

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790553

研究課題名（和文） 喫煙者の呼気中ガス成分と酸化ストレスマーカー及び吸煙行動の因果関係の解明

研究課題名（英文） Causal relationship among the exhaled gas constituents, oxidative stress markers and smoking behaviors in smokers

研究代表者

稲葉 洋平（INABA YOHEI）

国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任研究官

研究者番号：80446583

研究成果の概要（和文）：我々は、固相抽出と GC/MS または LC/MS/MS を組合せた呼気中の揮発性有機化合物，尿中の 8-isoprostane 及びニコチン代謝物の測定法の確立を行った。これらの手法を用いて喫煙者の酸化ストレスマーカー，ニコチン代謝物及び喫煙行動との関連性を解析した。その結果，8-OHdG は 1 日の喫煙本数，1 日の総吸煙量，尿中コチニンに有意であった（ $p<0.05$ ）。iPF_{2a} は，年齢，唾液中コチニン，尿中 3-ヒドロキシコチニンに有意であった（ $p<0.05$ ）。一方で，呼気中一酸化炭素と尿中酸化ストレスマーカーとの関連性は，認められなかった。

研究成果の概要（英文）：We established the methods for determination of the terminal-expiratory volatile organic compounds, urinary 8-isoprostane and nicotine metabolites by solid phase extraction with GC/MS and LC/MS/MS. The association with the oxidation stress marker, nicotine metabolites and the smoking pattern about smokers was statistically analyzed. The amounts of urinary 8-OHdG was statistically significant in number of cigarettes smoked per day, total smoked puff volume per day and urinary cotinine ($p<0.05$). The amounts of iPF_{2a}-III was statistically significant in the age, salivary cotinine and urinary 3-hydroxycotinine ($p<0.05$). On the other hand, the association with breath carbon monoxide and oxidative stress markers was not observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1000000	0	1000000
2011 年度	1400000	0	1400000
2012 年度	600000	0	600000
年度			
年度			
総計	3000000	0	3000000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：呼気中ガス成分，酸化ストレス，揮発性有機化合物，尿中ニコチン代謝物，F₂-isoprostane 類

1. 研究開始当初の背景

日本における喫煙率は，平成 18 年度の厚生労働省国民健康栄養調査によると 23.8%（全体）（男性 39.9%，女性 10.0%）である。

喫煙が，がんをはじめとする様々な疾病の要因となっており，それ故，生体への影響は計り知れないものがあることを考えると上記喫煙率は，看過できない数値である。近年，

喫煙による生体への影響のうち、通常はほぼ一定に保たれている生体内酸化・抗酸化レベルのバランスが崩れ、酸化ストレス値が上昇することが注目を集めている。ヒトは生活習慣や薬物、放射線などの要因で生体内の酸化・抗酸化のバランスが崩れ、酸化傾向になり、酸化ストレス状態となる。この状態はヒトががん、糖尿病などの生活習慣病になるリスクを高めると報告されている。これまでに酸化ストレスは喫煙との関連性について報告もあるが、その原因物質や反応機構については未知な部分も多い。酸化ストレスマーカーの1つであるDNA損傷型の8-OHdGは細胞内において活性酸素種と 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。

これまでに、申請者は尿中ストレスマーカーの8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)の高感度分析法の確立した。さらに厚生労働科学研究「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に関する研究」において、喫煙者の尿中酸化ストレス値は、たばこの銘柄（外箱表示タール・ニコチン値）と無関係に総吸煙量と相関があることを報告してきた。これらの結果から吸煙されるガス成分と酸化ストレスとの関連性があると推察し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究により日本人喫煙者の尿中酸化ストレス値は、総吸煙量と関連性が認められた。これは総吸煙量と関連する化学物質が酸化ストレス上昇原因物質と考えられる。そこで、その原因物質がガス成分であるという作業仮説をたてた（特に、揮発性有機化合物：VOC）。この呼気中ガス成分の曝露実態調査を行うことで、酸化ストレスとの関連性の解明を行うことを目的とした。さらに、新たな酸化ストレスマーカーとして8-iso-prostaglandin F_{2α}の測定法の開発も行い、8-OHdGと同時に評価を行った。

3. 研究の方法

①呼気中VOCの測定

喫煙者を対象としてBio-VOC サンプラーを用いて終末呼気を加熱脱着管に捕集し、加熱脱着装置付ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) でVOCの測定を行なった。

