

表 1 Multiplex-PCR で用いるプライマー

GSTT1	5'-TTC CTT ACT GGT CAC ATC TC-3' 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'
β -globin	5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'
GSTM1	5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG-3' 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'

表 2 遺伝子多型の結果

	喫煙群		非喫煙群	
	GSTM1	GSTT1	GSTM1	GSTT1
present	20	23	20	18
null	24	21	18	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

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（Ⅱ）～

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た。昨年度に引き続き、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。

健康な男性喫煙者の1日尿を被験試料とした。昨年度の研究結果から最適と思われた ODS 系固相カラム Sep-Pak tC18 に加えて、新たに湿潤性逆相ポリマー固相である OASIS HLB 及びスチレンジビニルベンゼン共重合体固相である Sep-Pak PS 2 を用いて抽出を行った。OASIS HLB 及び PS2 では中極性のメタノール及び無極性のジクロロメタンの2種類の抽出溶媒を用いた。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、①Sep-Pak tC18 では主に YG1024 株 S9mix 添加条件下で変異原性が認められ、被験尿試料は異なるが昨年と同様の結果が得られた。②今回比較した固相抽出手法の中では OASIS HLB/ジクロロメタン抽出が、比較的高い陽性率と比活性を示したが、再現性試験では若干大きい変動が認められた。③被験尿試料によっては Sep-Pak PS2 抽出物でのみ明瞭な陽性を示す場合もあり、抽出される変異原性成分の多様性も示唆された。

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なる、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、昨年度に引き続き、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、OASIS HLB、及

び Sep-Pak PS2（いずれも Waters 製、Plus type）を用いた。

溶媒：メタノール、ジクロロメタン（以上、関東化学残留農薬試験・PCB 試験用）、ジメチルスルホキシド（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

吸引方式(吸引速度 2mL/分以内)で抽出した。抽出直前に溶出溶媒(メタノール・ジクロロメタン)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。

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 S9 mix 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B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。

表2に、今回試験した喫煙者5名の尿の Sep-Pak tC18 抽出物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。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 1 mL 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、昨年度同様、主に YG1024 株で変異原性が認められた[5]。S9mix 添加条件下では、5 試料中 4 試料が陽性、残り 1 試料も擬陽性であった。S9mix 無添加条件下では、5 試料中 1 試料が陽性、2 試料が擬陽性となったが、2 試料では変異原性は認められなかった。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。

表3に、喫煙者尿の OASIS HLB 抽出物の変異原性の測定結果を示す。この表ではメタノール溶出物とジクロロメタン溶出物の結果をまとめて示してある。なお被験者Bのジクロロメタン溶出物については、後述する再現性試験結果(表6)から3回の平均値で示してある。表3から、喫煙者尿の OASIS HLB 抽出試料も、Sep-Pak tC18 抽出試料同様、主に YG1024 株で変異原性が認められた。メタノール溶出物では、S9mix 添加条件下において、5 試料中 1 試料が陽性、3 試料が擬陽性、1 試料が陰性であった。S9mix 無添加条件下において陽性例はなく、2 試料が擬陽性、3 試料が陰性であった。ジクロロメタン溶出物では、S9mix 添加条件下において、5 試料中 4 試料が陽性、残り 1 試料も擬陽性となり、これは Sep-Pak tC18/メタノール溶出試料の結果と同様であった。一方 S9mix 無添加条件下では、5 試料中 3 試料が陽性、1 試料(E)が擬陽性であった。YG1029 株に対しては、いずれの溶媒を用いても、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。

表4に、喫煙者尿の Sep-Pak PS2 抽出物の変異原性の測定結果を示す。この表でもメタノール溶出物とジクロロメタン溶出物の結果をまとめて示してある。表4から、喫煙者尿の Sep-Pak PS2 抽出試料も主に YG1024 株で変異原性が認められた。メタノール溶出物では、S9mix 添加条件下において、5 試料中 3 試料が陽性、1 試料が擬陽性、1 試料が陰性、S9mix 無添加条件下においては 5 試料中 2 試料が陽性、3 試料が陰性であった。ジクロロメタン溶出物では、S9mix 添加条件下において、5 試料中 4 試料が陽性、1 試料が擬陽性であったが、擬陽性例は被験者EではなくCの試料であった。また S9mix 無添加条件下では、5 試料中 1 試料(B)が陽性、3 試料が擬陽性であった。YG1029 株に対

しては、いずれの溶媒を用いても、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。

D. 考察

昨年度は ODS 系固相カラム 2 種類 (Sep Pak tC18 及び Bond Elut C18) と多孔性ケイソウ土カラム K-solute の比較を行った。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。K-solute は、操作性は優れているものの、陰性例が多く検出感度は良くなかった。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などを報告した[5]。

今年度は、ODS 系カラム Sep-Pak tC18 に加えて、新たに湿潤性逆相ポリマー固相である OASIS HLB 及びスチレンジビニルベンゼン共重合体固相である Sep-Pak PS 2 を用い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。OASIS HLB 及び PS2 では中極性のメタノール及び無極性のジクロロメタンの 2 種類の抽出溶媒を用いて比較を行った。

喫煙者 5 名の尿の変異原性の測定結果 (表 2~4) から、今回検討した 3 種類の固相抽出カラムの中では OASIS HLB/ジクロロメタン抽出で比較的良好な結果が得られた。OASIS HLB/ジクロロメタン溶出物では、S9mix 添加条件下において、5 試料中 4 試料が陽性、1 試料が擬陽性、S9mix 無添加条件下では、5 試料中 3 試料が陽性、1 試料が擬陽性となり、今回比較した抽出条件の中では最も高い陽性率を示した。また陽性例の変異原比活性も 7 例中 6 例で最も高い値が得られた。

OASIS HLB カラムでも溶出溶媒にメタノールを使用した場合は、擬陽性例が多く、明瞭な変異原性陽性を示したものは 1 例 (試料 C YG1024 + S9mix) のみであったが、その比活性はジクロ

ロメタン溶出物よりも高い値を示した。同様にポリマー系固相である Sep-Pak PS2 では、OASIS HLB で陽性の結果が得られなかった被験者 E の試料で明瞭な変異原性が確認できるなど、若干異なる変異原性の検出傾向が認められた (表 4)。

