

の禁煙モチベーションを増幅させる検査マーカーとする。

B. 方法

対象者：平成23年4月1日より平成24年2月1日までの間に国際医療福祉大学クリニックの禁煙外来を受診したニコチン依存症患者さんに研究協力を申し出、書面による同意を得た方を対象者とした。初回診察時（喫煙中）、1週後（バレニクリン服用1週目、喫煙中）、4週後（禁煙3週目）、12週後（禁煙11週目）の4回50mL コニカルチューブに採尿し、 -20°C に凍結保存した。13名が参加し、そのうち11名の尿サンプルの解析が平成24年2月段階で終了した。11名中2名は禁煙に失敗し、研究より途中脱落したため、4週、12週のサンプルはない。1名は禁煙に成功したが、12週の尿酸プルを提供しないまま研究から脱落した。

対象者数の算定根拠：私たちの開発した8-OHdG測定法の変動係数（CV）は、2.0~2.9であるので、ここで「低下」は、2CVを越える低下（5.8%）以上の低下とする。酸化ストレス・バイオマーカーが禁煙開始前に低下する期待値を0.2、禁煙開始後に低下する期待値を0.8であると仮定すると、有意水準0.05、検出力0.9でサンプル数が15以上あれば禁煙の効果は検出できる。脱落者（禁煙を3週以内に途中で中止）が30%程度あるとすると、リクルートする人数は21名である。

Isoprostane 類の測定：測定対象物質は、8-iso-prostaglandin F₂ α （iPF₂ α -III）及び5-iso-prostaglandin F₂ α -VI（5-iPF₂ α -VI）とした。試料抽出は YMC 製オクタデシルシリカ担体（YMC*GEL ODS-AQ）を充填した自製カラムに尿試料を導入後、0.1%酢酸、1%アンモニア/40%メタノール溶液及び0.1%酢酸の順で通液し、50%

メタノールで溶出した。溶出試料は Supelco 製 Supelclean ENVI-Carb に導入後、0.1%酢酸及びメタノールの順で通液し、0.1%酢酸/エタノール溶液で溶出した。溶出試料は窒素気流下で溶媒留去後、33%アセトニトリル/メタノール（95/5）溶液で溶解し分析用試料とした。化学分析は、LC部に Agilent Technologies 製の1100シリーズ及びMS部に Micromass 製の Quattro LC を用いて、ESI-/MRMで行った。

ニコチン代謝物の測定：ニコチン代謝物は、ニコチン、コチニン、3-ヒドロキシコチニンを測定対象物質とした。その測定法は、本報告書の稲葉らの手法を用いて行った。なお、今回の測定の検出限界は、50ng/mlであったが、対数変換の際に検出限界値以下の値を25ng/mlとして扱った。

統計解析：IBM SPS Statistics 19を用い、尿中ニコチン代謝産物および酸化ストレスマーカーは正規分布に近づけるため対数変換した後、解析した。正規性の検討は、Kolmogorov-Smirnov検定で行った。禁煙後のニコチン代謝産物および酸化ストレス・バイオマーカーの変化は、一元配置分散分析で有意差検定を行い、有意な場合は多重比較をDunnnett t検定を行った。0.05を有意水準とした。

倫理的配慮：本研究計画「禁煙による尿中酸化ストレス・バイオマーカー変動に関する研究」（受付番号FK-28）は、国際医療福祉大学病院の倫理委員会で審査され、平成22年10月1日付けで承認された。

C. 結果

表に示すように、現段階では、酸化脂質の代謝産物である尿中酸化ストレス・バイオマーカーは、禁煙により有意な変化は認められない。但し、研

究計画で必要なサンプル数を21と計算しており、またその計算には8-OHdGのバラツキを根拠にしていたことより、未だ結論を出すのは早計である。他方、尿中ニコチン代謝産物は、バレニクリン服薬後1週で喫煙本数が減少する（タバコが不味くなるという）ことを反映してか、低下傾向が認められ、尿中ニコチンはもっとも鋭敏に変化をとらえていた。禁煙3週でニコチン代謝産物は全て検出限界以下に低下した。

D. 考察

酸化損傷した脂質の代謝産物である8-isoprostane類を酸化ストレス・バイオマーカーとしたMorrowらの先行研究では、安定アイソトープ希釈ガスクロマトグラフィー法が使われていた²。その後安定アイソトープ希釈ガスクロマトグラフィー法とMS・MSを組み合わせた方法⁵やELISA法⁶など検討されてきた。ガスクロマト法は、多くのサンプルを検査するのに適しておらず、一方、ELISA法は、多数の対象者を測定対象とする疫学調査で用いられており、簡便である一方で試薬の不安定性のため再現性に乏しい欠点がある（鈴木の実験）。このため、臨床検査センターレベルで検査可能な高精度の酸化ストレス・バイオマーカーの測定法の開発が望まれていた。

今回、私たちは、HPLC-MS/MSにより尿中の8-isoprostaneと5-isoprostaglandin F2 α -VIを測定する手法を確立した。また、酸化損傷を受けたDNAの代謝産物である8-OHdGを尿中酸化ストレス・バイオマーカーとして検討した。本報告までに8-OHdGの測定は間に合わなかったが、今後測定の予定である。8-isoprostaneと5-isoprostaglandinに関しては、禁煙が成功した9症例の検討では、禁煙による有意な変化は認められない。この結果は、禁煙2～3週で酸化ストレスマーカーの改善があるとの他の研究者の報告と合致しない^{7,8}。但

し、研究計画で必要なサンプル数を21と計算しており、またその計算には8-OHdGのバラツキを根拠にしていたことより、未だ結論を出すのは早計である。今後、サンプル数を増やして再解析する予定である。

E. 結論

新たに、酸化損傷した脂質の代謝産物である8-isoprostaneおよび5-isoprostaglandin F2 α -VIをHPLC-MS/MSにより測定する手法を確立した。サンプル数が未だ目標数まで達していないため、喫煙による酸化ストレス・バイオマーカーの変化に関しては、最終結論は出ていない。

引用文献

1. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ, 2nd. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87(23): 9383-7.
2. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *The New England journal of medicine*. 1995; 332(18): 1198-203.
3. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(24): 9697-701.
4. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion

- in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*. 1992; 13(12): 2241-7.
5. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *American journal of epidemiology*. 2002; 156(3): 274-85.
 6. Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003; 23(3): 434-9.
 7. Pilz H, Oguogho A, Chehne F, Lupattelli G, Palumbo B, Sinzinger H. Quitting cigarette smoking results in a fast improvement of in vivo oxidation injury (determined via plasma, serum and urinary isoprostane). *Thrombosis research*. 2000; 99(3): 209-21.
 8. Morita H, Ikeda H, Haramaki N, Eguchi H, Imaizumi T. Only two-week smoking cessation improves platelet aggregability and intraplatelet redox imbalance of long-term smokers. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; 45(4): 589-94.
- 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

表 対数変換尿中バイオマーカー濃度

	喫煙中				禁煙後			
	1 週前		禁煙当日		3 週目		11 週目	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Ln(8-isoprostane) (ng/mg creat)	-0.419	0.252	-0.455	0.423	-0.524	0.285	-0.386	0.458
Ln(5-isoprostaglandin F2a-IV) (ng/mg creat)	0.273	0.259	0.3	0.378	0.214	0.302	0.338	0.431
Ln(Nicotine) (ng/mg creat)	6.39	1.133	4.846 [*]	1.328	3.927 ^{**}	0.898	3.579 ^{**}	0.34
Ln(Cotinine) (ng/mg creat)	7.091	0.575	6.452	0.984	5.823 ^{\$}	1	5.069 ^{**}	0.895
Ln(3-OH-Cot) (ng/mg creat)	7.475	2.202	6.497	1.86	4.528 ^{\$}	2.104	3.767 ^{**}	0.436

* p = 0.004, ^{\$} p = 0.002, ** p < 0.001

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

禁煙外来における治療対象者の特性：たばこ煙の曝露低下の状況を
検討する際に考慮を要する要因の検討

研究分担者 大庭志野 国立保健医療科学院
研究分担者 井埜利博 群馬パース大学
研究協力者 大島譲二 久保島クリニック
研究協力者 小林敏宏 こばやし小児科
研究協力者 渋谷友幸 しぶや医院
研究協力者 瀬山邦明 順天堂大学医学部
研究協力者 豊島慶弥 医療法人長慶会 豊島医院

研究要旨

【目的】禁煙外来において治療を受ける人の背景要因及び生活習慣に係る要因を調べ、それがたばこ煙への曝露状況とバイオマーカーとの関連に与える影響について考察する。【方法】禁煙外来において治療を開始する人を対象に初診時に背景や行動に係る要因、運動、睡眠習慣及び睡眠の質等の生活習慣に係る要因について調べる。【結果】喫煙歴の指標であるブリンクマン指数のみならず、現在の喫煙量及び喫煙期間の双方を個別に検討する必要があると示唆された。また、年齢による運動量の調整が必要であろう。女性においては、喫煙への依存に対する感受性の高さが示唆され、また睡眠の質と喫煙との関連が男性とは異なることが示唆された。【考察】本研究の対象者は限られたものであるが、これまでにこのような検討を試みた研究例は少なく、本研究のデータを提供することは価値あることと考える。今後本研究のデータを継続する形で、研究が行われることが望まれる。

A. 目的

禁煙外来において患者のたばこ煙の曝露状況及び治療効果の影響を評価する方策として、特定のバイオマーカーを測定して検討することが考えられる。たばこ中に含まれる有害物質の代謝物の測定値に加え、酸化ストレスの指標の検討が有用であろう。特に DNA の損傷を示す 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)及び、脂質酸化の進行を示す 8-iso-prostaglandin F2α(8-epi-PGF2α)は、たばこ煙の曝露の状況のみ

ならず、喫煙が及ぼすその後のがん、循環器疾患、糖尿病等の生活習慣病のリスクとの関連について検討が可能となる(1, 2)。しかしながらこれらのバイオマーカーは、年齢等の個人の持つ特性や生活習慣に係る要因との関連することが示唆されている(3-11)。禁煙外来では様々な人が治療を受けるため、これらの要因の影響を考慮する必要があるといえよう。本研究においては、禁煙外来において治療を受ける人の背景要因及び生活習慣に係る要因を調べ、それらがたばこ

煙への曝露状況についてバイオマーカーを用いて検討する際に与える影響について考察することを目的とする。

B. 方法

禁煙治療を始める人で、本調査の同意が確認された人を対象として本調査を行う。禁煙外来を行う医院を複数設定し、本研究の実施を依頼する。喫煙歴、ニコチン依存度について初診時に問診を行う。背景や行動に係る要因、運動、睡眠習慣及び睡眠の質等の生活習慣に係る要因について調べる。

対象者

本研究の対象者の基準は以下の通りとする。

- ・直ちに禁煙しようと考えており、禁煙治療に同意している。
- ・ニコチン依存症と診断されている(12)。
 - ・ブリンクマン指数（1日の喫煙本数×喫煙年数）が200以上

対象者の特性の調査

身長及び体重の測定を行い、BMIを求める。婚姻の状況、教育歴、仕事の有無、深夜勤務の状況等については質問票を用いて調べる。睡眠の状況及び質について妥当性の確認された質問票を用いて調べる(13, 14)。また、運動習慣を調べ、代謝当量に換算して検討する(15)。

喫煙に係る要因の調査

喫煙を開始した年齢及び現在の喫煙量を質問票で確認する。ニコチン依存症の度合いについては、スクリーニングテストの結果を用いる(12)。禁煙外来受診の動機について、既存の研究で用いられた質問票で調べる(16)。

統計解析

各要因について要約統計量を示す。年齢（60歳未満及び60歳以上）と性別により層別の検討を行う。解析には IBM SPSS statistics (Chicago, IL)を用いる。

（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

本研究の対象となった人の詳細および検体の収集状況を Table 1、Table 2 に示す。これまでに5施設17名（男性9名 女性8名）が調査に参加した。

Table 3 に対象者全体と、性別の要約統計量を示す。60歳未満の群では、60歳以上の群に比して、運動量の高い傾向がみられた。また、60歳以上では女性の占める割合が比較的高かった。ブリンクマン指数の値に年齢による大きな違いは見られなかったが、60歳未満の群では一日当たりの喫煙量が高く、60歳以上の群では喫煙歴が長い傾向がみられた。60歳未満の群では現在仕事を持つ傾向が高く、また深夜勤務の経験がやや高い傾向がみられた。60歳以上の群では睡眠の質にやや低下がみられた。どちらの群も「自分の健康を考えて」が禁煙外来受診の動機として高い割合で挙げられていた。次いで60歳未満では「たばこの費用」が理由として挙げられ、一方60歳以上の群では「自分の健康に問題や障害があるため」が挙げられた。ニコチン依存症の度合いは、60歳未満の群がやや高かった。

男女別の検討を Table 4 に示す。男女ともニコチン依存症の度合いはほぼ同じであった。喫煙量に着目すると、男性は女性に比して1日当たりの喫煙量が多く、喫煙期間が長い傾向にあった。睡眠の質については、女性は男性に比して低い傾向がみられた。「自分の健康に問題や障

害がある」ことをたばこを止める理由として挙げた人の割合は男女ともほぼ同じであったが、女性においては「たばこの費用」を理由として挙げた人の割合が高くみられた。

E. 結論

本研究では禁煙外来で治療を受ける人を対象に、その特性や生活習慣について検討を行った。年齢別の喫煙量の検討では、ブリンクマン指数に大きな違いは見られなかったが、一日の喫煙本数及び喫煙期間に違いがみられ、喫煙量の検討の際には慎重に検討する必要があることが示唆された。また、運動量は様々な生活習慣と関連があり、また酸化ストレスとの関連も示唆されているが(4)、喫煙者においても若い人には運動量が高い傾向が示され、たばこ煙曝露の影響を検討するには調整が必要な要因であることが示唆された。

女性においては喫煙量や喫煙期間が男性よりも低いことが示唆されたが、ニコチン依存症の度合いはほぼ同じであった。このことより、女性では男性よりも少ない喫煙量で高い依存の状態になる可能性が考えられる。既存研究において喫煙への依存の男女差の検討が為されているが、未だ一致した結論が得られていない(17-19)。しかしながら、ニコチン依存について検討する際には性別を考慮する必要があるだろう。また、禁煙外来未受診の動機について女性では、5人中4人までが「たばこの値段」を挙げ、最も高い割合を示した。禁煙行動との関連を検討するには考慮が必要であると考え。

女性の喫煙者において高い割合で睡眠の質の低下が示唆された。これまでに、睡眠障害が不快感、不安感や集中力の低下などの禁煙の離脱症状と関連していることが報告されている(20, 21)。また禁煙を試みる人のうち睡眠障害のある人には喫煙再発の高いリスクが見られるとの報

告がある(22)。本研究の結果より、禁煙の影響を検討する際に、喫煙者睡眠の質について特に男女別に考慮する必要があると示唆された。

本研究の対象者数は科学的な検討を行うためには充分であるとはいえない。しかしながら、このような検討を試みた既存研究は限られており、データの提供は価値あることと考える。たばこ煙の曝露の状況および身体の影響についてバイオマーカー等を用いて評価する際には、本研究の結果で示唆された個人の特性や生活習慣に係る要因のうち特に性別、運動量、これまでの喫煙習慣、喫煙への依存度、睡眠習慣や睡眠の質等について考慮する必要があるだろう。今後本研究のデータを継続する形で、研究が行われることが望まれる。

F. 引用文献

1. 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):1849-1851.
2. Roberts LJ, 2nd, Milne GL. Isoprostanes. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S219-223.
3. Keaney 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):434-439.
4. 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.
5. Block G, Dietrich M, Norkus EP, et al. Factors associated with oxidative stress in

- human populations. *Am J Epidemiol.* 2002;156(3):274-285.
6. Thompson HJ, Heimendinger J, Sedlacek S, et al. 8-Isoprostane F2alpha excretion is reduced in women by increased vegetable and fruit intake. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(4):768-776.
 7. Bianchini F, Jaeckel A, Vineis P, et al. Inverse correlation between alcohol consumption and lymphocyte levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans. *Carcinogenesis.* 2001;22(6):885-890.
 8. Proteggente AR, England TG, Rehman A, et al. Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals. *Free Radic Res.* 2002;36(2):157-162.
 9. Kristenson M, Kucinskiene Z, Schafer-Elinder L, et al. Lower serum levels of beta-carotene in Lithuanian men are accompanied by higher urinary excretion of the oxidative DNA adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine. *The LiVicordia study. Nutrition.* 2003;19(1):11-15.
 10. Hori A, Mizoue T, Kasai H, et al. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. *Cancer Sci.* 2010;101(2):517-522.
 11. Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, et al. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2005;127(5):1674-1679.
 12. Kawakami N, Takatsuka N, Inaba S, et al. Development of a screening questionnaire for tobacco/nicotine dependence according to ICD-10, DSM-III-R, and DSM-IV. *Addict Behav.* 1999;24(2):155-166.
 13. 土井由利子、箕輪眞澄、内山真、大川匡子. ピッツバーグ睡眠質問票日本語版の作成. *精神科治療学.* 1998;13(6):755-763.
 14. Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, et al. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* 1989;28(2):193-213.
 15. Suzuki I, Kawakami N, Shimizu H. Reliability and validity of a questionnaire for assessment of energy expenditure and physical activity in epidemiological studies. *J Epidemiol.* 1998;8(3):152-159.
 16. Sieminska A, Buczkowski K, Jassem E, et al. Patterns of motivations and ways of quitting smoking among Polish smokers: a questionnaire study. *BMC Public Health.* 2008;8:274.
 17. Perkins KA, Donny E, Caggiula AR. Sex differences in nicotine effects and self-administration: review of human and animal evidence. *Nicotine Tob Res.* 1999;1(4):301-315.
 18. Bohadana A, Nilsson F, Rasmussen T, et al. Gender differences in quit rates following smoking cessation with combination nicotine therapy: influence of baseline smoking behavior. *Nicotine Tob Res.* 2003;5(1):111-116.
 19. Pomerleau OF, Pomerleau CS, Mehringer AM, et al. Nicotine dependence, depression, and gender: characterizing phenotypes based on withdrawal discomfort, response to smoking, and ability to abstain. *Nicotine Tob Res.* 2005;7(1):91-102.
 20. Berry DT, Webb WB. Sleep and cognitive functions in normal older adults. *J Gerontol.* 1985;40(3):331-335.

21. Roehrs T, Zorick F, Wittig R, et al. Predictors of objective level of daytime sleepiness in patients with sleep-related breathing disorders. Chest. 1989;95(6):1202-1206.
22. Persico AM. Predictors of smoking cessation in a sample of Italian smokers. Int J Addict. 1992;27(6):683-695.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 List of characteristics of participants

Serial number	Clinic	Age	Sex	BMI	Tobacco dependence screener	Cigarettes per day	Years of smoking	Physical activity (METS h/week)	Global Pittsburgh Sleep Quality Index	Subjective sleep quality	Sleep latency	Sleep duration	Habitual sleep efficiency	Sleep disturbances	Use of sleeping medication	Daytime dysfunction
1	A	70	M	24.4	6	.	.	2	1	0	1	0	0	0	0	0
2	B	38	M	18.4	8	20	20	0	5	1	1	1	0	1	0	1
3	B	58	M	22.3	6	25	40	2	4	0	0	4	0	0	0	0
4	B	41	M	19.3	8	15	17	4	4	0	0	2	0	1	0	1
5	B	63	M	32.8	9	18	44	8	4	1	1	1	0	1	0	0
6	B	29	M	20.4	7	20	11	8	3	1	0	0	0	0	0	2
7	B	36	F	23.3	8	13	18	2	5	1	1	2	0	1	0	0
8	B	67	F	22.0	7	10	12	47	13	3	5	2	1	2	0	0
9	C	44	F	30.0	10	50	27	47	4	0	0	4	0	0	0	0
10	C	48	F	22.8	5	20	25	10
11	C	54	F	17.3	10	20	36	132	0	0	0	0	0	0	0	0
12	D	61	F	25.2	8	20	20	8	4	1	1	1	0	1	0	0
13	D	45	M	22.7	10	30	23	153	4	1	1	0	0	1	0	1
14	D	65	F	21.6	5	20	40	12	2	0	1	0	0	1	0	0
15	E	82	M	.	5	10	65	0	1	0	0	0	0	0	0	1
16	E	76	M	16.8	6	.	50	10	6	1	0	0	1	1	2	1
17	E	47	F	.	10	17	27	10	6	1	1	2	0	1	0	1

Table 2 List of collected urine of the participants

Serial number	Clinic	First void urine Initial visit	First void urine Visit 4	Casual urine Initial visit	Casual urine Visit 1	Casual urine Visit 2	Casual urine Visit 3	Casual urine Visit 4
1	A	X		X	X	X		
2	B	X		X	X	X		
3	B	X	X	X	X	X	X	X
4	B	X	X	X	X	X	X	X
5	B	X	X	X	X	X	X	X
6	B	X	X	X	X	X	X	X
7	B	X		X	X			
8	B	X		X	X			
9	C	X			X	X	X	X
10	C							
11	C			X	X	X		
12	D			X	X	X	X	X
13	D			X	X	X	X	X
14	D			X	X			
15	E			X	X	X	X	X
16	E			X	X	X		
17	E			X	X	X		

Table 3 Summary of baseline characteristics of participants according to age group

	Overall					Less than 60 Years old n=10				60 Years old or older n=7			
	n	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Age	17	54.4	15.0	29	82	44.0	8.5	29	58	69.1	7.5	61	82
male (%)	17			71%				80%				57%	
BMI	15	22.6	4.4	16.8	33	21.8	3.8	17.32	30.1	23.8	5.3	17	33
METS (METS h/week)	17	26.4	45.9	0	153	36.5	57.6	0	153	12.1	15.8	0	47
Currently married	17			70.6%				70%				71%	
Education in years	17	13.7	2.6	9	18	14.3	2.1	12	18	12.9	3.2	9	16
Currently work (%)	17			70.6%				90%				43%	
Experience of late night shift (%)	17			35.3%				40%				29%	
Global Pittsburgh Sleep Quality Index (GPSQI)	16	4.1	2.9	0	13	3.9	1.7	0	6	4.4	4.2	1	13
GPSQI > 5	16			19%				11%				29%	
Tobacco dependence screener						8.2	1.8	5	10	6.6	1.5	5	9
Number of cigarettes per day	15	20.5	9.7	10	50	23.0	8.7	13	50	15.6	5.2	10	20
Years of smoking	16	29.7	14.9	11	65	24.4	8.7	11	40	38.5	19.6	12	65

	Overall				Less than 60 Years old n=10				60 Years old or older n=7				
	n	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Brinkman Index	15	572.7	332.8	120	1350	582.8	366.6	220	1350	552.4	290.9	120	800
Reason to quit cigarette smoking (%)													
Personal health problems	17		41.2%				30%				57%		
Family member's illness	17		5.9%				10%				0%		
Physician's advice	17		0%				0%				0%		
Somebody else's instigation	17		11.8%				20%				0%		
Cost	17		41.2%				50%				29%		
Health concern	17		76.5%				80%				71%		
Anxiety about family members' health	17		23.5%				30%				14%		
Others	17		5.9%				10%				0%		

Table 4 Summary of baseline characteristics of participants according to sex

	n	Male n=12				Female n=5			
		Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Age	17	54.0	16.2	29	82	55.2	13.3	36	67
male (%)	17								
BMI	15	22.5	5.1	16.8	33	23.0	1.6	21.6	25
METS (METS h/week)	17	31.0	53.6	0	153	15.4	17.8	1.5	47
Currently married	17		75%				60%		
Education in years	17	14.3	1.9	12	16	12.4	3.8	9	18
Currently work (%)	17		83%				40%		
Experience of late night shift (%)	17		33%				40%		
Global Pittsburgh Sleep Quality Index (GPSQI)	16	3.3	1.8	0	6	6.0	4.2	2	13
GPSQI > 5	16		9%				40%		
Tobacco dependence screener		7.5	1.9	5	10	7.6	1.8	5	10
Number of cigarettes per day	15	22.8	10.9	10	50	16.0	4.4	10	20
Years of smoking	16	32.5	16.1	11	65	23.4	10.7	12	40
Brinkman Index	15	657.7	343.9	220	1350	402.6	259.5	120	800
Reason to quit cigarette smoking (%)									
Personal health problems	17		42%				40%		
family member's illness	17		8%				0%		
Physician's advice	17		0%				0%		
Somebody else's instigation	17		8%				20%		
Cost	17		25%				80%		
Health concern	17		83%				60%		
Anxiety about family members' health	17		33%				0%		
Others	17		0%				20%		

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

喫煙における酸化ストレスと遺伝子多型の関連性に関する検討

研究分担者 竹田真由 天理医療大学
研究協力者 船渡忠男 東北福祉大学

研究要旨

本研究は、喫煙によって生じる酸化ストレスの変化と遺伝子多型の関連性について検討を行った。これまでの研究において、血清中の 8-OHdG 濃度とグルタチオン-S-転移酵素 (GST) の遺伝子多型における関連性を検討してきたが、血清 8-OHdG 濃度と GST ファミリーにおける遺伝子多型の相関性は見られなかった。そのため、酸化ストレスマーカーを 8-OHdG から d-ROMs という新しいマーカーに変更し、遺伝子多型との関連性を検討した。本研究では、健康診断受診者のうち喫煙群 44 名、非喫煙群 38 名を対象とし、酸化ストレスと遺伝子多型について検討を行った。酸化ストレスは、FRAS4 (ウィスマー) を用いて、d-ROMs テストを行った。遺伝子多型については、解毒関連酵素であるグルタチオン-S-転移酵素 (GST) の中でも、とくに酸化ストレスと関連性のある GSTM1、GSTT1 に着目し、遺伝子多型の解析を行った。その結果、d-ROMs テストは、喫煙の有無による差異がみられなかった。

