sup>3</sup> /min)	7.0	2.0	6.3	10.6	24.1	11.5	12.2	19.3	13.9	13.7
判定	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1時間最大喫煙本数	9	4	17	16	29	17	19	30	19	18
必要排気風量 (m <sup>3</sup> /min)	10.0	4.4	18.9	17.8	32.2	18.9	21.1	33.3	21.1	20.0
判定	○	○	○	○	×	○	○	×	×	○

注) 判定は、実測排気風量 > 必要排気風量の場合に○とした

表16 喫煙室の最大喫煙許容人数と実際の喫煙者数の比較

施設	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	B-4	C-1	C-2	C-3
実測排気風量 (m <sup>3</sup> /min)	25.5	20.4	20.4	27.7	28.3	24.8	21.7	26.5	16.7	22.3
最大喫煙許容人数	1.9	1.5	1.5	2.1	2.1	1.9	1.6	2.0	1.3	1.7
1分間平均喫煙者数	0.4	0.1	0.7	0.8	1.9	0.6	0.7	1.1	0.8	0.7
判定	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1分間最大喫煙者数	4	2	7	5	8	6	4	9	5	5
判定	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

注) 判定は、1分間平均喫煙者数又は同最大喫煙者数 < 最大喫煙許容人数の場合に○とした

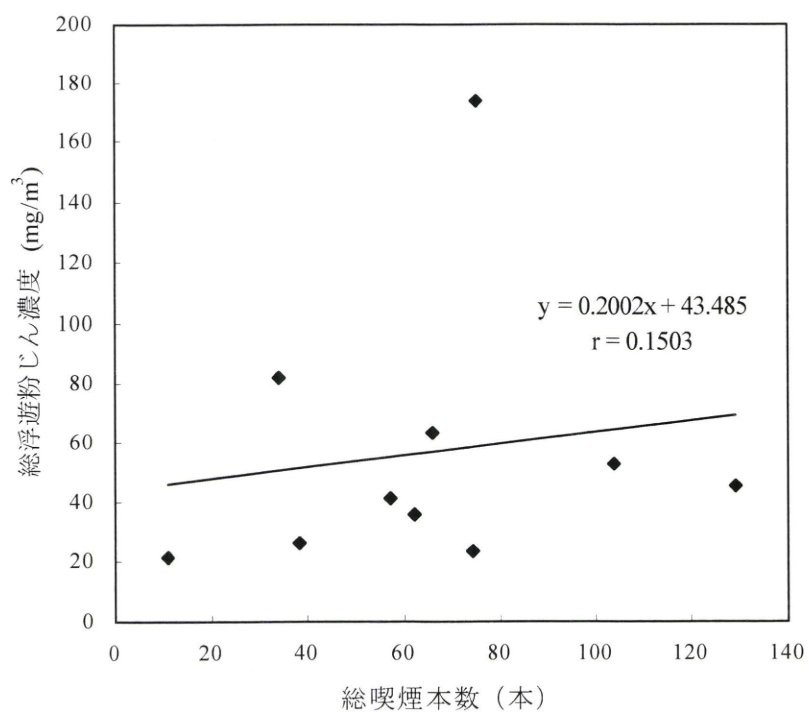


図1 喫煙本数と浮遊粉じん濃度の相関

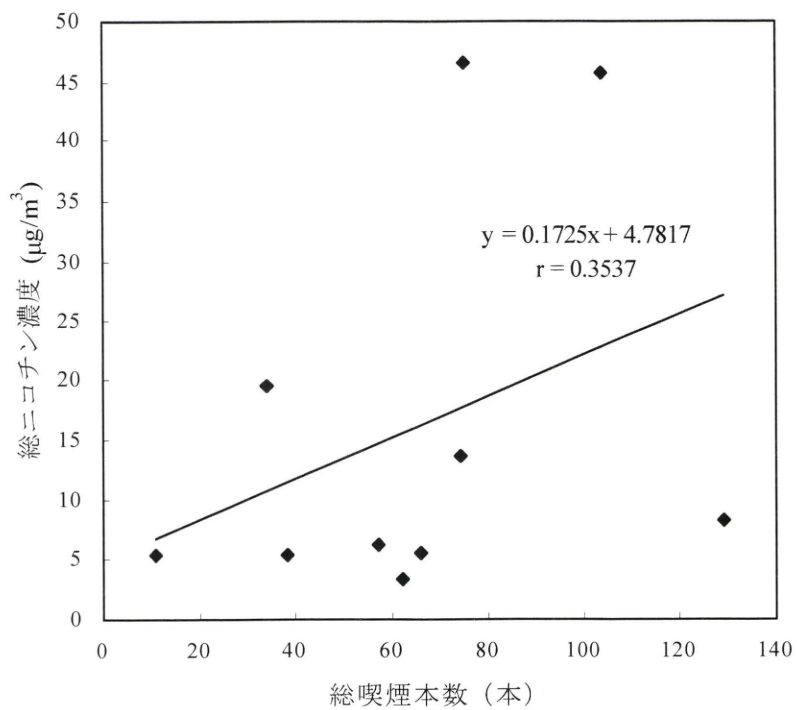


図2 喫煙本数とニコチン濃度の相関

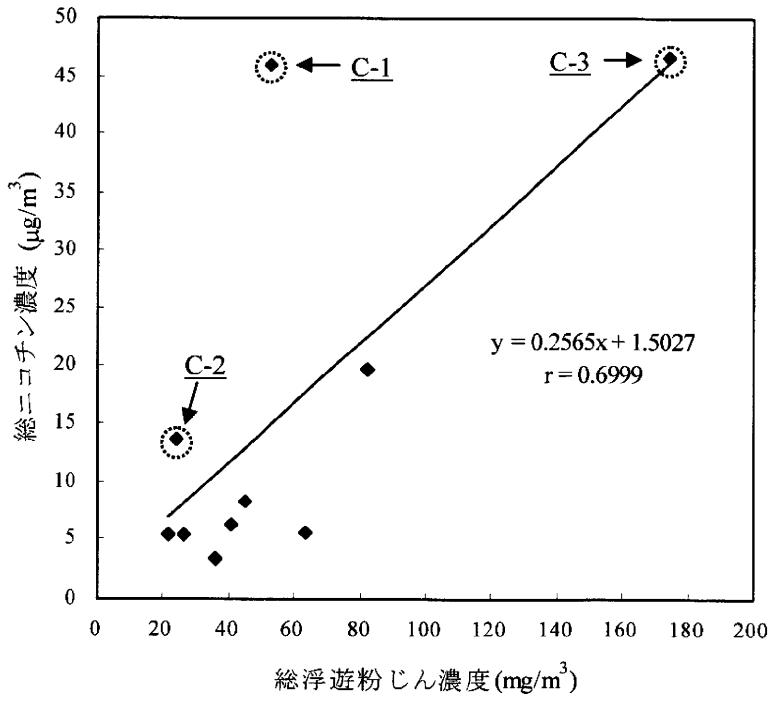


図3 浮遊粉じん濃度とニコチン濃度の相関

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

尿中変異原を指標とする喫煙の発がんリスク評価に関する研究  
～喫煙者の尿中変異原の固相抽出手法の比較～

研究分担者 遠藤 治 麻布大学

### 研究要旨

バイオマーカーによる喫煙の曝露・影響評価に関する研究の一環として、尿中代謝物等の迅速簡便な変異原性試験手法の確立を目的として、喫煙者等の尿中変異原の固相抽出手法の比較検討を行った。健康な男性喫煙者5名の1日尿を被験試料とした。ODS系カラム2種類（Waters Sep-Pak tC18, Varian Bond Elut C18）及び多孔性ケイソウ土カラムInertSep K-soluteを用い固相抽出を行った。変異原性試験はサルモネラYG1024及びYG1029両菌株を用い、ラット肝S9mix添加・無添加両条件下でマイクロサスペンション法により行った。その結果、喫煙者の尿の変異原性は主にYG1024株S9mix添加条件下で認められ、3種類の固相抽出カラムの中ではSep-Pak tC18が比較的良好的な結果が得られた。K-soluteは、操作性は優れているものの、被験5試料中2試料が擬陽性で、それ以外は陰性であった。これらの結果から、喫煙者の尿中変異原は主に代謝活性化により変異原性を発現するフレームシフト型の中極性物質であることが示唆された。また測定例数は少ないが、尿の変異原性は喫煙銘柄のパッケージ表示タール量を考慮した推定曝露タール量よりも、単純な喫煙本数と相関する傾向が認められ、尿の変異原性が喫煙の曝露・影響評価のバイオマーカーとして有望であることが判った。

### A. 研究目的

たばこ煙中には夥しい種類の有害化学物質が存在しており、その中には発がんに関連する物質も少なくない[1]。尿の変異原性は、特定の発がん関連物質について定量的かつ詳細な把握は困難とされるが、総合的かつ簡便な曝露評価手法のひとつとして期待されている[2]。今年度はバイオマーカーによる喫煙の曝露・影響評価に関する研究の一環として、尿中代謝物等の迅速簡便な変異原性試験手法の確立を目的として、喫煙者等の尿中変異原の固相抽出手法の比較検討を行った。

