

喫煙の尿変異原性に及ぼす影響に関する研究

第2報：受動喫煙動物実験モデル

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

金岡 俊雄*, 宮川美栄子**, 吉田 修

STUDY ON INFLUENCE OF CIGARETTE SMOKING ON THE MUTAGENICITY OF URINE

II. ANIMAL EXPERIMENTAL MODEL OF PASSIVE SMOKING

Toshio Kanaoka, Mieko Miyakawa and Osamu Yoshida

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

We developed a convenient animal experimental model to study the effects of passive smoking on urinary mutagenicity. Rats were individually placed into metabolic cages, and were exposed to a side-stream of cigarette smoke under specific conditions. Then 24-hour urine collections were performed. Mutagenicity was investigated by the Ames test using the *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100.

In strain TA98, the mutagenicity of urine was 5.4-fold and 5.3-fold increased with and without metabolic activation, respectively, by exposure to cigarette smoke, and that in strain TA100 was 4.7-fold and 4.4-fold increased. Using this animal model, the effect of passive smoking on urinary mutagenicity can be investigated conveniently. This model can be applied to a variety of experiments.

(Acta Urol. Jpn. 36: 395-399, 1990)

Key words: Passive smoking, Urinary mutagenicity, Animal model, Rat

緒 言

受動的喫煙は環境中の空気の中に含まれるタバコの煙への暴露と定義されている¹⁾。近年大きな社会的問題となっているのは、非喫煙者が喫煙者に長期間接触することにより、循環器²⁾、呼吸器機能³⁾、各種発癌⁴⁻⁷⁾等への影響が指摘されているからである。

受動的喫煙は尿変異原性にも影響を及ぼすものと考えられるが、ヒト受動的喫煙者尿の変異原性についての報告結果は一定しておらず⁸⁻¹⁰⁾、それは受動的喫煙の条件が異なることによるとと思われる。

一方、受動的喫煙の影響を検討するには暴露量の定量的評価が必要であるが、暴露量の指標の一つとして尿変異原性の測定が有用と考えられている¹¹⁾。

動物実験においても、受動的喫煙により尿変異原性の上昇がみられたとの報告はあるが¹²⁾、いまだ小動物を用いた簡便な方法は確立されていない。

われわれは独自に受動的喫煙の尿変異原活性への影響を調べるための簡便な動物実験モデルを考案しその有用性を明らかにしたのでその結果をここに報告する。

方法と材料

(1) 対象

動物：雌 Fisher 344 ラット（日本クレア）を実験2日前より代謝ケージにて1匹ずつ、通常飼育飼料、水道水の自由飲水にて飼育。実験開始時の体重は120～150 gであった。

(2) 採尿方法

1) 代謝ケージ：ガラス製ケージで容積 5560 cm³、天井面積 283 cm²、天井には、面積 0.57 cm² の換気孔が69個ある。尿は、飲料水、便等に汚染されことなく採取可能である。代謝ケージは換気のよい室内におかれ6連器になっており同時に6匹の実験が可能である (Fig. 1)。

2) 副煙流への暴露：タバコを15分間自然燃焼させ

* 現：倉敷中央病院泌尿器科

** 現：島田市民病院泌尿器科

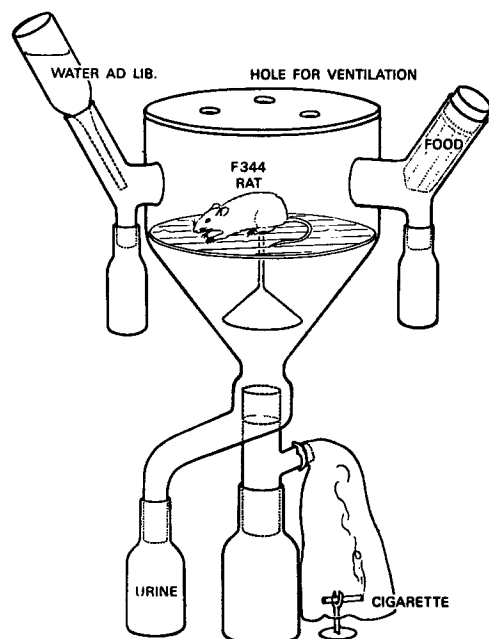


Fig. 1. Illustration of animal experimental model

Fig. 1 の様にして副煙流をケージ内に導き入れた。タバコ燃焼開始時から燃焼中を含めて30分間は換気を最少とするため、3個の換気孔のみとした。タバコはマイルドセブンをを用い、副煙流への暴露は1時間毎に4回行った。

