

令和2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）

「加熱式たばこの健康影響評価のためバイオマーカーを用いた評価手法の開発」

分担研究報告書

研究④：曝露マーカーによる評価方法の開発

受動喫煙者の尿中ニコチン代謝物の高感度分析の検討と日本人喫煙者のニコチン代謝物量
とたばこ特異的ニトロソアミン代謝物量の分析

研究分担者	稲葉洋平	国立保健医療科学院
研究代表者	大森久光	熊本大学
研究分担者	樺田尚樹	産業医科大学
研究分担者	緒方裕光	女子栄養大学
研究協力者	尾上あゆみ	熊本大学

研究要旨

2020年4月から完全施行された改正健康増進法は、望まない受動喫煙をなくするために施設の類型・場所ごとに対策を実施することで対応している。しかし、「加熱式たばこ」は経過措置として、飲食可能な喫煙室での使用が認められている。そこで本研究では、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（尿）に含まれているたばこ由来の有害化学物質の代謝物と影響マーカー（酸化ストレスマーカー）値から健康影響評価を行う。今年度は、喫煙者のニコチン代謝物とたばこ特異的ニトロソアミン代謝物（NNK代謝物）である4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol（NNAL）の分析を行なった。さらに、受動喫煙者のニコチン代謝物としてこれまで、コチニンと3-ヒドロキシコチニンを対象としてきたが、これに加えてグルクロン酸抱合体の分析も行い、分析感度向上に寄与できるかを評価した。加熱式たばこ受動喫煙者の曝露量の高感度化は、受動喫煙の有無を曝露実態ベースで評価する上で欠かせない。

ニコチン代謝物の合計値を算出したところ、酵素処理した条件においてニコチン代謝物量が高くなった。加熱式たばこ受動喫煙者の曝露量を検出するためには、高感度分析が必要であることから、今後は尿試料を酵素処理した上で分析することとした。日本人喫煙者19名の尿試料について、ニコチン代謝物とNNAL分析を行なった。喫煙者の内訳は、加熱式たばこ喫煙者が6名、紙巻たばこ喫煙者が7名そして併用者が6名であった。総ニコチン代謝物量（ng/mg creatinine）の範囲は、加熱しいたばこ喫煙者が6764から27026、紙巻たばこ喫煙者が58.9から19778、併用者が386から34808であった。ニコチン代謝物に関しては、加熱式たばこを使用しても曝露量が低減されることはない予想された。次に発がん性物質であるNNAL量（pg/mg creatinine）は、加熱式たばこ喫煙者が5.9から64.8、紙巻たばこ喫煙者が4から267、併用者が8.4から235であった。

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

響が結論づけられている。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」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たばこ特異的ニトロソアミンである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]。これら有害化学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。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]。

2020年4月から完全施行された改正健康増進法は、望まない受動喫煙をなくするために施設の類型・場所ごとに対策を実施することで対応している。しかし、「加熱式たばこ」は経過措置として、飲食可能な喫煙室での使用が認められている。その理由として加熱式たばこは日本で販売が開始されてから期間も短く、喫煙者の健康影響、受動喫煙に関しても科学的な根拠の蓄積が少ない状況が上げられる。この加熱式たばこは、加工されたたばこ葉を携帯型の装置で加熱することによって発生する煙(エアロゾル)を吸引するたばこ製品である。このたばこ製品は、

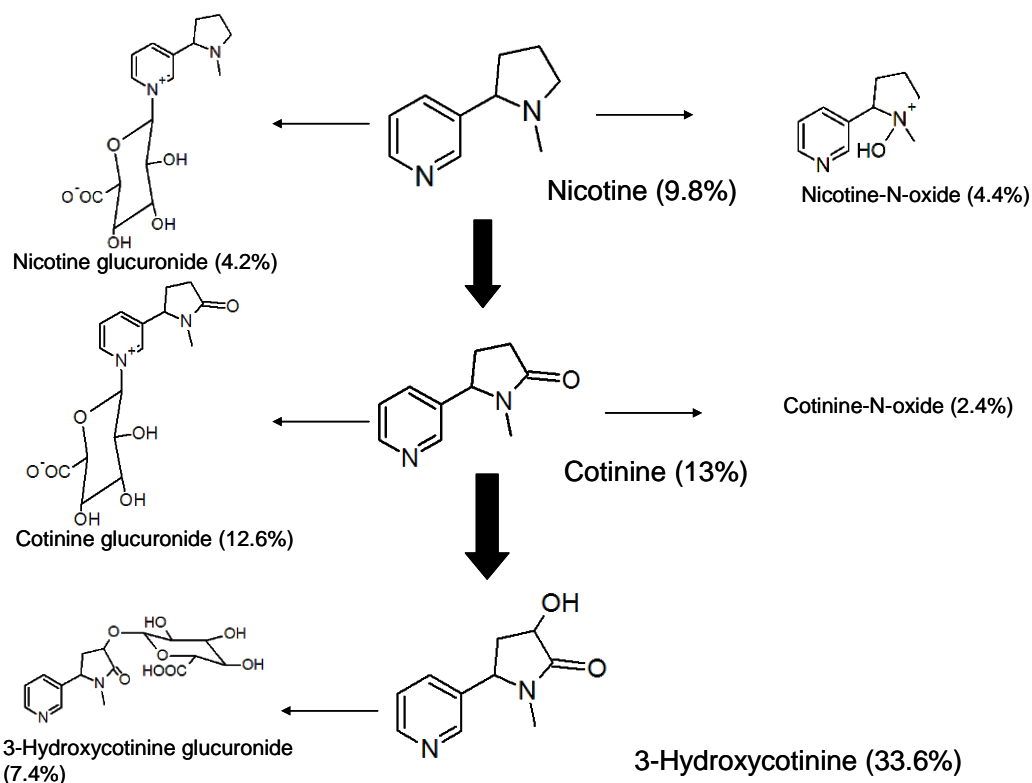


Fig.1 Quantitative scheme of nicotine metabolism, based on estimates of average excretion of metabolites as percent of total urinary nicotine [3].

燃焼を伴わないために紙巻たばこから発生する有害化学物質の発生を抑制する。

2014年に販売開始されたIQOSをはじめとする加熱式たばこの主流煙（エアロゾル）は、燃焼由来の有害化学物質が90%近く削減されている。しかし、低減されていない有害化学物質が存在している。特に加熱式たばこのエアロゾルの有害化学物質の数はそれほど低減されていないため、加熱式たばこを使用する限りは化学物質の複合曝露は継続されている。

そこで本研究では、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（尿）に含まれているたばこ由来の有害化学物質の代謝物と影響マーカー（酸化ストレスマーカー）値から健康影響評価を行う。今年度は、喫煙者のニコチン代謝物とたばこ特異的ニトロソアミン代謝物の分析を行い、受動喫煙者のニコチン代謝物としてこれまで、コチニンと3-ヒドロキシコチニンを対象としてきたが、これに加えてグルクロン酸抱合体の分析も行い、分析感度向上に寄与できるかを評価した。加熱式たばこ受動喫煙者の曝露量の高感度化は、受動喫煙の有無を曝露実態ベースで評価する上で欠かせない。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。

次に、今年度は喫煙者（紙巻たばこのみ、加熱式たばこのみ、両方を使用）のNNK代謝物である4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)の分析を行なった。

B. 研究方法

(1) 被験者

本研究の被験者は、今年度の本研究班の研究に参加した喫煙者・受動喫煙者の尿試料を使用した。本研究計画「加熱式たばこの健康影響評価のためバイオマーカーを用いた評価手法の開発」（受付番号 倫理第 2150 号）は、熊本大学の倫理委員会で審査され、2020年11月12日付けで承認された。さらに本研究を実施するために、国立保健医療科学院においても倫理委員会で審査され、承認された（NIPH-IBRA#12317）。

(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-テストワコー（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) を用いた。また、受動喫煙者の尿中ニコチン代謝物の高感度分析を評価するために、 β -グルクロニダーゼ処理を行なったのちに、ENVI-Carb 処理を行う手法の検討も行なった。

ニコチン代謝物の分析は、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) を使用した。また、HILIC カラムを使用することで、移動相のアセトニトリル比率を70%あたりにすることで、成分の高感度化を行なった。なお、前処理時に、Nicotine- d_4 とCotinine- d_4 と3-Hydroxycotinine- d_4 を内標準物質として添加した。

(4) NNAL 分析法

尿試料は、くえん酸緩衝液及び β -グルクロニダーゼ溶液を添加し、脱抱合処理を行った。次に、得られた処理溶液は、ケイソウ土カラム、Envi-Carb, Oasis-MCXの順に処理し、LC/MS/MSに供して測定を行った。なお、前処理時に、NNAL- d_4

を内標準物質として添加した。

C. 研究結果及び考察

(1) 受動喫煙者の尿中ニコチン代謝物分析法の検討

本研究の測定対象物質であるコチニン、3-ヒドロキシコチニンは、尿中ではグルクロン酸抱合体としても存在している。尿試料には、グルクロン酸抱合されたコチニンが 12.6%、3-ヒドロキシコチニンが 7.4%と報告されていることから、 β -グルクロニダーゼでコチニン、3-ヒドロキシコチニンへ変換することによって、分析値を上昇させることを検討した。Table1 は、紙巻たばこ喫煙者の家族の尿中ニコチン代謝物の分析結果を示す。また、今回の分析は、尿試料を酵素処理ありとなしの分析結果を比較した。その結果、コチニン分析値は酵素処理によって上昇した。一方で、3-ヒドロキシコチニンの分析値は低減する試料も確認された。これは、酵素処理済みの試料は、3-ヒドロキシコチニンのクロマトグラム上でいくつかの測定妨害ピークが確認され、3-ヒドロキシコチニンのピークにも重なり合う現象が認められた。その影響で、分析値が低減した結果と