表 2~4 から、YG1024 株 (±S9mix) に対する陽性率を比較すると、OASIS HLB/ジクロロメタン (70%) > Sep-Pak tC18/メタノール ≒ Sep-Pak PS2/ジクロロメタン (50%) > Sep-Pak PS2/メタノール (40%) > OASIS HLB/メタノール (10%) の順であった。使用した尿試料は異なるが、Sep-Pak tC18/メタノール抽出物の昨年度における陽性率は 60% となっており、ほぼ同程度であった。50% 以上の陽性率が認められた抽出条件について、同一尿試料の変異原比活性を比較すると、OASIS HLB/ジクロロメタン抽出物の変異原比活性は Sep-Pak tC18/メタノール抽出物のそれより 1.1~2.1 倍と高い数値を示した。これに対して、Sep-Pak PS2/ジクロロメタン抽出物の比活性は Sep-Pak tC18/メタノール抽出物のそれと同程度か若干低い値を示した。

これらの結果を考え合わせると、今回検討した固相抽出手法の中では OASIS HLB/ジクロロメタンが、変異原性陽性率と変異原比活性の観点から比較的良好であることが示唆された。

表 5 は OASIS HLB 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。被験者 B の試料を用い、OASIS HLB カラムを 3 段連結して試料を通過させ、1 段毎に抽出物をジクロロメタン溶出させて、YG1024 株 S9mix 添加・無添加両条件下で変異原性試験に供した。表 5 から、OASIS HLB は 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。この結果から、昨年度検討を行った ODS 系カラム同様、喫煙者の尿試料については複数のカラムを連結せずに十分抽出可能であることが示唆された。

表 6 は OASIS HLB/ジクロロメタン抽出の再現性試験結果を示したものである。被験者 B の試料を用い独立して 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 6 から、OASIS HLB/ジクロロメタン抽出は 3 回とも S9mix 添加の有無にかかわらず明瞭な

変異原性が認められた。S9mix 無添加条件下における変異原比活性（尿 1mL 当りの復帰変異コロニー数）の平均は 19.7、相対標準偏差（変動係数）は 20.3%であった。S9mix 添加条件下における変異原比活性の平均は 30.6、相対標準偏差は 53.9%であった。昨年度実施した Sep-Pak tC18/メタノール抽出における再現性試験では、S9mix 添加条件下のみで明瞭な変異原性が認められ、その相対標準偏差は 14.8%であった。使用した尿試料は異なるものの、相対標準偏差で比較した場合、OASIS HLB は Sep-Pak tC18 よりも抽出誤差が大きくなることが示唆された。

OASIS HLB は、多孔性ポリマーであるジビニルベンゼン-N-ビニルピロリジン共重合体を担体としており、親水性（Hydrophilic）と疎水性（Lipophilic）のバランス（Balance）を考慮してデザインされた（この頭文字が HLB の名称の由来となっている）。このため、酸性、塩基性、中性を問わず高率で再現性のよい回収率を有することが特徴とされている[6]。反面、選択性に欠けることや、尿試料のクロマト分析において、ある種の妨害ピークが認められたことも報告されている[7]。このようなことが変異原性成分の抽出誤差に影響を及ぼす一因となっている可能性も考えられる。

Sep-Pak PS2 は疎水性逆相ポリマーであるスチレンジビニルベンゼン共重合体を担体としている。厚生労働省の水道水中農薬試験法や陰イオン界面活性剤試験法、食品残留農薬試験法など各種公定法にも採用されており、各種水系サンプルに汎用されている。ポリマー系の 2 種類を比較した場合、総体的には親水性・疎水性両化合物に対応している OASIS HLB の方が良好であったが、サンプルによっては Sep-Pak PS2 抽出物でのみ明瞭な陽性を示す場合もあり、抽出される変異原性成分の多様性が示唆された。

昨年度の検討結果[5]も考え合わせると、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～低極性物質であり、試料によってはさらに極性の低い物質や、代謝活性化を必要としない物質も含まれることが示唆された。

表 7 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 7 から、抽出効率や再現性、操作性に経済性なども加味して総合的に判断すると、Sep-Pak tC18 もしくは OASIS HLB が好適であると考えられた。

今後、異種固相のタンデム連結など、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、能動的な喫煙者ばかりでなく受動喫煙者や非喫煙者などにも測定範囲を広げていくことが重要であると思われる。

E. 結論

(1) Sep-Pak tC18 では主に YG1024 株 S9mix 添加条件下で変異原性が認められ、被験尿試料は異なるが昨年と同様の結果が得られた。

(2) 今回比較した固相抽出手法の中では OASIS HLB/ジクロロメタン抽出が、比較的高い陽性率と比活性を示したが、再現性試験では若干大きい変動が認められた。

(3) 被験尿試料によっては Sep-Pak PS2 抽出物でのみ明瞭な陽性を示す場合もあり、抽出される変異原性成分の多様性が示唆された。

[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) 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 22 年度総括・分担研究報告書

- 6) Hennion M C (1999) Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 856, 3-54
- 7) Berges R, Segura J, de la Torre X, Ventura R (1999) Analytical methodology for enantiomers of salbutamol in human urine for application in doping control, J. Chromatogr. B, 723, 173-184

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

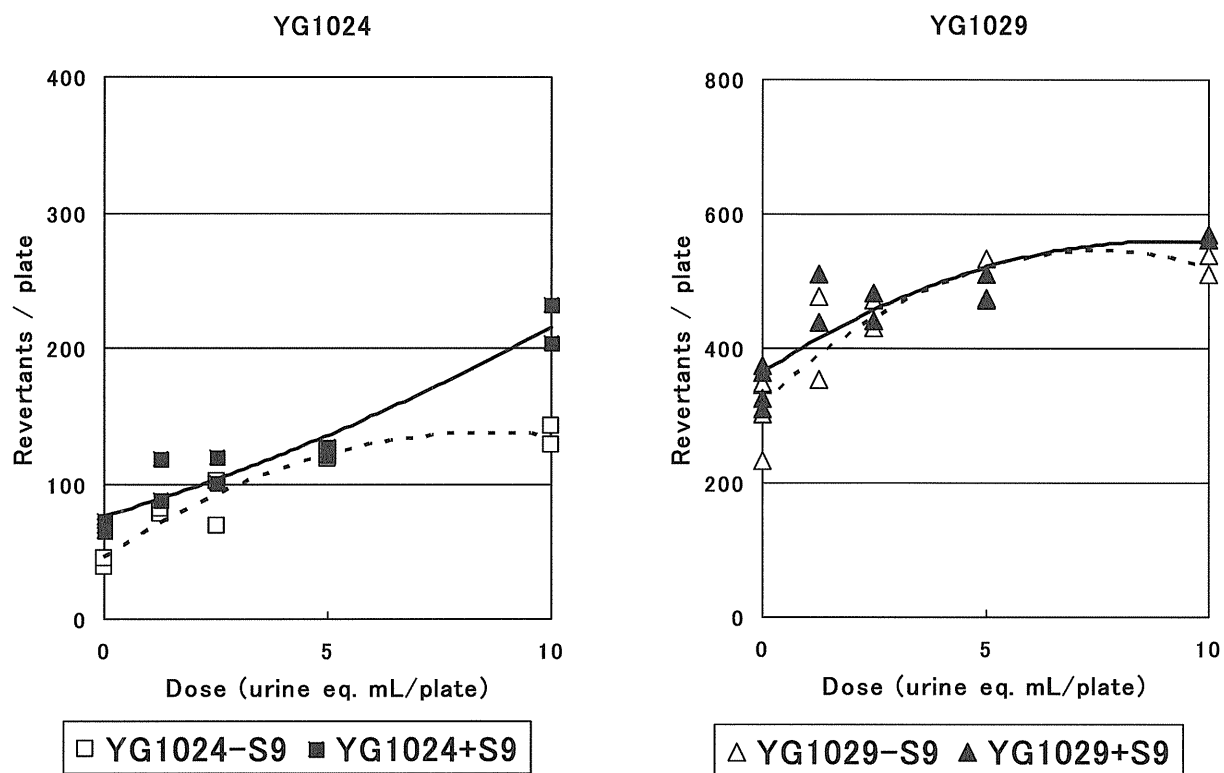


図1 変異原性試験結果の一例

試料：被験者 B OASIS HLB /ジクロロメタン抽出

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

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	54	57	23	21	23
喫煙歴	34	37	3	1	3
銘柄	Caster One	Kent Boost 1	Kent Boost 1	Lark Mint Sprash	Caster Mild
タール量 (mg)	1	1	1	7	3
ニコチン量 (mg)	0.1	0.1	0.1	0.5	0.4
1日平均 喫煙本数	20	25	20	15	12
採尿時 喫煙本数 ^{a)}	21	18	26	17	9
推定曝露ター ル量 (mg) ^{b)}	21	18	26	119	27

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 Sep Pak tC18 抽出物の変異原性試験結果

	CRE ^{b)} mg/dL	比重	変異原比活性 (revertants / mL, equivalent urine) ^{a)}			
			Sep Pak tC18 PLUS / メタノール抽出物			
			YG1024		YG1029	
			-S9	+S9	-S9	+S9
A	151.8	1.015	(7.3)	13.0	0	0
B	90.1	1.013	13.4	20.1	0	0
C	69.3	1.020	0	9.8	0	0
D	104.1	1.015	(6.7)	7.7	0	0
E	73.9	1.030	0	(5.1)	0	0

a) 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。

b) 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)

表3 喫煙者の尿の OASIS HLB 抽出物の変異原性試験結果

	変異原比活性 (revertants / mL, equivalent urine) ^{a)}							
	メタノール溶出物				ジクロロメタン溶出物			
	YG1024		YG1029		YG1024		YG1029	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
A	(9.1)	(18.0)	0	0	0	26.8	0	0
B	0	(14.6)	0	0	21.6 ^{b)}	30.6 ^{b)}	0	0
C	0	14.8	0	0	17.5	10.4	0	0
D	(7.7)	(11.0)	0	0	12.0	12.4	0	0
E	0	0	0	0	(4.3)	(3.6)	0	0

a) 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。

b) 再現性試験結果 (表 6) の平均値

表 4 喫煙者の尿の Sep Pak PS2 抽出物の変異原性試験結果

	変異原比活性 (revertants / mL, equivalent urine) ^{a)}							
	メタノール溶出物				ジクロロメタン溶出物			
	YG1024		YG1029		YG1024		YG1029	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
A	0	0	0	0	(2.1)	10.9	0	0
B	17.1	14.1	0	0	15.9	14.9	0	0
C	0	12.2	0	0	(3.4)	(6.5)	0	0
D	0	(11.7)	0	0	0	8.7	0	0
E	14.0	(6.7)	0	0	(2.7)	7.9	0	0

a) 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 5 OASIS HLB 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
OASIS HLB	1 段目	26.2	31.1
	2 段目	0.0	0.0
	3 段目	0.0	0.0

試料は被験者 B の尿を使用、ジクロロメタンにより溶出
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 6 OASIS HLB 抽出試料の再現性試験結果

尿抽出試料	変異原性	
	-S9	+S9
I	15.4	13.9
II	23.3	46.9
III	26.2	31.1
Mean	21.6	30.6
SD	5.6	16.5
RSD	25.8	53.9

試料は被験者 B の尿を使用、ジクロロメタンにより溶出
 変異原性は尿当量 1 mL 当りの復帰突然変異コロニー数
 SD：標準偏差、RSD：相対標準偏差

表 7 固相抽出カラムの性能比較

名称	Sep Pak tC18	OASIS HLB	Sep Pak PS2
充填剤	ODS (400mg) 粒径：37～55 μm	湿潤性逆相ポリマー (225mg)	スチルビニルベンゼン 共重合体(265mg) 粒径：50 μm
抽出対象	比較的極性広範囲	親水性～親油性 広範囲	農薬等
抽出効率	○	◎	?
再現性	○	△	?
操作性	△ (※)	△ (※)	△ (※)
カタログ単価	¥ 560	¥ 840	¥ 880
判定	○	○	△

※ いずれもポンプなど動力装置が必要

平成 22 年度研究報告データの訂正

平成 22 年度研究報告「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～」においてデータの一部に誤りがありましたので、当該箇所を以下のよう
に訂正させていただきます。

報告書 108 頁 表 2 喫煙者の尿のクレアチニン濃度

	誤	正
A	8.83	→ 88.3
B	19.44	→ 194.4
C	16.68	→ 166.8
D	5.47	→ 54.7
E	8.83	→ 88.3

なお、これに伴い 106～107 頁の図 2 及び図 3 も次頁のように修正させていただきます。

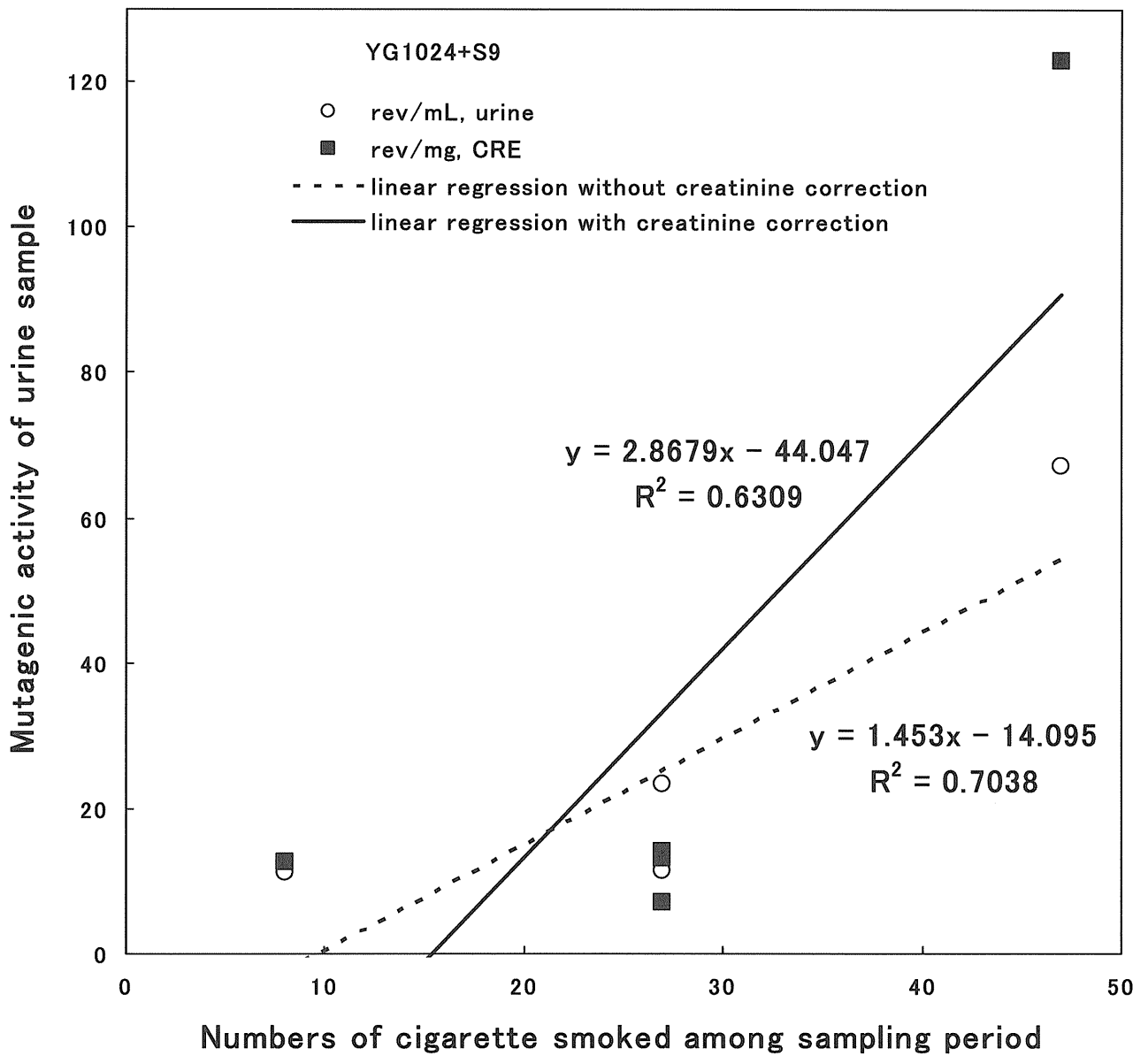


図2 喫煙本数と尿の変異原比活性の相関（修正版）

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

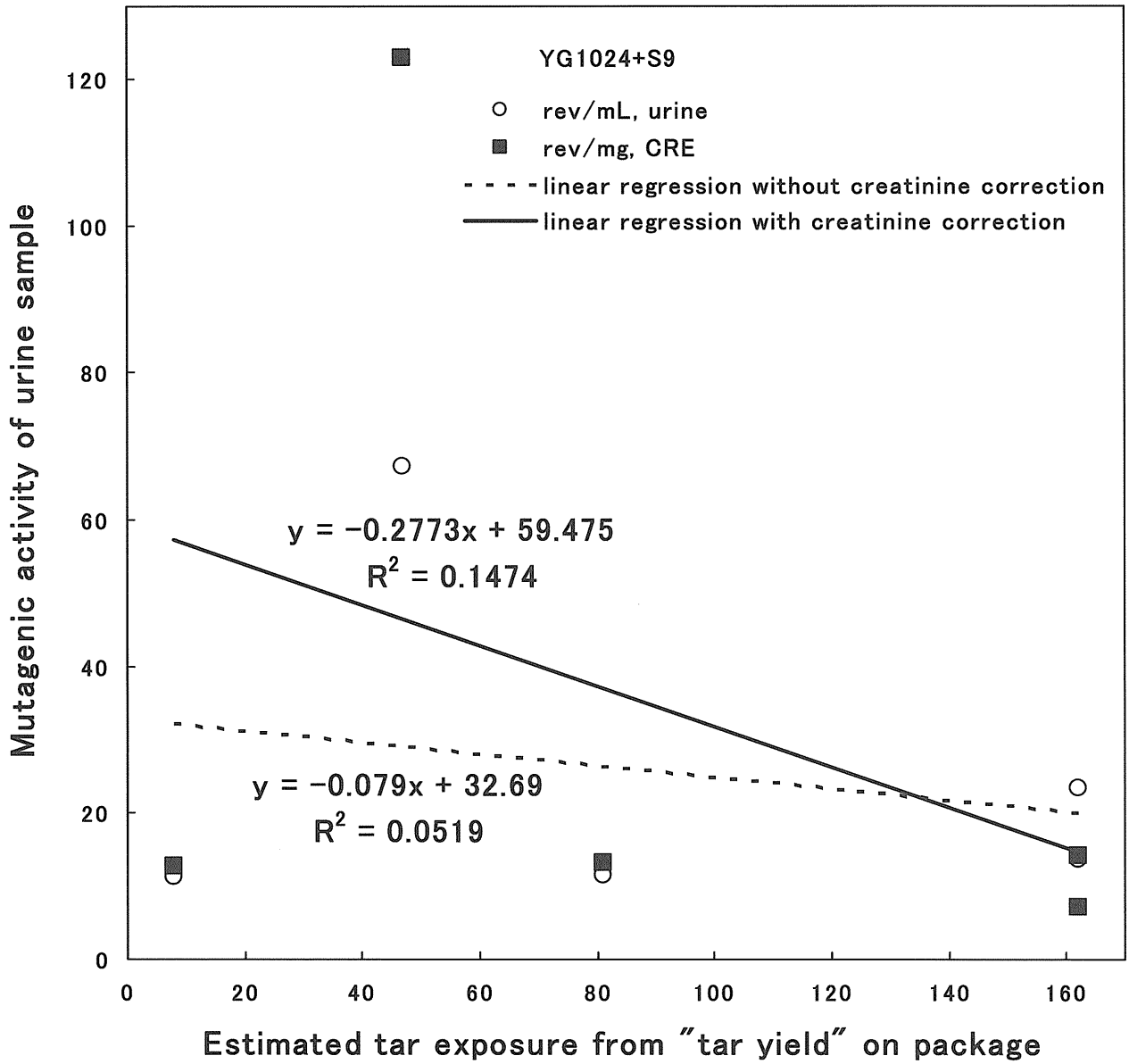


図3 推定曝露タール量と尿の変異原比活性の相関（修正版）

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

喫煙者及び非喫煙者の尿に含まれる重金属類の測定

研究分担者 後藤 純雄 麻布大学

研究分担者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

研究協力者 杉田和俊 三菱化学アナリテック（株）

研究要旨

喫煙が健康に及ぼす影響要因に関する研究の一環として、喫煙者10名の尿と非喫煙者10名の尿を採取しそれらに含まれる発がん関連重金属類など9種をICP/質量分析計（ICP/MS）を用いて測定した。その結果、前年度の研究でたばこの葉から検出されたクロム（Cr）、マンガン（Mn）、コバルト（Co）、ニッケル（Ni）、銅（Cu）、亜鉛（Zn）、ヒ素（As）、カドミウム（Cd）及び鉛（Pb）の9種類の重金属類のうち、Cd（喫煙者2試料及び非喫煙者2試料）、Cu（喫煙者3試料及び非喫煙者3試料）及びCo（喫煙者6試料及び非喫煙者9試料）の3種は定量下限値以下を与えた場合があったが、他の6種は全て測定可能であった。尿中のクレアチニン当たりの各重金属類濃度の喫煙者と非喫煙者との比較から、Cdは喫煙者の尿中濃度が危険率 $p=0.01$ 以下で有意に高いこと、Co、Mn、Ni及びPbの4種でも危険率 $p=0.05$ 以下で有意に高いことなどが認められた。発がんに関連の深いIARCでクラス1の2種では、Cdで約2.4倍（喫煙者0.50ng/mgクレアチニン及び非喫煙者0.21ng/mgクレアチニン）喫煙者の尿中濃度が高かった。また、As（喫煙者58ng/mgクレアチニン及び非喫煙者81ng/mgクレアチニン）では有意差が認められず、喫煙以外の影響が高かったことなどが示唆された。

A. 研究目的

たばこの煙には多くの発がん関連物質が含まれており、それらに発がん関連重金属類が含まれることも知られている¹⁾。これらは喫煙時に生成や混入してくるのではなく、たばこの葉に最初から含まれていることが前年度の本研究で明らかになった²⁾。しかし、たばこの葉に含まれるこれらの重金属類のヒト曝露状況や影響要因を把握するためには、不完全燃焼過程で煙に移行する重金属の種類やその量、気道から取り込まれる重金属の種類やその量、重金属類の体内挙動などを明らかにする必要がある。そこで今年度は、発がん関連重金属類の喫煙による曝露影響要因に関する研究の一環として、喫煙者と非喫煙者の尿を採取し、前年度のたばこの葉から検出された発がん関連重金

属類など9種類のヒト尿中含有量の相違などをICP/MSを用いて測定した。

B. 研究方法

(1) 試料採取

2011年に麻布大学関係者の男性健常者20名（喫煙者10名及び非喫煙者10名）からそれぞれ約1日間の尿を2Lの洗浄ポリエチレンビンに採取した。採取した一部の尿（15mL～30mL）をポリプロピレン製遠心沈殿管に移し、分析試料調製に供するまで冷凍保存（-30℃）した。なお、尿の採取時には簡単なアンケート（喫煙の時間や本数、飲食時間や内容、活動場所などの事項）のほか同意書への記入を依頼した。

(2) マイクロウェーブによる前処理

冷凍保存しておいた尿試料を室温で解凍し、このうち300 μ Lをテフロン製バイアルに採取した。これに700 μ Lの硝酸(60%超高純度試薬; 関東化学社)を加え、マイクロウェーブ(START D; マイルストーン社)処理を行った。マイクロ波出力は1000W、温度は50 $^{\circ}$ C/2min—30 $^{\circ}$ C/1min—180 $^{\circ}$ C/15min(10min)継続とした。処理後室温まで放置し、5mLに超純水で定容しICP/MS分析に供した。ブランク試料も同様の操作で調整した。