(3) 実験群

ラットを3群に分け、以下のスケジュールにて採尿した。

1) group 1 (G1): ラットを副煙流に暴露せず、24時間尿を集めたもの (n=10)。

2) group 2 (G2): ラットをいれない状態の代謝ケージを副煙流に暴露し、その後ラットを入れ24時間尿を集めた。この群はタバコ煙のケージ壁への付着による尿の汚染の有無を検討するため設けられた (n=10)。

3) group 3 (G3): ラットを副煙流に暴露。暴露開始時より24時間の尿を集めた (n=10)。

(4) 実験スケジュール

6連器の代謝ケージに各グループ2匹ずつ同時に前記のスケジュールに従って採尿。5回繰り返し(各グループ10匹ずつ)3グループの比較を行った。

(5) 尿検体

ケージの集尿器に溜った尿は No. 1 filter paper (東洋濾紙会社) で濾過し、ガラス製試験管に移し -20°C の冷凍庫に保存した。

(6) 菌種

カリフォルニア大学 Bruce N. Ames 教授より京都大学放射線生物センター武部啓教授へ送られた *Salmonella typhimurium* TA98 と TA100¹³⁾ を同教授のご好意により提供を受け使用した。

(7) 試料調整

1) 尿試料調整: 冷凍庫内の試験管を室温にて1~2時間放置し、解凍後 0.2 μm ミリポアフィルター (Millipore Corporation) に通して滅菌し、その 0.1 ml を試料とした。

2) 対照試料: negative control として生理的食塩水 (大塚製薬) 0.1 ml を、positive control として代謝活性化を行わない場合は TA98 には 2-nitrofluorene (半井化学薬品株式会社) 40 μg を、TA100 には sodium azide (Merck) 100 μg を、代謝活性化を行う場合は TA98, TA100 とも aminoanthracene (半井化学薬品株式会社) 100 μg を使用した。

(8) 突然変異試験

矢作らの方法にしたがった¹⁴⁾。negative control と positive control は毎回調べた。

(9) 判定

1) revertant colony: S-9 による代謝活性化の有無に関わらず TA98 では negative control のコロニー数が60以上あるいは positive control が500以下の時、TA100 では negative control が180以上、positive control が500以下の場合、それぞれその回の実験を無効とし、再実験を行った。

2) 尿変異原活性: 尿中クレアチニン値を測定し、クレアチニン 0.1 mmol を含む尿量あたりの revertant colony 数を、尿変異原活性とした¹⁰⁾。

3) 検定: Student-T 検定にて行った。

結 果

結果を Table 1 に示す。

G1 と G2 の尿変異原活性は、TA98, TA100 両菌種にて代謝活性化の有無にかかわらず、全く差を認めなかった。

G3 の尿変異原活性は G1 と比較し、TA98 で代謝活性化を行った場合 5.4 倍、代謝活性化を行わない場合 5.3 倍と有意に ($p < 0.01$) 上昇した。TA100 でも代謝活性化を行った場合、行わなかった場合、それぞれ 4.7 倍、4.4 倍と有意な ($p < 0.01$) 上昇を認めた。

考 察

受動喫煙 (passive smoking) は不随意喫煙 (involuntary smoking) ともいわれ非喫煙者の environ-

Table 1. Mutagenic activity of urine in rats: comparison among 3 groups

Salmonella Strain	TA98		TA100	
Metabolic activation (S-9)	(+)	(-)	(+)	(-)
group 1 (n = 10)	768 ± 524	378 ± 311	2010 ± 1409	1029 ± 563
group 2 (n = 10)	991 ± 788	238 ± 257	1984 ± 1140	1083 ± 768
group 3 (n = 10)	4150 ± 2687	2013 ± 1143	9378 ± 5457	4578 ± 2867

Mean ± SD: revertant colonies/urine equivalent/0.1mmol Cr
p < 0.01 : G3 and G1, G2 in every assay

mental tobacco smoke (ETS) に対する不可避的暴露と定義されている。ETS はタバコの燃焼端より空中に放散される副煙流と喫煙者に吸入された後吐き出された主煙流とが環境中の大気と混合希釈されたものである¹⁾。

