(Jpn. J. Hosp. Pharm.)
一般論文
(23:3) 207—211 (1997)

尿中ニコチン代謝物の定量によるタバコ煙暴露の評価と臨床応用

船越幸代*†¹, 小西敏夫†¹, 横手千秋†¹, 前田頼伸†¹, 大和浩之†¹,
突合皐月†¹, 大宇根晃雅†², 津谷隆史†²
中国労災病院薬剤部†¹, 同呼吸器科†²

The Assessment of Tobacco Smoke Exposure Based on the Presence of Metabolites of Nicotine in the Urine and its Clinical Application

SACHIYO FUNAKOSHI*†¹, TOSHIO KONISHI†¹, CHIAKI YOKOTE†¹, YORINOBU MAEDA†¹
HIROYUKI YAMATO†¹, SATSUKI TSUKIAI†¹, TERUMASA OHUNE†² and TAKAFUMI TSUYA†²
Department of Pharmacy†¹ and Pulmonary Division Department of Internal Medicine†²,
Chugoku Rosai General Hospital

(Received November 8, 1996)
(Accepted February 25, 1997)

It is well known that tobacco smoke causes the health risks not only for smokers but for non-smoker as well. We thus evaluated the urinary cotinine, content, which is a major metabolite of nicotine, by high-performance liquid chromatography (HPLC). Such a determination is considered to provide a useful objective assessment of exposure to tobacco smoke. Using the Previously described method, non-smokers in a typical company were thus found to apparently demonstrate cotinine concentrations due to passive smoking. Furthermore we also determined the urinary cotinine in an asthma patient who could not stop smoking. The results indicated that the measurement of the urinary cotinine level by HPLC could be effective as a strong motivating factor to stop smoking and also to form a system of non-smoking support groups. In the future, such continuous study will enable us to approximate the effect of passive-smoking on a disease based on the measurement of the urinary cotinine level.

Key words — nicotine, cotinine, passive smoking, HPLC, system of supporting non-smoking

緒 言

今日、喫煙者のみならず、受動喫煙による非喫煙者の健康に及ぼすタバコの悪影響が社会問題に

なっている。血清や尿中などの Nicotine 代謝物の定量は、ガスクロマトグラフィー法やラジオイムノアッセイ法など数多く報告されている¹⁻³⁾。我々は、タバコ煙の暴露量を客観的に把握するため、Nicotine の主要代謝物であり、喫煙者の尿中に比較的高濃度に存在し⁴⁾、生体内半減期が約20時間

†^{1,2} 呉市広多賀谷 1-5-1; 1-5-1, Hirotagaya, Kure-shi,
737-01 Japan

と長い⁵⁾ Cotinine に着目し、比較的簡便に測定できる高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を用いた定量法⁶⁾を検討した。また、喫煙者および受動喫煙者の尿中 Cotinine 濃度を測定し、興味深い結果が得られたので報告する。

実験材料・方法

1. 試薬

Cotinine は Aldrich Chem. Co. 製、その他の試薬は和光純薬製のものをを用いた。

2. 測定方法

分析は HPLC (TOSOH グラデュエートシステム) で行い、カラムは TSK-Gel ODS-80TM (TOSOH) を用いた。検出波長は UV260nm とし、移動相は acetonitril-methanol-0.025M KH_2PO_4 -0.01M sodium pentanesulphonate (10:2:88:0.43, V/V) を用い、流速 1.0ml/min とした。

3. 前処理操作

武田らの方法⁷⁾に準拠し、尿試料 3 ml に internal standard substance (I.S.) として norephedrin 50 μg を加え、3 N NaOH 1 ml を加え有機層に移行しやすくした後、chloroform (水飽和) 2 ml を加え振とう後、3000 $\times$ g で 5 分遠心し有機層を採取した。この操作を 3 回繰り返し、採取した有機層を水洗後、acetic acid 10 μl を加え溶媒を減圧乾固した。残渣を 250 μl の移動相に溶媒し、分析試料とした。

4. 対象および症例

比較的喫煙者が多く、受動喫煙による暴露が予想されるある職場において、年齢 24~52 歳の男性 15 名 (喫煙者 10 名、非喫煙者 5 名) の出勤時および退社時の尿を採取し、尿中 Cotinine 濃度を測定した。また、外来患者の尿中 Cotinine 濃度も測定した。尿中クレアチニンの定量は酵素法で行った。