### B. 研究方法

#### (1) 試薬類

固相抽出カラム：Sep-Pak® tC18 Plus（Waters）、Bond Elut® C18 Jr（VARIAN）、及びInertSep K-solute 50mL（ジーエルサイエンス）を用いた。

溶媒：メタノール（関東化学残留農薬試験・PCB試験用）、ジクロロメタン（関東化学残留農薬試験・PCB試験用）、ジメチルスルホキシド（DMSO, 和光純薬生化学用）を用いた。

代謝活性化酵素系：エームステスト用S9/コファクターAセット（S9 mix；オリエンタル酵母工業製）を用いた。

#### (2) 尿試料

健康な男性喫煙者5名の1日尿を被験試料とした。試料採取に際し、食事内容や喫煙に対する制限は設けなかったが、採尿開始前日からの食事内容や喫煙状況など簡単な生活行動を記録してもらい、またこれまでの喫煙歴等について簡単なアンケート調査を行った。表1に尿試料提供者の喫煙歴等をまとめた。この表で、採尿時喫煙本数は採尿時の行動記録表に記載された喫煙本数を積算した

もので、これに喫煙銘柄のパッケージ表示タール量に乗じたものを「推定曝露タール量」とした。

### (3) 抽出

ODS系のカラム (Sep-Pak tC18及びBond Elut C18) では吸引方式 (吸引速度2mL/分以内) で抽出した。抽出直前にメタノール及び脱イオン蒸留水 (各30mL) を通してコンディショニングを行った。なお予備的に行った実験において、一部の尿 (特に乳び尿) でカラムの目詰まりが認められたため、ガラスろ過器 (ポアサイズ40~160 µm) による前処理を行った。ケイソウ土カラム (K-solute) ではガラスろ過器等による前処理は不要で、自然落下方式で尿を吸着させ、3~5分後にジクロロメタン (50 mL) で溶出させた。

抽出溶液はロータリーエバポレーターを用いて約1mLになるまで減圧濃縮した後、試料バイアルに移し、窒素ガスを吹き付けて溶媒のみを揮散させた。抽出試料は密栓後、変異原性試験に供するまで-30°Cの冷凍庫内に遮光保存した。

### (4) クレアチニン濃度

酵素法 (クレアチナーゼ - ザルオキシダーゼ - POD法) に基づく体外診断用キット (CRE-ENカノイス: カノイス社製) を用いて測定した。

### (5) 変異原性試験

変異原性試験は、マイクロサスペンション法[3]により試験した。菌株はサルモネラYG1024及びYG1029両菌株[4]を用い、ラット肝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。

## C. 研究結果

変異原性試験により得られた用量-反応曲線の例を図1に示す。図1から、喫煙者 (被験者D) の尿はYG1024株に対して代謝活性化酵素系S9mix添加・無添加両条件下で明瞭な用量-反応関係を示し、変異原性が認められたが、YG1029株に対しては、S9mix添加の有無にかかわらず変異原性は認められなかった。なおYG1024株S9mix無添加条件下では、後述するように、上記以外の4試料では変異原性は認められなかった。

表2に、今回試験した喫煙者5名の尿の変異原性

の測定結果を示す。この表にはまたクレアチニン濃度及び比重の測定結果も示してある。ODS系カラム抽出試料はYG1024及びYG1029両菌株を、ケイソウ土カラム抽出試料はYG1024のみをそれぞれ用い、いずれもS9mix添加・無添加両条件下で実施した。変異原比活性は用量-反応曲線の直線的な部分から最小自乗法による直線回帰式を求め、その傾きから尿当量1mL当りの復帰突然変異コロニー数として算出した。括弧内の数値は擬陽性例 (溶媒対照値の2倍には満たないが、良好な用量-反応関係が認められるもの) で、陰性例は0で示してある。表2から、喫煙者の尿のSep-Pak tC18抽出試料はいずれもYG1024株S9mix添加条件下で明瞭な用量-反応関係を示し、変異原性が認められた。S9mix無添加条件下では、5試料中1試料 (被験者D) が陽性となったが、それ以外の4試料では変異原性は認められなかった。Bond Elut C18抽出試料は、5試料中1試料 (被験者D) のみがYG1024株S9mix添加・無添加両条件下で陽性となったが、それ以外の4試料では変異原性が認められなかった。K-solute抽出試料はYG1024株S9mix添加条件下の2試料 (被験者A及びD) で擬陽性となったが、それ以外はすべて陰性であった。

表3はODS系カラムによる尿試料の変異原性抽出効率を調べた結果である。表2からSep-Pak tC18抽出試料で5試料中最も強い変異原性を示した被験者Dの試料を用い、ODS系の2種類のカラムをそれぞれ3段連結して試料を通過させ、1段毎に抽出物を溶出させて、YG1024株S9mix添加・無添加両条件下で変異原性試験に供した。表3から、ODS系カラムは2種類とも1段目のカラム抽出物でのみ変異原性が認められ、2段目以降はS9mix添加の有無に関わらず変異原性は認められなかった。

表4はSep-Pak tC18抽出の再現性試験結果を示したものである。表2で5試料中最も低い変異原比活性を示した被験者Aの試料を用い、1回の抽出尿量を50mLとして3回抽出を行った。変異原性試験はYG1024株S9mix添加・無添加両条件下で実施した。表4から、Sep-Pak抽出は3回ともS9mix添加条件下で明瞭な変異原性が認められ、無添加条件下では陰性であった。S9mix添加条件下における変異原比活性 (尿1 mL当りの復帰変異コロニー数)

の平均は27.2, 相対標準偏差(変動係数)は14.8%であった。

#### D. 考察

尿の変異原性を試験する手法として, 初期の報告では尿自体に試験菌を混ぜる方法がとられたが, 試験に用いる尿量の制約や尿中に存在する妨害因子のため検出感度は極めて低いものであった[5]。その後スチレンジビニルベンゼンポリマー Amberlite XAD2や, 銅フタロシアニン誘導体を吸着させた青綿(ブルーレーヨン)など吸着剤を用いる試料前処理法が報告された[6,7]。筆者らもブルーレーヨンやSep-Pakカラムを用いてヒト尿の変異原性を指標とする発がん関連物質への曝露評価手法について検討を行ってきた[8-10]。近年バイオ分析用試料の新しい前処理方法として多孔性ケイソウ土カラムが注目されている。これは固相表面で液-液抽出を行うもので, 重力フローでバキュームマニホールドや吸引ポンプなどの機材を必要とせず, エマルジョンも発生し難いことから, 前処理方法の簡略化が期待されている。そこで本研究では, バイオマーカーによる喫煙の曝露・影響評価に関する研究の一環として, 尿中代謝物等の迅速簡便な変異原性試験手法の確立を目的として, 喫煙者の尿中変異原の固相抽出手法の比較検討を行った。

喫煙者5名の尿の変異原性の測定結果(表2)から, 今回比較した3種類の固相抽出カラムの中ではSep-Pak tC18で良好な結果が得られた。Sep-Pak tC18抽出試料は被験5試料すべてに対してYG1024株S9mix添加条件下で明瞭な用量-反応関係を示し, S9mix無添加条件下でも5試料中1試料(被験者D)で陽性の結果が得られた。また表3及び表4の結果から, Sep-Pak tC18は尿からの変異原抽出効率, 再現性ともに良好であった。これに対して, 同じODS系のカラムでもBond Elut C18による抽出試料は, 5試料中1試料のみが陽性となったものの, それ以外の4試料では変異原性が認められなかった。唯一陽性となった試料では, 表3に示すように, Sep-Pak tC18とほぼ同等の抽出効率が認められたものの, 複数の試料に対する検出率はSep-Pak tC18の方が優れていた。なおこれらODS

系のカラムでは, 一部の尿(特に乳び尿)で目詰まりが認められ, ガラスろ過器等による前処理が必要であったが, その残渣に変異原性は認められなかった。

ODS系のカラムで, トリファンクショナル結合の充填剤を持ちながら, Sep-Pak tC18 PlusとBond Elut C18 Jrで大きな差異が認められた理由は定かではないが, 変異原性試験の結果ばかりでなく, 抽出時の目詰まりの起こしやすさなど操作性の点でもSep-Pak tC18 Plusの方が優れているように思われた。

K-solute/ジクロロメタン抽出試料は被験5試料中2試料(被験者A及びD)で擬陽性(YG1024株+S9mix)と判定されたが, それ以外はすべて陰性であった。なおK-soluteで尿を吸着させたのち, 回収用の有機溶媒としてメタノールなど中極性の溶媒を使用した場合, 尿そのものが溶出してしまったため, 変異原性試験に供することができなかった。

これらの結果を考え合わせると, 喫煙者の尿中変異原は主に代謝活性化により変異原性を発現するフレームシフト型の中極性物質であることが示唆された。

表5に今回検討した3種類の固相抽出カラムの性能比較をまとめた。表5から, 抽出効率や再現性, 操作性に加えて経済性(カタログ単価)など総合的に判断すると, 現状ではSep-Pak tC18が最適であると考えられた。今回使用したK-soluteは, 市販のレギュラーカートリッジの中では最大容量(50 mL)のもので, 被験5試料中2試料(被験者A及びD)で溶媒対照値の2倍には満たないものの, 用量の増加に伴って復帰変異コロニー数の増加が認められ, 擬陽性と判定された。尿量を増やしODS系カラムと同等量(200 mL)を抽出するためには, 特製カラムの工夫や経費的な問題はあるものの, 重力フローで, バキュームマニホールドやポンプ等を必要とせず, エマルジョンフリーで目詰まりも起こしにくいなど操作性の長所も加味すると, 改善する余地が残されていると思われる。

図2及び図3に喫煙量と尿の変異原性(Sep-Pak tC18抽出試料/YG1024+S9mix)の関係を図示した。図2は採尿時の行動記録表に記載された喫煙本

数と変異原比活性の相関を、図3は推定曝露タール量と変異原比活性の相関を、それぞれ示したものである。尿中への有害化学物質排泄量を測定する際に、飲食や発汗、季節変動などによる濃度差を補正する手段としてクレアチニン濃度や比重が常用されているが、ここではクレアチニン補正を行った場合（■，回帰直線：実線）と、行わない場合（○，回帰直線：破線）の両方を示してある。これらの図から、まだ測定例数は少ないものの、クレアチニン補正の有無にかかわらず、尿の変異原性は喫煙銘柄のパッケージ表示タール量を考慮した推定曝露タール量とは相関せず、むしろ単純な喫煙本数と相関することが示唆された。

これまでの研究結果から、喫煙による有害化学物質への曝露量やその影響の大きさは、パッケージに表示されたタール量やニコチン量よりも喫煙本数を中心とした因子に影響されることが明らかとなってきた[11]。上記結果もこれを支持する内容となっており、尿の変異原性が喫煙の曝露・影響評価のバイオマーカーとして、有用であることが強く示唆された。

