

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21500663

研究課題名（和文） 受動喫煙のストレス評価を唾液中カテコールアミン代謝物等で行う研究

研究課題名（英文） A study on stress evaluation of the second hand smoke exposure by salivary catecholamine metabolites

研究代表者

勝又 聖夫（KATSUMATA MASAO）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：80169482

研究成果の概要（和文）：この研究は、受動喫煙のストレス評価を唾液中カテコールアミン代謝物等で行うことを目的とした。非喫煙者の受動喫煙の有無をアンケートで調査して、ニコチンの代謝物であるコチニン濃度を唾液試料から測定した。また、ストレス負荷を加えたときの唾液中コルチゾールとカテコールアミン代謝物の MHPG で挙動をみた。その結果、受動喫煙がある者において、負荷後に有意に MHPG が上昇した。従って、ストレス評価を唾液中 MHPG の挙動で捉える可能性を示唆できた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to perform stress evaluation of the second hand smoke (SHS) exposure by salivary catecholamine metabolites. SHS exposure was surveyed by a questionnaire, and salivary cotinine level was measured for the nonsmokers. Then, the subjects were loaded with Uchida-Kraepelin test, and salivary cortisol and 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) of catecholamine metabolite level was measured. Salivary MHPG level of a subject exposed to second hand smoke was significantly high after Uchida-Kraepelin test. Therefore, the salivary MHPG level was suggested to be valuable as a stress evaluation of second hand smoke exposure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：受動喫煙 ストレス評価 唾液 カテコールアミン代謝物 HPLC 分析

1. 研究開始当初の背景

受動喫煙とは、「室内又はこれに準ずる環

境において、他人のたばこの煙を吸わされること」と健康増進法で定義されている。受動

喫煙による身体への悪影響において、慢性影響はがんや循環器疾患へのリスク因子として疫学研究で認められている。一方、急性影響は、目の痛み、くしゃみ、のどの痛み、咳、喘鳴、心拍増加など様々な症状を引き起こす。また、周産期においては、低出生体重や乳幼児突然死症候群の原因となっている。このように様々な疾病の原因となるたばこ煙には、ニコチン、タール、一酸化炭素をはじめ、様々な有害物質が含まれていることは周知の事実である。

受動喫煙の曝露指標にはニコチンの代謝物であるコチニンが用いられている。生体試料(血液、尿、唾液等)のコチニン濃度が高ければ受動喫煙が疑われる。ただし、必ずしも主観的な受動喫煙の有無が生体試料中のコチニン濃度に反映されないことがあり、これは非喫煙者のたばこへの嫌悪感の違いが関わっているからと思われる。ニコチン薬理作用の依存性を考えた場合、非喫煙者でも普通の生活で受動喫煙が常時あると、たばこへの高い寛容性を持つ可能性がある。

ニコチンの依存性とは、取り込まれたニコチンが脳内報酬系を活性化し、薬物依存としての多幸感、快感、緊張緩和等の効用を感じるようになり、それを維持するために繰り返しのニコチンの取り込み、すなわち喫煙の習慣化が生じ、喫煙者のニコチン依存症が生じる。

脳内報酬系への活性ではドパミンの放出が促進されるが、ドパミンはカテコールアミンに含まれる物質で、副腎髄質、交感神経等に存在する生体アミンの一種である。したがって、カテコールアミンの代謝物であるホモバニリン酸(HVA)や3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルエチレングリコール(MHPG)等の挙動をみることで、受動喫煙の精神的なストレスを捉えることができるのではないかと考えている。

ストレス評価をする場合の生体試料は、非侵襲的に採取できる唾液が適していると思われるが、唾液を用いたカテコールアミンの代謝物を測定する方法は十分に検討されていないので、2~3種類の代謝物を同時に測定する方法を確立することを第一とした。その後、実験的に軽い精神的な負荷をかけたときの唾液中の種々のバイオマーカーを測定して、受動喫煙のストレス評価の検証を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、受動喫煙のストレス評価法を唾液中のカテコールアミン代謝物等を用いて行い、タバコを吸わない人にはタバコ煙はストレスであることを客観的なデータとして示すことである。この結果を踏まえて、受動喫煙が心身へのストレスとして重要な問題であることを再認識させ、受動

喫煙防止の教育を含めた取り組みをさらに積極的に行う時の基本的な資料とすることである。

3. 研究の方法

(1)唾液中カテコールアミン代謝物の測定方法の確立

①唾液採取方法

唾液採取方法には流涎唾液の採取や唾液吸収体を用いて採取する方法があるが、今回は、我々が実用新案登録した唾液採取器具(登録3138944号)を用いた。これは、この唾液採取器は唾液採取が簡易にできること、唾液採取量が十分に得られることなどの利点があり、今回の研究に適しているからである。

(2)唾液中カテコールアミン代謝物の測定方法

カテコールアミンの代謝物にはHVAやMHPG等あり、それらの代謝物を同時に測定する機器として、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたカラムスイッチングシステムで行った。検出法は蛍光検出器を用いた。HPLCは唾液中の目的とする成分を吸着、分配、イオン交換などで分離し、目的成分の濃度を定量的に測定する機器である。唾液をHPLCで定量分析する前処理として、一般的には唾液の夾雑物を取り除いてからHPLCで定量測定するが、カラムスイッチングシステムでは、夾雑物の分離、試料の濃縮、分離測定を一連の操作で行え、試料のロスが少ない利点がある。蛍光検出は、高感度で高い選択性があるので、HVAやMHPG等の微量測定に適した検出器である。

(2)精神的な負荷を加えたときの唾液中カテコールアミン代謝物等の変動

①対象者

対象者は女性36名である。年齢は 19.7 ± 2.0 歳(18-26歳)で、医療機関への受診や薬の服用がないタバコを吸わない健康人である。受動喫煙の有無は、自己申告に基づいている。募集するに当たり、日本医科大学の倫理委員会の審査を受けて承認された研究であること及び研究の趣旨、実施内容を説明して同意を得た。

②負荷試験及びタイムスケジュール

負荷試験は、内田クレペリンテストで行った。内田クレペリンテストは、一桁の数字の加算作業で、1分ごとに加算する行を変えながら15分行い、途中5分の休憩を設け、休憩後に再び15分の加算作業を実施した(負荷1)。この作業を30分の休憩後、再び同様なタイムスケジュールで行った(負荷2)。

③測定項目

唾液の測定項目(バイオマーカー)は、唾液量、pH、コチニン、コルチゾール、MHPGである。唾液採取時間は、負荷1の開始5分前(試料1)、終了後5分以内(試料2)、負荷2の開始

5 分前(試料 3)、終了後 5 分以内(試料 4)、終了 30 分後(試料 5)で、合計 5 回採取した。唾液採取法は唾液採取器具の吸収体を正確に 1 分間口腔内に入れ、あめ玉を口腔内で転がすような感覚で吸収体に唾液を吸収させた。吸収体に吸収された唾液は、遠心分離後に採取量を計測し、引き続き pH を測定した後に唾液中のバイオマーカーを測定するまで凍結保存した。

コチニン及びコルチゾールは酵素免疫測定法で測定した。

日本語版の短縮版 POMS (Profile of Mood States) 質問紙票を用いて、負荷試験の前 (POMS1)、30 分の休憩 (POMS2)、終了後 (POMS3) に気分評価を行った。POMS は対象者のおかれている条件により変化する一時的な気分や感情を測定できる質問票で、「緊張-不安」「抑うつ-落ち込み」「怒り-敵意」「活気」「疲労」「混乱」の 6 つの気分尺度をみることができるとある。

負荷作業として用いた内田クレペリンテストの 30 分間の計算曲線の平均値を算出し、仕事量とした。

④受動喫煙の有無等のアンケート調査内容
被験者募集時に受動喫煙の有無等のアンケート調査を行った(受動喫煙あり: SHS+, 受動喫煙なし: SHS-)。主な内容は、性別、年齢、睡眠時間、受動喫煙の有無、受動喫煙が有ると回答した者に対しては、主観的な受動喫煙の強度(1~10 の 10 段階評価)、主な喫煙者、主な場所などである。

4. 研究成果

(1)HPLC を用いた唾液中カテコールアミン代謝物の測定方法

カテコールアミン代謝物の MHPG と HVA について標準物質を用いて検量線の直線性の検討、測定の日内変動、日間変動および唾液への添加回収率などを求めた。両物質共に 0~40ng/mL までの検量線を作成し、精度の良い直線性($R^2=0.999$)が得られた。また、日内変動(CV%) (N=5)は、MHPG において、2.8~4.2%、HVA は 3.8~9.3%、日間変動は、それぞれ 2.6~4.0%、11.3~16.0%であった。MHPG、HVA 共に 10ng/mL と 40ng/mL の標準物質を唾液に添加した時の回収率は、MHPG は 102.3%と 102.9%で、HVA は 89.4%と 87.6%であった。また、HPLC に添加するサンプル量は 20 μ L とした。

(2)精神的な負荷を加えたときの唾液中カテコールアミン代謝物等の変動

①唾液中コチニン濃度

自己申告に基づく受動喫煙の有無と唾液中コチニン濃度測定結果を表に示した。有意水準 5%で有意差が認められた。しかし、受動喫煙があると回答した対象者で一週間に 3 日以上の受動喫煙がある者となない者では有意差

はなかった。

受動喫煙	唾液中コチニン濃度 (ng/mL) (平均値±標準偏差)
あり (N=14)	0.33±0.18
なし (N=22)	0.17±0.15

②受動喫煙の有無別にみた時のクレペリンの平均仕事量と POMS から算出された気分評価値

受動喫煙の有無によるクレペリン負荷(負荷 1)の平均仕事量には有意差はなかった。また、POMS から求められる気分評価では、受動喫煙の有無群共に「活気」のみが、負荷 1 の前後で有意差があり、元気さや躍動感が低下した。

③受動喫煙の有無別にみた時の唾液中バイオマーカーの挙動

各バイオマーカーの挙動は、負荷 1 の開始 5 分前(試料 1)と負荷 2 の開始 5 分前(試料 3)の値で、受動喫煙の有無別にみた。その結果、pH と採取した唾液量には有意差を認めなかったが、コルチゾールは、有意に両群共に低下した。一方、MHPG は受動喫煙無し群では、濃度に変化はなかったが、受動喫煙有り群では、試料 1 (負荷 1 の 5 分前に採取した唾液)に比べ、試料 3 (負荷 2 開始 5 分前)で有意に上昇していた。

以上の研究結果より、自己申告による受動喫煙の有無は、唾液中コチニン濃度で評価することができると考えられた。また、軽いストレス負荷を加えた場合、コルチゾールは受動喫煙の有無群共に同じような挙動であったが、MHPG は受動喫煙が有り群で有意に増加していた。従って、普段の生活空間で受動喫煙がある人のストレス評価を唾液中コチニン測定と同時に MHPG 等の交感神経-副腎髄質系の代謝物で測定することで、その度合いを示すことができる可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

勝又聖夫、平田紀美子、小林麻衣子、平田幸代、稲垣弘文、川田智之、唾液中 Chromogranin A の EIA 測定法における唾液採取器具の検討. 第 83 回日本衛生学会学術総会 2013 年 3 月 金沢市

平田紀美子、勝又聖夫、稲垣弘文、川田智之、カラムスイッチングシステムを用いた HPLC

による唾液中カテコールアミン代謝物の同時分析法. 日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 静岡市

平田紀美子、勝又聖夫、川田智之. 受動喫煙のストレス評価に用いるための唾液中カテコールアミン代謝物のHPLC分析法. 第 69 回日本公衆衛生学会総会 2010 年 10 月 東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝又 聖夫 (KATSUMATA MASAO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：80169482

(2) 研究分担者

川田 智之 (KAWADA TOMOYUKI)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00224791

稲垣 弘文 (INAGAKI HIROFUMI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50213111

平田 幸代 (HIRATA YUKIYO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40322515

平田 紀美子 (HIRATA KIMIKO)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・

その他

研究者番号：70445815