②酸化ストレスマーカー8-iso-prostaglandin F_{2α}の測定

測定対象物質は、8-iso-prostaglandin F_{2α} (iPF_{2α}-III) 及び5-iso-prostaglandin

F_{2α}-VI (5-iPF_{2α}-VI) とした。尿試料はYMC製オクタデシルシリカ担体を充填した自製カラムに導入後、0.1%酢酸、1%アンモニア/40%メタノール溶液及び0.1%酢酸の順で洗浄後50%メタノールで溶出した。溶出試料はSupelco製Supelclean ENVI-Carbに供し、0.1%酢酸及びメタノールの順で洗浄後0.1%酢酸/エタノール溶液で溶出した。得られた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) 溶液で溶解し測定用試料とした。得られた試料を高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LCMS/MS) に供し、iPF_{2α}-III と5-iPF_{2α}-VIの定量を行った。

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高速液体クロマトグラフ/電気化学検出器 (HPLC/ECD) に供し、8-OHdGの定量を行った。

④尿中ニコチン代謝物の測定

尿試料をENVI-Carb (250 mg/6 mL) に導入し、H₂O、20%メタノール溶液で洗浄を行った。次に溶出液の検討 (70 または 100%メタノールに0.1, 1%酢酸またはギ酸を含有) を行った。得られた溶出液をOasis-MCX (150 mg/6 mL) に供し、100%メタノール溶液で洗浄を行ない、5%アンモニア含有メタノール溶液で溶出し、遠心エバポレーターで濃縮を行った。前処理済試料は、アセトニトリルに再溶解し、N-(tert-ブチルジメチルシリル)-N'-メチルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) で誘導体化後GC/MSによる測定を行った。

④日本人喫煙者の酸化ストレスマーカーと喫煙行動との関連性

本研究の被験者は、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。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、2006年度の国産主要10銘柄のたばこを3ヶ月以上喫煙している者を対象とした。また、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を行った。さらに、喫煙者尿中8-OHdG及びiPF_{2α}-III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を受けて行われた。

⑤統計解析

喫煙者と非喫煙者の尿中 8-OHdG, iPF_{2α}-III と 5-iPF_{2α}-VI 濃度について一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。また、尿中 8-OHdG, iPF_{2α}-III と 5-iPF_{2α}-VI 濃度と関係する因子 (尿中ニコチン代謝物等) 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。

4. 研究成果

①呼気中 VOC の測定

VOC のサンプリング試料には、痛みを伴わずに捕集可能な呼気を使用した。喫煙者を対象として Bio-VOC サンプラーを用いて終末呼気を加熱脱着管に捕集し、加熱脱着装置付ガスクロマトグラフィー質量分析計で VOC の測定を行なった。喫煙直後にサンプリングを行ない、GC-MS に供したところ VOC 類の検出が認められた。今後は、平常時と喫煙時の呼気中 VOC を比較し、喫煙の曝露マーカーとして最適な化合物の選定を行う必要がある。

②酸化ストレスマーカー 8-iso-prostaglandin F_{2α} の測定

尿中の酸化ストレスマーカーである F₂-isoprostane 類 (iPF_{2α}-III, 5-iPF_{2α}-VI) の測定法の更なる確立を行った。その手法は、球状 C18 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%酢酸の順で洗浄後 50%メタノールで溶出した。溶出試料は次に ENVI-Carb に供し、0.1%酢酸及びメタノールの順で洗浄後 0.1%酢酸/エタノール溶液で溶出し LC/MS/MS へ供した。尿試料を用いての日間及び日内変動は、iPF_{2α}-III がそれぞれ 1.0-20.2%, 2.9-14.7%, 5-iPF_{2α}-VI がそれぞれ 0.8-11.9%, 3.2-3.6%となった。また、添加回収試験での回収率は iPF_{2α}-III が 78.2-90.7%, 5-iPF_{2α}-VI が 75.5-95.3%であった。

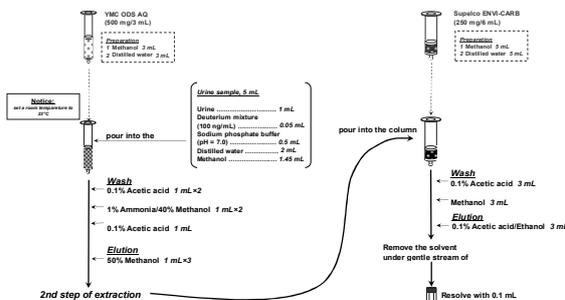


図 尿中イソプロスタンの抽出法

③喫煙者及び非喫煙者の酸化ストレスマーカーの比較

尿中 8-OHdG 値は、喫煙者が 4.85±2.54 ng/mg Creatinine であり、非喫煙者が 3.58±1.90 ng/mg Creatinine であった。また、尿中 iPF_{2α}-III 値は、喫煙者が 0.37±0.19 ng/mg Creatinine, 非喫煙者が 0.25±0.11 ng/mg Creatinine となった。喫煙者と非喫煙者の各酸化ストレスマーカー値で t 検定を行ったところ、尿中の 8-OHdG 値と iPF_{2α}-III 値は、喫煙者が高いことが分かった (p<0.05, p<0.001)。しかし、5-iPF_{2α}-VI では差が認められなかった。

④尿中ニコチン代謝物の測定

ENVI-Carb と Oasis MCX の 2 つの担体を組合せたニコチン代謝物前処理法を確立した。3-ハイドロキシコチニンの誘導體化剤には、MTBSTFA を使用した。定量範囲は、GC/MS が 50-12,000 ng/mL であった。なお、本手法の同時再現性は、1.1-7.6%であり、添加回収率は、70-149%であった。また、8-β-グルクロニダーゼの反応は、1000U で 37°C, 24 時間とした。

④日本人喫煙者の喫煙行動と呼気中ガス成分及び酸化ストレスマーカーとの関連性

日本人喫煙者の各種バイオマーカーの値について単相関分析を行った。8-OHdG は、1 日の喫煙本数、1 日の総吸煙量、尿中コチニンに有意であった (p<0.05)。iPF_{2α}-III は、年齢、唾液中コチニン、尿中 3-ハイドロキシコチニンに有意であった (p<0.05)。一方で、呼気中一酸化炭素との関連性は、認められなかった。また、呼気中 VOC のサンプリング法及び分析方法の確立を行ったが、喫煙後のサンプリングまでの間隔など更なる条件検討が必要であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 稲葉洋平, 鈴木元, 櫻田尚樹. たばこ煙の曝露評価法. 臨床化学; 2010.; 39: 117-122. 査読, 無
2. 稲葉洋平, 内山茂久. 日本たばこ主流煙の化学分析法と測定結果. 保健医療科学; 2010.; 59: 139-144. 査読, 有
3. 稲葉洋平, 内山茂久, 櫻田尚樹. 日本産たばこの主流煙の化学分析からみるたばこの害. 保健師ジャーナル; 2011.; 67: 408-413. 査読, 無
4. 稲葉洋平, 内山茂久. 喫煙と室内環境. 空衛. 2012; 66: 56-63. 査読, 無
5. 稲葉洋平. タバコ煙に含まれる化学物質.

G. I. Research. 2012; 20: 277-286. 査読,
無

〔学会発表〕(計7件)

1. 稲葉洋平, 大久保忠利, 杉田和俊, 内山茂久, 鈴木元, 櫻田尚樹, 尿中4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol 測定法の検討 日本薬学会第131年会 2011年3月28-31日, 静岡
2. 大久保忠利, 稲葉洋平, 内山茂久, 鈴木元, 櫻田尚樹. 尿中F2-isoprostane 類の測定法の検討 日本薬学会第131年会 2011年3月28-31日, 静岡
3. 稲葉洋平, 杉田和俊, 内山茂久, 鈴木元, 櫻田尚樹 尿中ニコチン代謝物を測定するための固相抽出法 第82回日本衛生学会学術総会 2012年3月24-26日, 京都
4. 大久保忠利, 稲葉洋平, 内山茂久, 緒方裕光, 櫻田尚樹 生体試料中酸化ストレスマーカーの測定 第82回日本衛生学会学術総会 2012年3月24-26日, 京都
5. 稲葉洋平, 大久保忠利, 内山茂久, 鈴木元, 櫻田尚樹. 日本人喫煙者の酸化ストレスマーカーと喫煙行動について 日本環境変異原学会第41回大会, 2012年11月29-30日, 静岡
6. 稲葉洋平, 内山茂久, 鈴木元, 櫻田尚樹. 日本人喫煙者の3種類の尿中ニコチン代謝物と喫煙行動との関連性 第83回日本衛生学会学術総会 2013年3月24-26日, 金沢
7. 大久保忠利, 稲葉洋平, 内山茂久, 鈴木元, 櫻田尚樹. 日本人喫煙者の2種類の酸化ストレスマーカーと喫煙関連因子との関連性 第83回日本衛生学会学術総会 2013年3月24-26日, 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 洋平 (国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任研究官)

研究者番号: 80446583

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

櫻田 尚樹 (国立保健医療科学院・生活環境研究部・部長)

研究者番号: 90178020

内山 茂久 (国立保健医療科学院・生活環境研究部・上席主任研究官)

研究者番号: 40524236