今後、尿中代謝物等の迅速簡便な変異原性試験手法の確立を目的として、さらに効果的な抽出手法に関する詳細な検討を行うとともに、喫煙者ばかりでなく非喫煙者や受動喫煙者など測定範囲を広げていくことが必要であると思われる。

## E. 結論

(1) 喫煙者の尿の変異原性は主にYG1024株S9mix添加条件下で認められ、3種類の固相抽出カラムの中ではSep-Pak tC18が比較的良好な結果が得られた。

(2) K-soluteは、操作性は優れているものの、被験5試料中2試料が擬陽性で、それ以外は陰性であった。これらの結果から、喫煙者の尿中変異原は主に代謝活性化により変異原性を発現するフレームシフト型の中極性物質であることが示唆された。

(3) 測定例数は少ないが、尿の変異原性は喫煙銘柄のパッケージ表示タール量を考慮した推定曝露タール量よりも、単純な喫煙本数と相関する傾向が認められ、尿の変異原性が喫煙の曝露・影響評価のバイオマーカーとして有望であることが判っ

た。

## [引用文献]

- 1) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2004) VOLUME 83 Tobacco Smoke and Involuntary Smoking, WHO IARC, Lyon, France
- 2) 遠藤治, 田邊潔, 後藤純雄, 溝口次夫, 松下秀鶴 (1993) 尿中変異原性を指標とした日常生活における発がん関連物質への曝露評価の検討, 衛生化学, 39, 554-559
- 3) Maron D M, Ames B N (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, 173-215
- 4) 能美健彦(1993) ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ菌株の開発, 環境変異原研究, 15, 1-11
- 5) Durston W E, Ames B N (1974) A Simple Method for the Detection of Mutagens in Urine: Studies with the Carcinogen 2-Acetylaminofluorene, Proc Natl Acad Sci U S A., 71, 737-741
- 6) Yamasaki E, Ames B N (1977) Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine, Proc Natl Acad Sci U S A., 74, 3555-3559
- 7) Hayatsu H, Hayatsu T, Ohara Y (1985) Mutagenicity of human urine caused by ingestion of fried ground beef, Jpn J Cancer Res (Gann), 76, 445-448
- 8) 遠藤治, 大久保忠利, 西村義隆, 田邊潔, 後藤純雄, 石井忠浩, 溝口次夫 (1994) 非喫煙者の尿中変異原性の経時変動, 環境変異原研究, 16, 177-188
- 9) 遠藤治, 関谷幸江, 小谷野道子, 関幸雄, 後藤純雄, 松下秀鶴 (1996) 尿中の変異原性物質の抽出法について—Sep-Pak tC18 とブルーレーヨンを用いた抽出法の比較—, 衛生化学, 42, 429-432
- 10) 遠藤治, 小谷野道子, 森康明, 後藤純雄 (1998) 尿試料の変異原性に及ぼす保存条件

の影響, 衛生化学, 44, 378-385

- 11) 稲葉洋平 (2010) 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新しい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

#### **F. 研究発表**

統括報告書に一括記載した。

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし



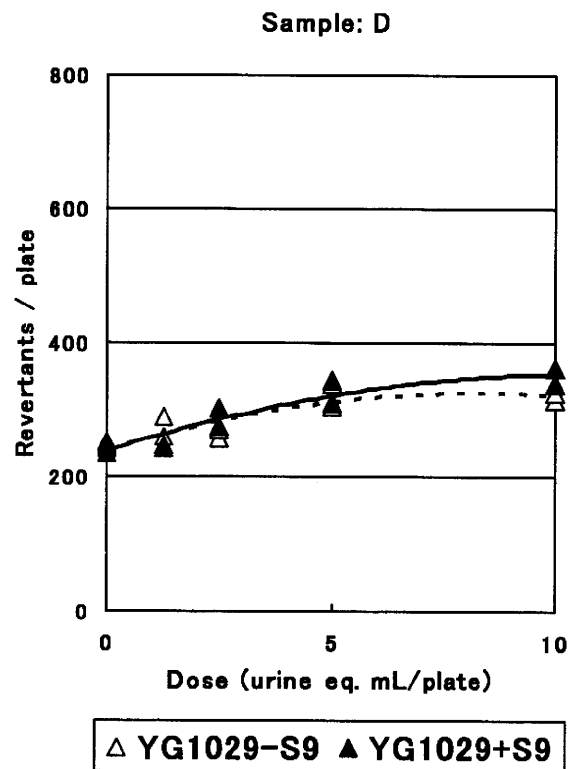
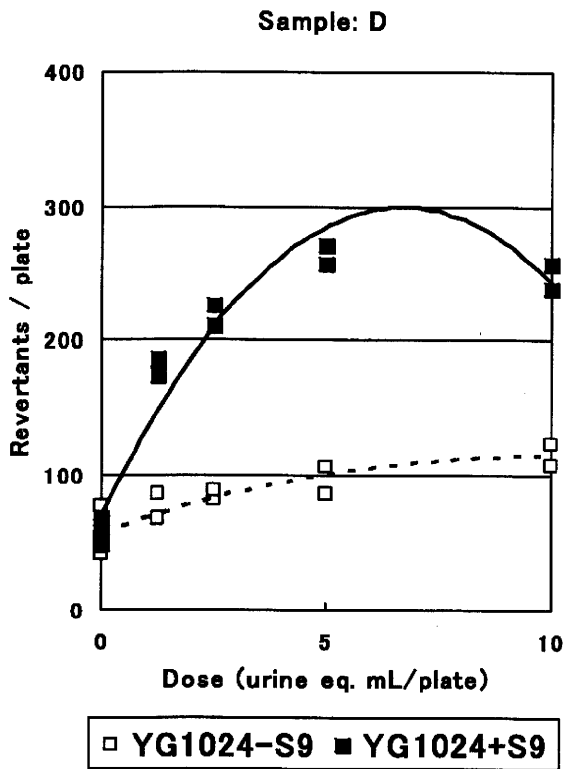


図1 変異原性試験結果の一例

試料：被験者 D Sep-Pak tC18 plus /メタノール抽出  
 サルモネラ菌 YG1024 (左) 及び YG1029 (右) ±S9mix / マイクロサスペンション法  
 グラフの横軸は用量 (抽出に供した尿当量/プレート) を表している

