

令和3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)
分担研究報告書

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及び受動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

昨年度に引き続き本研究では、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）の分析を行っている。今年度は、追加の喫煙者と受動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。

喫煙者の分析結果は、加熱式たばこ喫煙者が 8 名、紙巻たばこ喫煙者が 13 名そして併用者が 11 名であった。総ニコチン代謝物量 (ng/mg creatinine) の中央値は、加熱式たばこ喫煙者が 7160、紙巻たばこ喫煙者が 7928、併用者が 9423 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と思われた。次に発がん性物質である NNAL 中央値 (pg/mg creatinine) は、加熱式たばこ喫煙者が 19.1、紙巻たばこ喫煙者が 38.2、併用者が 36.1 であった。受動喫煙者の分析結果は、加熱式たばこ受動喫煙者が 15 名、紙巻たばこ受動喫煙者が 23 名そして併用者の受動喫煙者が 25 名であった。総ニコチン代謝物量 (ng/mg creatinine) の中央値は、加熱式たばこ受動喫煙者が 4.53、紙巻たばこ受動喫煙者が 4.02、併用者の受動喫煙者が 3.50 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と思われた。次に発がん性物質である NNAL 中央値 (pg/mg creatinine) は、加熱式たばこ受動喫煙者が 4.07、紙巻たばこ受動喫煙者が 1.12、併用者の受動喫煙者が 1.26 であった。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、喫煙者、受動喫煙者ともに 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 1/10 の曝露量ではなく、紙巻たばこ、併用者の 50%程度の曝露差であった。

A. 研究目的

昨年度に引き続き、日本人喫煙者に加えて受

動喫煙者のバイオマーカー分析を行った。

たばこ煙には、多くの有害化学物質が含まれ

ており、その有害化学物質の曝露による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]。

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、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]。

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、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。また、加熱式たばこのエ

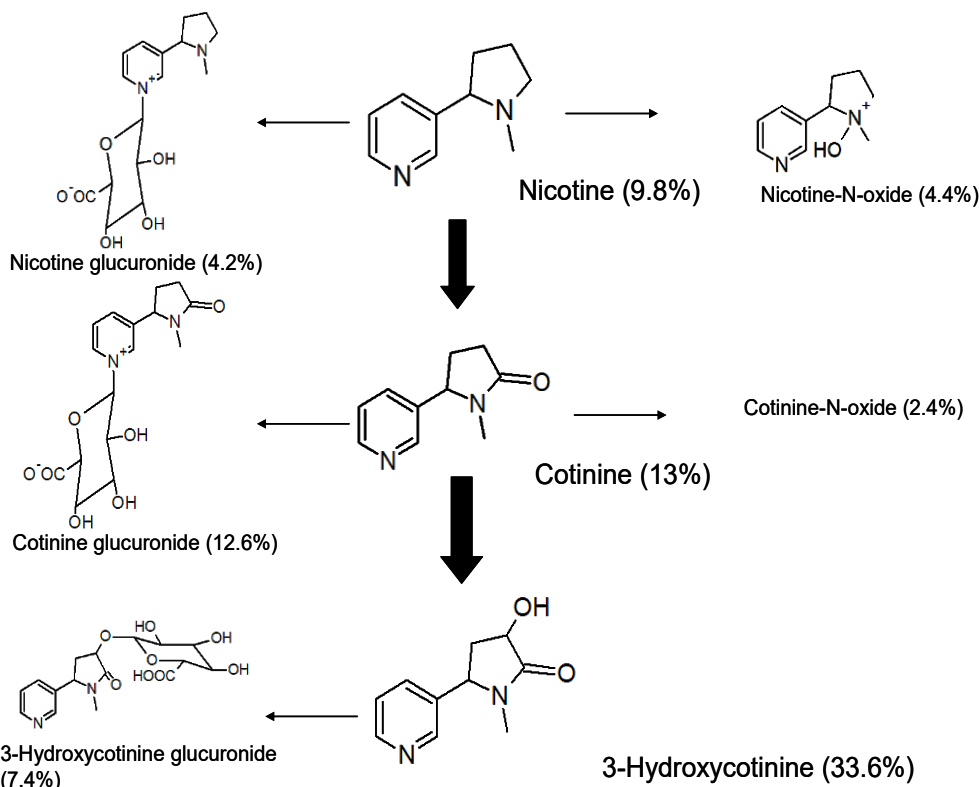


Fig.1 Quantitative scheme of nicotine metabolism, based on estimates of average excretion of metabolites as percent of total urinary nicotine [3].

アロゾルの有害化学物質の成分数は大幅に低減されていないため、加熱式たばこを使用する限り化学物質の複合曝露は継続されている。

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。

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。今年度は喫煙者及び受動喫煙者（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) とニコチン代謝物の分析を行なった。

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ー

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。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。

(4) NNAL 分析法

尿試料は、クエン酸緩衝液及び 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。NNAL の定量下限値は、2 pg/mL (LC/MS/MS) であり、尿試料では 0.08 pg/mL であった。

C. 研究結果及び考察

(1) 喫煙者の尿中ニコチン代謝物分析と NNAL の分析

日本人喫煙者 33 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 1)。喫煙者の内訳は、加熱式たばこ喫煙者が 8 名、紙巻たばこ喫煙者が 13 名そして併用者が 12 名であった。総ニコチン代謝物量 (ng/mg creatinine) の範囲は、加熱式たばこ喫煙者が 99.4 から 27200、紙