(3) ICP/MSを用いた重金属類の分析

今回の重金属類の微量分析には Agilent7700X (Agilent社製) ICP/MSを用いた。リアクションガスにヘリウム及び水素を用い、内部標準元素にはEr(166)を使用した。各元素の検量線はICPマルチエレメントスタンダードXXI MS用(30元素; MERCK社製)を用いて段階的に希釈して作成した。各重金属類の測定質量数は、Cr(52)、Mn(55)、Co(59)、Ni(60)、As(75)、Pb(208)、Cu(63)、Zn(66)及びCd(111)とした。

(4) クレアチニン濃度の測定

クレアチニン濃度測定にはHPLC(LC-9A 島津製作所)を用いた^{3,4)}。約1mLの尿試料を3000rpm、5分間遠心処理し、その上澄みを50%メタノールで100倍希釈し、Capcell Pak C18カラム(資生堂社)で分離し234nmの吸光度を求めた。また、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)を用いて得られたデータとも相互比較した。

C. 研究結果

(1) 尿のクレアチニン濃度及び重金属類濃度

前年度の研究でたばこの葉から検出されたクロム(Cr)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)、ニッケル(Ni)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、ヒ素(As)、カドミウム(Cd)及び鉛(Pb)の9種類をICP/MS分析対象として、喫煙者10名の尿と非喫煙者10名の尿を測定した結果をTable-1に示す。また、Table-1には、検出下限値及び定量下限値(以下の場合括弧付き)も併せて示してある。Table-1から、検出下限値はCr、Mn、Co、Ni、As及びPb

の6種が0.6ng/mL(定量下限値: 1.7ng/mL)、Cuが3.0ng/mL(定量下限値: 8.4ng/mL)、Znが6.0ng/mL(定量下限値: 17ng/mL)となり、Cdでは0.06ng/mL(定量下限値: 0.17ng/mL)となった。定量下限値以下を示したCd(喫煙者2試料及び非喫煙者2試料)、Cu(喫煙者3試料及び非喫煙者3試料)及びCo(喫煙者6試料及び非喫煙者9試料)の場合を除き全て定量可能であった。喫煙者及び非喫煙者の各1試料のCdが検出下限値以下(ND)であった。また、尿のクレアチニン濃度は全ての試料で測定可能であり、20試料の平均値は171.2mg/100mLであった。

(2) 喫煙者及び非喫煙者の尿の重金属類濃度の比較結果

尿のクレアチニン濃度と各重金属類濃度からクレアチニン当たりの各重金属類濃度(μ g/g.cre)を求めTable-2に示した。なおTable-2には、検出下限値以下のCd値を検出下限値の1/2(0.03ng/mL)から算出した平均値 \pm 標準偏差値も併せて示してある。Table-2から、9種の重金属濃度で高い濃度を示したのはZn(喫煙者380 μ g/g.cre及び非喫煙者425 μ g/g.cre)とAs(喫煙者58.8 μ g/g.cre及び非喫煙者81.2 μ g/g.cre)であり、この結果はFig.1aにも示してある。これらの2種の喫煙者及び非喫煙者のデータのt検定では両者間に有意差は認められなかった。なお、Fig1は、喫煙者及び非喫煙者の各尿中重金属濃度の平均値とそれらの最大値及び最小値を示してある。Cr、Mn、Ni、Pb及びCuの結果はFig.1bに示してある。これらのうちCr(喫煙者15.4 μ g/g.cre及び非喫煙者4.49 μ g/g.cre)及びCu(喫煙者32.7 μ g/g.cre及び非喫煙者7.94 μ g/g.cre)に喫煙者及び非喫煙者間の有意差は認められなかったが、Mn(喫煙者8.10 μ g/g.cre及び非喫煙者2.77 μ g/g.cre)、Ni(喫煙者15.4 μ g/g.cre及び非喫煙者3.28 μ g/g.cre)及びPb(喫煙者5.44 μ g/g.cre及び非喫煙者1.53 μ g/g.cre)では危険率p=0.05以下で有意であることが認められた。9種のうち比較的低い濃度を示したのはCoとCdの2種であった。その結果をFig.1cに示してある。このうちCo(喫煙者1.55 μ g/g.cre及び非喫煙者0.93 μ g/g.cre)は危険率p=0.05以下

で有意であることが認められ、最も低い濃度を示した Cd (喫煙者 0.50 μ g/g.cre 及び非喫煙者 0.21 μ g/g.cre) では危険率 $p=0.01$ 以下で有意であることが認められた。

D. 考察

喫煙者 10 名の尿と非喫煙者 10 名の尿中の発がん関連重金属類など 9 種の含有量は Fig.1 に示しているように Zn > As > Cu > Cr \geq Ni > Mn > Pb > Co > Cd の順であった。

尿中濃度の高い Zn や As では喫煙者及び非喫煙者の濃度差はあまり認められず、得られたデータのばらつきも他の重金属類に比べて大きくなかった。前年度の本研究²⁾ でたばこの葉に含まれる As 含有量は 0.2 μ g/g と他の重金属類よりも少なかったことから、喫煙以外の飲食などの要因が大きかったことが推測される。また、たばこの葉の Zn 含有量は 31~39 μ g/g であり、Mn の 127~167 μ g/g よりも低い値であったが尿中の Zn は Mn より高い濃度を示した。従って、Zn も As の場合と同様に喫煙以外の影響が大きかったものと考えられる。たばこの葉中の含有量が 127~167 μ g/g と最も高かった Mn は尿中の濃度が比較的良かったものの喫煙者の方が高い値 ($p=0.05$ 以下) を示したことから、たばこの葉に含まれる Mn の一部が喫煙を介してヒトに取り込まれたものと考えられる。

尿中の濃度が Cu > Cr \geq Ni > Pb > Co を与えた 5 種の重金属類のたばこの葉の含有量²⁾ は Cu (10.0~11.7 μ g/g) > Cr (1.1~1.8 μ g/g) \geq Ni (1.2~1.7 μ g/g) > Pb (0.6~1.2 μ g/g) > Co (0.4~0.6 μ g/g) であり尿中濃度の示す順と同じ順となっていた。この 5 種のうち Ni、Pb 及び Co の尿中濃度は喫煙者の方が有意に高い値 ($p=0.05$ 以下) を示していた。また、Cu 及び Cr では今回の検体数ではその有意差は認められなかったが平均値では Ni、Pb 及び Co の場合と同様に喫煙者の方が高い値を示していた。従って、これらの 5 種類の重金属類は、喫煙→取り込み→尿中への排泄などの挙動が類似しているものと考えられた。たばこの葉中濃度で同レベルの濃度を示した

Cd と Pb では Cd の尿中濃度が比較的良かった。しかし尿中 Cd の場合は、喫煙者の尿中濃度が危険率 $p=0.01$ 以下で非喫煙者よりも有意に高いことが認められた。これらから Pb など 5 種の重金属類の挙動と Cd の挙動は少し異なる可能性がある。

今回測定した発がんに関連の深い IARC でクラス 1 の 2 種では、Cd で約 2.4 倍 (喫煙者 0.50ng/mg クレアチニン及び非喫煙者 0.21 ng/mg クレアチニン) 喫煙者の尿中濃度が高かった。また、As (喫煙者 58ng/mg クレアチニン及び非喫煙者 81 ng/mg クレアチニン) では有意差が認められず、喫煙以外の影響が高かったことなどが示唆された。今回の重金属類の分析に必要であった尿試料は 0.3mL、クレアチニン分析用を加えても 1.5mL 程度で少なかった。多検体採取が比較的容易になることから、今後、尿中濃度の経時変化や受動喫煙レベルの調査研究に利用できる可能性が高い。

E. 結論

発がん物質の曝露実態把握のための基礎資料作成は発がんリスク低減対策に極めて重要である。本研究ではたばこ喫煙に伴う発がん関連物質の経気道曝露に関して重金属類を取り上げ、喫煙者 10 名の尿と非喫煙者 10 名の尿を採取しそれらに含まれる発がん関連重金属類 9 種を ICP/MS を用いて測定し比較した。その結果、前年度の研究でたばこの葉から検出された 9 種類の重金属類のうち、Cd (喫煙者 2 試料及び非喫煙者 2 試料)、Cu (喫煙者 3 試料及び非喫煙者 3 試料) 及び Co (喫煙者 6 試料及び非喫煙者 9 試料) の 3 種は定量下限値以下を与えた場合があったが、他の 6 種は全て測定可能であった。尿中のクレアチニン当たりの各重金属類濃度の喫煙者と非喫煙者との比較から、Cd は喫煙者の尿中濃度が危険率 $p=0.01$ 以下で有意に高いこと、Co、Mn、Ni 及び Pb の 4 種でも危険率 $p=0.05$ 以下で有意に高いことなどが認められた。発がんに関連の深い IARC でクラス 1 の 2 種では、Cd で約 2.4 倍 (喫煙者 0.50ng/mg クレアチニン及び非喫煙者 0.21 ng/mg クレアチニン) 喫煙者の尿中濃度が高かった。また、As (喫煙者 58ng/mg クレアチニン及び非喫煙者 81 ng/mg クレ

アチニン)では有意差が認められず、喫煙以外の影響が高かったことなどが示唆された。これらのことから、たばこ喫煙に伴う尿中発がん関連重金属類の測定では他の要因(Asの場合など)を考慮すれば発がん関連化学物質対策に有効である可能性が高い。

F. 引用文献

- [1] IARC: Tobacco smoke and involuntary smoking (in; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol.83) WHO, Lyon, France (2004).
- [2] 後藤純雄、稲葉洋平、杉田和俊: たばこの葉に含まれる重金属類の測定、たばこ規制枠組み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;厚生労働科学研究費補助金平成22年度総括・分担研究報告書,2011,65-68.

- [3] Hausen, A., Fuch, D., Wachter, H.; Determination of creatinine in urine by HPLC. J. Cli. Chem. Biochem., (1981) 19(6), 375-378.
- [4] Kuo, C. T.: Study on Creatinine Analyzed with HPLC and Jaffe's, J. Occup. Safety and Health (1993),1(2), 75-82.

G. 研究発表

統括報告書に一括記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table-1喫煙者及び非喫煙者のクレアチニン及び重金属類の尿中濃度

Urin Sample	creatinine [mg/100mL]	Cr [ng/mL]	Mn [ng/mL]	Co [ng/mL]	Ni [ng/mL]	As [ng/mL]	Pb [ng/mL]	Cu [ng/mL]	Zn [ng/mL]	Cd [ng/mL]
Non-smoker-1	216	7.0	4.5	(1.5)	4.0	63	2.7	14	1200	(0.10)
Non-smoker-2	60	3.7	4.1	(1.2)	3.1	33	2.2	(4.2)	200	ND
Non-smoker-3	171	8.1	4.4	(1.3)	3.9	150	2.8	8.4	630	0.27
Non-smoker-4	323	7.7	4.8	(1.4)	4.7	150	2.6	57	1900	0.76
Non-smoker-5	219	3.3	3.8	(1.4)	4.0	280	2.5	15	1000	0.27
Non-smoker-6	272	5.2	4.2	(1.4)	4.4	110	3.1	19	650	0.46
Non-smoker-7	115	6.1	4.5	(1.3)	3.1	93	1.9	(5.0)	350	0.27
Non-smoker-8	302	8.7	4.3	(1.4)	6.8	270	2.4	24	1200	0.98
Non-smoker-9	225	25	4.2	2.8	12	110	2.9	22	1100	0.51
Non-smoker-10	109	6.2	4.6	(1.5)	9.2	230	2.1	(8.2)	530	0.58
Smoker-1	74	4.1	4.0	(1.2)	3.3	15	4.3	(4.8)	380	ND
Smoker-2	107	5.5	5.1	(1.4)	4.2	81	2.4	8.9	600	(0.08)
Smoker-3	339	5.0	4.7	2.7	6.0	150	4.8	44	1000	0.67
Smoker-4	144	26	29	3.9	80	46	19	16	690	1.7
Smoker-5	141	10	10	2.0	23	44	6.7	10	320	0.72
Smoker-6	73	9.4	11	1.9	27	44	10	(6.8)	180	0.42
Smoker-7	86	6.5	6.5	(1.5)	14	61	4.3	(6.8)	390	0.49
Smoker-8	194	9.3	4.8	(1.4)	9.7	120	2.6	14	600	0.30
Smoker-9	159	30	8.4	(1.5)	9.2	180	5.3	74	490	1.1
Smoker-10	94	68	12	(1.6)	8.5	71	3.5	197	390	0.96
Detection limit	-	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	3	6	0.06
Quantitative limit	-	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	8.4	17	0.17

Numbers in parenthesis are under quantitation limit

Table-2 喫煙者及び非喫煙者のクレアチニン当たりの尿中重金属類濃度

Urin Sample	creatinine [mg/100mL]	Cr [μg/g·CRE]	Mn [μg/g·CRE]	Co [μg/g·CRE]	Ni [μg/g·CRE]	As [μg/g·CRE]	Pb [μg/g·CRE]	Cu [μg/g·CRE]	Zn [μg/g·CRE]	Cd [μg/g·CRE]
Non-smoker-1	216	3.2	2.1	(0.69)	1.9	29	1.3	6.6	570	(0.05)
Non-smoker-2	60	6.1	6.9	(2.1)	5.2	55	3.7	(7.0)	330	ND
Non-smoker-3	171	4.8	2.6	(0.78)	2.3	87	1.6	4.9	370	0.16
Non-smoker-4	323	2.4	1.5	(0.44)	1.4	46	0.8	18	590	0.23
Non-smoker-5	219	1.5	1.7	(0.65)	1.8	127	1.2	6.7	470	0.13
Non-smoker-6	272	1.9	1.5	(0.52)	1.6	41	1.2	6.9	240	0.17
Non-smoker-7	115	5.3	3.9	(1.1)	2.7	80	1.7	(4.3)	300	0.24
Non-smoker-8	302	2.9	1.4	(0.46)	2.2	90	0.8	7.9	400	0.33
Non-smoker-9	225	11	1.9	1.25	5.2	49	1.3	9.8	500	0.23
Non-smoker-10	109	5.7	4.2	(1.3)	8.5	207	1.9	(7.5)	490	0.54
Non-smoker-Ave.	201	4.5	2.8	0.93	3.3	81	1.5	7.9	426	0.23
Smoker-1	74	5.5	5.4	(1.6)	4.4	20	5.8	(6.5)	510	ND
Smoker-2	107	5.1	4.7	(1.3)	3.9	76	2.2	8.3	560	(0.07)
Smoker-3	339	1.5	1.4	0.80	1.8	45	1.4	13	300	0.20
Smoker-4	144	18	20	2.67	55	32	13	11	480	1.2
Smoker-5	141	7.4	7.1	1.39	17	31	4.7	7.1	220	0.51
Smoker-6	73	13	14	2.54	36	61	14	(9.2)	250	0.57
Smoker-7	86	7.6	7.6	(1.8)	16	71	5.0	(7.9)	460	0.58
Smoker-8	194	4.8	2.5	(0.71)	5.0	64	1.4	7.3	310	0.15
Smoker-9	159	19	5.3	(0.96)	5.8	110	3.3	47	310	0.71
Smoker-10	94	72	12	(1.7)	9.0	75	3.7	210	410	1.0
Smoker-Ave.	141	15.4	8.1	1.55	15.4	58	5.4	32.7	381	0.56

ND:DL/2/CRE

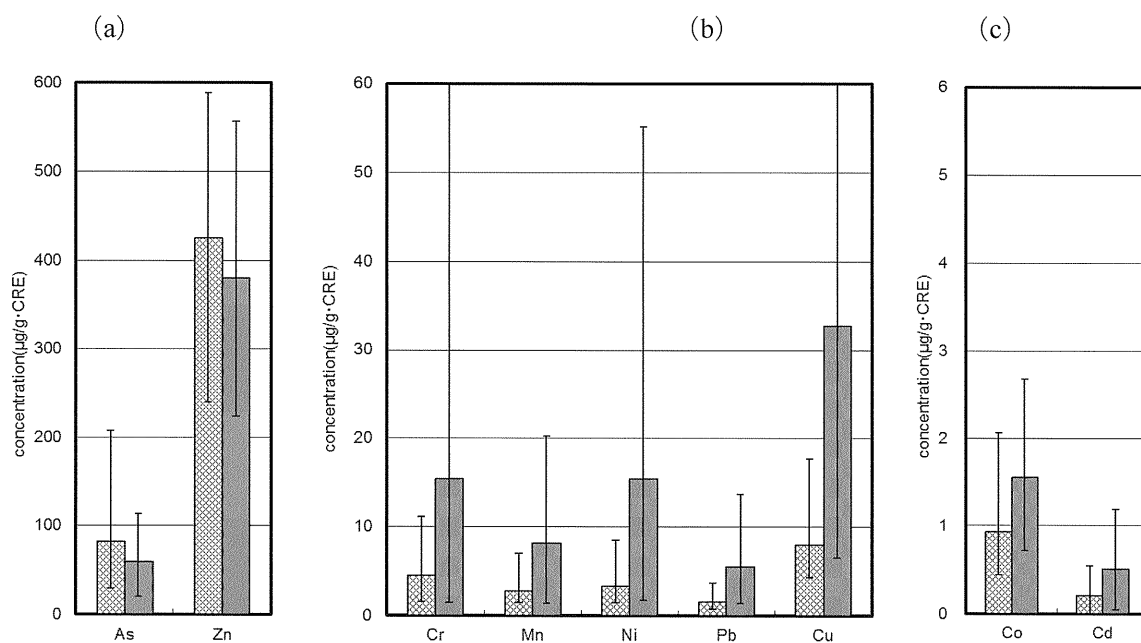


Fig.1 喫煙者と非喫煙者の尿中重金属類濃度の平均値（含最大値及び最小値）の比較

■喫煙者の尿中重金属濃度、▨非喫煙者の尿中重金属濃度