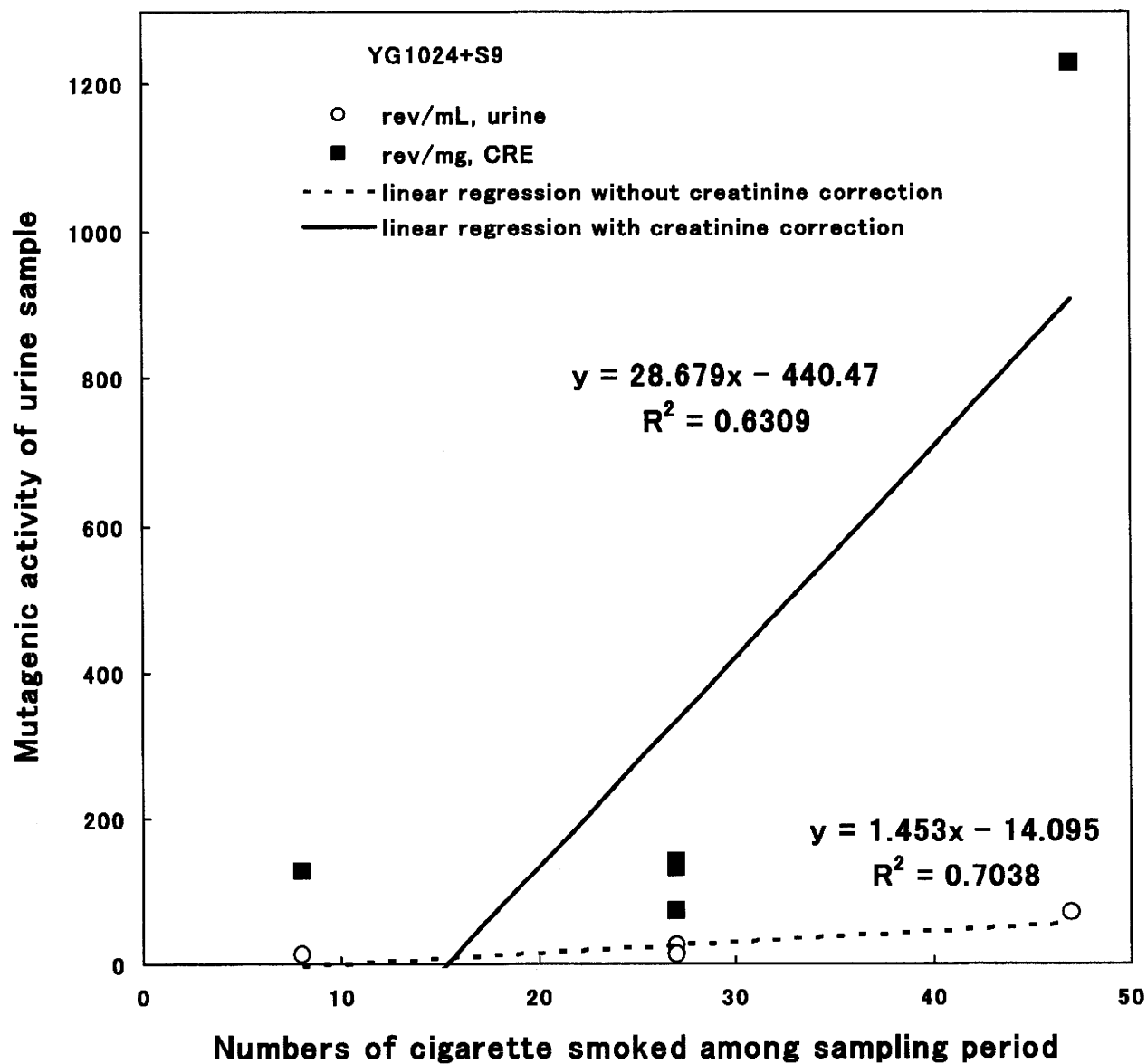


図2 喫煙本数と尿の変異原比活性の相関

x 軸は採尿時の行動記録表に記載された喫煙本数

y 軸は変異原比活性で、○と破線による回帰直線：尿当量 1 mL 当りの復帰突然変異コロニー数

■と実線による回帰直線：クレアチニン 1mg 当りの復帰突然変異コロニー数

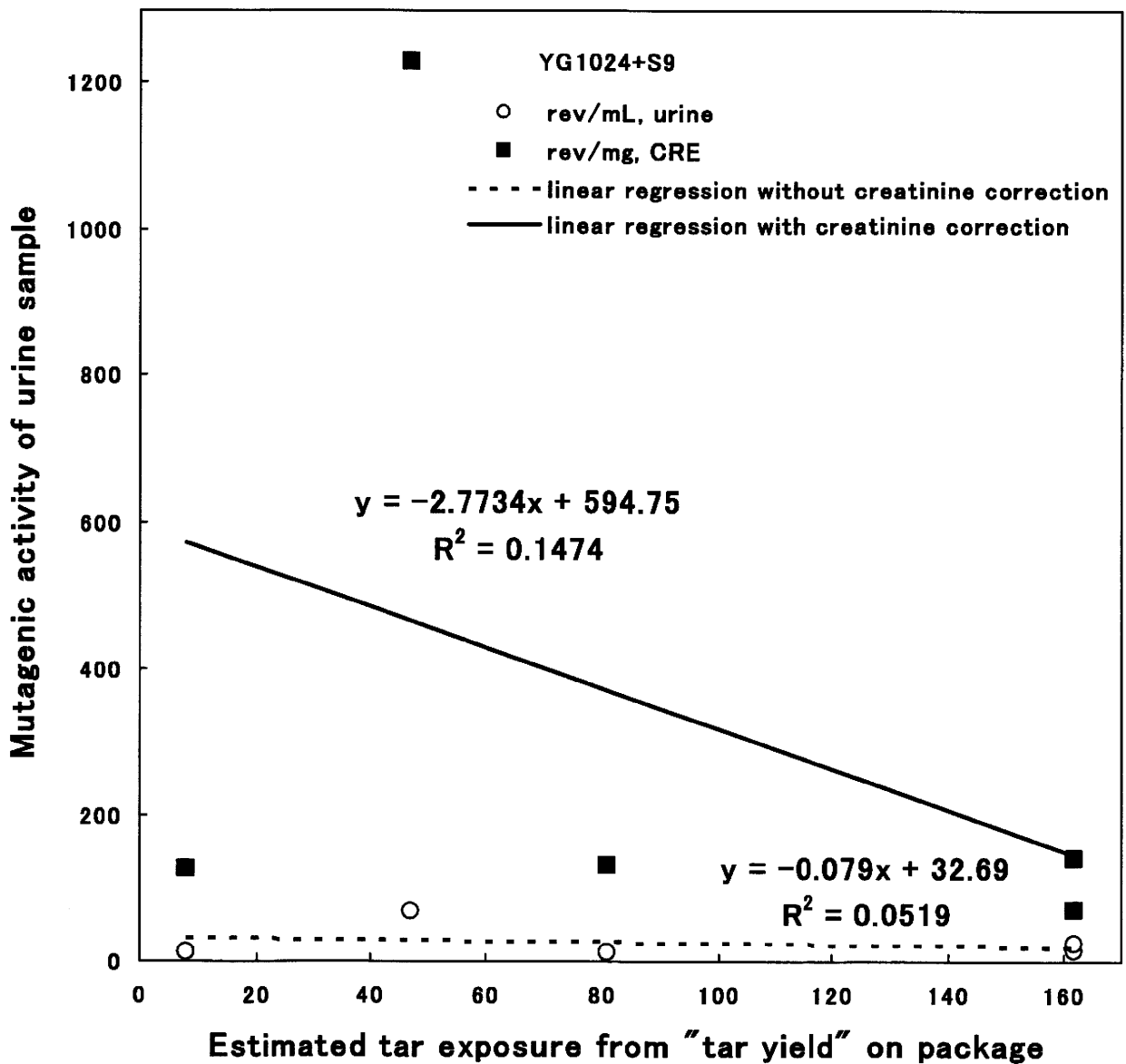


図3 推定曝露タール量と尿の変異原比活性の相関

x 軸は推定曝露タール量 (=採尿時喫煙本数×喫煙銘柄のパッケージ表示タール量)

y 軸は変異原比活性で, ○と破線による回帰直線: 尿当量 1 mL 当りの復帰突然変異コロニー数

■と実線による回帰直線: クレアチニン 1mg 当りの復帰突然変異コロニー数

表1 尿試料提供者の喫煙歴等

試料 ID	A	B	C	D	E
性別	男	男	男	男	男
年齢	51	21	21	48	22
喫煙歴	31	3	2	28	6
銘柄	PIANISSIMO FRAM MENTHOL ONE	KENT SUPER 6	MARLBORO LIGHT	LARK ULTRA ONE	CASTER SUPERMILD
タール量 (mg)	1	6	6	1	3
ニコチン量 (mg)	0.1	0.6	0.5	0.1	0.3
1 日平均喫煙本数	10	10	10	30	20
採尿時喫煙本数 <sup>a)</sup>	8	27	27	47	27
推定曝露タール量 (mg) <sup>b)</sup>	8	162	162	47	81

a) 採尿時の行動記録表に記載された喫煙本数の積算

b) 推定曝露タール量 = 採尿時喫煙本数 × 喫煙銘柄のパッケージ表示タール量

表2 喫煙者の尿の変異原性試験結果

CRE <sup>a)</sup> mg/dL	比重	変異原比活性 (revertants / mL, equivalent urine) <sup>b)</sup>										
		Sep Pak tC18 PLUS				Bond Elut C18 Jr				K-Solute		
		YG1024		YG1029		YG1024		YG1029		YG1024		
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
A	8.83	1.010	0	11.3	0	0	0	0	0	0	0	(18.4)
B	19.44	1.015	0	13.7	0	0	0	0	0	0	0	0
C	16.68	1.018	0	23.4	0	0	0	0	0	0	0	0
D	5.47	1.009	5.8	67.2	0	0	7.4	45.2	0	0	0	(21.8)
E	8.83	1.012	0	11.6	0	0	0	0	0	0	0	0

a) CRE: クレアチニン濃度 (酵素法に基づく体外診断用キットによる測定値)

b) 用量-反応曲線の直線的な部分から最小自乗法による直線回帰式を求め、その傾きから算出した尿当量 1 mL 当りの復帰突然変異コロニー数

( )内の数値は擬陽性例, 0 は陰性例を示す。

表3 ODS系カラムによる尿試料の変異原性抽出効率

抽出カラム		変異原性	
		-S9	+S9
Sep Pak tC18 PLUS	1 段目	5.8	46.4
	2 段目	0.0	0.0
	3 段目	0.0	0.0
Bond Elut C18 Jr	1 段目	7.4	45.2
	2 段目	0.0	0.0
	3 段目	0.0	0.0

試料はいずれも被験者 D の尿を使用

変異原性は尿当量 1 mL 当りの復帰突然変異コロニー数で、数値 0.0 は陰性例を示している

表4 Sep Pak 抽出試料の再現性試験結果

尿抽出試料	変異原性	
	-S9	+S9
I	0.0	23.8
II	0.0	26.2
III	0.0	31.7
Mean	-	27.2
SD	-	4.0
RSD	-	14.8

試料は被験者 A の尿（いずれも 50mL）を使用

変異原性は尿当量 1 mL 当りの復帰突然変異コロニー数で、数値 0.0 は陰性例を示している

SD：標準偏差

RSD：相対標準偏差

表 5 固相抽出カラムの性能比較

名称	Sep Pak tC18 PLUS	Bond Elut C18 Jr	K Solute
充填剤	ODS (400mg)	ODS (500mg)	多孔性ケイソウ土
抽出対象	極性比較的広範囲	極性比較的広範囲	無極性
抽出効率	○	△	△～×
再現性	○	△	未実験
操作性	△ ポンプなど動力装置が必要	△～× ポンプなど動力装置が必要 目詰まりしやすい	○ 重力フローで装置不要 エマルジョンフリー
カタログ単価	¥ 560	¥ 430	¥ 980
判定	○	△	△～×

長期喫煙習慣者及び多量喫煙習慣者のたばこ煙曝露の除去の過程における短・中期的な身体  
の酸化ストレスの状態の変化の追跡方法に係わる研究

研究分担者 大庭志野 国立保健医療科学院

**要旨**

【目的】 たばこ煙への曝露の有無が、酸化ストレスの指標の状態とどのように関連するか既存研究を調べ、身体に及ぼす短・中期的な影響について詳細に検討するために研究計画案を作成する。【方法】 過去の関連論文を検索し、喫煙者の禁煙と酸化ストレスのマーカーとの関係についてこれまで明らかになっている主要な知見を収集し整理する。それに基づき研究案を作成する。【結果】 既存研究においては、喫煙により高まった酸化ストレスの状態がたばこを止めることにより改善されることが示唆された。しかしながら慢性疾患のある人には健康な人ほどの改善がみられなかった。またこれとは別に、運動等の生活習慣が身体酸化ストレスの状態に影響を及ぼすことが示唆されている。これらの知見に基づき、長期的あるいは多量の喫煙習慣のある人において、たばこ煙の曝露の除去が酸化ストレスの状態に与える影響についてその過程を詳細に追って検討することが必要であり、研究案を作成する。【考察】 本研究案を用いて、喫煙習慣のある者が禁煙をすることにより生ずる体内の酸化ストレスの状態の変化を詳細に追跡し検討することが可能となろう。

**A.目的**

たばこ煙への曝露の除去が、身体酸化ストレスの状態とどのように関連するか、内外の既存研究を整理し明らかにする。これらに基づき、長期喫煙習慣のある人及び多量喫煙習慣のある人において、禁煙によるたばこ煙の除去が身体酸化ストレスの状態に及ぼす短・中期的な影響について、その過程を詳細に検討するために研究計画案を作成する。

過去に発表された学術論文を検索し、喫煙者のたばこ煙曝露の除去と酸化ストレスの状態との関係について、内外の主要な知見を収集し整理する。これらを用い、長期喫煙習慣のある人及び多量喫煙習慣のある人において、禁煙によるたばこ煙の除去が身体酸化ストレスの状態に及ぼす短・中期的な影響について、科学的なエビデンスを得ることを目標とした研究計画案を作成する

**B.方法**

(倫理面への配慮)

本研究は国立保健医療科学院研究倫理審査専門委員会において承認を受けた。

## C.結果

### ①背景

酸化ストレスとはfree radicals生成物質やfree radicalsそのものの蓄積が、除去や防御のメカニズムを上回ることによって生じ、DNA、脂質等に酸化的損傷を起こす状態を表す(1)。これまでに、酸化ストレスと循環器疾患、糖尿病、がん、高脂血症等の慢性疾患や、老化そのものとの関連が報告されている(2, 3)。本研究では人体の酸化ストレスの状態を示すバイオマーカーのうち、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)と、8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub>(8-epi-PGF<sub>2α</sub>)に着目する(4, 5)。どちらも高い精度で測定が可能な指標である。8-OHdGはDNAのdeoxyguanosineの8位の炭素が酸化されることで生成され、DNAの損傷を示す(6)。8-epi-PGF<sub>2α</sub>はF2-isoprostanesのうち、特に生体内に多く生成される因子である。F2-isoprostanesは不飽和脂肪酸のアラキドン酸を前駆物質とし、脂質酸化の進行を示す(5)。

たばこ煙には多種のfree radicalsが含まれていることが報告されており(7)、喫煙による酸化ストレスの高まりが容易に予測される。これは喫煙の健康への有害な影響のメカニズムの一つとして提唱される。8-OHdGと喫煙の関連についての既存研究はこれまでに Roweらが行われており、83名の喫煙者及び非喫煙者を比較した研究においては、8-OHdGの高い値が喫煙者において報告されている(8)。また318名の男性を対象とした本邦で行われた研究において、喫煙者

で喫煙量の多い人に8-OHdGの高まりが報告されている(9)。F2-isoprostanesと喫煙との関連については、まずF2-isoprostanesの発見者であるMorrowらが、喫煙者、非喫煙者それぞれ10名の尿中F2-isoprostanesを測定し、喫煙者の値が有意に高いことを報告した(10)。その後住民を対象とした比較的大規模な疫学研究が行われ、Framingham Heart Studyにおいては、2,828名の男女を対象とし、現喫煙者の8-epi-PGF<sub>2α</sub>の値が有意に高いことが報告されている(11)。

このように喫煙と酸化ストレスの状態に関連が示唆されたことにより、喫煙者がたばこをやめることで改善することという仮説が提唱される。これまでに禁煙を前向きに追跡することで禁煙による酸化ストレスへの影響を検討した研究が行われている。健康な喫煙者を58名の禁煙群と65名の喫煙継続群に割り付けしたデンマークの研究では、禁煙群における4週間後の尿中8-OHdGの値に有意な低下がみられた(12)。本邦における健康な若年成人喫煙者27名を対象とした研究では、2週間の禁煙により、尿中8-OHdG及び尿中8-epi-PGF<sub>2α</sub>ともに低下がみられ、喫煙を再開した14名には双方の値の上昇が見られた(13)。一方、慢性疾患のある人の研究においてはこのような明らかな結果は得られていない。152名の喫煙者で心血管疾患の既往がある男女を喫煙継続群と減煙群に割り付けた米国の研究では、6ヶ月後の血中F2-isoprostanesに大きな変化は見られなかった(14)。また喫煙者で喘息やCOPDを持つ人らを加えたフィンランドの研究では、禁煙に成功した15名において3か月後



の唾液中のF2-isoprostanesに若干の減少がみられたが、依然として非喫煙者より高い値が確認され、酸化ストレスの持続が示唆された(15)。

運動については多くの研究がなされており、急激な運動による8-OHdGの上昇及び長期的な運動習慣による低下が示唆されている(16)。その他の生活関連に係る要因では、F2-isoprostanesについては、肥満、血漿中アスコルビン酸・βカロチン、性別、野菜摂取(11, 17, 18)、8-OHdGについてはアルコール摂取、性別、体内鉄分量、血清中βカロチン、睡眠等との関連が報告されている(19-23)。

## ②既存研究の知見への考察

これまでに喫煙により高まった酸化ストレスの状態はたばこを止めることにより改善されることが予測された。しかしながら、慢性疾患のある喫煙者には健康な人ほど改善がみられなかった。循環器疾患の発症には、運動や栄養摂取等の生活習慣が大きく係ることがわかっており、たばこ煙曝露の除去と身体の酸化ストレスの状態の関係の検討においても、既往歴や生活習慣の考慮が必要であろう。

既存研究においては年齢や対象者の特徴が限定されており、個人が持つ多くの要因の検討が充分になされていない。本研究案においては、これまで特に酸化ストレスの状態との関係が明らかになっている要因に着目し、これらが喫煙をやめる過程においてどのような影響を及ぼすか、可能な範囲で考慮することとする。

既存研究において喫煙者の一日の喫煙量が酸化ストレスの状態と関連すること

が報告されていることより、禁煙の過程においても喫煙量や生涯の喫煙期間が影響を及ぼすと考えるが、これらについては未だ十分な検討がなされていない。本邦で行われた介入試験では、若年成人者を対象としていることより、これは喫煙歴が比較的短い人を対象としていると考える。本研究案では、一日の喫煙量が多く、また長い喫煙歴を持つ人を対象とすることにより、たばこ煙除去の過程において、喫煙習慣に伴うたばこ煙へのこれまでの曝露の頻度や期間等の量的な影響を検討することが可能となる。

既存の介入・臨床研究では、主に禁煙に成功した人のみ検討が為されている。Prieme, Hらにおいては58人の喫煙者のうち禁煙に成功した人は半数以下の27人であった(12)。禁煙の成功率は研究によりばらつきがあると思われるが、検討が必要であろう。本研究案では、特に禁煙指導を受ける人を対象とすることで、高い割合でたばこ煙除去が行われることを期待する。

以上のことより、本研究案では特に既存研究において十分な検討が為されておらず、未だ明らかになっていない点に着目することを試みる。本研究の結果をもって、禁煙を試みる多様な人に一般化することを目標とする。

## ③研究計画案

長期的なまたは多量の喫煙習慣のある人の喫煙の状況を詳細に調べ、たばこを止める過程において定期的な観察を行い、8-OHdGおよび8-epi-PGF<sub>2α</sub>を測定することにより身体の酸化ストレスの状態を詳細に推定する。収集したデータを用い、たば

こ煙への曝露の除去が身体の酸化ストレスの状態の変化に対して短・中期的に及ぼす影響を詳細に観察し、検討する。その際、生涯喫煙年数や一日の喫煙量などの喫煙習慣に伴うたばこ煙へのこれまでの曝露の量的な指標を用い、その影響を考慮する。また、喫煙や酸化ストレスの状態と関連が有ると考えられる個人の持つ特性について可能な範囲で考慮する。

対象者は禁煙外来において禁煙治療を受けることを目的で来院した人とする。研究は複数施設で実施し、集めたデータは全てまとめて解析する。対象者の募集は調査実施を行う医院において行われる。調査の内容及び目的を説明し、同意書への記名をもって本調査への協力を確認する。

対象者の基準を以下に示す。

1. 以下の基準において、禁煙治療のための標準手順書（日本循環器学会，日本肺がん学会，日本癌学会，日本呼吸器学会）に基づき保険適用の禁煙治療の対象となる人
  - ・直ちに禁煙しようと考えている
  - ・TDS[ニコチン依存症のスクリーニングテスト](24)でニコチン依存症と診断されている
  - ・ブリンクマン指数（1日の喫煙本数×喫煙年数）が200以上
  - ・禁煙治療に同意している
2. がん，脳卒中，心筋梗塞等の主要な疾患が無い人

既存の類似研究が少なく、必要とされる標本サイズの厳密な推定は困難であるが、8-OHdGに着目すると、既存研究において(13)，禁煙後28日目の値が75 ng/kg/day，喫煙再開時に125 ng/kg/dayであった。こ

の値を利用すると， $\alpha = 0.05$ ，common standard deviation (SD) 50.5，検出力=80%と設定した場合，t-testを行う際に必要なサンプル数は1群あたり17名であった(25)。しかしながら本研究案を遂行する際には他施設で対象例を可能な限り集約し、対象者数を増やす試みが必要であろう。

対象者には初診時と再診時の計5回，12週間にわたり随時尿の採取を行う。検体は採取後直ちに保管場所に送付され， $-70^{\circ}\text{C}$ で測定時まで保管する。

8-OHdG及び8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> は専門家に測定を依頼する。この際クレアチニン値を同時に測定する。解析の際には8-OHdG及び8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> の測定値をクレアチニン値で補正して用いる。更に，概ねの正規分布を得るためにlog変換を行う。

対象者の持つ特性や生活習慣は自記式質問票を用いて調べる（著作権の範囲内で一部を添付）。

身体及び個人の持つ特性の調査

- ・年齢
- ・性別
- ・身体調査：初診時及び各再診時
  - 身長（初診時）体重より求めたBMI，禁煙補助薬の処方内容，本人及び家族の既往歴（初診時）
  - ・深夜勤務歴（初診時）
  - ・社会経済的状況：初診時
    - 婚姻の状況，教育歴，就業の状況
  - ・運動：初診時及び各再診時
    - 運動習慣（METS換算）(28)，受診直前の運動状況
- 喫煙の状況の把握
  - ・禁煙（外来受診）の動機
  - ・過去喫煙歴

- ・禁煙治療中の喫煙量
  - ・各診察時における喫煙量
  - ・初診時及び最終診察時の尿中コチニン
- 解析をおこなうために、検体及び自記式質問票より収集されたデータの電子化を行う。その際には2重入力あるいは打ち出しデータと電子データの照合を行うことで品質管理・品質保証を行う。この作業は業者に委託することでデータの品質を保つ。

酸化ストレスの状態を示す指標について、初診時から最終再診時（約12週後）までの変化についての継続した検討を行い、統計的な解析を行う。症例群及び対照群は特に定められていないが、必要に応じて年齢、肥満度や体重変化、運動、社会経済的状況、それまでの喫煙量及び喫煙歴等の要因について調整あるいは層化を行う。データの解析には信頼性・妥当性が保証されたソフトウェアを用いる。

#### D.結論

喫煙者においては身体の酸化ストレスの状態が高まるのが既存研究において報告されている。また喫煙者がたばこをやめることで酸化ストレスの状態が改善することが示唆されている。本研究案を用いて、長期喫煙習慣及び多量喫煙習慣のある人のたばこ煙曝露の除去の短・中期的な過程において、身体の酸化ストレスの状態の変化を追跡し、詳細に検討することが可能となろう。

#### E.研究発表

無し

#### F.知的財産権の出願・登録状況

無し

#### G.引用文献

1. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(17):7915-22.
2. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ, 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. FASEB J 2004;18(15):1791-800.
3. Loft S, Svoboda P, Kasai H, et al. Prospective study of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion and the risk of lung cancer. Carcinogenesis 2006;27(6):1245-50.
4. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86(24):9697-701.
5. Roberts LJ, 2nd, Milne GL. Isoprostanes. J Lipid Res 2009;50 Suppl:S219-23.
6. Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, et al. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. Carcinogenesis 1986;7(11):1849-51.

7. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985;64:111-26.
8. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, et al. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 1992;13(12):2241-7.
9. Kasai H, Iwamoto-Tanaka N, Miyamoto T, et al. Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative dna damage: effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. *Jpn J Cancer Res* 2001;92(1):9-15.
10. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332(18):1198-203.
11. Keane JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):434-9.
12. Prieme H, Loft S, Klarlund M, et al. Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion. *Carcinogenesis* 1998;19(2):347-51.
13. Morita H, Ikeda H, Haramaki N, et al. Only two-week smoking cessation improves platelet aggregability and intraplatelet redox imbalance of long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(4):589-94.
14. Joseph AM, Hecht SS, Murphy SE, et al. Smoking reduction fails to improve clinical and biological markers of cardiac disease: a randomized controlled trial. *Nicotine Tob Res* 2008;10(3):471-81.
15. Louhelainen N, Ryttila P, Hahtela T, et al. Persistence of oxidant and protease burden in the airways after smoking cessation. *BMC Pulm Med* 2009;9:25.
16. Miyata M, Kasai H, Kawai K, et al. Changes of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels during a two-day ultramarathon race period in Japanese non-professional runners. *Int J Sports Med* 2008;29(1):27-33.
17. Block G, Dietrich M, Norkus EP, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002;156(3):274-85.
18. Thompson HJ, Heimendinger J, Sedlacek S, et al. 8-Isoprostane F2alpha excretion is reduced in women by increased