結 果

1. クロマトグラム

Blank 尿 (A) 及び Cotinine と I.S. を添加した

Fig. 1. Chromatograms by HPLC

(A) Blank urine from a non-exposed non-smoker, (B) Blank urine added two compounds. 1=Norephedrine (I.S.), 2=Cotinine (400 ng/ml)

尿 (B) のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。I.S. の retention time は 5.58 分に、Cotinine のそれは 9.73 分に認められた。

2. 検量線

Cotinine の検量線を Fig. 2 に示した。50~2000 ng/ml の広い濃度範囲において、濃度とピーク面積比に良い直線性 ($r=0.997$) が得られた。また Cotinine の検出限界は 5 ng/ml であった。

Fig. 2. Calibration Line of Cotinine

$$y = 7.119 + 896.9x \quad (r = 0.997)$$

Table 1. Recovery of Cotinine with the Proposed Procedure

conc. (ng/ml)	1	2	3	4	5	mean±S. D. (CV)	arrecovery (%)
200	191.2	194.9	193.9	207.8	209.6	199.5±7.646 (3.83%)	99.75±3.82
(RRT)	1.726	1.748	1.720	1.726	1.710	1.726±0.012 (0.695%)	
400	389.5	390.0	406.1	404.9	383.2	394.7±9.115 (2.31%)	98.68±2.28
(RRT)	1.727	1.733	1.734	1.726	1.714	1.727±0.007 (0.405%)	

RRT=relative retention time (Cotinine/I.S.)

3. 回収試験

Table 1 にBlank尿にCotinine(200ng/ml, 400ng/ml)を添加したときの回収量を示した。いずれも、回収率約99%, 変動係数(CV) 3%前後と良好な再現性が認められた。

4. ボランティアによる Cotinine 濃度の測定

ボランティア15名の尿中 Cotinine の測定結果を Table 2 に示した。尿は部分尿であるため生体内成分である尿中クレアチニン (Cr) により Cotinine 濃度の補正を行った。また、Nicotine 摂取量は、

Table 2. Analyses of Cotinine in Urine Sample of Volunteers by HPLC

No	Nicotin (mg)	to the office		from the office	
		Cotinine (ng/ml)	Cotinine/Cr (ng/mg)	Cotinine (ng/ml)	Cotinine/Cr (ng/mg)
<i>Smoker</i>					
1	19.5	2865	8005	3692	4193
2	16.0	4087	1559	3094	2129
3	16.0	3698	1428	3689	1585
4	15.0	1255	659	666	1801
5	15.0	2994	1044	3340	1719
6	12.0	1957	972	1710	779
7	10.0	549	318	433	196
8	8.0	624	690	602	1316
9	5.0	362	124	327	114
10	4.9	677	213	632	200
<i>Non-Smoker</i>					
11	-	418	134	131	82
12	-	174	136	106	111
13	-	25	19	24	48
14	-	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
15	-	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

N. D.=not detected

アンケートにより1日の平均喫煙本数と喫煙タバコの Nicotine 含有量より算出した。

喫煙者ではすべての尿に Cotinine が検出され、その濃度は、出勤時124～8005, 退社時114～4193 Cotinine/Cr (ng/mg) であった。尿中 Cotinine 濃度は、尿量など水分量により影響を受けやすく、前述のようにクレアチニンによる補正を行ったが、補正值においても、10人中3人において出勤時濃度が退社時よりもかなり高値となっている。これは Cotinine の半減期が20時間と長い⁵⁾ ことや就寝前喫煙など家庭での喫煙状態の関与によると思われる。一方、非喫煙者においては5名中3名より Cotinine が検出され、その濃度は、出勤時19～134, 退社時48～111 Cotinine/Cr (ng/mg) であった。検出された3名はいずれも喫煙経験がなく、副流煙による受動喫煙が示唆された。

5. 相関性の検討

Fig. 3 には、摂取 Nicotine 量と尿中 Cotinine 濃度の相関性を示した。Nicotine 摂取量と尿中 Cotinine 濃度には、 $r=0.83897$ と直線傾向が認められ、両者には相関関係があると思われる。

考 察

近年、受動喫煙が社会問題となっている。今回我々は HPLC による尿中 Cotinine の定量法を検討し、受動喫煙による暴露量を客観的に把握できる

Fig. 3. Correlation between Cotinine in Urine and Nicotine Amount in Tobacco

$$Y = -38.18 + 90.506 X \quad (r = 0.86897)$$

かどうか検討した。非喫煙者で尿中に Cotinine が検出されるのは個人の家庭や職場、公共の場所など生活環境でのタバコ煙の暴露によるものである。Cotinine 測定により喫煙が疾患に与える影響がより認識できればと思われる。喫煙の健康に対する悪影響が認められて以来、多くの禁煙法が研究、開発されてきた。禁煙支援の方法にはニコチンガムやクロニジン投与などの薬理学的方法、Rapid-Smoking Therapy やリラクゼーションとストレス管理などの行動療法的アプローチ、また催眠療法やカウンセリングなどがある。病院ではニコレット等の Nicotine 含有ガムにより禁煙の援助をし、禁煙教室が開かれている。多くの人が禁煙の悪影響を認識し、禁煙したいと思っているにもかかわらず、完全に禁煙することができず、禁煙しても Nicotine による依存性のため再度喫煙を始めてしまう。臨床における具体例として外来患者における尿中 Cotinine 測定の一症例を紹介する。

1日10～20本の喫煙習慣があるこの患者は、喘息発作により救急受診を繰り返した後、大発作によるチアノーゼをおこし、緊急入院となった。入院中、禁煙とともに症状が軽快し、患者の希望によりニコレットを用いた禁煙指導を受けるが、症状が無くなると再び喫煙を始め、退院時には1日5本程度の喫煙状態となっていた。その後、医師より何度も禁煙を勧められ、本人も禁煙しているといったが、平成7年には32回にものぼる救急受診と4回の入院を繰り返し、禁煙はできなかった。5度目の退院時、医師より厳しく禁煙をいわれた後、平成8年1月末、尿中 Cotinine 測定を依頼された。呼気中 CO 濃度は5ppm程度 (COアナライザー) であった。喫煙者では10ppm以上の値となることから⁸⁾、この値は喫煙を示すほどのものではなかった。Fig. 4にこの患者の尿のクロマトグラムを示した。患者は禁煙しているといったが Fig. 4のように1428ng/ml (1739 Cotinine/Cr) の Cotinine が検出されており、10mg/day 程度の Nicotine 摂取が示唆された。ニコチンガムの処方とはされていなかったため喫煙が疑われ

Fig. 4. HPLC Chromatograms Obtained from Urine of an Asthma Patient
(A) on consulting, (B) on leaving the hospital

た。その後、この患者は喘息発作を何度かおこし、測定1週間後に救急車で緊急入院となった。入院時の血中Hb-COは2.2%であった。退院前の尿中にはCotinineは検出されていなかった。

呼気中からは検出されず、尿中Cotinineが検出されたということはCOの半減期が数時間と短いのに比べ、Cotinineの半減期は約20時間⁵⁾と長いことに起因しているものと思われる。この患者のように喫煙が誘因で喘息発作が起り入院治療の後、症状の軽快とともに本人に禁煙の意思がうすれ再び喫煙を始めてしまうような場合において、尿中Cotinineの測定は患者にとって禁煙を支援

し、再喫煙を防止する動機付けになるのではないかとと思われる。

禁煙支援の一環として尿中Cotinineを測定することが、今回紹介した症例のように患者の喫煙の動機付けにおいてCOアナライザーにまさる禁煙支援方法となりうることが示唆された。今後、禁煙支援システムの手助けとなり、また、受動喫煙によるCotinineを測定できることで、家庭や職場における間接的なタバコ煙の暴露が本人の疾患に与える影響が推しはかれるように、今後更なる検討をしていきたい。

引用文献

- 1) G. A. Kyerematen and E. S. Vesell, *Drug Metab. Rev.*, **23**, 3-7 (1991).
- 2) Peyton J., Wilson M. and Benowitz N. L., *J. Chromatogr.*, **222**, 61-70 (1981).
- 3) G. J. Knight, G. E. Palomoki, D. H. Lea and J. E. Haddow, *Clin. Chem.*, **35**, 1036-1040 (1989).
- 4) Curvall Margareta, Vala EK, Enzell CR, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**, 42-49 (1982).
- 5) M. J. Jarris, *Mutation Research*, **222**, 101-110 (1989).
- 6) P. P. Rop, F. Grimaldi, C. Oddoze and A. Viala, *J. Chromatogr.*, **612**, 302-309 (1993).
- 7) 武田則昭, 實成文彦, 福永一郎他, 四国公衛誌, **38**, 181-187 (1933).
- 8) 川根博司, からだの科学, **169**, 54-57 (1993).