

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460235

研究課題名(和文)薬物代謝酵素活性の簡便な評価方法を用いたニコチン製剤の禁煙治療設計

研究課題名(英文) Estimation for the adequate dose of nicotine by using the ratio of the metabolites in urine

研究代表者

田山 剛崇 (Tayama, Yoshitaka)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：80389121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、尿中に排泄されたニコチンの代謝物であるcotinineと3'-hydroxycotinine濃度比よりニコチン製剤の適正投与量を推定することを目的としておこなった。我々は薄層クロマトグラフによる代謝物の分離とnicotine骨格の発色作用を組み合わせることで、クリニックや薬局にてもcotinine濃度を簡便に推定できるツールを考案し、ラット尿にてcotinineと3'-hydroxycotinineを検出した。しかし、ヒトの尿ではニコチン濃度が低く、夾雑物も存在したため、十分な検出が行えなかった。今後、尿の代わりに、非侵襲的な検体である唾液を用いて、検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study is to estimate for the adequate dose of nicotine by using the ratio of the metabolites in urine. We could determine the nicotine and the metabolites (cotinine, 3'-hydroxycotinine) in rats urine semi-quantitatively, by using new methods (combination of the TLC isolation and the color identification of nicotine analogs). However, it was not enough to determine their concentration in human urine. We suggest that the contaminant of urine, such as bilirubin, interfere with the color identification of nicotine analogs, and then it was not enough to determine the nicotine metabolites. In future plane, we will investigate by using saliva instead of urine.

研究分野：医療薬学

キーワード：医療薬学 ニコチン製剤

1. 研究開始当初の背景

近年、喫煙と様々な疾病との関連性が報告され、禁煙への取り組みがなされている。このような背景の中、禁煙補助剤であるニコチン製剤の使用量が増加している。Nicotine は、Cytochrome P-450 2A6 (CYP2A6) によって 5'-hydroxynicotine に代謝後、aldehyde oxidase (AO) によって cotinine へと代謝され、さらに 3'-hydroxycotinine へと代謝される。これら酵素活性には、大きな個体差が存在している。従って、ニコチン製剤の投与設計において、有効成分である nicotine, cotinine, 3'-hydroxycotinine の血中濃度に影響を及ぼす代謝酵素活性を考慮する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、尿中排泄された nicotine とその代謝物の濃度比を用いて、CYP2A6 や AO 活性を推定する簡便な方法を確認し、ニコチン製剤の適正な投与設計を行うことを目的とする。加えて、HPLC や LC-MS 等高度な測定機器が備わっていない施設においても、nicotine 代謝活性を推定できる簡便なツールを開発する。

3. 研究の方法

ニコチン製剤とその代謝物である(nicotine, cotinine, 3'-hydroxycotinine)を分離・半定量可能なシステムを確認するため、様々な分離方法を試みた。

加えて、尿中の代謝物濃度比と本システムで定量したものを比較するため HPLC による測定システムも確立した。さらに、nicotine 代謝における aldehyde oxidase 活性の影響を検討する目的で、aldehyde oxidase 活性の異なるラット(高活性ラットとして、Jcl:SD 系、低活性ラットとして、CrI:WI 系)を用いて、検討を行った。

4. 研究成果

尿中および血中 nicotine, cotinine, 3'-hydroxycotinine, 測定システムの確立を行った。すなわち、各 nicotine 誘導体を添加した尿サンプルに internal standard (5-aminoquinoline)

を添加後、6N NaOH 添加した。その後、ジクロロメタン:アセトン(3:1)で抽出後、その溶液を乾固した。その後、逆相カラムを用いて分離定量をおこなった。その結果、500ng/mL 濃度まで定量が可能となった。

ニコチン製剤を販売している薬局においても、高価な機器を使用せず、簡便に nicotine 濃度評価を行える手段としてクロマト分離を用いることとした。クロマトにて nicotine 代謝物を分離した後、代謝物を発色させることにより、nicotine 代謝物の半定量を試みた。分離を行うクロマトグラフには、TLC や安価なペーパークロマトがある。TCL は nicotine およびその誘導体の分離が可能であったが、発色試薬を染み込ませることが困難であり、半定量の感度に問題があった。一方、ペーパークロマトは発色試薬を染み込ませることが可能であり nicotine 誘導体の呈色(半定量)が可能であったものの、nicotine およびその誘導体の分離が困難であった。次に、分離ができ、発色試薬を染み込ませることのできる分取用クロマトを用いて検討を行い、分離および半定量が可能なることを確認した(下図)。

次に、我々はラット in vivo におけるツールの有用性を検討した。雄性ラットに nicotine(0.05 mg/kg)を尾静脈より単回投与し、尿中(12 時間蓄尿)排泄された nicotine とその代謝物を検出した。ビリルビン等の黄色を呈する夾雑物が測定感度に影響を及ぼすものの、nicotine, cotinine, 3'-hydroxycotinine とも半定量が可能であった。