巻たばこ喫煙者が 58.9 から 21700, 併用者が 386 から 34808 であった。ニコチン代謝物に関して, 中央値を比較すると紙巻たばこ喫煙者が 7928、加熱式たばこ喫煙者が 7160 そして併用者が 11800 となり、加熱式たばこを使用してもニコチン曝露量が紙巻たばこと比較して低減されることはないと予想された。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 1.9 から 64.6, 紙巻たばこ喫煙者が 4.0 から 267, 併用者が 8.4 から 235 であった。各喫煙者群の最大値で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, その中央値の曝露量は紙巻たばこが 38.2、加熱式たばこが 19.1 そして併用者が 35.1 であった。まず、併用者は加熱式たばこを使用することによって発がん性物質の曝露量が低下することは確認されなかった。加熱式たばこ喫煙者についても主流煙中の TSNAs は紙巻たばこの 90%削減であるとたばこ産業は報告しているが、実際の曝露量は半減している程度であった。

(2) 受動喫煙者の尿中ニコチン代謝物分析と NNAL の分析

日本人喫煙者 63 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)。受動喫煙者の内訳は, 加熱式たばこ受動喫煙者が 15 名, 紙巻たばこ受動喫煙者が 23 名そして併用者の受動喫煙者が 25 名であった。総ニコチン代謝物量 (ng/mg creatinine) の範囲は, 加熱式たばこ受動喫煙者が 1.06 から 14.6, 紙巻たばこ受動喫煙者が 1.81 から 19.2, 併用者の受動喫煙者が 1.31 から 318.5 であった。ニコチン代謝物に関して, 中央値を比較すると紙巻たばこ受動喫煙者が 4.02、加熱式たばこ受動喫煙者が 4.53 そして併用者の受動喫煙者が 3.53 となり、受動喫煙の曝露に関して加熱式たばこを使用してもニコチン曝露量が紙巻たばこと比較して低減されることはないと考えられた。次に発がん性物質である NNAL 量 (pg/mg creatinine) は, 加熱式たばこ受動喫煙者が 0.5 から 14.6, 紙巻たばこ受動喫煙者が 0.34 から 13.3, 併用者の受動喫煙者が 0.45 から 235 であった。NNAL に関して, 中央値を比較すると紙

Table 1 日本人喫煙者のニコチン代謝物及びたばこ特異的ニトロソアミン代謝物量の分析結果

	Amounts											
	ng/mg creatinine									pg/mg creatinine		
	Cotinine			3-hydroxycotinine			Total nicotine metabolites			NNAL		
	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median
紙巻たばこ n=13	49.6	5,110	2,691	9.3	16,600	4,131	58.9	21,700	7,928	4.0	267	38.2
併用者 n=11	89.3	8,160	3,232	34.7	26,700	5,779	386.3	34,800	9,423	8.4	235	36.1
加熱式たばこ n=8	90.0	17,600	3,930	9.4	18,400	3,980	99.4	27,200	7,160	1.9	64.6	19.1

Table 2 日本人受動喫煙者のニコチン代謝物及びたばこ特異的ニトロソアミン代謝物量の分析結果

	Amounts											
	ng/mg creatinine									pg/mg creatinine		
	Cotinine			3-hydroxycotinine			Total nicotine metabolites			NNAL		
	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median
紙巻たばこ n=23	0.70	16	2.66	0.42	3.18	1.13	1.81	19.2	4.02	0.34	13.3	1.12
併用者 n=25	0.88	70.7	2.22	n.d.	248	1.31	1.31	318.5	3.50	0.45	29.1	1.26
加熱式たばこ n=15	0.63	12.7	2.36	0.43	6.11	1.83	1.06	14.6	4.53	0.5	14.6	4.07

巻たばこ受動喫煙者が 1.12、加熱式たばこ受動喫煙者が 4.07 として併用者の受動喫煙者が 1.26 となり、受動喫煙の曝露に関して加熱式たばこを使用してもニコチン曝露量が紙巻たばこと比較して低減されることはないと考えられた。これまでの結果を総合すると、その加熱式たばこ受動喫煙者の曝露量に差は認められない。よって現段階で、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。

今回は、初年度のよりもサンプル数が増えて少しずつではあるが、喫煙者、受動喫煙者の曝露実態が見えてきた。今後、さらに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。最終年度は、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、喫煙者及び受動喫煙者のニコチン代謝物と発がん性物質の代謝物 NNAL の分析を行い、加熱式たばこ、紙巻たばこ及び併用者の比較を行うことを目的とした。現在、リクルートの途中ではあるが、さらにサンプル数が増加することによって加熱式たばこ喫煙者及び受動喫煙者の曝露実態が分かってくる。この成果が改正健康増進法の見直しに使用するための科学的根拠の一部になると考えている。日本人喫煙者と受動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、紙巻たばこと併用者の 3 区分に分けて傾向を評価した。ニコチン代謝物量は、喫煙者、受動喫煙者ともに 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 1/10 の曝露量ではなく、紙巻たばこ、併用者の 50%程度の曝露差であった。また、受動喫煙者の分析結果は、加熱式たばこ受動喫煙者の曝露量が紙巻た

ばこ受動喫煙者よりも高い値であった。まだまだサンプル数が少ないこともあるが、加熱式たばこは受動喫煙を生じさせないと喫煙者が考え、受動喫煙者の近くにおいて喫煙をしている可能性もあると考えられた。

[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

稲葉洋平, 尾上あゆみ, 緒方裕光, 井上博雅, 黒澤一, 寒川卓哉, 町田健太郎, 樺田尚樹, 大森久光. たばこ製品喫煙者の有害化学物質の曝露量評価の検討. 第 92 回日本衛生学会学術総会 (オンライン) 2022.3.21-23.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし