

令和6年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

LC/MS/MS を使用した DNA/RNA 損傷体一斉分析法の開発と現在のリクルート状況

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院
研究分担者 大澤絵里 国立保健医療科学院
研究分担者 溝上哲也 国際医療研究センター
研究分担者 瀬瀬朋弥 岐阜大学
研究分担者 牛山 明 国立保健医療科学院

研究背景・目的 ; たばこ煙には 5,300 種類以上の有害化学物質が含まれ、IARC 発がん性リスクグループ 1 に分類される 1,3-ブタジエン、NNK、ベンゾ[a]ピレンなどの発がん性物質や、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドなどの揮発性有機化合物が確認されている。これらの複合曝露により、がん、動脈硬化、呼吸器疾患などのリスクが増大する。

喫煙による健康影響は酸化・メチル化による遺伝情報分子の損傷が関与し、従来は DNA 損傷マーカーが評価指標とされてきたが、近年 RNA も同様に損傷を受けることが明らかとなった。本研究では、DNA/RNA 損傷体・修飾体を高感度 LC/MS/MS 法で定量し、喫煙曝露および喫煙関連疾患との関連性を検討することで、非侵襲的健康影響評価および疾患予測・重症度評価への応用を目的とした。

研究方法 ; 尿中 DNA/RNA 損傷体 10 成分を分析対象とし、固相抽出には ODS-AQ-HG カラムを使用した。分析には高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS ; Qtrap5500) を用い、ACQUITY Premier T3 カラム (1.8 μ m, 2.1 \times 150 mm) を採用した。

研究結果及び考察 ; 従来多用されていた HILIC カラムに代わり、ACQUITY Premier T3 カラムを採用することで、分子構造が類似する 1-Mad と 3-Mad、8-OHdG と 8-OHGuo の良好な分離を実現した。DNA/RNA 損傷体ピーク付近の妨害成分との識別も明確になり、10 成分すべての同時分析が可能となった。検量線作成では低濃度領域での高精度分析が可能となり、実際の尿試料含有量に対応した適切な定量範囲を確立した。

現在、職域でのサンプル収集が順調に進行し、2025 年度分を含めると約 2,000 検体に達する見込みである。

今後の計画 ; 最終年度には確立した分析法を用いて大規模一斉分析を実施し、日本人喫煙者における異なるたばこ製品間の比較、受動喫煙者の曝露状況調査を行う。DNA/RNA 損傷体および 8-isoprostane を影響マーカーとして健康診断結果との関連性解析を実施する。本研究により開発された分析法は、喫煙による健康影響の早期検出と疾患予測への応用が期待され、非侵襲的な健康管理手法の実用化に貢献する。

A. 研究目的

たばこ煙には、有害化学物質が含まれており[1]、喫煙によって発生する複数の有害化学物質の複合曝露によって生体への健康影響が報告されている。たばこの主流煙には 5,300 種類以上の化学物質が含まれていると報告されており[2]その主流煙には、IARC の発がん性リスク一覧のグループ 1 とされた化合物が確認されている (1,3-ブタジエン、NNK、NNN、ベンゾ[a]ピレン)。グループ 1 には、厚生労働省によって室内濃度指針値が定められているホルムアルデヒドが指定され、有害化学物質のアセトアルデヒド、アクロレイン、アクリルアミド、アクリロトリルなどの揮発性有機化合物なども含まれている[1]。室内濃度指針値の対象物質以外にも有害化学物質 (グループ 2A) として、アクリルミドなども報告されている。

これまでに我々は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の尿中揮発性有機化合物代謝物の分析法を確立し、日本人喫煙者、受動喫煙者の揮発性有機化合物代謝物 (Volatile Organic Compounds: VOC 代謝物)、多環芳香族炭化水素類の水酸化多環芳香族炭化水素 (OH-PAHs) などの曝露マーカー分析を行ってきた[3]。

さらに喫煙はがん、動脈硬化、呼吸器疾患など多くの疾患の主要なリスク因子であり、酸化・メチル化による遺伝情報分子の損傷が病態進展に深く関与する。これまで DNA 損傷 (例: 8-OHdG、O6-methylguanine) は喫煙関連損傷の代表的指標とされてきたが、RNA も同様に酸化やメチル化の標的となることが明らかになってきた。特に、8-oxoguanosine (8-oxoGsn) や 6-methylguanosine (m6G) は RNA 損傷マーカーとして注目されている。そこで本研究では、これらの DNA/RNA 損傷体・修飾体を高感度 LC/MS/MS 法で定量し、喫煙曝露および喫煙関連疾患 (COPD、心血管疾患) との関連性を検討することで、将来的には非侵襲的健康影響評価

および疾患予測・重症度評価への応用を目的とした。

B. 研究方法

(1) 試薬

試薬は、ギ酸、酢酸、MeOH は、(LC/MS 用、富士フィルム 和光純薬株式会社製) を使用した。アセトニトリル、酢酸アンモニウム、8-OHdG は Sigma Aldrich 製を使用した。

その他の試薬は、8-OHGuo (Cayman Chemical)、6-O-MG、7-MGuo (東京化成工業株式会社)、7-MG、6-O-MGuo、7-MGuo-*d*3、1-Mad、3-Mad、3-MAd-*d*3、1-MAdo、1-MAdo-*d*3、8-OHGuo-*13C*,*15N*2 (Toronto Research Chemicals Inc.)、6-O-MG、7-MG-*d*3、8-OHdG,*15N*5 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を使用した (Table 1)。

(2) 尿中 DNA/RNA 損傷体の分析

尿中 DNA/RNA 損傷体は、Table 1 に示す 10 成分を分析対象とした。尿中 DNA/RNA 損傷体の固相抽出には、ODS-AQ-HG (YMC 社製) を 3 mL 容のカラムに充填し使用した。尿中 DNA/RNA 損傷体の分析は、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS ; Qtrap5500, SCIEX 社製) を使用した。LC 条件は HILIC,C18 カラムを比較検討して使用した。本分析法は、分析カラムによって生体試料の結果をもとに成分分離に効果が確認されたカラム Waters 社製、ACQUITY™ Premier T3 (1.8 μm, 2.1x150 mm) を採用した。

C. 研究結果及び考察

(1) LC/MS/MS による DNA/RNA 損傷体の分析

先行研究によると HILIC による分析を行う報告 [3-6]が多い傾向にあったが、本研究では分析カラムを ACQUITY™ Premier T3 (1.8 μm, 2.1x150 mm) を使用した。喫煙者尿のクロマトグラムを見ると分子構造が近い 1-Mad と 3-Mad、8-OHdG と 8-OHGuo の分離が良好であった (Fig. 1)。それ以外

にも DNA/RNA 損傷体ピーク付近に確認されていた他成分のピークとの見分けも明確になった。また、本分析法によって、分析対象物質 10 成分の分析が可能となった。本研究では今後、新たに開発した改良した DNA/RNA 損傷体分析法を使用して研究を推進する計画である。

(2) 検量線

本分析法を使用して検量線を作成したところ、検量線の低濃度領域の分析が可能となった (Table 2)。尿試料に含まれる含有量の分析が可能な定量範囲となっていた。Table 2 において尿試料の分析濃度範囲が拡大している理由は、尿試料の前処理で尿試料を 5 倍希釈することになるためである。

(3) 現在のリクルート状況

現在、職域のリクルート状況は順調に進んでおり、2025 年度の尿試料を含めると 2,000 検体程度になる。最終年度は、これまで開発した分析法をもとに一斉分析を実施し、日本人喫煙者のたばこ製品間の比較、受動喫煙者の曝露状況などを調査していく、さらに影響マーカーとして考えている DNA/RNA 損傷体、8-isoprostane の分析による評価は、健康診断結果との関連性を含めて行っていく。

D. 結論

本研究では、喫煙による健康影響評価のため、尿中 DNA/RNA 損傷体の高感度分析法を開発し、将来的な疾患予測・重症度評価への応用を目指した基礎研究を実施した。

研究成果として、LC/MS/MS 法を用いた 10 成分の DNA/RNA 損傷体分析法を確立した。特に、従来多用されていた HILIC カラムではなく、ACQUITY Premier T3 カラムを採用することで、分子構造が類似する化合物 (1-Mad と 3-Mad、8-OHdG と 8-OHGuo) の良好な分離を実現し、他の妨害成分との識別も明確化した。開発した分析法では、尿試料中の含有量に対応した適切な定量範

囲での検量線作成が可能となった。

現在、職域でのサンプル収集が順調に進行しており、2025 年度分を含めると約 2,000 検体に達する見込みである。最終年度には、確立した分析法を用いて大規模な一斉分析を実施し、日本人喫煙者における異なるたばこ製品間の比較、受動喫煙者の曝露状況調査を行う予定である。さらに、DNA/RNA 損傷体や 8-isoprostane を影響マーカーとして、健康診断結果との関連性解析を通じて、非侵襲的な健康影響評価手法の実用化を図る計画である。

[引用文献]

- [1] IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 83: 1-1438, 2004.
- [2] Rodgman A, Perfetti TA. Alphabetical Component Index. In: The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. Rodgman A, Perfetti TA, editors. Boca Raton, FL: CRC Press, 1483-1784, 2009.
- [3] Rodríguez-Gonzalo E, Herrero-Herrero L, García-Gómez D. Development, validation and application of a fast analytical methodology for the simultaneous determination of DNA- and RNA-derived urinary nucleosides by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016;1019:132-9.
- [4] Gątarek P, Kałużna-Czaplińska J, Pawełczyk M, Jastrzębski K, et.al.. LC-MS/MS Determination of Modified Nucleosides in The Urine of Parkinson's Disease and Parkinsonian Syndromes Patients. Molecules. 2020;25(21):4959.
- [5] Guo C, Hu Y, Cao X, Wang Y. HILIC-MS/MS for the Determination of Methylated Adenine Nucleosides in Human Urine. Anal Chem. 2021;93(51):17060-17068.

[6] Fang Z, Hu Y, Hong X, Zhang X, Pan T, Pan C, Zheng S, Guo C. Simultaneous Determination of Methylated Nucleosides by HILIC-MS/MS Revealed Their Alterations in Urine from Breast Cancer Patients. *Metabolites*. 2022;12(10):973.

F. 研究発表

1. 論文発表

稲葉洋平. 「新しいタバコに関する知識とエビデンス」加熱式タバコの有害化学物質と健康への影響. *調剤と情報* 2024;30:1588-1594.

2. 学会発表

1. 内山茂久, 稲葉洋平, 磯部友彦, 中山祥嗣. rans-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレンと 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いる空気中二酸化窒素, オゾン, カルボニル化合物の同時分析. 第3回環境化学物質合同大会、広島、2024.7.3-5 ; 同 Web 抄録集.

2. 齋藤みのり, 内山茂久, 稲葉洋平, 小倉裕直, 牛山明, 林基哉. 夏期と冬期における室内空气中ガス状化学物質の動態. 第3回環境化学物質合同大会、広島、2024.7.3-5 ; 同 Web 抄録集.

3. 稲葉洋平, 磯部秀太, 飯島健太郎, 楠瀬翔一, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 加熱式たばこ IQOS 互換機から発生する主流煙芳香族アミン類の分析. 日本分析化学会第73年会、名古屋、2024.9.11-13 ; 同講演要旨集 P3121.

4. 内山茂久, 稲葉洋平, 牛山明. 電子タバコから発生する熱分解物質(アルデヒド類)の発生メカニズム. 第83回日本公衆衛生学会総会、札幌、2024.10.29-31 ; 同講演抄録集 p608.

5. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 加熱式たばこ主流煙に含まれるアクリルアミドの

実態調査. 第61回全国衛生科学技術協議会年会、大阪、2024.11.21-22 ; 同講演集 p194-195.

6. 内山茂久, 高口倅暉, 江口哲史, 稲葉洋平, 磯部友彦, 中山祥嗣. BPE/DNPH 含侵シリカゲルを用いる空気中二酸化窒素, オゾン, カルボニル化合物の同時分析. 2024年室内環境学会学術大会. 札幌、2024.11.30-12.1 ; 同講演要旨集 p115-116.

7. 齋藤みのり, 内山茂久, 稲葉洋平, 金勲, 小倉裕直, 牛山明, 林基哉. 拡散サンプラーによる仮設住宅と一般住宅におけるガス状化学物質のモニタリング. 2024年室内環境学会学術大会. 札幌、2024.11.30-12.1 ; 同講演要旨集 p121-122.

8. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 紙巻たばこ・加熱式たばこ主流煙に含まれるアクリルアミドの分析と比較. 2024年室内環境学会学術大会. 札幌、2024.11.30-12.1 ; 同講演要旨集 p243-244.

9. 稲葉洋平. 「シンポジウム8 メディカルスタッフが知っておきたい禁煙支援と加熱式タバコや電子タバコの有害性」日本の加熱式タバコと電子タバコの有害成分と喫煙者への曝露成分の実態調査. 第54回日本口腔インプラント学会学術大会、京都、2024.11.1-3. Web 講演集.

10. 稲葉洋平. 「セッション1 加熱式たばこは生活習慣病のリスクを上げるか?」「加熱式タバコそのものの有害性(成分分析と曝露評価)」第6回禁煙推進学術ネットワーク学術会議、東京、2024.11.16 ; 同抄録集 p6.

11. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 楠瀬翔一, 内山茂久, 牛山明. 加熱式たばこ主流煙の分析—有害化学物質90%削減は本当なのか?— 第95回日本衛生学会学術総会、埼玉、2025.3.19-21; 同講演要旨

集.S213.

12. 稲葉洋平. シンポジウム「販売開始から 10 年経過した加熱式たばこの実態から禁煙支援を考える」 加熱式たばこは本当に有害性が低減されているのか? 第 34 回日本禁煙推進医師歯科医師連盟学術総会、埼玉、2025.3.1-2;同講演抄録集. P14.

13. 稲葉洋平、内山茂久、戸次加奈江、楠瀬翔一、牛山明. 国内販売の加熱式たばこ 50 銘柄の主流煙成分の比較による加熱式たばこの評価 日本薬学会第 145 年会、福岡、2025.3.26-29;同講演要旨集. P2258.

14. 多良春希、吉田さくら、安孫子ユミ、戸次加奈江、稲葉洋平、鳥羽陽. 加熱式たばこ製品の主流煙に含まれるヒドロキノロン類とベンゾキノロン類の濃度比較. 日本薬学会第 145 年会、福岡、2025.3.26-29;同講演要旨集. P4283.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

Table 1 分析対象の DNA/RNA 損傷体

分析対象成分		内部標準物質	
1-MAd	1-Methyladenine	3-MAd- <i>d3</i>	3-Methyladenine- <i>d3</i>
3-MAd	3-Methyladenine		
1-Madno	1-Methyladenosine	1-MAdo- <i>d3</i>	1-Methyladenosine- <i>d3</i>
6-Madno	6-Methyladenosine	6-Maden- <i>d3</i>	6-Methyladenosine- <i>d3</i>
6-O-MG	6-O-Methylguanine	6-O-MG- <i>d3</i>	6-O-Methylguanine- <i>d3</i>
7-MG	7-Methylguanine	7-MG- <i>d3</i>	7-Methylguanine- <i>d3</i>
6-O-MGuo	6-O-Methylguanosine	6-O-Mguo- <i>d4</i>	6-O-Methylguanosine- <i>d4</i>
7-MGuo	7-Methylguanosine	7-MGuo- <i>d3</i>	7-Methyl- <i>d3</i> -guanosine
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine	8-OHdG,15N5	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine,15N5
8-OHGuo	8-Hydroxyguanosine	8-OHGuo-13C,15N2	8-Hydroxyguanosine-13C,15N2

Table 2 DNA/RNA 損傷体の内部標準物質と検量線範囲

略称	DNA/RNA損傷体	内部標準	検量線濃度範囲 (ng/mL)	
			LC/MS/MS	尿試料
1-MAd	1-Methyladenine	3-Methyladenine- <i>d3</i>	0.1-20	0.5-100
3-MAd	3-Methyladenine	3-Methyladenine- <i>d3</i>	0.05-20	0.25-100
1-Madno	1-Methyladenosine	1-Methyladenosine- <i>d3</i>	5-2000	25-10000
6-Madno	6-Methyladenosine	6-Methyladenosine- <i>d3</i>	0.2-200	1-1000
6-O-MG	6-O-Methylguanine	6-O-Methylguanine- <i>d3</i>	0.05-20	0.25-100
7-MG	7-Methylguanine	7-Methylguanine- <i>d3</i>	5-1000	25-10000
6-O-MGuo	6-O-Methylguanosine	6-O-Methylguanosine- <i>d4</i>	0.05-20	0.25-100
7-MGuo	7-Methylguanosine	7-Methyl- <i>d3</i> -guanosine	0.5-200	2.5-10000
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine,15N5	0.1-20	0.5-100
8-OHGuo	8-Hydroxyguanosine	8-Hydroxyguanosine-13C,15N2	0.2-20	1-100

(A)標準尿試料(喫煙者)

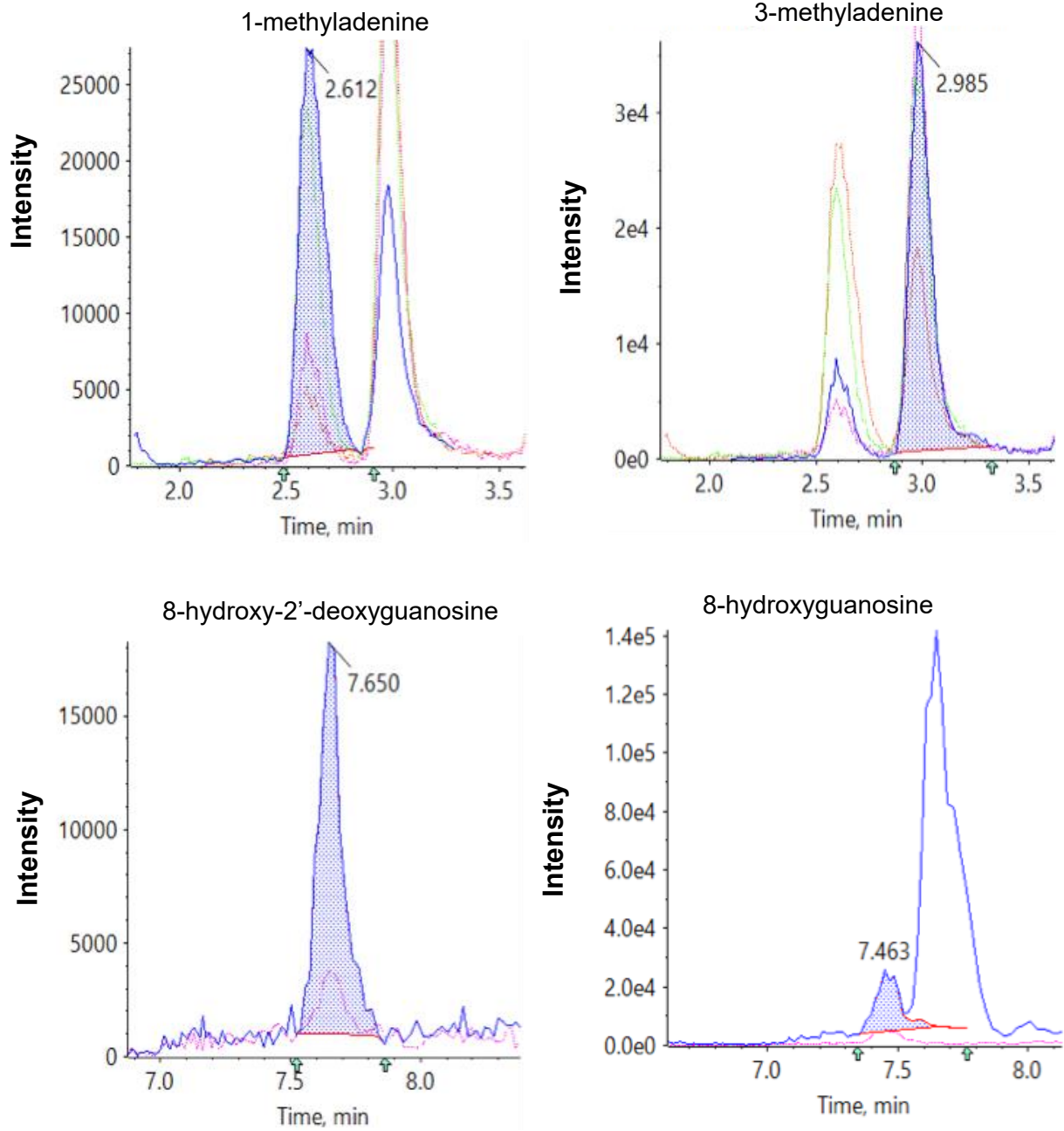


Fig. 1 DNA/RNA 損傷体のクロマトグラム
(A)尿試料