次に、喫煙者のスポット尿を用いた検討においては、尿着色の影響が大きく、尿中 nicotine 代謝物の十分な半定量が行えなかった。尿中 nicotine およびその代謝物の濃度を感度よく測定するためには尿中に含まれる夾雑物を取り除く等の煩雑な作業を行う必要もある。今後、尿の代わりに、非侵襲的な検体で、着色のない唾液を用いて、検討を

行う予定である。

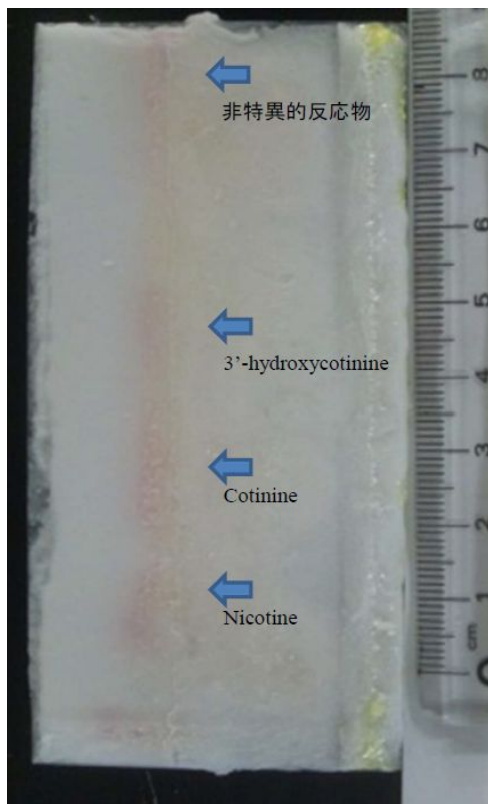


図 分取用 TLC を用いた nicotine 代謝物の半定量

Nicotine 代謝における aldehyde oxidase 活性の影響を検討する目的で、高 aldehyde oxidase 活性の Jcl:SD 系, 低 aldehyde oxidase 活性の CrI:WI 系ラットに nicotine を投与して、尿中代謝物濃度を検討したが、代謝物の濃度比に差は認められなかった。ニコチン製剤の代謝において aldehyde oxidase および CYP2A6 の関与が報告されていることおよび本検討の結果より、aldehyde oxidase の関与は CYP2A6 に比して少ないことが推測できる。今後、CYP2A6 活性が低いケースにおいて、aldehyde oxidase 活性の影響を検討していく必要がある。

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2件)

Masako Yasuhara, Yoshitaka Tayama, Takehiro Kashiwagi, Akihiro Sawa, Kenji Kihira,

Katsushi Miyake :Effect of Bakumondo-to on cytochrome P450 activities in rat liver microsomes, *Journal of King Saud University – Science*, **28**, 198-202, (2016).

田山剛崇, CYP2B6 とプロピオン禁煙治療 ヒドロキシプロピオンの役割とは, *ファルマシア*, **49**(12), 1206 (2014).

〔学会発表〕(計5件)

田山剛崇, 杉原数美, 三宅勝志, 北村繁幸, 太田茂 Allopurinol 代謝に及ぼす投与量の影響 日本薬学会 第136年会 (2016)

田山剛崇, 杉原数美, 三宅勝志, 北村繁幸, 太田茂 ラット in vivo における Allopurinol 代謝に及ぼす aldehyde oxidase 活性の影響～臨床濃度における検討～ 第25回日本医療薬学会 (2015)

田山剛崇, 杉原数美, 三宅勝志, 北村繁幸, 太田茂 Allopurinol 代謝に及ぼす aldehyde oxidase 活性の影響～ラット in vivo における検討～ 日本薬学会 第135年会 (2015)

田山剛崇, 杉原数美, 三宅勝志, 北村繁幸, 太田茂 ラット in vivo における allopurinol 代謝への xanthine oxidase および aldehyde oxidase 活性の影響 第24回日本医療薬学会 (2014)

田山剛崇, 杉原数美, 三宅勝志, 北村繁幸, 太田茂 Allopurinol 代謝における aldehyde oxidase 活性の寄与に関する検討、日本薬学会 第134年会 (2014)

〔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〕なし

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田山 剛崇 (TAYAMA Yoshitaka)

広島国際大・薬学部・講師

研究者番号: 80389121

(2)研究分担者

佐能 正剛 (SANHO Seigo)

広島大学・大学院医歯薬総合研究科・助教

研究者番号: 00552267

杉原 数美 (SUGIHARA Kazumi)
広島国際大学・薬学部・教授
研究者番号： 20271067

谷口 良彦 (TANIGUCHI Yoshihiko)
広島国際大学・薬学部・教授
研究者番号： 30403520

北村 繁幸 (KITAMURA Shigeyuki)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号： 40136057

太田 茂 (OHOTA Shigeru)
広島大学・大学院医歯薬総合研究科・教授
研究者番号： 60160503

(3)連携研究者 なし
()
研究者番号：