なつたと考えられる。また、ニコチン代謝物の合計値を算出したところ、酵素処理した条件においてニコチン代謝物量が高くなった (1.24~1.85 倍の上昇)。加熱式たばこ受動喫煙者の曝露量を検出するためには、高感度分析が必要であることから、今後は尿試料を酵素処理した上で分析することとした。なお、ニコチン代謝物の定量下限値は、5 pg/mL (LC/MS/MS) であり、尿試料では 50 pg/mL であった。

(2) 喫煙者のニコチン代謝物と NNAL 濃度

日本人喫煙者 19 名の尿試料について、ニコチン代謝物と NNAL 分析を行なった (Table 2)。喫煙者の内訳は、加熱式たばこ喫煙者が 6 名、紙巻たばこ喫煙者が 7 名そして併用者が 6 名であった。総ニコチン代謝物量 (ng/mg creatinine) の範囲は、加熱しいたばこ喫煙者が 6764 から 27026、紙巻たばこ喫煙者が 58.9 から 19778、併用者が 386 から 34808 であった。ニコチン代謝物に関しては、加熱式たばこを使用しても曝露量が低減されることはない予想された。次に発がん性物質である NNAL 量 (pg/mg creatinine) は、加熱しいたばこ喫煙者が 5.9 から 64.8、紙巻たばこ喫煙者が 4 か

Table 1 受動喫煙者のニコチン代謝物の分析結果(未処理と酵素処理の比較)

Sample name	処理法	Amounts (ng/mL)		
		Cotinine	3-Hydroxycotinine	Total Nicotine Metabolites
A	未処理	0.49	2.30	2.79
	β -グルクロニダーゼ処理	1.99	2.41	4.40
B	未処理	0.98	1.43	2.41
	β -グルクロニダーゼ処理	1.87	1.12	2.99
C	未処理	0.49	1.68	2.17
	β -グルクロニダーゼ処理	1.54	1.15	2.69
D	未処理	0.59	1.20	1.79
	β -グルクロニダーゼ処理	1.93	1.39	3.32
E	未処理	0.56	2.96	3.52
	β -グルクロニダーゼ処理	1.91	3.39	5.30

ら 267, 併用者が 8.4 から 235 であった。各喫煙者の最大値と比較すると加熱式たばこ喫煙者の曝露量が低い結果であった。一方で, その曝露量は 3 倍程度の差であることから, 紙巻たばこが加熱式たばこよりも健康影響が低いまで言及することが困難であることが分かった。なお, NNAL の定量下限値は, 2pg/mL (LC/MS/MS) であり, 尿試料では 0.08 pg/mL であった。

今回は, 研究計画の喫煙者数よりも少ない喫煙者において初期検討を行なった。今後, サンプル数が増えることによって, 現在の日本人喫煙者のたばこ製品における曝露状況が判明する。次年度は, この曝露マーカーに加えて酸化ストレスマーカーの分析も進めていく計画である。

D. 結論

本研究では, 受動喫煙者のニコチン代謝物の高感度分析を目的として β -グルクロニダーゼ処理を行った分析法の検討を行なった。この酵素処理を行うことによって, 分析結果が 1.5 倍程度は上昇することが確認された。次に, 日本人喫煙者のニコチン代謝物と NNAL 分析を行なった。喫煙者を加熱式たばこ, 紙巻たばこ併用者の 3 区分に分けて傾向を評価した。ニコチン代謝物量は, 3 区分に大きな違いは認められなかった。これは, 加熱式たばこ主流煙の分析結果とも合致した。NNAL 量は, 加熱式たばこ喫煙者が主流煙の分析値と同様の傾向ではなく, 10 倍以上の濃度差は認められなかった。

Table 2 日本人喫煙者のたばこ製品使用状況ごとのニコチン代謝物とたばこ特異的ニトロソアミン代謝物量

Smoker No.	Tobacco products		Amounts			
			ng/ mg creatinine			pg/ mg creatinine
			Cotinine	3-Hydroxycotinine	Total Nicotine metabolites	
1		○	4,780	18,356	23,136	15.4
2		○	1,998	8,395	10,393	39.1
3		○	17,559	9,647	27,206	64.6
4		○	2,291	4,938	7,228	5.9
5		○	5,113	1,651	6,764	9.4
6		○	4,069	3,021	7,090	22.9
7	○		737	1,036	1,773	13.9
8	○		1,560	960	2,520	266.6
9	○		49.6	9.3	58.9	4.0
10	○		5,112	14,666	19,778	112.2
11	○		3,609	11,482	15,091	139.4
12	○		2,152	8,609	10,761	83.0
13	○		2,691	2,643	5,333	24.7
14	○	○	1,234	34.7	1,268	175.9
15	○	○	8,158	26,650	34,808	165.4
16	○	○	4,319	14,238	18,557	34.1
17	○	○	3,132	21,379	24,511	8.4
18	○	○	89.3	297	386	15.9
19	○	○	6,090	17,472	23,562	235.2

[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.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし