

原活性は国内販売製品（F試料）と比較して、海外産製品が大きな差を示すことはなかった。葉中ニコチン量についても、上記同様銘柄間での差異が認められなかったため、タール量及びニコチン量は国内製品と同様の品質を保っていることが考えられた。しかしながら、葉中TSNA量は銘柄による差があり、特にD試料が国産品（F試料）の2倍近い値を示したことから、製品に使用しているたばこ葉の種類や複数のたばこ葉による混合率が違うのではないかと推測された。なお、MILD SEVEN ORIGINALを販売する日本たばこ産業のホームページにおいて、海外で販売するたばこ銘柄は、各ブランドの基本的な味、香りは国内製品と同一であるが、各国の嗜好にあわせて製品仕様を微調整している場合があると明記されていた。

D 結論

現在、個人がインターネットなどを通じて購入したたばこ製品についての問題はあくまでも税法上のものであり、その製品品質の差による健康影響ではない。このため今後国内たばこ製品がさらに高騰した場合、個人輸入が増加する可能性がある。そのためにも、海外製品の個人購入者に対して、それら製品の違いを認識してもらう必要がある。特に今回測定した海外産銘柄に発がん性物質である葉中TSNA量が国産銘柄に比べて2倍近く含有されていたことは考慮すべき結果であり、また今後測定予定の主流煙中TSNA量と合わせて検討する必要がある。今後は個人での海外から購入品の動向を注意するとともに、必要なればそれら製品の各種成分測定を行っていききたい。

E 引用文献

[1] ISO 4387. Cigarettes – Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using an routine analytical smoking machine. 3rd ed., International Organization for Standardization,

2000.

- [2] T-115. Determination of tar, nicotine and carbon monoxide in mainstream tobacco smoke, Health Canada, 1999.
- [3] 研究代表者 稲葉洋平. 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（H21-3次がん一般-005）平成22年度 総括・分担研究報告書, 2011.
- [4] ISO 10362-1. Cigarettes – Determination of water in smoke condensates – Part 1: Gas-chromatographic method. 2nd ed., International Organization for Standardization, 1999.
- [5] ISO 10315. Cigarettes – Determination of nicotine in smoke condensates - Gas-chromatographic method. 2nd ed., International Organization for Standardization, 2000.
- [6] ISO 8454. Cigarettes – Determination of carbon monoxide in the vapour phase of cigarette smoke – NDIR method. 2nd ed., International Organization for Standardization, 1995.
- [7] Maron DM, Ames BN. Revised method for the salmonella mutagenicity test, *Mutat Res*, 113, 173-215, 1983.
- [8] 稲葉洋平, 内山茂久, 櫻田尚樹. WHO TobLabNetラウンドロビン研究-たばこ葉中ニコチンの測定-, 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（H21-3次がん一般-005）平成22年度 総括・分担研究報告書, 29-35, 2011.
- [9] 稲葉洋平, 鈴木元, 大久保忠利. 国産たばこ

銘柄のたばこ葉中たばこ特異的ニトロソアミンの測定, 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 (H21-3次がん一般-005) 平成22年度 総括・分担研究報告書, 53-60, 2011.

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

表1 個人輸入たばこの諸元

試料名	A	B	C	D	E	F
パッケージ表示名	MILD SEVEN ORIGINAL	MILD SEVEN ORIGINAL	MILD SEVEN ORIGINAL	MILD SEVEN SKY BLUE	MILD SEVEN ORIGINAL	MILD SEVEN ORIGINAL
輸入元	韓国	マレーシア	韓国	タイ	韓国	
製造元	日本たばこ		日本たばこ			日本たばこ
原産地	日本					日本
製造工場		マレーシア製 フィリピンへの輸出用		フィリピン工場		日本
定価(10箱)	4100→3200円(値下げ)	3100円	2800-3300円 (カートン数で変動)	3800円		4100円
表示言語	韓国	英語	英語	フィリピン	英語	日本
タール(外箱表示, mg)	10		10			10
ニコチン(外箱表示, mg)	0.7		0.8			0.8
箱の形状	丸みのある箱	丸みのある箱	角張った箱	ソフト箱	角張った箱	ソフト箱
箱の色	濃いブルー	薄いブルー	濃いブルー	タバコの有害性写真	濃いブルー	全面ブルー
中のアルミ紙		マイルドセブンマーク付		光沢あり	光沢あり	
免税表記	Duty Free		for DUTY FREE sale only	FOR EXPORT ONLY	for DUTY FREE sale only	
たばこの長さ (mm)	84	84	84	84	84	84
オーバーラップ (mm)	30	32	30	32	30	30
Butt Length (mm)	33	35	33	35	33	33
穴の本数(本)	1	2	1	2	1	1
穴の数(個)	46	46	46	46	46	46
たばこ重量 (mg/本)	888	889	883	847	892	927
全フィルター+紙(重さ/長さ)	285 mg/25mm	293 mg/26 mm	282 mg/25 mm	281 mg/27 mm	283 mg/25 mm	284 mg/24 mm
白フィルター(重さ/長さ)	75 mg/15 mm	89 mg/16 mm	76 mg/15 mm	88 mg/17 mm	78 mg/15 mm	81 mg/15 mm
活性炭フィルター(重さ/長さ)	94 mg/10 mm	84 mg/10 mm	93 mg/10 mm	75 mg/10 mm	90 mg/10 mm	89 mg/9 mm
紙 (mg)	115	120	113	118	115	114
たばこ薬 (mg)	603	596	601	567	609	623

表2 個人輸入たばこ主流煙中の各成分量

	Tar (mg/cig)				Nicotine (mg/cig)				CO (mg/cig)			
	ISO		HCI		ISO		HCI		ISO		HCI	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
A	9.84 ± 0.45		25.0 ± 2.11		0.74 ± 0.06		1.52 ± 0.11		8.47 ± 0.58		21.9 ± 1.32	
B	11.3 ± 0.36		26.0 ± 1.12		0.92 ± 0.03		1.95 ± 0.13		8.17 ± 0.76		19.9 ± 1.41	
C	9.86 ± 0.21		22.2 ± 1.11		0.70 ± 0.03		1.54 ± 0.14		7.47 ± 0.39		18.8 ± 0.85	
D	7.27 ± 0.28		24.5 ± 2.43		0.69 ± 0.05		1.65 ± 0.22		5.91 ± 0.47		19.1 ± 1.36	
E	9.30 ± 0.23		29.6 ± 1.95		0.76 ± 0.03		1.73 ± 0.06		7.25 ± 0.53		18.8 ± 0.75	
F	9.58 ± 0.76		30.7 ± 1.62		0.81 ± 0.05		1.98 ± 0.06		8.52 ± 0.13		19.9 ± 1.66	

表3 個人輸入たばこ主流煙抽出物の変異原性

Smoking protocol	Mutagenicity (revertants/cig)						
	TA100		TA98		YG1024		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
ISO	A	(2,000)	(3,680)	-	7,380	(998)	57,600
	B	(2,850)	(4,080)	-	7,950	(1,430)	75,900
	C	(2,470)	(3,420)	-	6,640	(766)	82,200
	D	2,720	(2,900)	-	6,040	(949)	55,000
	E	(2,720)	(4,000)	-	7,390	(1,090)	76,200
	F	(3,300)	(3,220)	-	6,650	(1,210)	67,000
HCI	A	-	(8,200)	-	15,500	(2,590)	163,000
	B	(10,800)	(7,810)	-	18,000	-	137,000
	C	-	(7,100)	(2,430)	21,600	(1,990)	167,000
	D	-	(6,390)	-	13,900	-	152,000
	E	-	(9,090)	-	18,900	-	158,000
	F	-	(8,200)	-	14,500	(3,160)	132,000

-, negative; (), pseudo positive

表4 個人輸入たばこの葉中の各成分量

	Nicotine (mg/g)		TSNA (ng/g)							
			NNN		NNK		NAT		NAB	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
A	15.7 ± 0.69		1027 ± 18.1		380 ± 33.0		887 ± 11.5		98.4 ± 3.73	
B	19.0 ± 0.18		1388 ± 33.7		627 ± 26.5		1146 ± 19.6		132 ± 0.67	
C	16.1 ± 0.15		1229 ± 18.0		423 ± 40.5		943 ± 21.6		81.0 ± 3.39	
D	20.3 ± 0.24		1386 ± 14.6		744 ± 5.84		1279 ± 17.1		148 ± 3.05	
E	17.6 ± 0.14		1129 ± 20.7		449 ± 31.0		962 ± 10.5		108 ± 2.05	
F	15.1 ± 0.19		885 ± 52.6		186 ± 7.15		770 ± 29.8		77.4 ± 9.23	

たばこ主流煙に含まれる重金属類の測定

研究分担者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院
研究分担者 内山 茂久 国立保健医療科学院
研究分担者 樫田 尚樹 国立保健医療科学院
研究協力者 杉田 和俊 三菱化学アナリティック（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、国産たばこ主要 10 銘柄を選び、ISO 法及び HCl 法の 2 種類の喫煙法でそれぞれの主流煙を捕集し、それらに含まれる発がん関連重金属 11 成分を ICP/質量分析計（ICP/MS）を用いて測定した。測定対象とした 11 成分は前年度の研究において測定を行ったベリリウム（Be）、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）、水銀（Hg）及び鉛（Pb）とした。その結果、主流煙から検出された主な成分は Ni, Cu, Zn, As, Cd 及び Pb であり、その中でも Zn は、ISO 法で 73~248ng/本、HCl 法では 163~379ng/本で最も高い結果となった。また、たばこ葉では主成分の 1 つであった Mn やその他 Cr, Co は主流煙ではほとんど検出されなかった。また、主流煙で検出された重金属含有量は HCl 法が ISO 法に比べ高濃度であり、粗タール量と同様の傾向を示した。また、主流煙中重金属含有量はたばこ葉中重金属含有量と組成比が大きく異なることから、元素の物性や喫煙状態によって重金属のたばこ葉から主流煙への移行率に差があることが示唆された。そこで、移行率を試算したところ、Pb において ISO 法で最大 2.5%、HCl 法で最大 6.9%の移行率が観察された。

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、それらには発がん関連重金属類も含まれている。前年度の本研究ではこれら重金属が、たばこの葉に最初から含まれていることを明らかにした¹⁾。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、喫煙による主流煙中の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。そこで本年度は、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、ISO法²⁾とHCl法³⁾の2種類の方法で主流煙を捕集し、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11成分について主流煙中含量を ICP/MSを用いて測定し、たばこ葉との比較や移行率などについて検討した。

B. 研究方法

(1) 試料の捕集

2006年度の売上上位10銘柄を用い、ISO法及びHCl法の2種類の喫煙法で主流煙を捕集した。捕集には石英繊維ろ紙を用い、ISO法ではろ紙1枚あたり3本、HCl法では1枚あたり2本分の主流煙を捕集した。主流煙を捕集したろ紙5枚をマイクロウェーブによる酸処理に供した。即ち、ISO法では15本、HCl法では10本を1試料として酸処理を行った。

(2) マイクロウェーブによる前処理

捕集後のろ紙は5枚を1試料としてマイクロウェーブ（マイルストーン社製）による酸処理を行った。主流煙の試料はタール含有が予測されたため、硝酸（ELグレード：関東化学社製）及び過酸化水素（三徳化学工業社製）を用いた酸分解を行い、50mLに定容しICP/MS分析試料とした。

(3) ICP/MSを用いた重金属類の分析

重金属類の分析にはAgilent7500C（Agilent technologies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使用した。各重金属類の測定質量数は、Be(9)、Cr(52)、Mn(55)、Co(59)、Ni(60)、Cu(63)、Zn(66)、As(75)、Cd(111)、Hg(202)及びPb(208)とした。内部標準物質としてレニウム（Re）（対象化合物：Cr、Mn、Co、Ni、Cu及びPb）及びイリジウム（Ir）（対象成分：Be、Zn、As、Cd及びHg）を添加し、内部標準法で定量した。

C. 研究結果

(1) 主流煙の捕集用ろ紙

通常、主流煙の捕集にはガラス繊維ろ紙が用いられている。しかし、一般にガラス繊維ろ紙は金属の含有量が比較的多く、金属分析には推奨されていない。一方、ろ紙の種類を変更することにより、主流煙の捕集量が変わることも考えられる。そこで、通常使われているろ紙を用いて、測定対象成分についてブランクチェックを行った。その結果をTable-1に示す。測定の対象とした成分は前年度の研究で測定したベリリウム（Be）、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）、水銀（Hg）及び鉛（Pb）とした。

Table-1より、ろ紙ブランクでは操作ブランクに比べほとんどの成分において10倍以上の濃度が検出され、ろ紙1枚当りの含有量がZnでは7000 µgになることが認められた。そこで、ガラス繊維ろ紙と石英繊維ろ紙及び洗浄方法について比較・検討を行った。その結果をTable-2に示す。Table-2より、ガラス繊維ろ紙ではZn、MnなどHgを除く成分が検出され、ろ紙由来の金属汚染が懸念された。一

方、石英ろ紙では未洗浄（なし）ろ紙に比べ、洗浄したろ紙では、含有レベルの低下が認められ、硝酸-純水-エタノールによる洗浄を行った石英繊維ろ紙を試料捕集に用いることとした。

(2) 主流煙中重金属類濃度

前年度の研究で測定したBe、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、As、Cd、Hg及びPbの11成分をICP/MS分析対象として、ISO法及びHCl法で得られた主流煙中重金属のたばこ1本当りの含有量をTable-3に示す。また、Table-3には、たばこ1本当りの定量下限値及び昨年度の研究結果であるたばこ1本当りのたばこ葉中金属含有量も併せて示した。

Table-3から、主流煙から検出された主な成分はNi、Cu、Zn、As、Cd及びPbであり、その中でもZnはISO法で73~248ng/本、HCl法では163~379ng/本で他の成分に比べて非常に高濃度であった。また、たばこ葉では最も高濃度であったMnが主流煙ではほとんど検出されておらず、Cr及びCoについても主流煙ではほとんど検出されなかった。Be及びHgは、たばこ葉同様に主流煙でも検出されなかった。

検出された重金属類の濃度はISO法では粗タール量と同様にたばこの種類により金属含有量も変動が認められ、粗タール量に比例して増加している傾向が見られた。試料の捕集法による比較を行った結果をTable-4に示す。銘柄毎に1回の測定のため、明確ではないがHCl法で捕集された主流煙中の金属濃度が高い傾向が認められた。粗タール量についても同様の傾向が認められた。

D. 考察

主要10銘柄の主流煙中の重金属含有量を測定した結果、Table-1及びTable-4から主に検出された元素間ではAs<Ni<Cu<Cd<Pb<<ZnとなりZnの含有割合が非常に大きいことが認められた。これは昨年度のたばこ葉中の重金属含有割合と比較すると大きく異なり、たばこ葉で主成分であったMnは主流煙では検出されなかった。このことから、当該重金属の物性や主流煙の捕集方法などにより、主流煙や副流煙、灰への分配、フィルターへの吸着などが異なることが考えられる。そこで、

たばこ葉に含有される重金属濃度を元に主流煙への移行率を試算した。試算方法は元素毎に1本当りの重金属含有量を1本あたりたばこ葉の金属含有量で除することとした。1本当りのたばこ葉中の含有量は昨年度の研究成果であるたばこ葉中の重金属含有濃度及び1本あたりたばこ葉が平均600mgであることを元にして算出した。その結果をTable-5及びFig-2に示す。Table-5については定量下限未満の値についても移行率を試算した。

移行率はPb>Cd>As>Zn,Ni>Cuの順番であり質量数が大きくなるに従って高い移行率を示す傾向が認められた。また、同じ成分ではISO法に比べHCl法で補修した主流煙の方が移行率が高く、粗タール量と同様の傾向が認められた。高い移行率を示したPbでは、ISO法では0.03から6.41%、平均で2.5%に対し、HCl法では5.12から11.9%、平均で6.9%であり、HCl法では高い移行率と共に銘柄間での差が小さいことも認められた。Ni, Cu, Zn, As及びCdについても同様の傾向が見られ、ISO法では10倍程度、HCl法では数倍の差が認められた。

E. 結論

発がん物質の曝露実態把握は発がんリスク低減対策に非常に重要である。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、主要10銘柄のたばこについてISO法及びHCl法で主流煙を捕集し、主流煙に含まれる発がん関連重金属類11種をICP/MSを用いて測定、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重金属類の比率とは大きく異なる組成比が認められ、元素や試料捕集法によってその移行率は大きく異なることが示唆された。そこで、たばこ葉から主流煙への移行率を試算したところ、ISO法とHCl法でそれぞれ10銘柄

の平均でPbでは2.5%と6.9%、Cdでは1.9%と6.0%、Asでは1.2%と3.7%、Znでは0.6%と1.1%、Cuでは0.1%と0.4%、Niでは0.8%と0.6%となり、HCl法が高い傾向が認められた。

今後は副流煙やたばこのフィルターなどへの負荷率についても明らかにすることにより、より精度の高い暴露評価を行う基礎データとなることが期待される。

F. 引用文献

- [1]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.
- [2] ISO 4387. Cigarettes – Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using an routine analytical smoking machine. 3rd ed., International Organization for Standardization, 2000.
- [3] T-115. Determination of tar, nicotine and carbon monoxide in mainstream tobacco smoke, Health Canada, 1999.

G. 研究発表

総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 ガラス繊維ろ紙のブランクチェック

	Filter (3pieces) [ng/mL]	Filter (2pieces) [ng/mL]	BL [ng/mL]	Detectio Limit (3pieces) [µg]	Detectio Limit (2pieces) [µg]
Be	2.0	1.9	0.06	0.1	0.1
Cr	58	54	ND	3	3
Mn	170	140	ND	9	7
Co	7	6	ND	0.4	0.4
Ni	12	10	ND	0.6	0.5
Cu	14	13	ND	0.7	0.7
Zn	220000	190000	160	20000	10000
As	24	21	0.04	2	2
Cd	17	15	0.01	0.9	0.8
Sn	2.3	2.3	0.21	0.2	0.2
Hg	0.08	0.07	0.05	0.004	0.004
Pb	140	140	0.26	7	7

Table-2 ろ紙の洗浄方法の比較

洗浄方法	unit, ng/piece					
	石英ろ紙			ガラス繊維ろ紙		
	なし	硝酸 水 メタノール	硝酸 メタノール	なし	硝酸 水 メタノール	硝酸 メタノール
Be	<0.6	<0.6	<0.6	34	32	25
Cr	210	53	110	630	510	400
Mn	17	9.1	9.1	3100	2600	2200
Co	4.9	1.6	1.9	170	150	130
Ni	98	4.6	8.4	200	150	140
Cu	25	<2	<2	220	110	130
Zn	5.6	2.8	12	4900000	4800000	3600000
As	<0.4	<0.4	<0.4	260	220	160
Cd	<0.1	<0.1	<0.1	340	310	260
Hg	6.7	1.4	<0.5	<0.83	<0.83	<0.83
Pb	<2.6	<2.6	<2.6	2700	2500	2000

Table-3 たばこ1本当りの主流煙中の重金属類濃度

		unit, ng/cig										
Regime	Sample	Be	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Pb
ISO	A Pianissimo One	ND	ND	ND	ND	(3)	(1)	64	(0.3)	(1.1)	ND	(0.1)
	B Mild Seven One	ND	ND	ND	ND	8	(4)	92	(0.3)	(1.5)	ND	0.6
	C Mild Seven Extra Lights	ND	ND	ND	ND	(2)	(3)	40	0.6	3.2	ND	2.1
	D Caster Mild	ND	ND	ND	ND	(4)	8	73	1.0	8	ND	16
	E Mild Seven Super Lights	ND	(6)	ND	ND	(5)	(5)	64	1.2	6.7	ND	6.3
	F Cabin Mild	ND	ND	ND	ND	11	12	163	1.8	10	ND	10
	G Mild Seven Lights	ND	ND	ND	ND	ND	9	168	1.3	9.2	ND	8.2
	H Mild Seven Original	ND	(4)	ND	ND	(3)	9	187	2.2	16	ND	14
	I Hope	ND	28	ND	ND	17	13	153	3.1	44	ND	27
	J Seven Stars	ND	(1)	ND	ND	14	14	248	2.8	23	ND	20
<i>Determination limit (ng)</i>		5	18	3	5	5	5	19	0.4	2	0.6	1
HCI	A Pianissimo One	ND	(1)	ND	ND	(6)	28	272	3.5	30	ND	32
	B Mild Seven One	ND	(6)	ND	ND	(6)	36	292	6.8	72	ND	50
	C Mild Seven Extra Lights	ND	ND	ND	ND	(2)	29	163	3.8	30	ND	24
	D Caster Mild	ND	ND	ND	ND	9	20	175	3.4	29	ND	24
	E Mild Seven Super Lights	ND	14	ND	ND	(5)	18	185	2.9	33	ND	21
	F Cabin Mild	ND	(2)	ND	ND	(6)	26	379	6.2	47	ND	36
	G Mild Seven Lights	ND	(17)	ND	ND	(6)	25	170	4.7	28	ND	26
	H Mild Seven Original	ND	(4)	(1)	ND	(6)	40	376	4.6	41	ND	29
	I Hope	ND	(2)	ND	ND	(6)	25	219	4.6	35	ND	26
	J Seven Stars	ND	(2)	ND	ND	(3)	26	184	4.1	36	ND	22
<i>Determination limit (ng)</i>		8	27	4	8	8	8	28	0.8	2	1	1
Leaf		ND	850	90000	330	890	6400	22000	120	630	ND	420

括弧 () 内の数値は定量下限未満のため参考値

Table-4 ISO法及びHCI法で捕集した主流煙中の重金属含有量概要の比較

		unit, ng/cig											
Regime	Sample	Tar (mg)	Be	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Pb
ISO	Main Stream (av.)	140	—	10	—	—	7	8	125	1	12	—	10
	Detected No.	10	0	4	0	0	9	10	10	10	10	0	10
	Main Stream (min.)	31	—	1	—	—	2	1	40	0	1	—	0
	Main Stream (max.)	283	—	28	—	—	17	14	248	3	44	—	27
HCI	Main Stream (av.)	342	—	6	1	—	6	27	242	4	38	—	29
	Detected No.	10	0	8	1	0	10	10	10	10	10	0	10
	Main Stream (min.)	212	—	1	1	—	2	18	163	3	28	—	21
	Main Stream (max.)	440	—	17	1	—	9	40	379	7	72	—	50

表-5 たばこ葉から主流煙への重金属の移行率

Regime	Element	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	unit, %
												av.
ISO	Be	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cr	-	-	-	-	0.76	-	-	0.46	3.27	0.06	1.14
	Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Co	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ni	0.30	0.86	0.26	0.47	0.55	1.19	-	0.35	1.87	1.56	0.82
	Cu	0.02	0.06	0.05	0.12	0.08	0.19	0.14	0.15	0.21	0.22	0.12
	Zn	0.29	0.42	0.18	0.33	0.29	0.74	0.76	0.85	0.70	1.13	0.57
	As	0.26	0.22	0.48	0.84	0.97	1.46	1.10	1.86	2.62	2.30	1.21
	Cd	0.18	0.24	0.50	1.22	1.07	1.53	1.47	2.58	6.92	3.63	1.94
	Pb	0.03	0.15	0.50	3.74	1.51	2.45	1.95	3.45	6.41	4.76	2.49
HCI	Be	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cr	0.16	0.66	-	-	1.70	0.22	1.99	0.51	0.22	0.24	0.71
	Mn	-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	-	0.001
	Co	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ni	0.70	0.68	0.19	1.01	0.60	0.63	0.66	0.67	0.73	0.35	0.62
	Cu	0.44	0.57	0.45	0.31	0.28	0.40	0.39	0.63	0.39	0.41	0.43
	Zn	1.24	1.33	0.74	0.80	0.84	1.72	0.77	1.71	1.00	0.84	1.10
	As	2.93	5.67	3.20	2.87	2.40	5.13	3.93	3.87	3.87	3.40	3.73
	Cd	4.73	11.48	4.79	4.63	5.25	7.38	4.41	6.56	5.54	5.65	6.04
	Pb	7.71	11.90	5.65	5.67	5.12	8.51	6.26	6.79	6.22	5.19	6.90

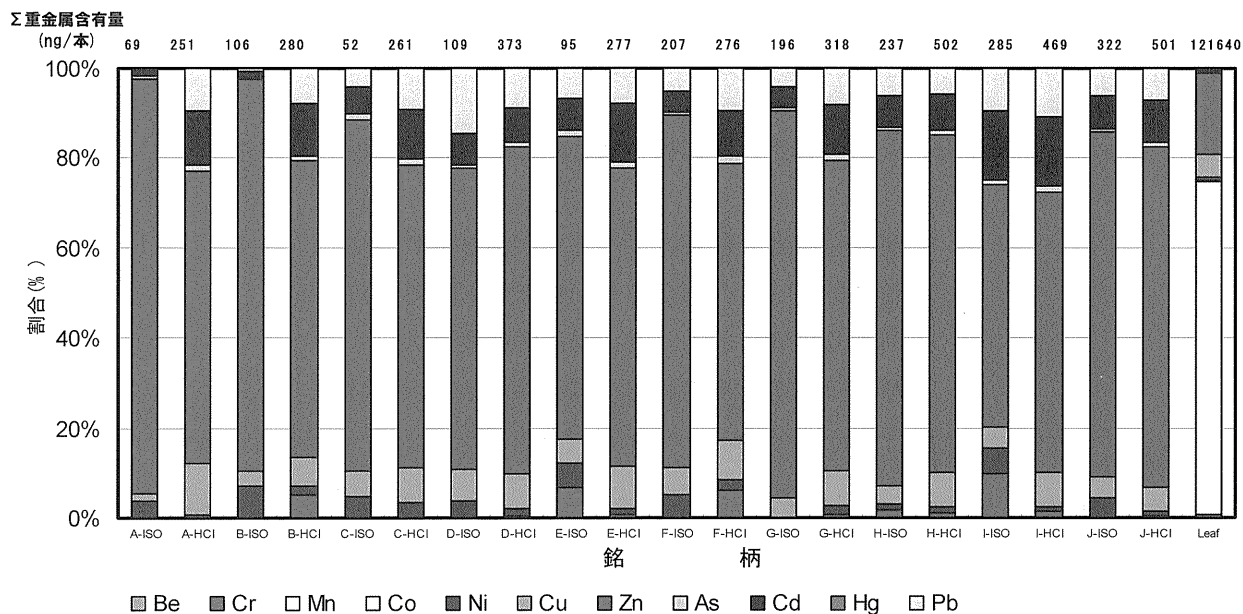


Fig-1 主流煙及びたばこ葉中の重金属含有割合の比較

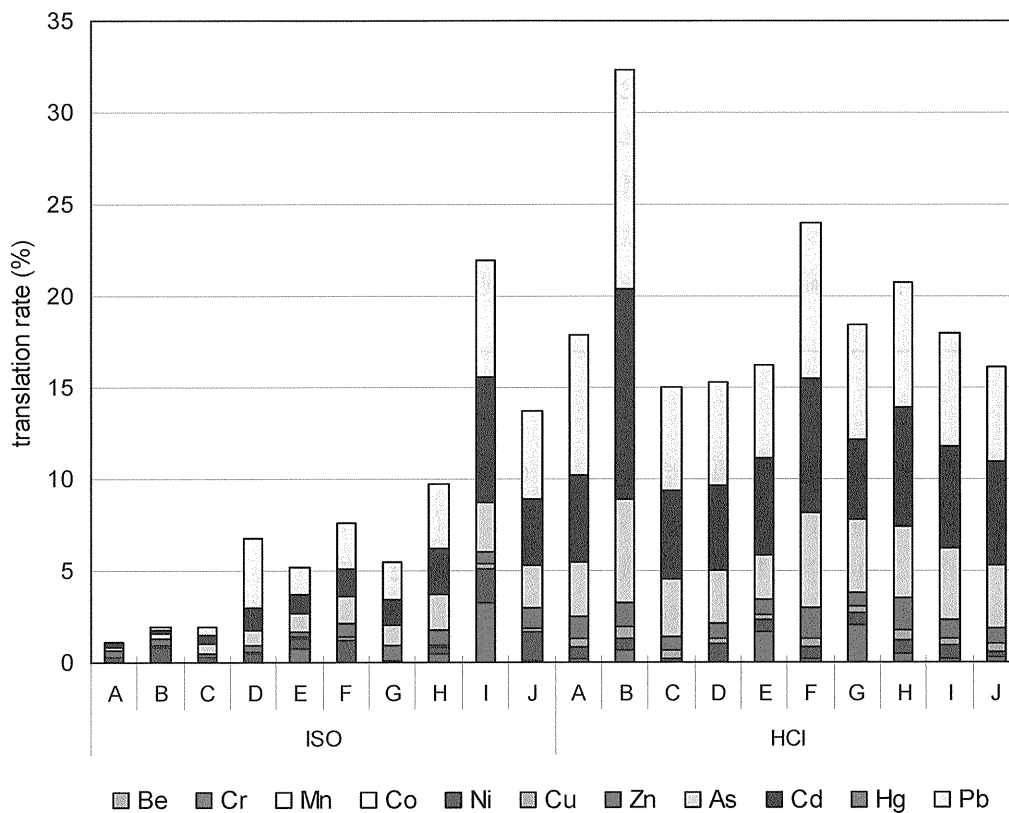


Fig-2 たばこ葉から主流煙への重金属の移行率

喫煙者の尿中ニコチン代謝物の測定のための固相抽出法の確立

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院

研究分担者 内山茂久 国立保健医療科学院

研究分担者 鈴木 元 国際医療福祉大学

研究分担者 樺田尚樹 国立保健医療科学院

研究要旨

本研究は、喫煙者の曝露実態を評価するためにニコチン代謝物の測定手法の確立を行った。先行研究の報告にもあるように低タール・低ニコチンたばこの喫煙者は、「代償性補償喫煙行動」を起こすことによってニコチンをはじめとする有害化学物質の曝露量が上昇し、たばこ外箱表示とは一致しない喫煙行動を行う傾向がある。そのため、尿中ニコチン代謝物の測定を行ない喫煙者のより詳細な曝露実態を把握することは重要性が高い。そこで本研究では、ニコチンの代謝物としてニコチン、コチニン、3-ヒドロキシコチニンとそれら化合物のグルクロン酸抱合体の測定法を確立した。尿中の各種化合物の前処理法は、ENVI-Carb と Oasis MCX の2つの担体を組み合わせた固相抽出を行い、次に、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) を使用して、3-ヒドロコチニンの誘導体化を行った。その試料をガスクロマトグラフ/質量分析装置によって測定した。定量範囲は、50-12,000 ng/mL であり、CV は、1.2-7.6%であった。また回収率は、70-149%であった。禁煙外来患者の尿中測定を実施したところ、ほとんど参加者においてニコチン代謝物の低減が確認された。今後は、受動喫煙者にも対応した手法の開発を進める計画である。

A. 研究目的

たばこ煙には、多くの有害化学物質が含まれていることが報告されており、その生体への影響が議論されている。2004年に世界保健機関 (WHO) の附属機関である国際がん研究機関 (IARC) は、発がん性の網羅的な分類において「喫煙」、「たばこ煙」と「受動喫煙」は、分類最上位のグループ1の「発がん性がある」とした[1]。この喫煙とがんに関する問題は、たばこの煙に有害化学物質が数多く含まれていることに起因しており、現在までに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

と報告されている[2]。さらに主流煙は、IARCの発がん性リスク一覧のグループ1とされた「ヒトに対する発がん性が認められる」16化合物が確認されている。このグループ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、大気汚染物質として知られている多環芳香族炭化水素類のベンゾ[a]ピレンとたばこに特有の有害物質であるN'-ニトロソノルニコチン (NNN) および4-(N-ニトロソメチルアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK) などが含まれている[1]。また、これら有害化学

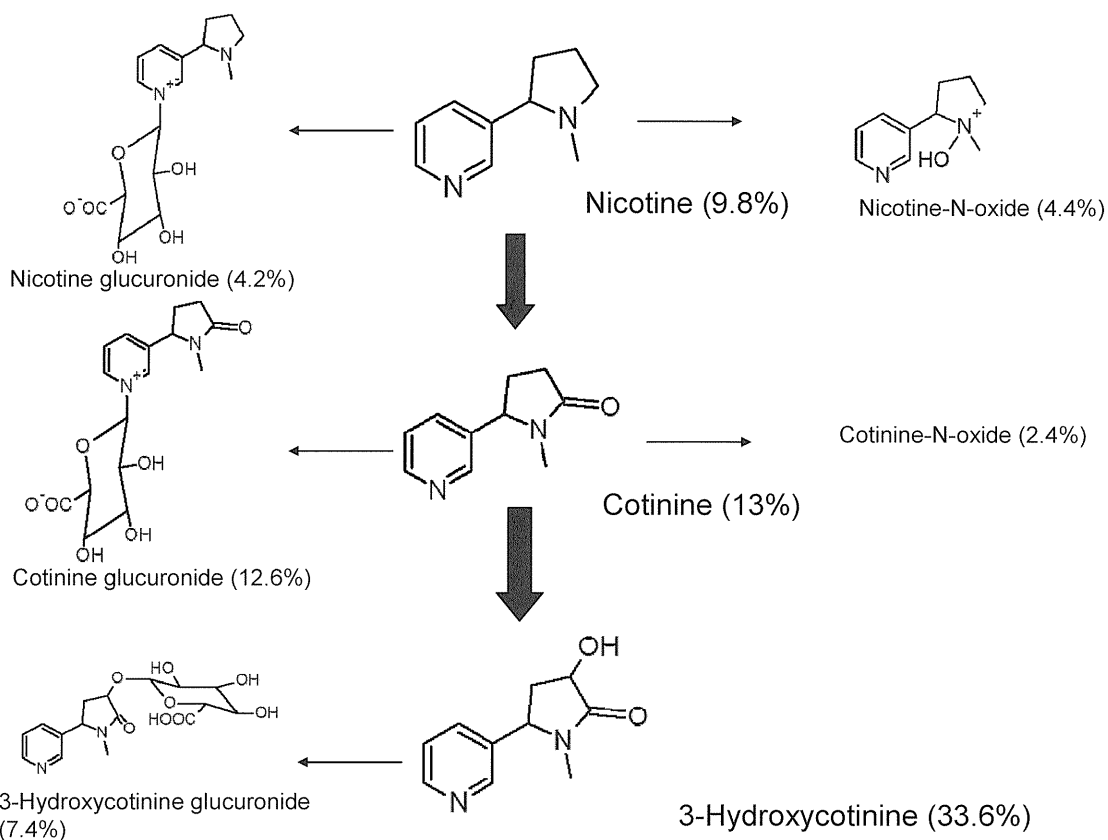


Fig.1 Quantitative scheme of nicotine metabolism, based on estimates of average excretion of metabolites as percent of total urinary nicotine [3].

物質以外にもたばこの依存性に大きく関与する化学物質として「ニコチン」がある。ニコチンは、たばこ特異的な化学物質であり、現在では、依存症の原因物質として認識されている。また、我が国においても 2006 年 4 月からニコチン依存症患者の病院での禁煙治療が健康保険制度の適用となった。このニコチンは、生体内に取り込まれるとコチニンまたは 3-ヒドロキシコチニンやそのグルクロン酸抱合体などのニコチン代謝物に変換され、最終的には尿へ排泄される (Fig. 1) [3]。この尿中ニコチン代謝物の測定をすることによってたばこ煙の曝露評価が可能になってくる。また、これまで報告のあるニコチン代謝物測定法は、コチニンを目的対象物質とした報告が多いが、喫煙者の曝露状況を把握するには、コチニンばかりではなくニコチン、3-ヒドロキシコチニンとその

グルクロン酸抱合体を詳細に測定し、評価することが必要になると考える。さらには、鈴木らの報告[4]にもあるように、低タール・低ニコチンたばこの喫煙者は、「代償性補償喫煙行動」を起こすことによってニコチンをはじめとする有害化学物質の曝露量が上昇し、たばこ外箱表示とは一致しない喫煙行動を行う傾向がある。そのため、尿中ニコチン代謝物の測定を行わない喫煙者のより詳細な曝露実態を把握することは重要性が高い。

そこで本研究では、喫煙者を対象とし、先行研究[9]において分析法による回収率が低かった 3-ヒドロキシコチニンとニコチン、コチニンの同時前処理法の確立を行い、ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS) によって分析する手法の開発を行った。

B. 研究方法

(1) 被験者

本研究の被験者は、今年度の鈴木らの研究に参加した禁煙外来患者 11 名の尿試料を使用した。本研究計画「禁煙による尿中酸化ストレス・バイオマーカー変動に関する研究」(受付番号 FK-28) は、国際医療福祉大学病院の倫理委員会で審査され、平成 22 年 10 月 1 日付けで承認された。

(2) クレアチニン測定

尿中クレアチニンの測定には、クレアチニン測定用キットである和光純薬製クレアチニン-テスタワコー (Jaffé 法) を適用した。

(3) 尿中ニコチン代謝物の測定

尿中ニコチン代謝物の固相抽出には、ENVI-Carb (250 mg/6 mL; SUPELCO 社製) と Oasis-MCX (150 mg/6 mL; Waters 社製) を用いた。なお、本測定原理は、2 種類の固相抽出用のカラム (活性炭, 陽イオン交換能を有する合成吸着剤) の組み合わせで実施した。2 段階の固相抽出法は、Fig 2 に示した。GC/MS は、HP6890 (Agilent technology 製) を用いた。GC 部は、キャピラリーカラムに HP-5MS (J&W Scientific 製, 30 m x 0.25 mm id, 0.1 μm film) を用いた。オープン温度は、50°C で 2 分間保持後、毎分 15°C で 180°C まで昇温後、毎分 2°C で 200°C まで昇温し、毎分 12°C で 215°C まで昇温し、さらに毎分 20°C で 280°C まで昇温して 10 分間保持した。注入口温度は 250°C、インターフェイス温度は 280°C に設定した。キャリアガスにはヘリウムを用い、流量は 1 mL/min に設定した。試料はスプリットレスで 1 μL 注入した。MS 部については、電子イオン化エネルギーは 70 eV、測定する m/z は、ニコチンは 84, 161, コチニンは 98, 176, 3-ヒドロキシコチニンは 144, 249, ニコチン-d₃ は、87, 164, コチニン-d₃ は、101, 179 そして 3-ヒドロキシコチニン-d₃

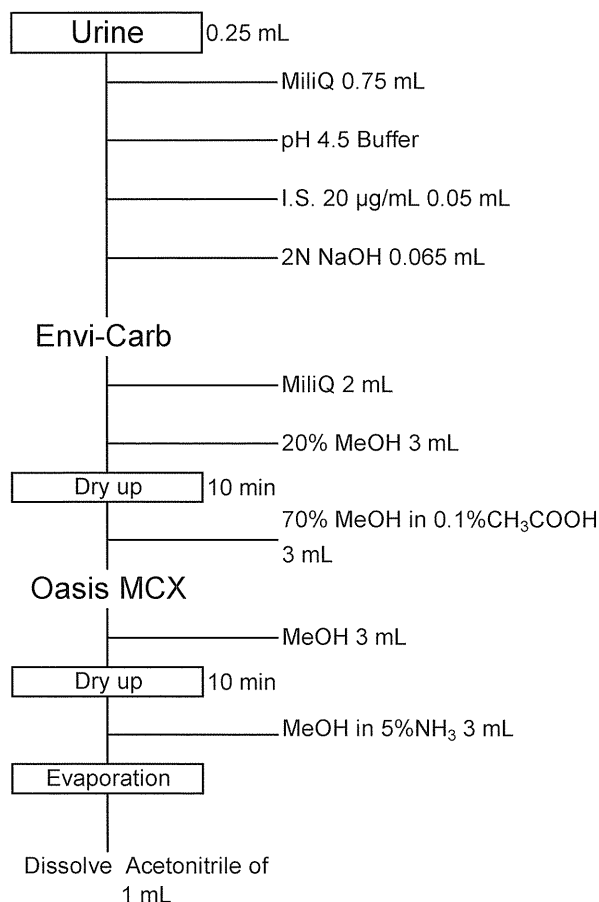


Fig.2 Solid phase extraction of nicotine metabolites in urine.

が 147, 252 で、SIM モードで測定した。

C. 研究結果及び考察

(1) 3-ヒドロキシコチニン誘導化反応時間の検討

本研究の測定対象物質である 3-ヒドロキシコチニンは、GC/MS で測定を行うためには誘導体化の必要がある。これまでに誘導体化剤として N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (BSTFA) が報告されている[5]。本研究では、BSTFA より反応性の高い試薬である 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) を使用して、3-ヒドロキシコチニンの誘導体化を行った[6, 7]。アセトニトリルで調製した 3-ヒドロキシコチニンまたは 3-ヒドロキシコチニン-d₃ 標準溶液と 1%tert-ブチ

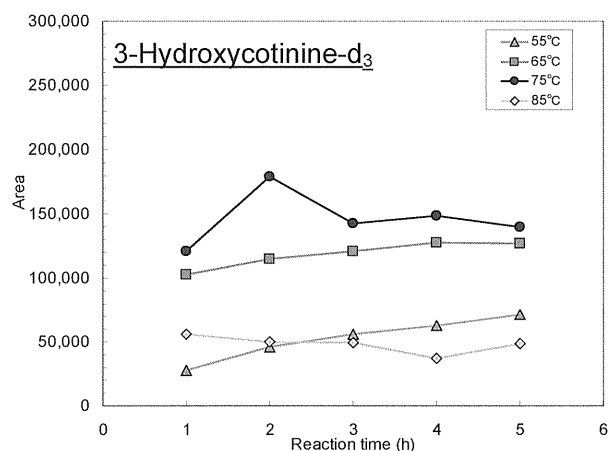
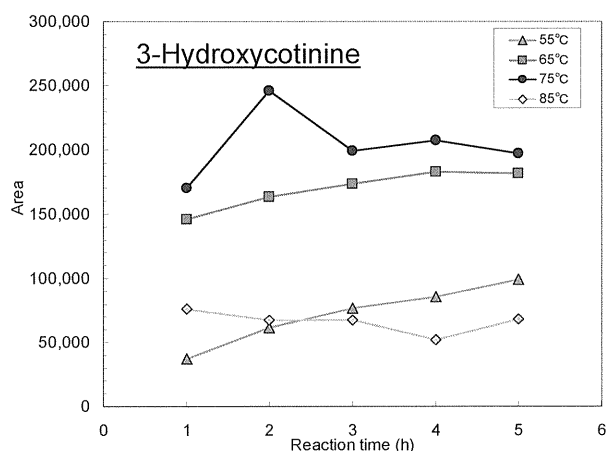


Fig. 3 Optimum condition of reaction time and temperature by 3-hydroxycotinine and MTBSTFA.

ルジメチルクロロシランが添加された MTBSTFA 溶液を 35 μ L ずつ混合し、55, 65, 75, 85°C でそれぞれ 1, 2, 3, 4, 5 時間反応させた後に GC/MS に供した。Fig. 2 は、測定結果を示す。この結果より 3-ヒドロキシコチニン、3-ヒドロキシコチニン-d₃ 標準溶液ともに 75°C 条件で反応したときに最も高い反応が確認された。また、反応時間については、大きな差は確認されなかった。よって、誘導体化の条件は、反応温度は 75°C とし、反応時間は比較的した結果が得られた 3 時間とした。

(2) ニコチン代謝物の検量線

ニコチン、コチニン、3-ヒドロキシコチニンの重水素標識体を利用した内部標準法を用いて、検量線の作成を行った (Table 1)。まず、本研究で使用した GC/MS の検出下限値は、3 化合物ともに 5 ng/mL であった。次に定量下限値は、12.5 ng/mL であり、定量範囲は 12.5-3,000 ng/mL となった。本手法は、尿試料 0.25 mL を最終的に 1 mL のアセトニトリルで再溶解しているため、定量範囲は 50-12,000 ng/mL となっている。よって本手法では Geniewicz らが報告した喫煙者と受動喫煙者の境界濃度である 31.5 ng/mL [8] と比較すると

Table 1. LOD and linearity.

Compounds	LOD, ng/mL	Clibration range, ng/mL	Calibration equation	R ²
Nicotine	5	12.5-3,000	y = 0.0022 x + 0.0181	0.9996
Cotinine	5	12.5-3,000	y = 0.0023 x - 0.0427	0.9994
3-Hydroxycotinine	5	12.5-3,000	y = 0.0027 x - 0.0522	0.9996

若干感度に劣ることが分かった。

(3) 前処理条件の検討

ENVI-Carb へ吸着されたニコチン代謝物の溶出条件の検討を行なった。まず、各重水素標識体が前処理後に 1,000 ng/mL になるように添加し、前処理操作、GC/MS に供したところ、70%メタノール溶液の条件においてニコチンの回収率が、終濃度 1%酢酸含有 70%メタノールを除いて 90%付近であることが確認された (Table 2a)。次に、尿試料に各重水素標識体を添加し、標準溶液と同様に

Table 2. Recovery of nicotine-d₃, cotinine-d₃ and 3-hydroxycotinine-d₃ in standard solution or urine sample by SPE method.

(a) Standard solution

MeOH	ENVI-Carb add acid	Recovery (%)					
		Nicotine-d ₃		Cotinine-d ₃		3-Hydroxycotinine-d ₃	
		164	87	179	101	252	147
70%	0.1%CH ₃ COOH	94.8	102.0	99.0	107.4	78.3	88.2
	1%CH ₃ COOH	104.1	108.6	92.2	99.4	70.8	82.5
	0.1%HCOOH	109.5	114.2	95.0	99.8	76.1	88.7
	0.1%HCOOH	90.6	88.8	87.6	87.3	72.0	80.1
	1%HCOOH	70.1	62.4	91.4	91.3	86.4	95.3
100%	0.1%CH ₃ COOH	72.3	65.3	88.7	87.2	87.0	95.9
	1%CH ₃ COOH	59.5	52.7	88.0	91.2	77.7	87.4
	0.1%HCOOH	80.4	72.4	92.0	88.8	90.2	99.9
	0.1%HCOOH	80.4	72.4	92.0	88.8	90.2	99.9
	1%HCOOH	84.4	77.0	108.5	106.6	114.4	123.6

(b) Urine sample

MeOH	ENVI-Carb add acid	Recovery (%)					
		Nicotine-d ₃		Cotinine-d ₃		3-Hydroxycotinine-d ₃	
		164	87	179	101	252	147
70%	0.1%CH ₃ COOH	92.3	92.8	87.6	91.5	82.5	92.5
	1%CH ₃ COOH	93.7	93.1	85.6	90.2	80.6	87.1
	0.1%HCOOH	108.7	108.4	103.6	110.1	102.4	110.9
	0.1%HCOOH	84.7	82.7	63.3	65.5	61.7	65.9
	1%HCOOH	90.6	90.3	78.4	82.1	79.4	86.4
100%	0.1%CH ₃ COOH	86.0	85.8	84.2	86.6	83.5	92.8
	1%CH ₃ COOH	89.4	89.3	89.7	92.9	82.4	87.4
	0.1%HCOOH	81.8	82.9	78.4	82.4	73.2	80.1
	0.1%HCOOH	81.8	82.9	78.4	82.4	73.2	80.1
	1%HCOOH	82.5	83.7	91.6	94.2	82.3	88.3

前処理を行い、回収率を計算した (Table 2b)。その結果、終濃度 0.1 または 1%酢酸含有 70%メタノール溶液が、ニコチン代謝物の重水素標識体の回収率が良いことが確認された。そこで本研究は、尿中の夾雑物の溶出力が弱く、2 番目を行う Oasis-MCX へ直接ロード可能な終濃度 0.1%酢酸含有 70%メタノールを ENVI-Carb 処理の溶出条件とした。また、溶出条件における尿試料に添加した重水素標識体の回収率が 80.6-93.7%であったことから、本 2 段階固相抽出法が有効であったことが分かった。

(4) 酵素反応時間の検討

ニコチン代謝物の 4.2-12.6%は、生体内でグルクロン酸抱合されて尿に排泄される[3]。このグルクロン酸抱合体から遊離のニコチン代謝物へ変換するためには、酵素 β -グルクロニダーゼ (EC 3.2.1.31) による酵素処理が有効である。そこで、本研究では、尿試料あたりの最適酵素活性と反応時間の検討を行った。また、今回使用した β -グルクロニダーゼは、*Helix pomatia* 由来のため酵素反応の pH 及び温度は至適条件である 4.5 と 37°C で実施した。さらに、尿試料 0.25 mL において評価を行なったところ、Nicotine-Glucuronide から Nicotine への変換は、6 時間以降は安定した結果となり、1000U が良好な条件であった。次に、Cotinine-Glucuronide と 3-Hydroxycotinine-Glucuronide は、Nicotine-Glucuronide と同様に 1000U で良好な結果が得られ、反応開始から 24 時間までゆっくりと反応が確認された。以上のことから、喫煙者の尿中ニコチン代謝物グルクロン酸抱合体の酵素反応条件は、1000U、24 時間であることが確認され、以後、この条件で研究を進めた。

(5) 同時再現性

Table 3 は、4 名の喫煙者の尿中ニコチン、コチ

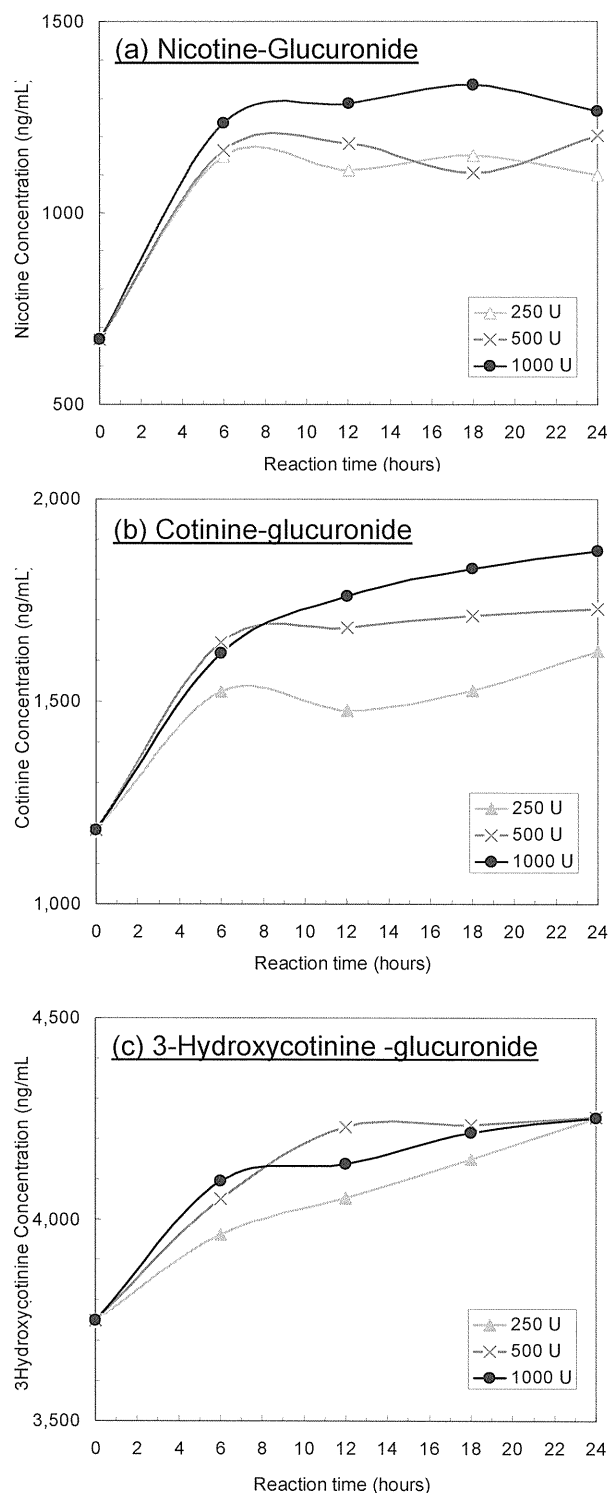


Fig. 4 Effect of enzyme activity and reaction time by β -Glucuronidase. (a) Nicotine-Glucuronide, (b) Cotinine-glucuronide, (c) 3-Hydroxycotinine-glucuronide.

ニンと 3-ハイドロキシコチニンの同時再現性試験の結果 (n=7) である。ニコチンの CV は、1.1-3.4%

Table 3. Intra-day reproducibility for urine samples at different concentrations.

β-Glucuronidase	Sample No.	Nicotine (ng/mL)		Cotinine (ng/mL)		3-Hydroxycotinine	
		Average	CV (%)	Average	CV (%)	Average	CV (%)
Non	1	540	3.4	1,300	6.0	1,500	1.2
	2	1,100	1.1	400	3.2	nd	—
	3	930	2.2	350	7.6	nd	—
	4	510	3.4	1,600	5.3	24,000	4.9
Add	1	1,500	2.4	3,500	3.3	3,100	2.1
	2	2,000	1.8	600	2.8	nd	—
	3	2,800	2.1	770	4.0	nd	—
	4	2,400	1.7	9,400	3.5	51,000	2.7

であり、コチニンが 2.8-7.6%そして 3-ヒドロキシコチニンが 1.2-4.9%と比較的安定した結果が得られた。また、喫煙者の尿中ニコチン代謝物の濃度範囲もニコチンが 510-2800 ng/mL, コチニンが 350-9,4000 ng/mL として 3-ヒドロキシコチニンが 1,500-51,000 ng/mL と喫煙者の想定される濃度であったことから本手法の有効性が確認された。また、β-グルクロニダーゼ処理を行った尿試料についてもほぼ同様の再現性が確認されたことから、β-グルクロニダーゼ処理によって、ニコチン代謝物の前処理や測定に影響を与えることはないと考えられた。

(6) 添加回収実験

Table 4 は、5 名の喫煙者の添加回収実験の結果を示した。これは、それぞれの尿試料にニコチン、コチニンそして 3-ヒドロキシコチニンの標準

Table 4. Recovery of nicotine, cotinine and 3-hydroxycotinine in urine samples by the proposed solid phase extraction

β-Glucuronidase	Sample No.	Recovery (%)		
		Nicotine	Cotinine	3-Hydroxycotinine
Non	5	102 - 130	71 - 91	70 - 98
	6	90 - 100	83 - 91	85 - 94
	7	96 - 101	87 - 99	94 - 109
	8	96 - 98	84 - 90	72 - 101
	9	94 - 98	84 - 91	90 - 100
Add	5	103 - 127	89 - 95	100 - 123
	6	98 - 102	85 - 94	85 - 93
	7	99 - 103	91 - 118	91 - 149
	8	-	-	-
	9	98 - 103	92 - 104	90 - 94

Added nicotine, cotinine and 3-hydroxycotinine concentration is 100, 200, 400, 1000, 2000 ng/mL, respectively

溶液を 100, 200, 400, 1000, 2000 ng/mL ずつ添加し、そのときの回収率の範囲を示している。未酵素処理のそれぞれの尿試料のニコチン回収率は、94-130%であった。また、コチニンは 71-99%, 3-ヒドロキシコチニン 70-109%であった。コチニンの回収率がサンプル No. 5 の 100 ng/mL の 71%で確認されているが、それ以外の結果では、83-118%であった。3-ヒドロキシコチニンについては、サンプル No. 5 と No.8 の 100 ng/mL において 70 と 72%であり、No. 7 の 100 ng/mL の条件で 149%であった。

(7) 禁煙外来患者のニコチン代謝物の測定

最後に本研究班の鈴木が実施している禁煙外来患者の尿中ニコチン代謝物の測定を行った (Table 5)。禁煙外来患者 11 名は、初回の外来時の尿中測定値は、ニコチン代謝物は検出されたが、2 回目の外来以降、明らかなニコチン代謝物の減少が確認された。しかしながら、コチニン濃度は、他の 2 化合物が検出されない場合においても若干は検出されていた。患者に測定結果を伝える際には、この濃度範囲は、受動喫煙レベルの曝露と評価されても不自然ではないといった説明も必要になると考えられる。今後は、本手法と既知の手法と

の比較検討を行い、さらには受動喫煙者の尿中にニコチン代謝物レベルまでの感度で測定する手法の開発を促進する計画である。

Table 5. Amounts of nicotine, cotinine and 3-hydroxycotinine in urine samples.

Sample		(ng/mg Creatinine)		
		Nicotine	Cotinine	3-Hydroxycotinine
#1	1	1400	3,300	3,900
	2	72	1,400	2,000
	3	0	580	0
	4	0	0	0
#2	1	1,900	680	0
	2	300	660	0
	3	0	420	0
	4	0	220	0
#3	1	1,200	440	0
	2	1,000	470	0
	3	0	430	0
	4	0	260	0
#4	1	410	1,300	20,000
	2	0	170	480
	3	0	230	0
	4	0	100	0
#5	1	570	1,300	4,100
	2	150	870	2,200
	3	0	100	0
	4	0	530	0
#6	1	1,200	1,400	1,200
	2	0	180	150
	3	0	200	0
	4	0	250	0
#7	1	280	2,200	8,000
	2	0	150	200
	3	55	120	0
	4			
#8	1	260	1,600	14,000
	2	580	1,300	14,000
	3	320	1,500	14,000
	4			
#9	1	0	1,700	1,300
	2	0	1,900	1,000
	3	170	2,200	1,900
	4			
#10	1	450	780	7,800
	2	120	650	4,300
	3	0	120	0
	4	0	250	0
#11	1	2,400	2,000	1,100
	2	500	2,400	1,200
	3	0	290	0
	4	0	0	0

D. 結論

本研究では、ENVI-Carb と Oasis MCX の 2 つの担体を組み合わせた固相抽出を行い、次に、

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) を使用して、3-ヒドロコチニンの誘導体化を行い、最終的に GC/MS で定量する尿中ニコチン代謝物の測定法を確立した。本手法は、禁煙外来患者に適用可能であった。今後は、他の手法との比較実験、受動喫煙者の尿試料での測定を行う計画である。また、本研究において確立した固相抽出法は、GC/MS ばかりでなく LC/MS/MS に供することも可能であることを確認している。今後の受動喫煙者の尿試料に関しては、LC/MS/MS で実施することも計画している。

[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] Benowitz NL, Jacob P 3rd, Fong I, Gupta S. Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. J Pharmacol Exp Ther. 268, 296-303. 1994.
- [4] 鈴木元、アジア太平洋たばこ研究－日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価－、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の新しい国際標準化試験法に関する研究平成 20 年度総括・分担研究報告書 12-18. 2009.
- [5] Kim I, Darwin WD, Huestis MA. Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using

- solid phase extraction and gas chromatography
-mass spectrometry. 814, 233-240, 2005.
- [6] 小川茂. GC/MS, LC/MS のための誘導体化.
ぶんせき 332-336, 2008
- [7] Schummer C, Delhomme O, Appenzeller BM,
Wennig R, Millet M. Comparison of MTBSTFA
and BSTFA in derivatization reactions of polar
compounds prior to GC/MS analysis.. Talanta 77,
1473-1482, 2009.
- [8] Goniewicz ML, Eisner MD, Lazcano-Ponce E,
Zielinska-Danch W, Koszowski B, Sobczak A,
Havel C, Jacob P, Benowitz NL. Comparison of
urine cotinine and the tobacco-specific nitrosamine
metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-
butanol (NNAL) and their ratio to discriminate
active from passive smoking. Nicotine Tob Res 13,
202-208, 2011.
- [9] Kim I, Darwin WD, Huestis MA. Simultaneous
determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and
trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using
solid phase extraction and gas chromatography
-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt
Technol Biomed Life Sci. 814, 233-240, 2005.

F. 研究発表

統括報告書に一括表記した。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

「禁煙による尿中酸化ストレス・バイオマーカー変動に関する研究」

研究分担者 鈴木 元 国際医療福祉大学クリニック

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院

研究要旨

仮説と目的：本研究では、複数の尿中酸化ストレス・バイオマーカーが禁煙により変動するのかわかを検討し、どのマーカーがもっとも禁煙効果を反映するのかわかを検討する。もって、禁煙外来で患者さんの禁煙モチベーションを増加させる情報提供に役立てる。

方法：バレニクリン（チャンピックス）を処方された禁煙外来患者より、書面による同意を得た上で、初回（喫煙中）、1週後（バレニクリン服用1週目、喫煙中）、4週後（禁煙3週目）、12週後（禁煙11週目）の4回採尿し、酸化ストレスマーカー8-isoprostane, 5-isoprostaglandin F2 α -VI, 8-OHdGを、ニコチン関連分子としてNicotine, Cotinine, 3-OH-Cotinineを測定した。値は、尿中creatinine濃度で補正した。

結果：平成23年4月から平成24年2月現在、13名が研究に参画した。このうち11名（2名途中脱落）の対象者のサンプルに関し、解析が終了した。ニコチン関連分子は禁煙後有意に減少したが、8-isoprostane, 5-isoprostaglandin F2 α -IVは、変化がなかった。8-OHdGは、今後測定する。

結論：酸化ストレス・バイオマーカーのゴールドスタンダードと謂われる8-isoprostaneに関しては、先行研究と異なり、禁煙11週で有意な変化は認められなかった。

倫理的配慮：本研究は、国際医療福祉大学病院倫理委員会の審査を受け、承認された（受付番号FK-28,H22.10.28承認）。

A. 研究仮説と目的

たばこ煙は4000種類を超す化学物質を含み、その中にはアルデヒド類やアルファ放射性核種であるポロニウム-220やカルボニル・ラジカルなど呼吸器官の酸化損傷を引き起こす物質が含まれている。実際、Morrowらの先行研究により酸化ストレスのゴールドスタンダードとして酸化損傷を受けた脂質の代謝産物である血漿中のF2-isoprostane類が確立され、この酸化ストレス・バイオマーカーは2週の禁煙により有意に低下することが報告されている^{1,2}。しかし測定法が煩雑

なこともあり、臨床応用はされてこなかった。今回、我々は、尿中の8-isoprostaneを固相抽出とLC/MS/MSを組合せることによって測定する手法を確立し、禁煙の効果を検討した。平行して、酸化損傷を受けたDNAの代謝産物である8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)^{3,4}を測定した。

研究仮説：禁煙は尿中酸化ストレス・バイオマーカーを低下させる

目的：臨床応用可能な尿中酸化ストレス・バイオマーカーを確立し、もって禁煙外来の患者さん