

(質問)問25. この1ヶ月「健康警告表示」をよく読んだか

| | | | | | | | |
|-----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 総数 | 84 | 19 | 21 | 23 | 10 | 9 | 無回答 |
| (%) | 84 | 23 | 25 | 27 | 12 | 11 | 2 |

(質問)問26. この1ヶ月「健康警告表示」をみて吸うのを止めたか

| | | | | | | | |
|-----|----|----|---|---|---|---|-----|
| 総数 | 84 | 75 | 2 | 5 | 0 | 2 | 無回答 |
| (%) | 84 | 89 | 2 | 6 | 0 | 2 | 2 |

(質問)問27. この6ヶ月の間、タバコの販売促進活動を見たか

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|----|---|---|-----|
| 総数 | 383 | 320 | 32 | 18 | 4 | 2 | 無回答 |
| (%) | 383 | 84 | 6 | 5 | 1 | 1 | 2 |

(質問)問28. この6ヶ月の間、タバコの広告を見たか

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|---|---|
| 総数 | 383 | 179 | 37 | 26 | 48 | 82 | 94 | 3 | 81 | 1 | 21 | 81 | 7 | 2 |
| (%) | 383 | 47 | 10 | 7 | 13 | 21 | 25 | 25 | 21 | 1 | 21 | 21 | 7 | 2 |

(質問)問29. この6ヶ月の間、タバコ会社の名前などを目にしたことがあるか

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|----|---|---|---|----|----|
| 総数 | 383 | 277 | 49 | 20 | 2 | 8 | 3 | 21 | 14 |
| (%) | 383 | 72 | 13 | 5 | 1 | 2 | 6 | 6 | 4 |

(質問)問30. 喫煙が要因だと思うもの

| (ア)喫煙者の心臓病 | (イ)喫煙者の脳卒中 | (ウ)男性喫煙者のインポテンツ | (エ)喫煙者の肺がん | (オ)受動喫煙を受けた喫煙者の肺がん | (カ)喫煙者の低体重児出産 | (ク)喫煙者による子どもの喘息 | (ケ)喫煙者の車内喫煙 |
|--------------------|------------|-----------------|------------|--------------------|---------------|-----------------|-------------|
| 総数 | 383 | 263 | 77 | 23 | 74 | 71 | 78 |
| (%) | 383 | 272 | 79 | 32 | 71 | 71 | 78 |
| (ウ)男性喫煙者のインポテンツ | 383 | 138 | 199 | 46 | 36 | 36 | 36 |
| (エ)喫煙者の肺がん | 383 | 350 | 21 | 12 | 91 | 91 | 91 |
| (オ)受動喫煙を受けた喫煙者の肺がん | 383 | 287 | 61 | 25 | 78 | 78 | 78 |
| (カ)喫煙者の低体重児出産 | 383 | 272 | 78 | 33 | 71 | 71 | 71 |
| (ク)喫煙者による子どもの喘息 | 383 | 293 | 62 | 28 | 77 | 77 | 77 |
| (ケ)喫煙者の車内喫煙 | 383 | 202 | 141 | 40 | 53 | 53 | 53 |

(質問)問31. (1)低タール、低ニコチンの製品はやめやすいか

| | | | | | |
|-----|-----|----|-----|----|-----|
| 総数 | 383 | 34 | 338 | 11 | 無回答 |
| (%) | 383 | 9 | 88 | 3 | 3 |

(質問)問31. (2)低タール、低ニコチンの製品は害が少ないか

| | | | | | |
|-----|-----|----|-----|----|-----|
| 総数 | 383 | 77 | 298 | 10 | 無回答 |
| (%) | 383 | 20 | 77 | 3 | 3 |

【質問】問31. (3)位タール、低ニコチンの製品はタール、ニコチンを取り込む量が少ない
と思う。 そう思う と思う程ない 無回答

| | | | | |
|-----|-----|-----|-----|----|
| 総数 | 383 | 106 | 206 | 11 |
| (%) | 383 | 28 | 70 | 3 |

【質問】問32. 消費の根拠は、
1ヶ月に2~4回 1ヶ月に2回以下 1ヶ月に2回以上 1週間以上 1週間以上4回以上 無回答

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|----|----|---|
| 総数 | 383 | 158 | 54 | 33 | 69 | 3 |
| (%) | 383 | 41 | 14 | 9 | 23 | 1 |

【質問】問33. 1日の摂取量
該当者 1~2単位以下 3~4単位 5~6単位 7~9単位 10単位以上 無回答

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|----|---|---|
| 総数 | 224 | 127 | 62 | 21 | 8 | 3 |
| (%) | 224 | 57 | 28 | 9 | 4 | 1 |

【質問】問34. 1日に6単位以上の飲酒頻度
該当者 ない 1か月に1回未満 1か月に1回 1週間に1回 毎日あるいはほとんど毎日 無回答

| | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|----|----|----|---|---|
| 総数 | 224 | 137 | 30 | 24 | 17 | 11 | 5 | 2 |
| (%) | 224 | 61 | 13 | 11 | 8 | 5 | 2 | 2 |

【質問】問35. 過去1年間に、飲み始めたらやめられなかったこと
該当者 ない 1か月に1回未満 1か月に1回 1週間に1回 毎日あるいはほとんど毎日 無回答

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|----|---|---|---|
| 総数 | 224 | 156 | 10 | 11 | 6 | 9 | 2 |
| (%) | 224 | 83 | 5 | 5 | 3 | 4 | 1 |

【質問】問36. 過去1年間に、飲酒していたためにできなかったこと
該当者 ない 1か月に1回未満 1か月に1回 1週間に1回 毎日あるいはほとんど毎日 無回答

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|---|---|---|---|
| 総数 | 224 | 180 | 30 | 6 | 3 | 4 | 1 |
| (%) | 224 | 80 | 13 | 3 | 1 | 2 | 0 |

【質問】問37. 過去1年間に、悪え酒をたたくてはならなかったこと
該当者 ない 1か月に1回未満 1か月に1回 1週間に1回 毎日あるいはほとんど毎日 無回答

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|
| 総数 | 224 | 217 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| (%) | 224 | 97 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

【質問】問38. 過去1年間に、飲酒後、罪悪感や自責の念にかられたこと
該当者 ない 1か月に1回未満 1か月に1回 1週間に1回 毎日あるいはほとんど毎日 無回答

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|---|---|---|---|
| 総数 | 224 | 205 | 13 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| (%) | 224 | 92 | 6 | 1 | 1 | 0 | 0 |

【質問】問39. 過去1年間に、飲酒のため飲後の出来事を思い出しなかったこと
該当者 ない 1か月に1回未満 1か月に1回 1週間に1回 毎日あるいはほとんど毎日 無回答

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|---|---|---|---|
| 総数 | 224 | 180 | 21 | 7 | 3 | 2 | 1 |
| (%) | 224 | 85 | 9 | 3 | 1 | 1 | 0 |

【質問】問40. 飲酒のために誰かが休めたこと
該当者 ない あるが、過去1年間に1年間は休めたこと 無回答

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|----|---|---|---|
| 総数 | 224 | 208 | 12 | 3 | 1 | 0 |
| (%) | 224 | 93 | 5 | 1 | 0 | 0 |

〈留意〉即41. 飲酒量を減らすように勧められたこと

| | あるが、過去1年 間にはない | 過去1年間に ある | 無回答 |
|-----|-------------------|--------------|-----|
| 総数 | 224 | 185 | 13 |
| (%) | 83 | 6 | 11 |
| | 224 | 0 | 0 |

〈留意〉F1. 年収

| | 100万円未満 | 100～200万円 未満 | 200～300万円 未満 | 300～400万円 未満 | 400～500万円 未満 | 500～600万円 未満 | 600～800万円 未満 | 800～1,000 万円未満 | 1,000～1,200 万円未満 | 1,200～1,500 万円未満 | 1,500万円以 上 | 記入なし | わからない | 無回答 |
|-----|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------|------|-------|-----|
| 総数 | 383 | 67 | 73 | 57 | 36 | 43 | 19 | 5 | 1 | 0 | 0 | 36 | 31 | 13 |
| (%) | 353 | 18 | 19 | 15 | 9 | 11 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 9 | 8 | 3 |

〈留意〉F2. 身長

| | 150cm未満 | 150cm～ 160cm未満 | 160cm～ 170cm未満 | 170cm～ 180cm未満 | 180cm以上 | 無回答 |
|-----|---------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|-----|
| 総数 | 383 | 37 | 143 | 111 | 78 | 10 |
| (%) | 383 | 10 | 37 | 29 | 20 | 3 |

〈留意〉F3. 体重

| | 50kg未満 | 50kg～ 60kg未満 | 60kg～ 70kg未満 | 70kg～ 80kg未満 | 80kg以上 | 無回答 |
|-----|--------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|-----|
| 総数 | 383 | 63 | 142 | 82 | 53 | 16 |
| (%) | 383 | 22 | 37 | 21 | 14 | 4 |

厚生労働省科学研究費補助金(循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業)
(分担)研究報告書

喫煙の暴露状態を反映する毛髪中ニコチンおよびコチニンの
測定系の確立に関する研究

分担研究者 福島 哲仁 福島県立医科大学医学部衛生学・予防医学講座 教授
神田 秀幸 福島県立医科大学医学部衛生学・予防医学講座 講師

研究要旨

わが国において毛髪を用いた能動喫煙・受動喫煙の暴露状態を反映する測定系の確立のための研究を行った。毛髪の採取、毛髪の運搬・保存方法、毛髪測定の方法(前処理から分析・測定まで)について、研究実施あるいは分析実施の条件などの検討を重ねた。またプレ調査として、喫煙者もしくは受動喫煙者計7人に対して今回我々が開発した方法を実施した。

今回の研究で、毛髪中のニコチンおよびコチニンの検出にあたっては、HPLCを用いた方法においては、フェニルカラム(imtakt社製)を用いる方法が最も感度が高く測定できると考えられた。喫煙者および受動喫煙者において、この方法で測定したところ、毛髪中のニコチンおよびコチニンが分離・検出され、毛髪中のニコチン量は個体差の影響を受けたが、毛髪中のコチニン量は受動喫煙者では少ないことが認められた。

このことから、喫煙の中～長期的な暴露状態をモニタリングするために、毛髪を用いたニコチンおよびコチニンの評価が有用であると考えられた。

研究協力者

吉野勝治(福島県立医科大学医学部衛生学・予防医学講座 大学院生)

A.目的

喫煙の健康への悪影響が広く認識され、喫煙対策は公衆衛生上の主要な課題である。喫煙者の行う能動喫煙のみならず、周囲への受動喫煙によってもがんや虚血性心疾患等で死亡する危険性が高くなることが報告されており¹⁻²、喫煙対策は喫煙者だけでなく、非喫煙者であっても受動喫煙の可能性のある者やその環境に対しても行っていく必要がある。

わが国では、健康増進法が施行されて以降、学校、体育館、病院等のような多数の者が利用する施設の管理者は、受動喫煙を防止するために必要な措置を講ずるよう努められてきた³。実際、医療機関、公共施設、飲食店などの分煙化が全国的に進んできたこ

とが報告されている⁴⁻⁷。

こうした対策に関して、喫煙者あるいは受動喫煙者の生物学的モニタリングが重要である。これまで、尿や唾液からニコチンや、その代謝産物であるコチニンが測定されてきた⁸⁻¹⁰。しかしこれらは喫煙の急性期を反映するものであり、受動喫煙を含めたタバコの煙の長期的曝露に関する生物学的モニタリングとして反映される生体試料に関する検討は極めて少ない。

毛髪を使った分析は法医学、衛生学などの分野で薬毒物や重金属の曝露状況を調べるために30年以上も前から行われている。毛髪は、その成長が1ヶ月あたり1.1cm程度と成長が遅く、長期にわたり頭部において成長をつづけるため、中～長期の生体曝露のモニタリングとして有用である¹¹⁻¹²。また、毛髪はもともと外界にさらされている死細胞であるために、それに含まれる物質は室温でも大変安定で、ニコチンとその代謝物質は

室温に1週間保管しても1割より減ることはない¹¹。今回この毛髪の特徴に着目し、毛髪中のニコチンや、その代謝産物であるコチニンを測定することにより、毛髪がタバコの煙の長期的曝露の生物学的モニタリング指標となりえると考えた。

これまで、毛髪中のニコチンおよびコチニンに関する測定は、欧米を中心に行われているが、わが国ではほとんどない¹³⁻¹⁵。よって、わが国において毛髪を用いた能動喫煙・受動喫煙の暴露状態を反映する測定系の確立に研究として取り組んだ成果を報告する。

B. 研究方法

1. 毛髪の採取

毛髪分析の文献^{11,13,16}を参考にし、対象者に安全かつ容易、さらに美容的外観を損ねないような方法による毛髪採取方法を検討した。

2. 毛髪の運搬・保存方法

毛髪分析の文献^{11,13,16}を参考にし、運搬・保存に関して検討を行った。この検討によって、ニコチンおよびコチニンが毛髪中に出来るだけ保持される方法を見出すこととした。

3. 毛髪測定の方法

3-1. 毛髪中のニコチンおよびコチニンの測定に影響を与える項目の質問票作成

毛髪中のニコチンおよびコチニンは、毛髪中のメラニンと親和性があることが知られている^{11,17}。したがって、毛髪の状態が測定結果に与える影響が考えられる。そこで、毛髪に影響を与える項目について、毛髪採取時に質問票調査を行うことで、その影響を考慮することとした。

3-2. 毛髪中のニコチンおよびコチニンの主たる測定方法

ニコチンおよびコチニンの化学分析として、1990年代初期までは高速液体クロマトグラフィ(HPLC)と紫外可視検出器(UV)、ラジオイミュノアッセイ(RI)を用いた方法が主流で

あった。その後、ガスクロマトグラフィ(GC)と質量分析(MS)を用いた方法へと変わり、さらにGCにタンデム質量分析(MS/MS)、HPLCとMS、LCとMS/MSの方法がよく用いられるようになった。しかし、RIやMS、MS/MSを用いる方法は感度が高いが、前処理が煩雑で、初期および維持のコストが非常にかかることが難点である。

現在、HPLC/UVは、HPLCのポンプ、検出器、カラムの発展により、1990年代に比べ10倍以上の感度で測定することが可能な状態になってきた。前処理が煩雑でコストのかかるGC/MSよりも、簡便に処理できるHPLC/UVはそれと同等の検出力を出せることが予想された。よって本研究では、測定方法としてHPLC/UV法を採用した。測定機器は、日本分光株式会社製高速液体クロマトグラフLC-2000Plus Seriesを用いた(図1)。

ただし、HPLCの際に考慮すべき事項は、ニコチンの保持、コチニンとカフェインの分離である。そのため、移動相へのイオンペア剤の添加、移動相のpHの調整が必要となる。

3-3. 前処理

毛髪分析の文献^{16,17}を参考にし、前処理に関して検討を行った。この検討によって、毛髪表面の汚れの影響を無くし、測定結果が毛髪の一般性を反映するようにした。詳細は結果で述べる。

3-4. 測定機器、分析カラム等

HPLCはPU-2089低圧グラジェントポンプ、AS-2055オートサンプラー、UV-2070紫外可視検出器、FP-2020蛍光検出器、ChromNAVデータ処理装置(いずれも日本分光社製)、カラムオープン(Waters社製)を用いた。

HPLC分析カラムは6種類用いた。Inertsil ODS-3(3 μ m, 3mm \times 150mm, GLサイエンス社製)、Develosil-UG(5 μ m, 4.6mm \times 250mm, 野村化学社製)、Develosil-HG(3 μ m, 3mm \times 150mm 野村化学社製)、

ZORBAX80A Extend-C18(粒子径 $3\mu\text{m}$ 、 $3\text{mm} \times 150\text{mm}$ 、Agilent 社製)、Unison UK-Phenyl($3\mu\text{m}$ 、 $3\text{mm} \times 150\text{mm}$ 、Imtakt 社製)を用い、ニコチン・コチニンの測定に関して、それぞれのカラムにおいて検出を検討した。

また、検出感度・特異度を上げるため、蛍光検出器を用いた光照射法による測定も実施した。方法の詳細は結果に記す。

標準試薬にはニコチン、コチニン、カフェイン(いずれもSigma Aldrich社)、内部標準物質にはN-エチルノルコチニン(コスモバイオ社)を希釈して使用した。パフアー、溶離液などの試薬は和光純薬社製のものを用いた。

3-5.喫煙者および受動喫煙者から採取した毛髪中のニコチンおよびコチニンの測定

対象者は、福島県内在住の成人の喫煙者もしくは受動喫煙の自覚のある者7人(男性4人、女性3人、平均年齢41.7才(23-69才)、喫煙者4人、受動喫煙者3人)とした。すべての対象者にインフォームドコンセントを行い、全ての参加者から同意が得られた。

対象者は、我々が作成した毛髪中のニコチンおよびコチニンの測定に影響を与える項目の質問票を回答し、かつ毛髪採取キットを利用して毛髪を切断、提出した。

提出された毛髪は、すぐに -80°C の冷凍庫で保存し、検討した前処理方法と測定方法により分析された。

測定方法は、3-4での検討により、分析カラムとしてUnison UK-Phenyl(Imtakt社製)、移動相はメタノール:水(ギ酸アンモニウム 50mM 、 $\text{pH}7.15$)=10:90、流速 $1\text{ml}/\text{min}$ カラムオープン温度 50°C 、UV検出波長 260nm で行った。検出限界値は $S/N=3$ でニコチン・コチニンともに一回注入あたり 0.08ng 、つまり $0.01\text{ng}/\text{mg}$ (使用毛髪が平均である 40mg とする場合)であった。これまでの報告^{11, 13}によると、HPLC/UVによる毛髪中のニコチン・コチニンの検出限界値は $0.1\text{ng}/\text{mg}$ であったため、本研究は既存限界値よりかなり高い感度で測定が可能となった。

C. 研究結果

1.毛髪の採取

毛髪を使った分析は法医学(薬毒物)、衛生学(重金属)などで30年以上も前から行われている。しかし、毛髪を検体として使った大規模な調査は血液、尿、唾液と異なりほとんど行われていない¹⁴。

採取部位は、毛髪の成長のばらつきが少なく、成長期の毛髪が比較的多く、長い髪があり、年齢や性別の差が少ない後頭部から行われるのが一般的であった。

毛髪の採取に当たっては、Wipfliらの報告¹⁵によると後頭部の毛髪を根元近くから30~50本ハサミで切断・採取したと記載があり、その他の報告でも同様の内容が書かれていた。

しかし、上記の採取方法を行うと小さい禿ができる可能性があり、美容的外観を損ねることが考えられた。本研究班は、今後、無作為抽出を前提とした不特定多数を対象とするため、誰にでも安全・容易に採取できるような方法を考案することが必要であった。

その結果、対象者に安全かつ容易、さらに美容的外観を損ねないような方法として、毛髪採取キットとそれを使った毛髪の採取方法の説明書を作成した(図2, 3)。

毛髪採取キットは、縦 15cm 、横 5cm の工作用紙とし、下端の 1cm 部に赤線を引き、この赤線の上部に両面テープが貼られているものである。キット下端を頭皮に当て、両面テープ部に頭髪を貼り付け、赤線部でカットする。測定に使用する毛髪は、切断部から 5cm の間を用いる。この長さは、半年前から直近の1ヶ月前までの体内状況を反映するものである。毛髪切断後の処理については図4に示す。

2.毛髪の運搬・保存方法

毛髪の運搬・保存に当たっては、Wipfliらの報告¹⁶によると採取後すぐに、蓋をし保管することができるプラスチックバックに入れたと記載されていたが、その他の報告では運搬や、保存の方法にはほとんど触れておらず、運搬・保存の方法はあまり重視されて

こなかった。

検体としての毛髪、唾液や血液や尿と異なり、もともと外界にさらされた死細胞ということで、大変物質的に安定で、多少室温に保管していても変化がなく、特にニコチンとその代謝物質に関しては1週間室温保存でも1割より減ることはないといわれている¹¹。このことを踏まえ、今回のような全国調査で検体採取するには最も安定的な検体と考えられる。

しかしながら、長期間空気にさらされると加水分解や酸化が進行するため、採取後なるべく早く低温で保存されることが望ましい。

今回は、毛髪採取後、採取キットごとにビニール袋に入れ、調査員が冷暗所で最大2週間保存し、この状態で発送され、試料が当講座に届き次第、 -80°C の冷凍庫にて保存することとした。

3.毛髪測定の方法

3-1.毛髪中のニコチンおよびコチニンの測定に影響を与える項目の質問票作成

毛髪中のニコチンおよびコチニンの測定に影響を与える要因として、毛髪の染色・脱色・パーマの有無、カフェインの摂取量、肝機能低下が主にあげられる。

毛髪中のニコチンとその代謝物質の量は、染色・脱色・パーマなどで約3割減少するといわれる^{11,13}。そのため、本測定では根元から6cm、つまり採取日より半年間前までの間の毛髪の状態の変化を知る必要があったため、染色・脱色・パーマの有無とその時期を聞いた。

分析において、コチニンとカフェインは性質が似ており、リテンションタイム(t_r)が近接していることから、その判別のためカフェインの摂取量も聴取することとした。

肝機能低下の設問は、ニコチンが肝臓のシトクローム P450 の分子種である CYP2A6¹⁹ の影響を受けるため、肝機能の低下がある場合、コチニンの代謝が遅れることが予想される。よって、その影響を考慮するために設定した。

