

平成 28 年 9 月 22 日現在

機関番号：82602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871157

研究課題名(和文)日本人喫煙者のたばこ特異的ニトロソアミン尿中代謝物量と喫煙行動との関連性

研究課題名(英文) Relationship of urinary metabolite of tobacco-specific nitrosamine and smoking patterns in Japanese smokers

研究代表者

稲葉 洋平 (Inaba, Yohei)

国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任研究官

研究者番号：80446583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：たばこ主流煙には、発がん物質のたばこ特異的ニトロソアミン(TSNA)が含まれる。4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)は、TSNAのNNKの代謝物であり、尿中に排泄される。本研究は、3種類の固相抽出法とHILICカラムを使用した高速液体クロマトグラフ-質量分析計を組合せて尿中NNAL分析法を開発し、日本人喫煙者の曝露実態を調査した。日本人喫煙者98名の尿中NNAL (pg/mg creatinine)を測定したところ全試料から検出され、平均値は92.5であった。尿中NNAL量は、喫煙行動と各種バイオマーカーと相関関係が認められた。

研究成果の概要(英文)：Mainstream smoke from cigarettes contains tobacco-specific N'-nitrosamines (TSNAs) listed as Group 1 and 3 carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC). 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) is metabolite of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), excreted from smoker urine. The main aims of this study were development of NNAL analysis method in urine and the examination of exposure from Japanese smokers. The analysis method of NNAL combined 3-steps solid phase extraction and LC/MS/MS using HILIC column. The mean of NNAL in 98 Japanese smokers was 92.5 ng/mg creatinine. The NNAL levels in the smokers associated with age, puff volume, carbon monoxide in exhaled breath, urinary nicotine metabolites (cotinine, 3-hydroxycotinine) and oxidative stress markers (8-OHdG and 8-isoprostane) ($p < 0.001$), but not with nominal values of nicotine-yield on packages.

研究分野：衛生学

キーワード：たばこ煙 発がん性物質 たばこ特異的ニトロソアミン 尿中代謝物 健康影響

1. 研究開始当初の背景

たばこ特異的ニトロソアミン類 (Tobacco-specific nitrosamine; TSNA) は、たばこ葉及びたばこ煙に含まれる4種類の有害化学物質で構成される化合物群である。中でもヒトに対する発がん性が認められる4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) は、生体内で代謝され、最終的に4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) またはそのグルクロン酸抱合体として尿中に排泄される。このNNALは代表的なたばこ特有のバイオマーカーであり、NNKが肺がんとの関連性も報告されていることから、尿中NNALの測定は重要である。また、NNALは、生体内の半減期がニコチン代謝物であるコチニンの16時間に対して10-16日間と長く、喫煙者の曝露実態さらには発がんリスクを反映した有効なバイオマーカーである。しかし、我が国の喫煙者のNNAL分析結果は、報告されていない状況であった。

2. 研究の目的

申請者は、先行研究の研究成果をもとに「日本人喫煙者のTSNA曝露量は、高ニコチンたばこより、低ニコチンたばこを使用する喫煙者の方が高い」という作業仮説を立てた。

本研究では、これを解明するために、新しい尿中NNALの測定法を確立し、既に喫煙行動と各種バイオマーカー測定を実施した日本人喫煙者100名の尿中NNALを定量し、さらに申請者が最近確立した手法を用いた尿中ニコチン代謝物(ニコチン、コチニン、3-ハイドロキシコチニン)及び尿中酸化ストレスマーカーの8-イソプロスタニンも合わせて測定し、尿中NNAL量と曝露状況等の上記既知データとの関連性を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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。得られた処理溶液は、3種類の固相抽出を行い、高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS/MS)に供して分析した。

(2) 被験者:本研究の被験者は、101名の喫煙者を得た。なお参加条件は、20歳から65歳の常習喫煙者であり、心肺の疾病経歴が無く、2006年度の国産主要10銘柄のたばこを3ヶ月以上喫煙している者を対象とした。また、喫煙習慣に関するアンケート、尿と唾液の採取、喫煙行動パターンの計測を行った。本研究は、国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認を受けて行われた。

(3) 喫煙行動パターンの計測:喫煙行動パターンの計測は、CReSSmicro装置を用いて行った。CReSSmicroは携帯型の装置であり、パイプに紙巻たばこを挿してそこから喫煙

することにより、吸煙量(mL/puff)、吸煙回数、吸煙間隔(ms)、平均流量(mL/sec)、日時などを喫煙者ごとに測定した。

(4) 統計解析:尿中NNAL量と喫煙行動パターン及び関係する因子(呼気中一酸化炭素濃度、尿中ニコチン代謝物、酸化ストレスマーカー濃度等)について単回帰分析も行った。全ての統計解析は、統計解析ソフトSPSS 22.0Jを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 尿中NNAL分析法

本研究で確立した尿中NNALの測定法は、尿試料にβ-グルクロニダーゼを添加して脱抱合処理を施した後、3種類の固相抽出(汎用性の高いケイソウ土カラム、ENVI-Carb、Oasis-MCX)を用いてカラム処理を行い、HILICカラムを使用したLC/MS/MSに供して行われる。固相抽出で用いる溶出液は、ケイソウ土カラムがジクロロメタン/2-プロパノール溶液(95/5)、ENVI-Carbが0.1%酢酸含有50%メタノール溶液、Oasis-MCXが2%アンモニア含有メタノール溶液とした。

(2) NNAL分析法の精度

本測定法の精度確認を行ったところ、同時再現性測定と日間再現性測定の変動係数(CV)は、それぞれ2.8-6.0%と1.3-5.1%となり、また添加回収試験による回収率は71.0-126%となった。なお、本測定法の尿中NNALの定量範囲は、2-800pg/mLであった。

(3) 日本人喫煙者の分析結果

日本人喫煙者98名の尿中NNAL(pg/mg creatinine)は全試料から定量され、平均値が92.5±55.1となり、最高値が298、最低値は10.0であった。尿中NNAL量は、年齢、1日の総吸煙量、尿中ニコチン代謝物(コチニン、3-ハイドロキシコチニン)、呼気中一酸化炭素濃度、酸化ストレスマーカーの8-OHdG及び8-isoprostane量と相関関係が認められた(p<0.001)。

海外の喫煙者の尿中NNAL量と比較すると日本人喫煙者の尿中NNAL量は低値であった(Table 1)。これは、我々のたばこ主流煙のたばこ特異的ニトロソアミン類(tobacco specific nitrosamines;TSNAs)の先行研究から、国産たばこは、海外産たばこと比較するとNNKが低く抑えられていることと一致する。今後は、たばこ対策によって有害化学物質の低減化が進んでいる国との比較も検討する予定である。また、国産たばこ主流煙には発がん性のあるTSNAのN'-nitrosonornicotineは海外産たばこと比較すると多く含まれるため、この代謝物分析法の開発も必要である。

Table 1 日本人喫煙者と海外喫煙者の尿中 NNAL 量の比較

研究	本研究	A*	B**	C***		
国	日本	米国	米国	米国	米国	ポーランド
被験者数 (男性/女性)	98 (88/13)	1,373 (844/533)	128 (74/54)	128 (74/54)	59 (26/33)	187 (83/104)
年齢	40.0	-	38.2	38.2	-	36.3
喫煙本数/日	18.4	15.4	17.2	18.4	6.9	15.0
NNAL (pg/mg creatinine)	92.5	285	230	223	120	182

A*: Yang Xia, et al. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in smokers in the united states: NHANES 2007 - 2008. Biomarkers, 2011, 16(2), 112-119

B**: Neal L. Benowitz, et al. Racial Differences in the Relationship Between Number of Cigarettes Smoked and Nicotine and Carcinogen Exposure. Nicotine & Tobacco Research, 2011, 13(9), 772-783

C***: Neal Benowitz, et al. Urine Cotinine Underestimates Exposure to the Tobacco-Derived Lung Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone in Passive Compared with Active Smokers. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2010, 19(11), 2795-2800

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. 稲葉洋平, 内山茂久, 櫻田尚樹. 国産たばこ製品の有害性の評価. 日本小児禁煙研究会雑誌; 2013;3:31-39.
2. 稲葉洋平, 内山茂久, 櫻田尚樹. タバコ煙の化学的組成. 日本小児科医会会報; 2014;47:19-26.
3. 稲葉洋平, 内山茂久, 櫻田尚樹. 我が国におけるたばこ規制枠組み条約第9, 10条「たばこ製品の成分規制とたばこ製品の情報開示に関する規制」に基づいたたばこ対策の必要性. 日本衛生学雑誌 2015;70:15-23.
4. 稲葉洋平, 大久保忠利, 内山茂久, 櫻田尚樹. 個人輸入たばこ及び同銘柄の国産たばこに含まれるタール・ニコチン・一酸化炭素及びたばこ特異的ニトロソアミンの分析. 日本衛生学雑誌 2014; 69: 205-210.
5. 大久保忠利, 稲葉洋平, 原泰子, 内山茂久, 櫻田尚樹. 個人輸入たばこ及び同銘柄の国産たばこの主流煙中多環芳香族炭化水素及び変異原性及び葉中重金属の測定. 日本衛生学雑誌 2016;71:84-90.

[学会発表](計 4 件)

1. 宇津木里香, 稲葉洋平, 内山茂久, 太田敏博, 櫻田尚樹. 固相抽出を組み合わせた尿中 NNAL の測定. 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月, 本薬学会第 134 年会 DVD 要旨集
2. Inaba Y, Utsugi R, Ohkubo T, Uchiyama S, Suzuki G, Kunugita N. Relationship between

Smoking Topography and Biomarkers in Japanese Smokers. 26th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology 2014;2014.8.24-28; Seattle, Washington, USA. P3-585.

3. Kunugita N, Inaba Y, Bekki K, Uchiyama S. The tobacco control measures through the effective implementation of the FCTC articles 9 and 10. In International Sessions: Ending the tobacco epidemic in Asia-Oceania: filling the gap by academic societies. 第 73 回日本癌学会学術総会;2014.9.25-27; 横浜.
4. 稲葉洋平, 宇津木里香, 内山茂久, 太田敏博, 櫻田尚樹. 日本人喫煙者のたばこ特異的ニトロソアミン尿中代謝物量と各種バイオマーカーとの関連性. 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月, 本薬学会第 136 年会 DVD 要旨集

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
稲葉 洋平(INABA, Yohei)
国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任研究官

研究者番号:80446583

(2)研究分担者
なし()

研究者番号：

(3)連携研究者
樺田 尚樹(KUNUGITA, Naoki)
国立保健医療科学院・生活環境 研究部・部長

研究者番号:90178020

内山 茂久(UCHIYAMA, Shigehisa)
国立保健医療科学院・生活環境
研究部・客員研究員

研究者番号:40524236