近年、受動喫煙が大きな社会問題となっているのは、受動喫煙により循環器疾患²⁾、慢性呼吸器疾患³⁾、さらには Hirayama, Correa, Trichopoulos らにより各種臓器の発癌⁴⁻⁷⁾ への影響が指摘されているからである。

受動的喫煙の発癌に対するリスクについては、疫学的手法の上から疑問を投げかける意見もあり¹⁰⁾、尿路発癌については受動的喫煙のリスクはないといわれているが⁷⁾、能動喫煙にみられるように¹⁰⁾ 化学物質への暴露等の他の要因との相乗効果も考えられることより、尿路発癌を論じるに当たっても無視できぬ因子であると思われる。

受動的喫煙の尿変異原性への影響を多角的に反復して検討するためには、小動物を用いた実験が必要である。今回、われわれは簡便な装置で小動物における受動喫煙の尿変異原性への影響を検討するための実験モデルを考案し、その有用性を検討した。

まず比較する群は環境を一定にするため同時に実験を行った。また変異原性の評価に当たっては尿量、腎機能の影響を除くため、0.1 mmol クレアチニンを含む尿量あたりの復帰変異コロニー数に換算（尿変異原活性）を行った¹⁰⁾。

G2 をもうけたのは、タバコ煙をケージ内に導きいれることによりケージ壁に変異原物質が付着し、それがラット尿にて溶出し尿検体を汚染する可能性を考えたためである。G2 と G1 の尿変異原活性にまったく差は認めず、副煙流によるケージ壁汚染の可能性は否

定された。それにより G3 の尿変異原活性が G1 に較べて有意に上昇しているのはラットが副煙流に暴露されたことによるものと判断できた。

ヒト喫煙者尿が frame shift 型菌種で、しかも代謝活性化を行わねば変異原性を示さない^{10,16,17)} のに対して、副煙流の暴露によるラット尿変異原活性の上昇は frame shift 型の TA98, 塩基置換型の TA100 の両菌種で代謝活性化の有無に関わらず認められヒトとラットの代謝に差があることを示唆しているものであろう。

受動喫煙の動物実験については Mohtashamipur ら¹²⁾ が smoking machine を用いてラットを副煙流に暴露し尿変異原性の上昇を認めたとの報告がある。われわれの実験モデルは smoking-machine を使わずにより簡便に受動喫煙の尿変異原性への影響を評価でき、また同時に数匹のラットを異なった受動喫煙条件下で採尿できるという利点がある。

ヒト受動的喫煙者の尿変異原性については Bos らが157本の喫煙が行われた密室内 (110 m³) での受動喫煙者8名について尿変異原性が有意に上昇したと報告している⁸⁾。一方 Scherer ら⁹⁾ は常識的な環境下での受動的喫煙では尿変異原性は上昇しないとし、われわれの検討でも換気条件のよい室内でも受動喫煙者と非喫煙者との間に有意差はなかった¹⁰⁾。受動喫煙の評価にあたっては ETS への暴露条件をよく検討する必要がある。

今回の動物実験モデルの副煙流への暴露条件は、代謝ケージの容量、体重あたりの受動喫煙本数より単純計算すると、Bos らが行ったヒト受動喫煙実験の20万倍高濃度の ETS にさらされたことになる。

動物の受動喫煙の実験結果からヒトの受動喫煙、喫煙を論じるのは、このように暴露条件が大きく異なっ

ている点、また動物の鼻腔の優れた防御的構造機能により ETS 中の粒子成分の大部分が捕足されてしまう可能性も推測されている¹⁸⁾ことより、慎重でなくてはならないが、本実験モデルは、今後各種条件下の喫煙（能動的喫煙、受動的喫煙）の尿変異原性におよぼす影響を検討するのに有用であると考えられる。

また受動喫煙暴露量の指標として各種のマーカーが提唱されているが¹⁹⁻²²⁾いまだ確立された評価法はなく、尿変異原性の有用性が示唆されている¹¹⁾。本実験モデルは尿変異原活性を指標とした全身への喫煙の影響の評価にも応用可能と考えられる。

結 語

ラットを用いた受動的喫煙の簡便な動物実験モデルを考案しその有用性を確認した。

この実験モデルは簡便な器具で受動的喫煙の尿変異原性におよぼす影響を調べることが可能で今後種々の実験に応用できると思われた。

本研究の一部は喫煙科学研究財団「各種環境条件下における非喫煙のたばこ煙吸入口量とその生体に及ぼす影響に関する研究」助成によった。また実験に種々の御助言、御協力を頂いた王曉雄先生（現：中国解放軍総医院泌尿器科）に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 春田 斉：受動喫煙（EST への暴露）—特に疫学の視点から—。最新医学 44：1468-1474, 1989
- 2) Aronow WS: Effect of passive smoking on angina pectoris. *N Engl J Med* 299: 21-24, 1978
- 3) Cameron P, Kostin JS, Zaks JM, Wolfe JH, Tighe G, Oselette B, Stocker R and Winston J: The health of smokers' and non smokers' children. *J Allergy* 43: 336-341, 1969
- 4) Hirayama T: Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *Br Med J* 282: 183-185, 1981
- 5) Correa P, Pickel LW, Fontham E, and Lin Y: Passive smoking and lung cancer. *Lancet* ii: 595-597, 1983
- 6) Trichopoulos D, Kalandidi A and Sparros L: Lung cancer and passive smoking: conclusion of Greek study. *Lancet* 2: 677-678, 1983
- 7) Hirayama T: Passive smoking and cancer: an epidemiological review. *Gann Monogr Cancer Res* 33: 127-135, 1987
- 8) Bos RP, Theuvs JLG and Henderson PTH: Excretion of mutagens in human urine after passive smoking. *Cancer Lett* 19: 85-90, 1983
- 9) Scherer G, Westphal K, Biber A, Hoepfner I and Adlkofer F: Urinary mutagenicity after controlled exposure to environmental tobacco smoke (ETS). *Toxicol Lett* 35: 135-140, 1987
- 10) 金岡俊雄, 宮川美栄子, 吉田 修: 喫煙の尿変異原性に及ぼす影響に関する研究: 第一報: 喫煙の健常人と膀胱腫瘍患者の尿変異原性に及ぼす影響, 泌尿紀要 36: 385-393, 1990
- 11) Bos RP and Henderson PT: Genotoxic risk of passive smoking. *Rev Environ Health* 4: 161-178, 1984
- 12) Mohtashamipour E, Norpoth K and Heger M: Urinary excretion of frameshift mutagens in rats caused by passive smoking. *J Cancer Res Clin Oncol* 108: 296-301, 1984
- 13) McCann J, Spingarn NE, Kobori J and Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 979-983, 1975
- 14) Yahagi T, Degawa M, Seino Y, Matsushima T, Nagao M, Sugimura T and Hashimoto Y: Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett* 1: 91-96, 1975
- 15) 福岡誠吾: 肺癌における喫煙原因説への疑問。最新医学 44: 1401-1409, 1989
- 16) Falck K, Sorsa M and Vainio H: Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. *Mutat Res* 79: 45-52, 1980
- 17) Yamasaki E and Ames BN: Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc Natl Acad Sci* 74: 3555-3559, 1977
- 18) Wynder EL, Taguchi KT, Baden V and Hoffmann D: Tobacco carcinogenesis IX. Effect of cigarette smoke on respiratory tract of mice after passive inhalation. *Cancer* 21: 134-153, 1968
- 19) Sorsa M, Einisto P, Husgafvel-Pursiainen K, Jarventaus H, Kivisto H, Peltonen Y, Tuomi T, Valkonen S and Pelkonen O: Passive and active exposure to cigarette smoke in a smoking experiment. *J Toxicol Environ Health* 16: 523-534, 1985
- 20) Husgafvel-Pursiainen K, Sorsa M, Engstöm K and Einistö P: Passive smoking at work: biochemical and biological measure of exposure to environmental tobacco smoke. *Int Arch Occup Environ Health* 59: 337-345, 1987
- 21) Letzel H, Fischer-Brandies A, Johnson LC, Uberla K and Biber A: Measuring problems in estimating the exposure to passive smoking using the excretion of nicotine. *Toxicol Lett* 35: 35-44 1987

- 22) Muramatsu M, Umenura S, Okada T and Tomita H: Estimation of personal exposure to tobacco smoke with a newly developed nicotine personal monitor. Environ Res 35:

218-227, 1984

(Received on November 13, 1989)
(Accepted on December 4, 1989)

(迅速掲載)