E. 研究目的

喫煙は生体にさまざまな影響を及ぼし、酸化ストレスとも関連することが示唆されている [1]。酸化ストレスは、生体内において酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化に偏った状態である。酸化ストレス状態では、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の過程や、薬剤、紫外線などによって活性酸素が発生する。がんや生活習慣病など多くの疾患では、生体は酸化ストレス状態にあり、活性酸素がこれらの疾患に関わっているとされる [2]。すなわち、酸化ストレスは過剰な活性酸素が引き起こす状態である。喫煙（たばこのニコチンなど種々の成分）における酸化ストレスおよび活性酸素との関連も明らかである [3]。

これら酸化ストレス状態に対し、防御機能の一つとして作用するのがグルタチオンである。グルタチオンの SH 基には、さまざまな物質が結合す

る反応を触媒する酵素として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) がある [4]。タバコの煙が生体内に入ると、化学物質を代謝する第 1 相酵素として、cytochrome P450 (CYP) が存在し、第 2 相酵素の一つとして、GST が存在する [5] [6]。これらの酵素の活性は、遺伝子変異の有無が関連すると考えられている。これまで我々は、GST 遺伝子変異として、GSTA1、GSTM1、GSTT1 に着目し、酸化ストレスとの関連性を追究してきた [7]。とくに、喫煙による体内の酸化ストレスの変化を酸化ストレスマーカーとして、血清 8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) 濃度を用いて検討を行ってきた。その結果、GST1、GSTM1 および GSTA1 の遺伝子多型と、血清 8-OHdG (8-Hydroxy-deoxyguanosine) 濃度における関連性は得られなかった。そこで、新たな酸化ストレスマーカーを検討し、遺伝子多型との関

連性について検討する必要性が考えられ、d-ROMテストに着目した。

d-ROMs テストは、生体内の活性酸素やフリーラジカルを直接計測するのではなく、それらにより生じた血中のヒドロペルオキシド (ROOH: 活性酸素・フリーラジカルにより酸化反応を受けた脂質・たんぱく質・アミノ酸・核酸などの総称であり酸化ストレス度のマーカー) 濃度を呈色反応で計測し、生体内の酸化ストレス度の状態を総合的に評価する。d-ROMs テストキットは、呈色液クロモゲン(N,N ジエチルパラフェニレンジアミン)がフリーラジカルにより酸化されると、無色から赤紫色のラジカル陽イオンになることを利用して、赤紫色のラジカル陽イオンを光度計で計測し、ヒドロペルオキシドの量を定量化する。血中の多種類あるヒドロペルオキシドの濃度を測定していることから、測定結果の数値は任意の単位として、開発者 Dr.CARRATELLI の名を冠し、U.CARR(ユニット・カール)としている。1U.CARR は $0.08\text{mg}/100\text{mlH}_2\text{O}_2$ に相当する[8][9]。

本研究は喫煙が生体に酸化ストレスを加えていることを実証し、その制御機構として解毒酵素である GST の遺伝子変異により、どのように影響しているかを解明することを目的としている。そこで、喫煙者と非喫煙者における d-ROMs テストの実施と、GST 遺伝子多型の解析を行った。

F. 研究方法

(1) 被験者

本研究の被験者は、企業などの健康診断受診者 82 名で行った。うち、喫煙者が 44 名(男性 40 名、女性 4 名)、非喫煙者が 38 名(男性 26 名、女性 12 名)であった。被験者から血液を採取し、末梢血細胞から DNA の抽出を行い、血清を用いて d-ROMs テストを行った。なお本研究は、研究課題を喫煙障害の分子機構解明と遺伝子解析とし

て東北福祉大学研究倫理委員会の承認を得て行った(受付番号:RS0811201)

(2) DNA 抽出

DNA 抽出には、FlexiGene DNA Kit (QIAGEN) を用いて行った。EDTA-2Na 採血管 5ml で血液を採取し、3000rpm で 10 分遠心後のパフィーコート 200 μl をサンプルとして使用した。キットに添付されたプロトコールの「100 μl ~500 μl バッフィーコートからの DNA 分離用プロトコール」に準じて抽出した。DNA 溶液はプロトコールでは 200 μl となっているが、回収量の多いものについては、FG3 溶液をさらに 100 μl 添加し、DNA が完全に溶解させた。

(3) d-ROMs テストの実施

酸化ストレス度測定には、d-ROM テストキットを用いた。まず、血清 10 μl を pH4.8 の酢酸緩衝液の入ったマイクロチューブに入れて混合させた。次に、全量を呈色クロモゲン入りのキュベットに入れて混合した後、キュベットを装置内の専用遠心機にて 1 分間遠心を行った。遠心後、キュベットを装置内にセットして吸光度測定を行った。本来は全血 20 μl で行うテストであり、基準値が全血 20 μl で HCT 値 43%に換算される。そのため、血清においての実測値は $20\mu\text{l} \times (100 - \text{HCT 値 } 43\%) = 11.4\mu\text{l}$ で測定を行う必要がある。そのため、血清 10 μl で測定を行い、1.14 を乗じて d-ROM 値とした。

(4) 遺伝子多型の解析

GSTM1、GSTT1 の遺伝子多型は、Multiplex-PCR を行った。調整済みの PCR 試薬に GSTM1、GSTT1、 β -globin の遺伝子領域をターゲットとしたそれぞれのプライマー(表 1)を用いた。94 $^{\circ}\text{C}$ 5 分の後、94 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、64 $^{\circ}\text{C}$ 60 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 60 秒を 1 サイクルとする 30 サイクル、72 $^{\circ}\text{C}$ 5 分の条件で PCR を

行った。アガロースゲル電気泳動により、増幅産物のサイズの違うバンドの有無によって、欠損を判定した[10]。

G. 研究結果

(1) 喫煙および非喫煙者の d-ROM 値の測定

まず、非喫煙群における性別での d-ROM テストについて、男性が 344.85 ± 34.48 U.CARR であり、女性が 384.08 ± 57.56 U.CARR となり、t 検定における p 値が 0.047 となり有意な差を生じた(図 1a)。そのため、喫煙群の有無による男性のみのデータについて統計解析を行った。喫煙群における d-ROM テストは、 354.93 ± 70.47 U.CARR であり、非喫煙群が 351.56 ± 45.82 U.CARR となり、有意差を生じなかった(図 1b)。

(2) 喫煙及び非喫煙者の遺伝子多型

喫煙群 44 名において GSTM1 欠損型は 24 名、GSTT1 の欠損型は 21 名であった。また、非喫煙群 38 名において GSTM1 の欠損型は 18 名、GSTT1 の欠損型は 20 名であった(表 2)。

(3) d-ROM 値と遺伝子多型の相関関係

図 2a は、GSTM1 における欠損の有無による d-ROMs テストの結果を表しており、2b は GSTM1 における欠損の有無による d-ROM テストの結果を表している。GSTM1、GSTT1 とともに有意な差は見られなかった。

図 3 は、喫煙群において遺伝子多型による d-ROMs テストの結果をまとめたものである。GSTT1 の遺伝子多型については、若干ではあるが差が有意であることが示唆された。

H. 考察

喫煙における酸化ストレスマーカーとして、d-ROMs テストという、新たな手法を用いて検討を行ったが、喫煙との有意差を得ることができな

かった。現在、酸化ストレスマーカーとして尿中 8-OHdG の正確な測定を可能としているという報告が既にあり[11]、これらを用いて遺伝子多型との関連性を検討していくことが望ましいと考えられる。また同時に、血清または血液細胞から測定できる酸化ストレスの指標の確立も必要であると考えられる。また、喫煙によって発がんのリスクが上昇し、その誘因として酸化ストレスが関わっていることが示唆されており、その解毒に GST の働きが関与するといわれている。しかし、今回のデータでは、喫煙による酸化ストレスの上昇と GST の多型変異による解毒の効力について、明確な関連性を示すに至らなかった。

現状の課題として、喫煙における酸化ストレスを臨床化学という視点から見ると、以下のような問題点がある。

まず、GST などの代謝酵素については、血中濃度によって酸化ストレスが左右すると考えられるが、酵素活性を血中で捉える必要性があり、そこから遺伝子多型との関連性を解明すべきであると考えられる。次に、抗酸化を有する酵素は、生体には多数存在している。そのため、1つの酵素活性が低下したとしても、他の酵素が補いあうことによって、酸化ストレスの極端化が抑制されている可能性が高いと考えられる。

今後、喫煙障害を酸化ストレスに着目した分子機序から解明していくにあたっては、これらの問題を解決していく必要がある。さらに、喫煙者群という対象の妥当性、最適な酸化ストレスマーカーの測定系の検討など、多くの課題をクリアする必要がある。

I. 結論

本研究は日本人喫煙者 44 名と非喫煙者 38 名の血清 d-ROMs テストの測定及び解毒に関する酵素 GST の遺伝子多型解析を行った。喫煙の有無による血清 d-ROMs テストの結果は、 354.93 ± 70.47

U.CARR であり、非喫煙群が 351.56 ± 45.82 U.CARR となり、2群間の有意な差は認められなかった。次に、GSTM1、GSTT1 の遺伝子多型における d-ROMs テストの関連性については、喫煙群の中で、GSTT1 遺伝子の有無によって、若干ではあるが、有意な差であることが示唆された。以上より、遺伝子多型と酸化ストレスの関連性を見出すために、喫煙との相関性が高い酸化ストレスマーカーを用いたさらなる検討が必要であると考えられる。

[引用文献]

[1] Selena Palma, Tommaso Cornetta, Luca Padua, et al. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke, *Mutation Research* (2007), 633;1-12,

[2] Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies, *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, (2008)5: 38-49,.

[3] Adamopoulos D, van de Borne P, Argacha JF, New insights into the sympathetic, endothelial and coronary effects of nicotine, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, (2008).35: 458-63,

[4] 谷口直之、淀井淳司：酸化ストレス・レドックスの生化学、共立出版

[5] Mette Sorensen, Herman Aurup, Anne Tjonneland, et al: Genetic polymorphisms in CYP1B1, GSTA1, NQO1, and NAT2 and the risk of lung cancer, *Cancer Letters*, (2005)221;185-190,

[6] CC McIlwain, DM Townsend and KD Tew: Glutathion-S-transferase polymorphisms; cancer incidence and therapy, *Oncogene*, (2006)25;1639-1648,

[7] 「臨床化学からみた喫煙障害 喫煙障害の分子機序」竹田真由、船渡忠男、他. *臨床化学* 39,112-116

[8] Alberti, A, Bolognini, L, Macciantelli, D. et.al.. The radical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine : a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.* (2000)26:253-267

[9] Cesarone, M. R, Belcaro, G, Caratelli, M., et al. A simple test to monitor oxidative stress. *Int. Angiol.* (1999) 2:127-130.

[10] Chacko P, Joseph T, Mathew BS, et al. Role of xenobiotic metabolizing gene polymorphisms in breast cancer susceptibility and treatment outcome. *Mutat Res.* (2005) 7;581(1-2):153-63.

[11] 稲葉洋平：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、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の新しい国際標準化試験法に関する研究平成 21 年度総括・分担研究報告書 (2010)

F. 研究発表

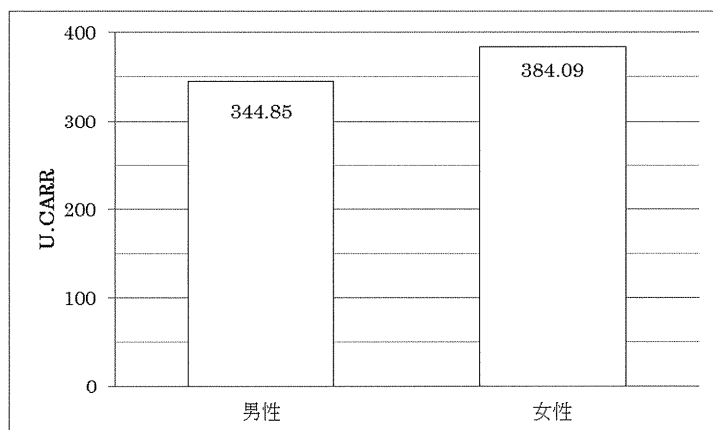
統括報告書に一括記載した。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1

a. 非喫煙群における男女別 d-ROM テストの結果



b. 喫煙群(男性のみ)における d-ROM テストの結果

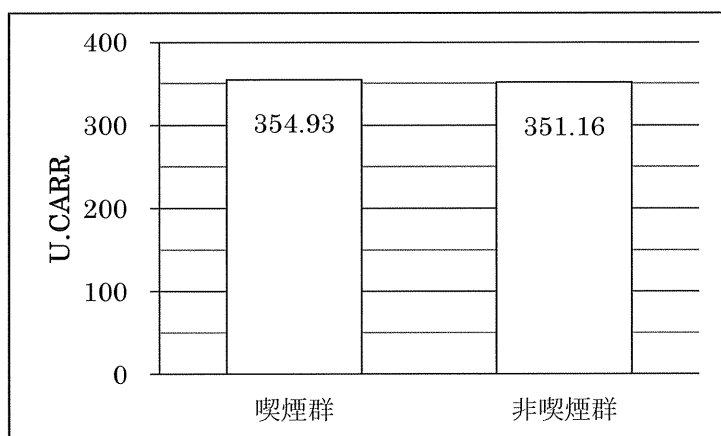


図 2

d-ROMs テストと遺伝子多型の関連

a. GSTM1 における欠損の有無による d-ROMs テストの結果

b. GSTT1 における欠損の有無による d-ROMs テストの結果

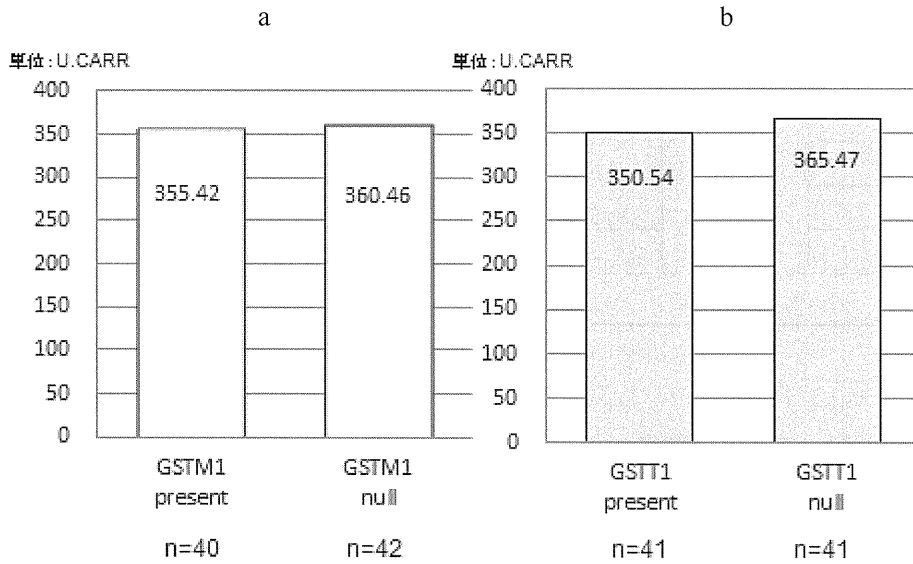


図 3 喫煙群(n=44)における d-ROMs テストの値と遺伝子多型