したがって、毛髪中のニコチンおよびコチ

ニンの測定に影響を与える項目の質問票は表1の様式を用いることとした。

3-2. 毛髪中のニコチンおよびコチニンの主たる測定方法

本研究では、測定方法として HPLC 法(日本分光株式会社製 高速液体クロマトグラフ LC-2000Plus Series)を採用した。検体はオートサンプラーにセットし、CromNAV システムの制御により、自動的に移動相に注入され、カラムで分離され、260nm の波長下で紫外可視検出器により検出、分析された。

3-3.前処理

文献によると、毛髪外部に付着したニコチンの洗浄方法としてジクロロメタン、アセトン、界面活性剤、メタノール、ヘキサン、ラウリル硫酸ナトリウム、脱イオン水などが使われている¹³。毛髪外部のニコチンが除去されたことを証明しているのはジクロロメタンのみである¹³。よって、今回は3mlのジクロロメタンで3回洗浄する方法を採用した。

毛髪を水酸化ナトリウムで加水分解後、一つの試料から複数の物質を分離するために、文献を参考に一部改変し、液-液抽出を行うこととした^{15,20,21}。前処理の手順を示したフローチャートを図5に示す。

3-4. 測定機器、分析カラム等

1) イオンペア剤を用いた方法

イオンペア剤は逆層カラムで保持のない物質の極性物質の保持に大変有効だが、 t_r がずれやすい、一方でカラムの平衡化に長時間を要し、その濃度の設定の問題、全体的な感度の低下という欠点が上げられ、分離が難しい微量物質の測定に用いるにはあまり適さない。

実際に今回、イオンペア剤を用いて測定条件を調整した。カラムは ODS-3($3\mu\text{m}$ 、 $3\text{mm} \times 150\text{mm}$ 、GLサイエンス)を、イオンペア剤にはヘプタスルホン酸ナトリウム(和光純薬社製)を使用し、その濃度は保持係数(k)値と分離を検討した結果、20mM とした。

図6は移動相のpHを検討したものである。pKa値の低いコチニンとカフェインはPHの変化があっても t_R はほぼ平行移動しているが、ニコチンはpHが上がるにつれての t_R 増加速度が上がるのが分かる。それはニコチンのpKa値を考える正しい結果といえる。また、PH4付近が k 、 t_R ともに良好と思われ、この結果をふまえて、次からの移動相のPHは4.7(酢酸ナトリウム)とした。

次に移動相の組成を検討した。その結果を図7に示す。水:アセトニトリル=91.5:8.5付近でニコチンの波形が二つに割れる現象が認められた。欠点で記載した内容以外にも、上記の理由からも移動相の組成を調節しなくてはならないことが分かった。

2) 特殊な ODS を使った測定

一般的な ODS はニコチンの保持がみられない。しかし、一部の ODS はニコチンの保持が弱いながらもみられるようである^{15,18}。我々もそういった ODS カラムを見つけ出し、測定を検討した。使用したカラムは Develosil-UG (5 μ m, id4.6mm, 250mm)、移動相の組成は水 (PH4.3, 酢酸アンモニウム):アセトニトリル=95:5、カラム温度 40°Cとした。

結果を図8に示す。結果として、ニコチンの保持はみられるがピーク形状が悪く、感度が落ちることが分かった。また、水系の多い移動相ではないと保持が得られないため、一検体当りの分析時間が大幅に伸びることが予想され、多数の検体を分析する場合には適さないと考えられた。

3) アルカリ耐性のある新規 ODS を使用した測定

測定に際し、逆層クロマトグラフィーの標準メソッドとして、対象物質をプロトン化し、保持を安定化させるために、移動相の PH は対象物質の pKa から 2 以上、最低でも 1.5 以上離れた値にするといわれる。そのため、ニコチンの pKa が 7.8(計算値)であることを踏まえると、PH9 以上のアルカリ条件下で分析することが標準メソッドに合う条件であ

ると考えられた。しかし、以前は逆層クロマトグラフィー用のシリカゲルカラム (ODS カラム等) は充填剤の問題からアルカリに弱く、酸性~中性領域での分析しかできなかった。しかし、ここ数年、ODS カラムの充填剤の構造の発展により、アルカリ耐性をもったカラムが開発され、普及してきている。そこに注目し、アルカリ耐性のある新規 ODS を使用し、アルカリ条件下で測定する方法を検討した。

結果を図 9-1、9-2 に示す。結果として、カラムによってはニコチンの保持が見られるものと見られないものがあることがわかった。ニコチンの保持のみみられるものに関しては、ニコチンのピーク形状・高さともかなり良好であったが、ニコチンの保持が強くなりすぎたことにより、カフェインとコチニンが分離できる移動相条件では t_R が遅くなりすぎるため、グラジエントを用いなくてはニコチンの感度が大きく低下してしまうことが分かった。

4) フェニルカラムを用いた測定の検討

逆層クロマトグラフィーにおいて ODS カラムで分離がうまくいかなかった場合、選択されるカラムの一つにフェニルカラムがある。このカラムは芳香族の π 結合と固定相の π 電子との間で π - π 相互作用を起こすことにより保持を変化させる特性がある。ニコチンとその代謝物質にはピリジン環が存在し、その中には窒素部分の持つ π 電子があり、フェニルカラムにより保持が変化することが予想されるため、測定を検討した。

結果を図 10、11 に示す。

アセトニトリルを用いると π - π 相互作用がアセトニトリル自身によって打ち消されるため、ニコチンとその代謝物質の保持はあまり変化がなかったが、メタノールを用いることにより保持はかなり大きくなった。それを表したのが図 10 で、移動相の条件は上段がアセトニトリル:水 (50mM、ギ酸アンモニウム) = 10:90、下段がメタノール:水 (50mM、ギ酸アンモニウム) = 12:88、流速 1.0ml/min、カラム温度 50°C、UV 検出波長

260nmで行った。

次に上記の検討により移動相にはメタノールを使うことを決め、 $k > 5$ になるようPHの検討を行った。その結果を図11に示す。

5) 蛍光検出器を用いた光照射法による測定

喫煙者の毛髪をフェニルカラムを使って分離し、UV検出器で検出すると同時に、UV検出器と蛍光検出器の間に殺菌灯GL-20(20W, NEC)を設置し、ETFEチューブ10m(id 0.25mm, od 1/16, 島津GLC社製)を巻きつけ、両端をUV検出器のout、もう一方を蛍光検出器のin側につないで連続検出、分析を行った(図1下段の写真)。蛍光検出器の条件は励起波長333nm、蛍光波長442nmとした。その結果を図12, 13に示す。標準物質ではカフェインは光誘導体化されなかったが、ニコチン・コチニンは光り誘導体化され、UV検出器での検出より感度良く測定されることが分かった(図12)。しかし、一方で喫煙者の毛髪を分析したものでは、ニコチン・コチニン以外の物質も光誘導体化を起こし、UV検出よりも分離が難しくなり、蛍光検出特有の高い特異度が得られないことが分かった(図13)。

4. 喫煙者および受動喫煙者から採取した毛髪中のニコチンおよびコチニンの測定

結果のクロマトグラムとニコチンとコチニンの測定値を図14-1, 14-2に示す。

受動喫煙者では毛髪中のコチニン量が少ないことが認められた。ニコチン量に関しては、喫煙・受動喫煙の区分に関わらず、対象者による個体差が大きかった。

D. 考察

本研究は、わが国において毛髪を用いた能動喫煙・受動喫煙の暴露状態を反映する

測定系の確立を検討した研究である。今回の研究で、毛髪中のニコチンおよびコチニンの検出にあたっては、HPLCを用いた方法においては、フェニルカラム(imtakt社製)を用いる方法が最も感度が高く測定できると考えられた。喫煙者および受動喫煙者において、この方法で測定したところ、毛髪中のニコチンおよびコチニンが分離・検出され、毛髪中のニコチン量は個体差の影響を受けたが、毛髪中のコチニン量は受動喫煙者では少ないことが認められた。

喫煙者あるいは受動喫煙者の生物学的モニタリングが重要である。特に我々は、毛髪に着目して、受動喫煙を含めたタバコの煙の長期的曝露に関する生物学的モニタリングを試みた。まず本研究結果から、スクリーニングとしてこの方法を活用する際、分析以前に毛髪検体の採取条件を均一化する必要性が重要であると考えた。急性期のニコチン曝露を反映しやすい血液、尿、唾液に比べ、毛髪は安定的な検体である。しかし、いくら安定的な検体であるからといって、長期間空気にさらされると加水分解や酸化が徐々に進行するため、採取後の運搬や保存の状態が分析結果に影響を及ぼすと考えられた。また毛髪中のニコチンおよびコチニンの測定に影響を与える要因として、毛髪の染色・脱色・パーマの有無、カフェインの摂取量、肝機能低下について、予め情報を得ておくことは分析結果の解釈に活用することができると考えられる。今回我々が開発した、質問票および毛髪採取キットは比較的簡便で広く活用できる可能性を含んだものであると考えた。また運搬や保存の条件は実行可能性の高い対応でありながら、毛髪ができるだけ劣化しない条件を確保すると思われる。よって、全国調査の展開において本研究で提案した毛髪検体の採取・運搬・保存の条件を徹底していく必要があると考えた。

ニコチンおよびコチニンの化学分析としては、1990年代初期まではHPLC/UV、RIを用いた方法が主流であったが、その後、

GC/MS や GC/MS/MS、HPLC/MS、LC/MS/MS の方法がよく用いられるようになった。近年の化学分析の主流は MS を用いる傾向にある。しかし、MS を用いる方法は前処理が煩雑で、初期および維持のコストが非常にかかることが難点である。それに対して、HPLC/UV は、最も普及した機器で、比較的の前処理が比較的楽であるが、感度と特異度の点で十分でないと言われてきた。しかし、今回の研究では HPLC/UV 法においてノイズレベルの低い検出器や理論段数が高く・低圧で高速分析が可能なカラムを選択することにより、検出限界 0.01ng/mg という GC/MS と同等の感度と以前より優れた特異度で毛髪中のニコチンやコチニンの検出が可能であることが明らかとなった。しかし、感度に関しては、試料の最終希釈量を減らすことで数倍の改善が可能だが、特異度に関しては MS に比べ、UV では t_R でしか物質の特定ができないため、劣ることは避けられない。そのためにも、ニコチンの保持、コチニンとカフェインの分離に注意しつつも、その他の毛髪のマトリック成分との確実な分離をし、より良い特異度が得られるようさらに検討していく必要がある。

分析カラムに関しては、今回の検討の中から、感度良く、ニコチンとコチニンを同時に分析するならば、フェニルカラムが最も感度が良いと考えられた。ただ、もしニコチンだけを測定する場合は新規アルカリ耐性 ODS カラムを用い、移動相をアルカリ条件下で測定するのが最も良いと考えられた。また、カラムの製造業者に関しては、特に imtakt 社のカラムは分析に要する圧力が低いため流速をあげて高速分析が可能であることと、一回の分析当りの注入可能量が多いという点から高感度分析には必須のカラムであると思われた。

また今回行った7人の結果から、ニコチン量は、喫煙・受動喫煙の区分に関わらず、対象者による個体差が大きかったが、受動喫煙者では毛髪中のコチニン量が少ないことが認められた。一般に、ニコチン量が

喫煙状態の反映と判断されがちである。しかしながら、個体差が大きかったことに関しては、喫煙者および受動喫煙者の喫煙環境が影響を与えている可能性が考えられた。これまで喫煙環境による曝露の違いが報告されている²²。喫煙者であってもニコチンの曝露が少ない環境、例えば屋外で風通しのよい環境での喫煙はニコチン曝露が少なくなるかもしれない。一方、受動喫煙者であっても、環境中のニコチン濃度が高い状態で、かつ曝露時間が長い場合(例えば、換気の悪い部屋での室内喫煙者と同居する場合等)には、毛髪中のニコチンは高い濃度になりがちであると類推できる。今後は普段の喫煙曝露状態の詳細な検討が必要と思われた。一方、ニコチンの生体内代謝産物であるコチニンが受動喫煙者で毛髪中に少なかったことは、受動喫煙者は慢性的な生体内ニコチン代謝経路を経ない程度のニコチン曝露に留まっている可能性が示唆された。言い換えれば、毛髪中のコチニンに関しては、喫煙者は習慣的にニコチンの曝露がある以上、ニコチンの生体内代謝経路を経た反応があらわれた証であると考えられた。

今回の研究では研究対象に限界がみられた。今回測定対象は7名と少なかった。今後対象者を拡大し、本研究結果を強固なものにしていく予定である。

この成果は、今後毛髪中からのニコチンコチニンの測定により、尿や血液では確認することのできなかつた喫煙の慢性影響の生体モニタリングの指標として、簡便で効果のある評価となると考えられる。本研究班では、今後全国調査が予定されており、調査に合わせて毛髪中のニコチンおよびコチニンを測定することは、わが国の能動喫煙・受動喫煙の慢性的暴露状態を客観的に評価することが可能となると思われる。

E. 結論

本研究は、わが国において毛髪を用いた

能動喫煙・受動喫煙の暴露状態を反映する測定系の確立を検討した研究である。今回の研究で、毛髪中のニコチンおよびコチニンの検出にあたっては、HPLCを主たる測定とし、フェニルカラムを用いる方法が適していると考えられた。喫煙者および受動喫煙者において、この方法で測定したところ、毛髪中のニコチンおよびコチニンが分離・検出され、毛髪中のニコチン量は個体差の影響を受けたが、毛髪中のコチニン量は受動喫煙者では少ないことが認められた。このことから、喫煙の暴露状態を反映するために、毛髪を用いたニコチンおよびコチニンの評価が有用であると考えた。これは、喫煙に対する社会の対応が変化した際にも、人への喫煙環境の評価として活用できる可能性を含んでいる。今後、対象者を増やし、本研究結果を強固なものにしていく必要がある。

参考文献

- 1.厚生省編. 喫煙と健康 喫煙と健康問題に関する報告書第2版. 東京: 健康体力づくり事業財団, 1993; 205.
2. Whincup PH, Gilg JA, Emberson JR, Jarvis MJ, Feyerabend C, Bryant A, Walker M, Cook DG. Passive smoking and risk of coronary heart disease and stroke: prospective study with cotinine measurement. *BMJ*. 2004 24;329(7459):200-5.
3. 芝池伸彰. 医療改革と健康増進法「21世紀の健康づくり」のあり方 健康増進法の制定に向けて. *健康管理* 575, 17-32. 2002.
4. 岩城紀男, 中島素子. 禁煙を科学する—禁煙推進活動の実際 医療機関の禁煙化. *総合臨床*. 57(8), 2115-2118, 2008.
5. 大淵宰, 佐々木崇, 茂木有子, 菅井明子, 足利歩美, 佐々木美幸. 公共施設等の分煙・禁煙実施状況調査結果について. *秋田県公衆衛生学雑誌* 4(1), 45-50, 2006.
6. 栃木県保健環境センター企画情報部. 平成16年度栃木県公共施設等での分煙状況調査. *栃木県保健環境センター年報* 10, 91-98, 2005.
7. 北田雅子, 武蔵学, 中村永友. 飲食店における受動喫煙対策の現状と課題 北海道「空気もおいしいお店推進事業」登録店の調査から. *厚生*の指標 54(13), 27-34, 2007.
8. 東栄吾, 指熊文子, 井谷舜郎ら. ガスクロマトグラフィーによる尿中ニコチン, コチニンの同時定量法について. *衛生化学*. 32(4), 276-280, 1986.
9. Heinrich J, Hölscher B, Seiwert M, Carty CL, Merkel G, Schulz C. Nicotine and cotinine in adults' urine: The German Environmental Survey 1998. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 15(1), 74-80, 2005
10. 山本蒔子, 柴田佳子, 麦倉正敏, 五十嵐孝之, 佐藤研. コチニン測定による正しい喫煙状況の把握. *交通医学* 54(5-6), 142-146, 2000.
11. Al-Delaimy WK. Hair as a biomarker for exposure to tobacco smoke. *Tob Control*. 11(3):176-82, 2002.
12. Klein J, Blanchette P, Koren G. Assessing nicotine metabolism in pregnancy—a novel approach using hair analysis. *Forensic Sci Int*. 145(2-3):191-4, 2004.
13. Pichini S, Altieri I, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P. The analysis of nicotine in infants' hair for measuring exposure to environmental tobacco smoke. *Forensic Sci Int*. 84(1-3):253-8, 1997.
14. Al-Delaimy WK, Crane J, Woodward A. Is the hair nicotine level a more accurate biomarker of environmental tobacco smoke

exposure than urine cotinine? J Epidemiol Community Health.56(1):66-71, 2002.

15. Fujii Junko, Higashi Akimasa, Matsuda Ichiro, Nakano Masahiro. Measurement of Concentrations of Nicotine and Cotinine in Maternal and Neonatal Hair. 臨床薬理. 32(4), 119-125, 2001.

16. 中村洋監修. 分析試料前処理ハンドブック. 東京: 丸善株式会社, 2003; 615.

17. Mizuno A, Uematsu T, Oshima A, Nakamura M, Nakashima M. Analysis of nicotine content of hair for assessing individual cigarette-smoking behavior. Ther Drug Monit. 15(2):99-104, 1993.

18. Wipfli H, Avila-Tang E, Navas-Acien A, Kim S, Onicescu G, Yuan J, Breyse P, Samet JM, Famri Homes Study Investigators. Secondhand smoke exposure among women and children: evidence from 31 countries. Am J Public Health. 98(4):672-9, 2008.

19. Malaiyandi V, Goodz SD, Sellers EM, Tyndale RF. CYP2A6 genotype, phenotype, and the use of nicotine metabolites as biomarkers during ad libitum smoking. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 15(10):1812-9, 2006.

20. Marchei E, Durgbanshi A, Rossi S, Garcia-Algar O, Zuccaro P, Pichini S. Determination of arecoline (areca nut alkaloid) and nicotine in hair by high-performance liquid chromatography/electrospray quadrupole mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 19(22):3416-8, 2005

21. 野上浩志, 東恵美子, 橋本正史. 毛髪中のニコチン代謝物分析の基礎的検討 高速液クロによる検討. 大阪府立公衆衛生研究

所研究報告(公害衛生編). 14, 9-13, 1993.

22. Maziak W, Ali RA, Fouad MF, Rastam S, Wipfli H, Travers MJ, Ward KD, Eissenberg T. Exposure to secondhand smoke at home and in public places in Syria: a developing country's perspective. Inhal Toxicol. 20(1):17-24, 2008.

F. 健康危機情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

特記すべきものなし

H. 知的所有権の取得状況

特記すべきものなし

1. 特許取得

特記すべきものなし

2. 実用新案登録

特記すべきものなし

3. その他 特記すべきものなし

高速液体クロマトグラフィー装置
LC-2000 plus システム(日本分光社製)



← 光照射法の装置組み



図 1. 今回用いた高速液体クロマトグラフィー装置

毛髪採取方法

介助者がいる場合

以下の方法を2回繰り返してください

- ① キットの両面テープのカバーをはがします



- ② 毛髪を持ち上げます



- ③ 両面テープ面を下にしてキットの先を頭皮に押しつけます



- ④ 写真のように両面テープ部分を毛髪に指で強く押し当てます



- ⑤ キットを持ち上げ、キットの赤線を毛髪ごとハサミで切り落とします



- ⑥ 毛髪の付いたキットを袋の中に入れます



図2. 毛髪採取方法の説明(介助者がいる場合)

毛髪採取方法

介助者がいない場合

以下を2回以上繰り返してください

- ① 両手を使って後頭部の毛髪をかき分け、左手で写真のように毛髪をつかみます

- ② 根元からなるべく近く(1cm以内)を目標にハサミで毛髪を切り取ります



- ③ 採取キットの両面テープのカバーを外し、採取した毛髪の根元を赤線側にして貼り付けます

- ④ 毛髪キットを袋の中に入れます

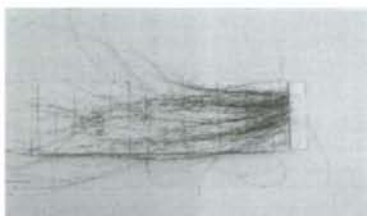
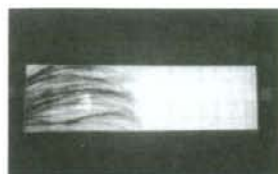
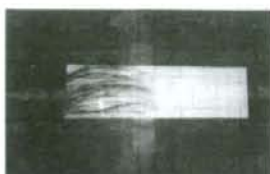


図3. 毛髪採取方法の説明(介助者がいない場合)

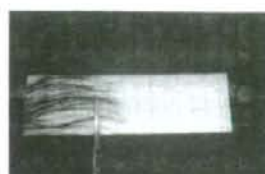
採取した毛髪切断方法



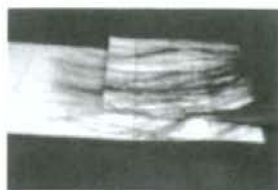
毛髪が付着したキットを -80°C の冷凍庫から取り出す



毛髪をまっすぐに整え、赤線から5cmの目盛りにあわせてテープを張る



赤線から5cmの目盛りにあわせてキットとともに毛髪を切断する



キットに張られた2本の両面テープの間の毛髪をピンセットでつかみ上げる



約5cmに切断された毛髪の中央をピンセットで持つ



あらかじめ定量しておいた洗浄用の共栓管に切断した毛髪の中央から入れる

図 4. 毛髪切断後の処理

< イオンペア剤を用いた方法における
移動相の pH 検討 >

クロマトグラム

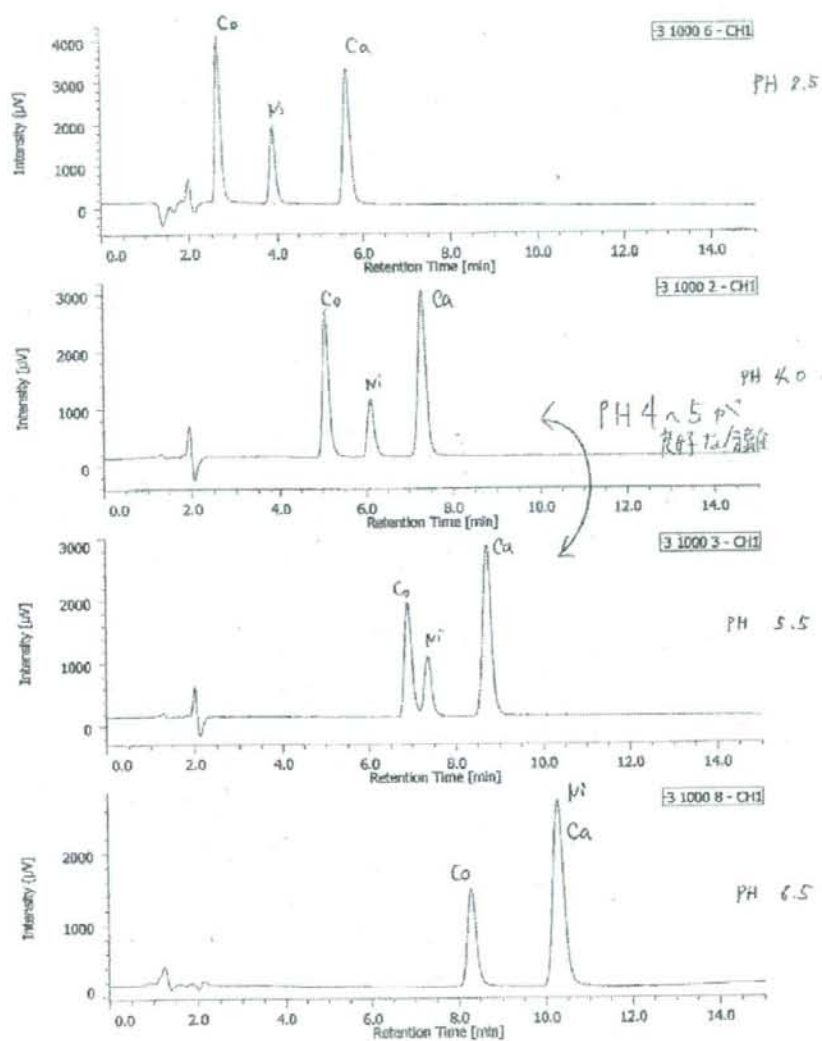


図 6. イオンペア剤を用いた方法における移動相の pH の検討

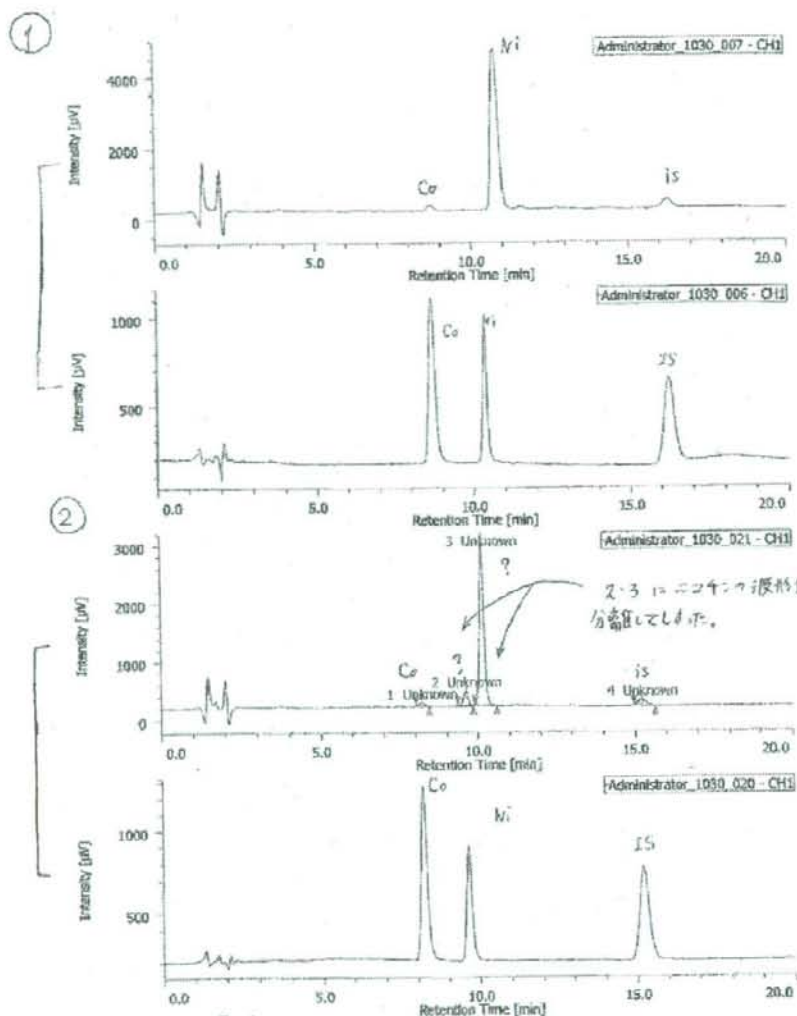
< イオンペア剤を用いた方法 >

Ni : ニコチン

Co : コカイン

IS : N-エチルニコチン

クロマトグラム



・ 移動相条件

ポットトリル : 水 (PH4.7, イオンペア剤 10mg/L)

① 7.5 : 92.5

② 8.5 : 91.5

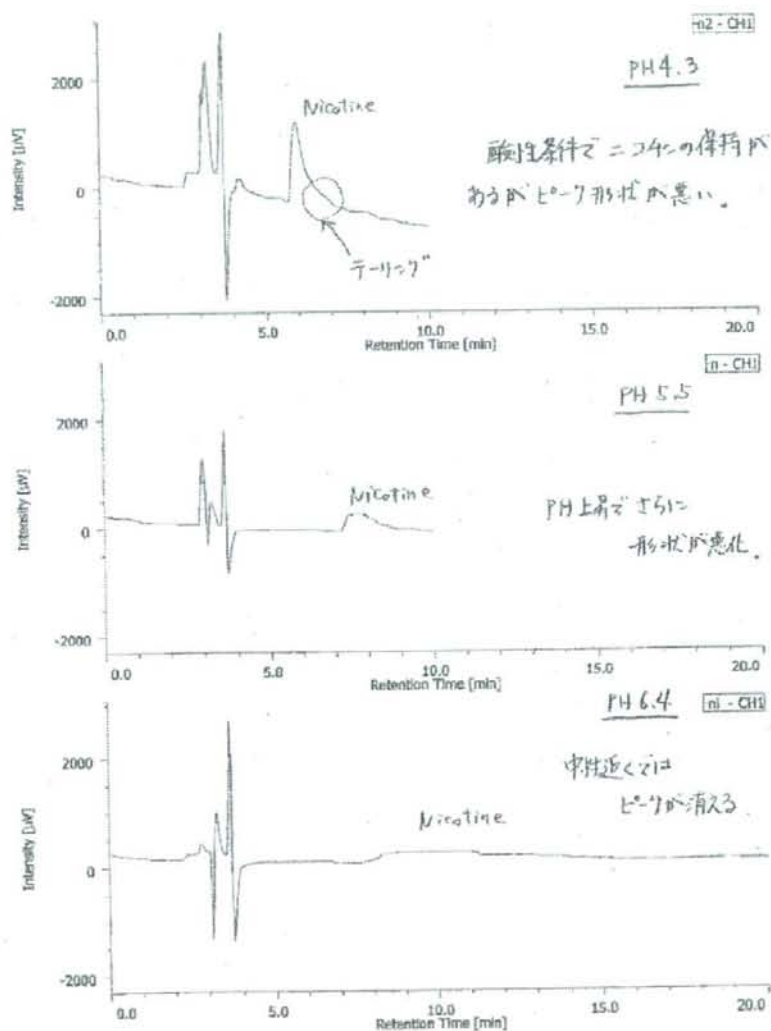
(上段 : 喫煙者のクロマトグラム
下段 : 標準物質のクロマトグラム

使用カラム : Inertsil ODS-3

図 7. イオンペア剤を用いた場合の移動相の組成の検討

< ニコチンの保持がみられる ODS カラム >

クロマトグラム



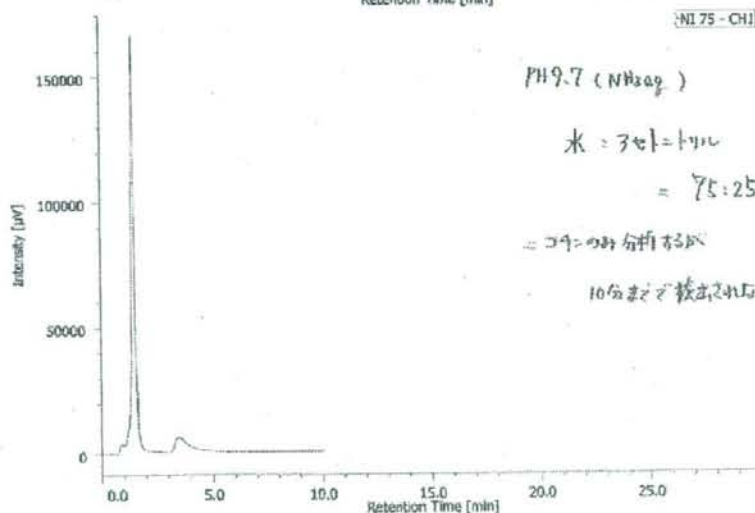
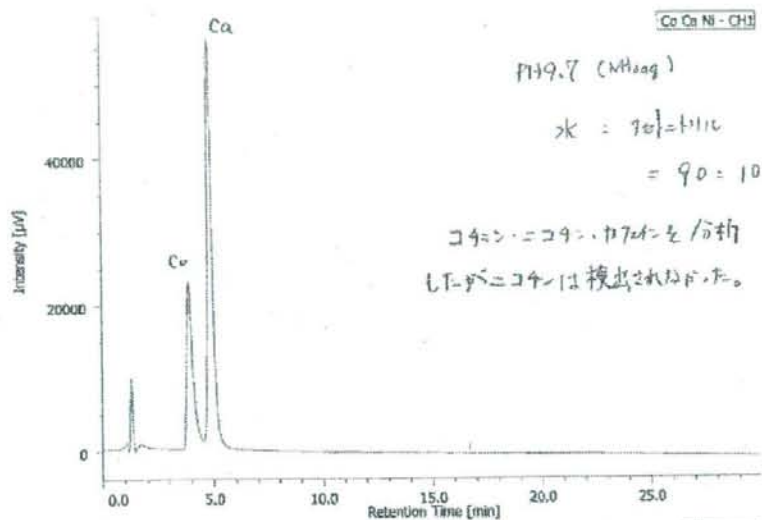
水 : 3-ヒドロキシブタン酸 = 95 : 5

使用カラム : Derelosisil-UG

図 8. ニコチンの保持がみられる ODS カラムの検討

< アルカリ耐性を持った新規 ODS カラム 1 >

クロマトグラム



使用カラム Zorbax Extend C-18

図 9-1. アルカリ耐性を持った ODS カラムの検討(使用カラム: Zorbax Extend C-18)

＜ アルカリ耐性を持った新規 ODS カラム 2 ＞

クロマトグラム

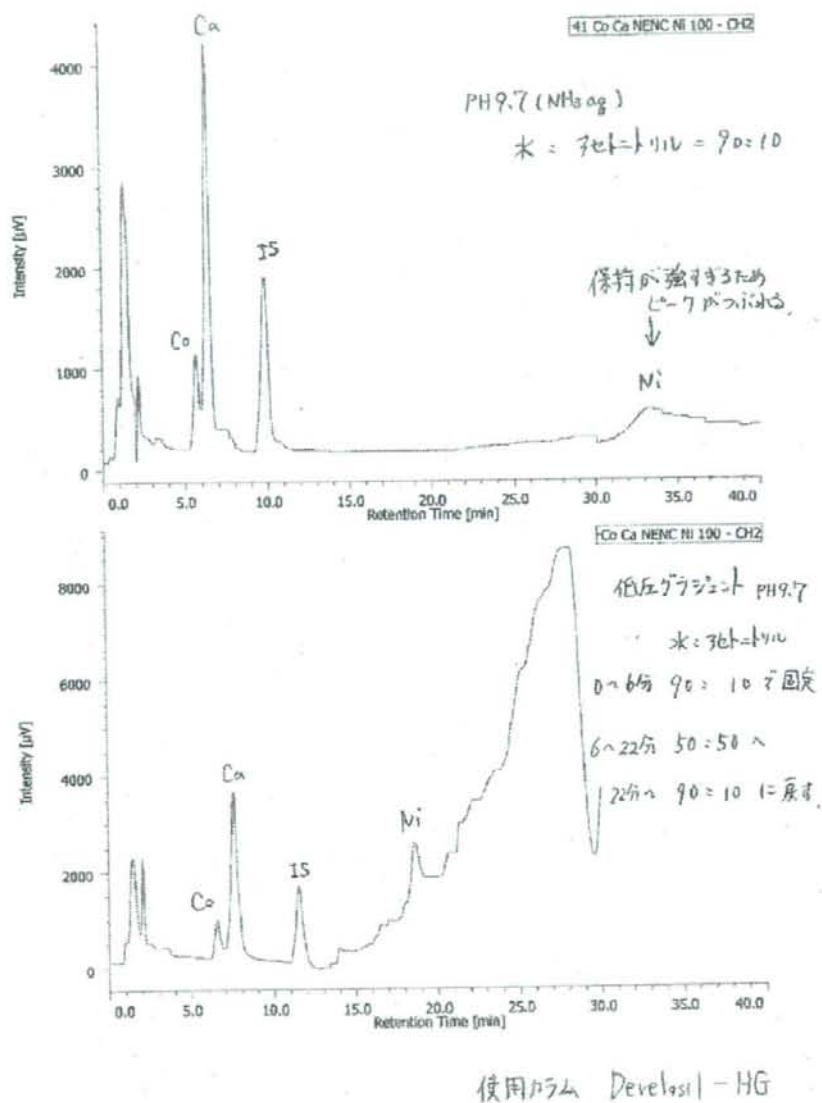


図 9-2. アルカリ耐性を持った ODS カラムの検討 (使用カラム : Develosil-HG)