

資料

加熱式タバコの喫煙者の尿中コチニン値の評価：ELISA法の有効性

| | | | | | |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------|
| キョウ 姜 ヤマト 大和 | エイ 英 ヒロシ 浩* | カワ 河井 ヒロシ 浩* | イ 一明 カズアキ 2* | リ 季 ウンゼン 云善 2* | カキウチ 垣内 カキウチ ノリアキ 3* |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------|

目的 尿中コチニン濃度は、喫煙者の喫煙状況を客観的に評価するための信頼性の高いバイオマーカーとして広く利用されている。その測定には、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS 法) やガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS 法) といった高精度な手法が主に使用されているが、高額な機器や専門的な分析技術を要するため大規模調査には不向きである。一方、LC-MS 法と GC-MS 法に匹敵する精度を持つ、簡便かつ低コストの酵素免疫測定法 (ELISA 法) が注目されている。ELISA 法は紙巻タバコの喫煙者の尿中コチニン値の評価で有用性が示されているが、加熱式タバコへの適用については検討されていない。本研究は、加熱式タバコ使用者の尿中コチニン濃度を測定し、ELISA 法が LC-MS 法と同等に有効であるかを検証することを目的とした。

方法 某事業場で勤務する労働者を対象に、平日の昼休み中に尿を採取した。「非喫煙者」11人、「紙巻タバコのみの喫煙者」13人、「加熱式タバコのみの喫煙者」9人の計33人を解析対象とし、尿中コチニン濃度を LC-MS 法および ELISA 法で測定した。両手法の測定値の相関をピアソン相関係数で評価し、一致性をブランド・アルトマンプロットで検討した。

結果 ELISA 法と LC-MS 法の測定結果は高い相関を示し（紙巻タバコのみ喫煙者： $r = 0.84$, $P < 0.001$ ；加熱式タバコのみの喫煙者： $r = 0.96$, $P < 0.001$ ），ブランド・アルトマンプロットでは概ね高い一致性が得られ、両手法間のデータの90.9% は一致限界内に収まった。

結論 ELISA 法は、紙巻タバコのみならず加熱式タバコ使用者の尿中コチニン値の評価においても有用であることが示された。その簡便性と低コスト性より、大規模疫学調査や職場での喫煙対策における応用が期待される。

Key words：加熱式タバコ、尿中コチニン、酵素免疫測定法 (ELISA 法)、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS 法)

日本公衆衛生雑誌 2025; 72(11): 880-885. doi:10.11236/jph.24-141

I 緒 言

タバコの使用は、喫煙者本人だけでなく、その周囲の人々にも深刻な健康リスクをもたらすことが広く知られている。従来の紙巻きタバコの喫煙は、肺がんや心血管疾患、呼吸器疾患など多くの疾患の主要な原因であり、また受動喫煙による健康被害も大

きな社会問題となっている。

近年では、加熱式タバコ (Heated Tobacco Products; HTPs) などの新たなタバコ製品が市場に急速に普及している。令和4年国民健康・栄養調査結果によると、現在喫煙している者の男性の30.1%、女性の34.4% が加熱式タバコを使用している¹⁾。とくに20代の女性喫煙者の85.7% は加熱式タバコを使用していることが分かった。メーカーは、加熱式タバコについて、紙巻きタバコと比べ、発生する有害性成分の量が平均で90~95% 低減されていると主張している²⁾。しかしながら、加熱式タバコの主流煙中のニコチン濃度はレギュラーで 1.1 ± 0.1 mg/cig、メンソールで 1.2 ± 0.1 mg/cig で、紙巻きタバコは高タールで 1.7 ± 0.1 mg/cig、低タールで

* 産業医科大学産業生態科学研究所健康開発科学

** 産業医科大学産業生態科学研究所職業性腫瘍学

*** 産業医科大学産業生態科学研究所作業関連疾患予防学

責任著者連絡先：〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

産業医科大学産業生態科学研究所健康開発科学研究室 姜 英

E-mail : jiangying@med.uoeh-u.ac.jp

1.0 ± 0.1 mg/cig とほぼ同じである³⁾。また、タバコ産業の調査において、ヒトが実際に加熱式タバコと紙巻きタバコを1回使用した際、血中ニコチン濃度の最大値はそれぞれ8.4 (95% CI : 6.8, 10.3) ng/mL と11.9 (95% CI : 9.5, 14.9) ng/mL で、最大値に達するまでの時間はどちらも約8分で、顕著な差はなかったことが示されている⁴⁾。さらに、加熱式タバコの主流煙には、多くの種類の有害化学物質が含まれることから⁵⁾、加熱式タバコの使用者やその周囲の人々への健康リスクが懸念されている。

コチニンはタバコに含まれるニコチンが体内で代謝された後に生じる物質であり、その濃度はタバコ煙への曝露量を反映するとされている。そのため、尿中コチニン濃度は喫煙者の喫煙状況を客観的に評価するための信頼性の高いバイオマーカーとして広く利用されてきた⁶⁾。尿中コチニン濃度を測定するための分析手法としては、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS 法) やガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS 法) といった高精度な技術が標準的に用いられている^{7,8)}。これらの手法は、コチニンを高感度かつ高特異的に検出することが可能であり、精密な評価を行う上で欠かせない手段である。しかし、これらの手法には高額な機器を必要とし、分析には専門的な技術が求められるため、利用可能な施設が限られる。また、試料の前処理に約15時間を必要すること、1検体あたりの測定費用が高額であることが課題である^{9~11)}。とくに、大規模調査における使用には不向きであるとの指摘もある。

これらの背景から、簡便かつ低成本で測定が可能な手法として、酵素免疫測定法 (ELISA 法) が注目されている。ELISA 法は、簡易的な設備で測定が可能であり、大規模な集団調査や臨床現場での使用に適しているとされている¹²⁾。先行研究では、ELISA 法が GC-MS 法に匹敵する精度を持つことが示されており、紙巻きタバコの喫煙者の尿中コチニンの評価においてその有用性が認められている¹³⁾。しかし、加熱式タバコによる曝露評価については研究がまだ行われていない。

本研究の目的は、加熱式タバコ使用者の尿中コチニン濃度を測定し、ELISA 法が LC-MS 法と同様に有効であるかを検証することである。これにより、従来の紙巻きタバコだけでなく、加熱式タバコの曝露を評価する際に、より簡便かつコスト効率の高い測定法を確立することを目指している。加熱式タバコの普及が進む中で、大規模調査にも応用可能なタバコ煙への曝露評価の手法を開発することは、今後の公衆衛生政策や喫煙対策の推進において極めて重要であると考えられる。

II 方 法

1. 対象者

某事業場で勤務する日本人労働者549人を対象とし、研究の趣旨を説明し、同意を得た労働者60人を対象とした。平日の昼休み中に尿を採取し、普段の喫煙状況（非喫煙、元喫煙、現喫煙）をグーグルフォームを用いた自記式質問票への記入を依頼した。また、尿中コチニンの半減期は約20時間とされているため¹⁴⁾、尿採取の直前24時間以内の喫煙状況も調べた。先行研究¹³⁾で報告された相関係数 ($r=0.63$) を参考に、検出力0.8、有意水準0.05で相関係数 $r=0.7$ を検出するには約13人が必要と算出された。研究協力者の確保（手上げ方式の依頼）や、LC-MS 法による設備、測定技術、時間と費用などの制約から、「非喫煙者」11人、「紙巻きタバコ喫煙者」13人、「加熱式タバコ使用者」9人、の計33人を解析対象とした。

2. 尿中コチニン値の測定方法

ニコチンは肝臓で代謝されてコチニンや他の代謝物 (trans-3'-ヒドロキシコチニン (3-HC), 3-HC グルクロン酸抱合体等) に変換され、これらが尿中に排泄される。ニコチンの主要代謝経路は図1で示している。

対象者から採取した尿検体を2つに分割し、それぞれ LC-MS 法と ELISA 法で測定を行った。ELISA 法はコチニン測定 ELISA キット（株式会社コスマックコーポレーション、東京、日本）を用いた。LC-MS 法の測定には、超高速液体クロマトグラフ (UHPLC) UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, 横浜、日本) とハイブリッド四重極オービトラップ質量分析計 Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific, 横浜、日本) を使用し、LC-MS/MS モードで測定した^{9~11)}。ELISA 法で用いられる抗体は、尿中コチニンに加えて 3-HC, 3-HC グルクロン酸抱合体とも反応することが知られている¹³⁾ことから、LC-MS 法で測定されたコチニン、3-HC, 3-HC グルクロン酸抱合体の値を用いて、以下の式でニコチン代謝物濃度を算出した¹³⁾。

ニコチン代謝物濃度

$$= \text{コチニン} + 1.013 \times (3\text{-HC}) + 2.218 \times (3\text{-HC グルクロン酸抱合体})$$

以下、ELISA 法の結果と、LC-MS 法の結果から算出したコチニン代謝物濃度を尿中コチニン値として比較し、両手法の一致性を評価した。

3. データの分析

尿中コチニン濃度を喫煙状況「非喫煙者」「紙巻きタバコ喫煙者」「加熱式タバコ使用者」で分類

図1 ニコチンの主要代謝経路

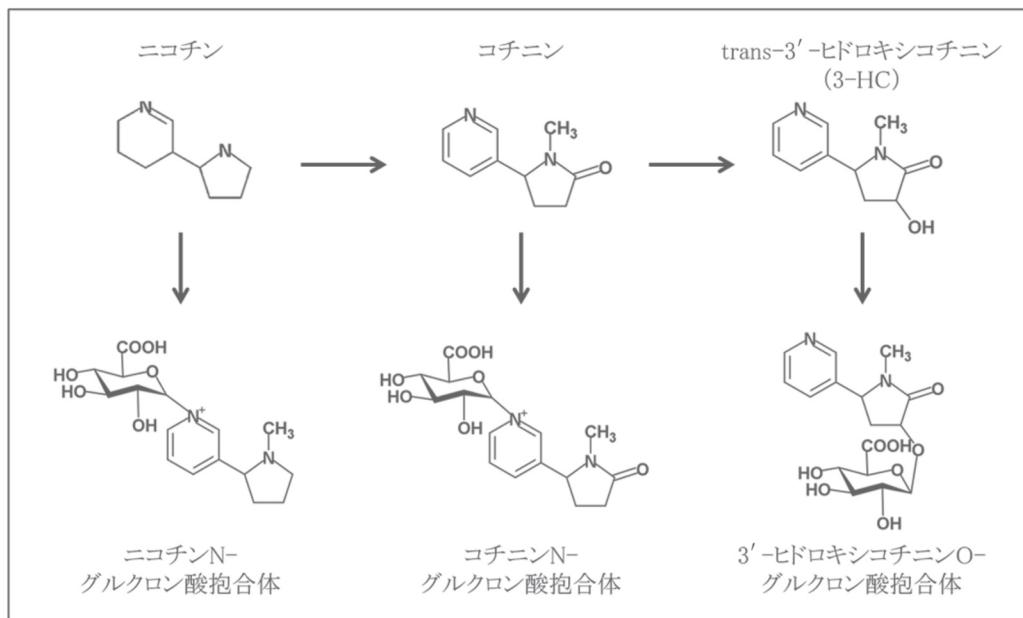


表1 喫煙状況別のELISA法とLC-MS法による尿中コチニン値(ng/mL)

| 人数 | ELISA法 | | LC-MS法 | |
|-----------|---------------|------------------------------|---------------|------------------------------|
| | 平均±標準偏差(値の範囲) | | 平均±標準偏差(値の範囲) | |
| 非喫煙者 | 11 | 1.82±0.40 (1.30~2.50) | | 0.82±0.79 (0.13~2.62) |
| 紙巻きタバコ喫煙者 | 13 | 6,084±3,514 (884~11,746) | | 4,344±1,527 (1,540~6,228) |
| 加熱式タバコ使用者 | 9 | 4,626±3,244 (1,040~8,843) | | 3,369±1,634 (1,200~5,326) |

し、各群ごとに分析を行った。ELISA法およびLC-MS法による測定結果間の相関をピアソン相関係数を用いて解析した。さらに、両測定法間の一致性をブランド・アルトマン分析を用いて評価した。統計解析にはJMP Pro 18 (SAS Institute社)を使用し、有意水準は5%とした。

4. 倫理的配慮

本研究は、産業医科大学倫理審査委員会の承認を得て実施し(承認番号ER23-027号、承認日:2023年9月26日;承認番号R1-037号、承認日:2019年11月1日),すべての参加者から文書で研究参加の同意を得て実施した。

III 報告内容

非喫煙者11人の平均尿中コチニン値は、ELISA法で1.82 ng/mL、LC-MS法で0.82 ng/mLであった。紙巻きタバコの喫煙者13人では、ELISA法で6,084 ng/mL、LC-MS法で4,344 ng/mLであった。加熱式タバコの喫煙者9人では、ELISA法で4,626 ng/mL、LC-MS法で3,369 ng/mLであった(表1)。

紙巻きタバコのみの喫煙者および加熱式タバコのみの喫煙者でのELISA法とLC-MS法による尿中コ

チニン値の相関を図2で示した。ピアソン相関係数は、紙巻きタバコのみの喫煙者で0.84、加熱式タバコのみの喫煙者で0.96、両方ともに高い相関を示した($P < 0.001$)。

両測定法間の一致性を評価したブランド・アルトマンプロットを図3に示した。両測定法の平均差(バイアス)は1,029 ng/mLであり、一致限界は、-2,619 ng/mLから4,677 ng/mLの範囲で、データの90.9%が一致限界内に含まれていた。

IV 考察

ELISA法とLC-MS法の測定値は高い相関を示し、とくに加熱式タバコの喫煙者での相関係数が0.96と非常に高かった。また、ブランド・アルトマンプロットによる一致性評価の結果、両手法は概ね高い一致性を示したことから、ELISA法は従来の紙巻きタバコのみならず、加熱式タバコにおいても有効な曝露評価法であることが示された。ELISA法の低コスト性と簡便性は、加熱式タバコの大規模調査や職場での喫煙者の評価において重要な手法であることが分かった。

ELISA法はコチニン以外のニコチン代謝物(3-

図2 ELISA法とLC-MS法による尿中コチニン値の相関
紙巻きタバコ喫煙者（13人）
加熱式タバコ使用者（9人）

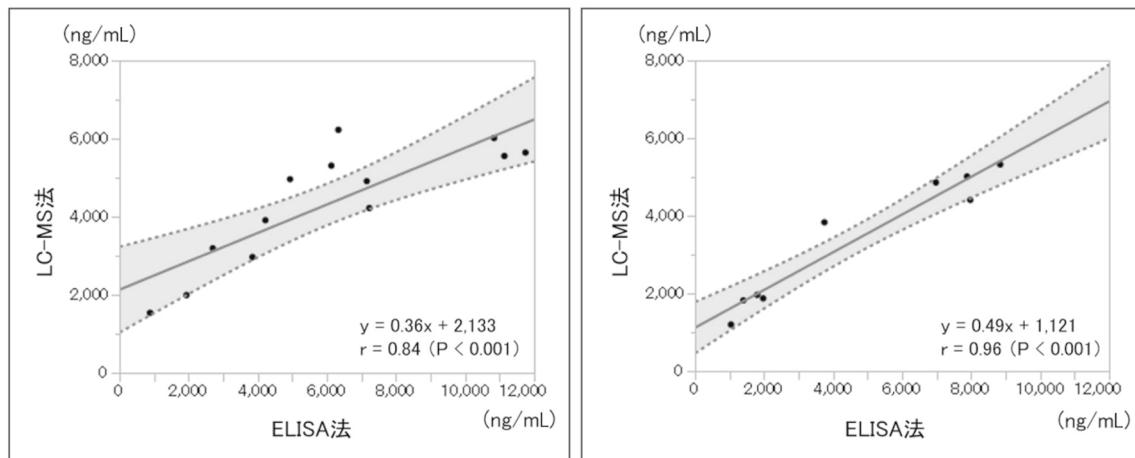
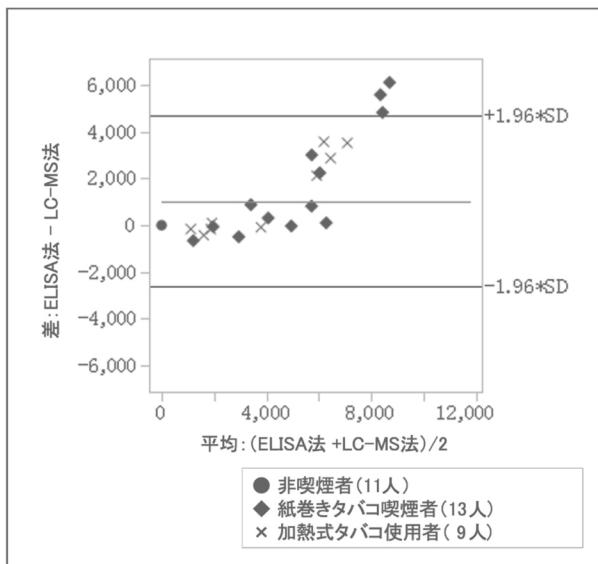


図3 ブランド・アルトマンプロット（ELISA法とLC-MS法の一貫性）



HC, 3-HC グルクロロン酸抱合体など)との交差反応や夾雑物との反応により高値になるため¹³⁾、この特性を理解した上でELISA法を活用することが必要であり、LC-MS法の結果と比較する際には補正を行う必要があると考えられる。また、ブランド・アルトマンプロットで紙巻きタバコの喫煙者3人の尿中コチニン値が高値領域において一致限界を超えていたことが観察された。これら3人は、尿採取の直前24時間以内に、1人は15本、2人は20本の紙巻きタバコを喫煙したことを確認している。そのため、重喫煙者のELISA法による尿中コチニン濃度は過大評価になる可能性があることを考慮する必要がある。

ELISA法で測定した非喫煙者の尿中コチニン値はLC-MS法と同様に喫煙者より低い値を示し、今

後、受動喫煙者における低値の評価が必要と考えられる。

V 結 語

本研究では、ELISA法とLC-MS法による尿中コチニン濃度測定の比較を行い、ELISA法が紙巻きタバコのみならず、加熱式タバコの曝露評価にも有用であることを示した。ELISA法は簡便で低コストの手法であり、公衆衛生分野における加熱式タバコの大規模な調査や職場での喫煙対策への応用が期待される。

本調査の実施にあたり、研究に協力いただいた事業所担当者の石井千代様に感謝いたします。また、本研究において開示すべき利益相反はない。

受付 2024.12.25
採用 2025. 5.12
J-STAGE 早期公開 2025. 8. 4

文 献

- 厚生労働省. 令和4年国民健康・栄養調査結果の概要. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisaku-00000000001296359.pdf> (2024年11月27日アクセス可能).
- IQOS. IQOSの有害性成分の低減に関するよくある質問. <https://jp.iqos.com/support/faq/iqos-risk> (2024年11月27日アクセス可能).
- Bekki K, Inaba Y, Uchiyama S, et al. Comparison of chemicals in mainstream smoke in heat-not-burn tobacco and combustion cigarettes. J UOEH 2017; 39: 201–207.
- Picavet P, Haziza C, Lama N, et al. Comparison of the pharmacokinetics of nicotine following single and *ad libitum* use of a tobacco heating system or combustible cigarettes. Nicotine Tob Res 2016; 18: 557–563.

- 5) 厚生労働省. 加熱式たばこにおける科学的知見. 2018. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000201435.pdf> (2024年11月27日アクセス可能).
- 6) Gariti P, Alterman AI, Ehrman R, et al. Detecting smoking following smoking cessation treatment. *Drug Alcohol Depend* 2002; 65: 191–196.
- 7) McManus KT, deBethizy JD, Garteiz DA, et al. A new quantitative thermospray LC-MS method for nicotine and its metabolites in biological fluids. *J Chromatogr Sci* 1990; 28: 510–516.
- 8) Krokos A, Orfanidis A, Mastrogiani O, et al. Gas chromatography-mass spectrometry determination of nicotine and cotinine in urine: a study of the effect of passive smoking. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2024; 38: e9864.
- 9) Kawasaki Y, Li YS, Ootsuyama Y, et al. Effects of smoking cessation on biological monitoring markers in urine. *Genes Environ* 2020; 42: 26.
- 10) Kawasaki Y, Li YS, Watanabe S, et al. Urinary biomarkers for secondhand smoke and heated tobacco products exposure. *J Clin Biochem Nutr* 2021; 69: 37–43.
- 11) Kawasaki Y, Li YS, Ootsuyama Y, et al. Assessment of exposure and DNA damage from second-hand smoke using potential biomarker in urine: cigarettes and heated tobacco products. *J Clin Biochem Nutr* 2023; 72: 242–247.
- 12) 太田光熙, 国広俊臣, 下駄雄介, 他. 受動喫煙モニタリングのための高感度 cotinine 測定法の開発と臨床応用. *医学と薬学* 2007; 58: 589–594.
- 13) Matsumoto A, Ino T, Ohta M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of nicotine metabolites. *Environ Health Prev Med* 2010; 15: 211–216.
- 14) Florescu A, Ferrence R, Einarson T, et al. Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 14–30.

Assessment of urinary cotinine levels in heated tobacco product (HTP) users: Effectiveness of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ying JIANG^{*}, Kazuaki KAWAI^{2*}, Yun-Shan Li^{2*}, Noriaki KAKIUCHI^{3*} and Hiroshi YAMATO^{*}

Key words : heated tobacco products, urinary cotinine, enzyme-linked immunosorbent assay, liquid chromatography-mass spectrometry

Objectives Urinary cotinine concentration is widely used as a reliable biomarker to objectively evaluate smoking status. High-precision methods, such as liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), are mainly used for measuring cotinine concentrations. However, these techniques require expensive equipment and specialized analytical techniques; therefore, they are not suitable for large-scale surveys. Conversely, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is simple and low-cost and has a precision comparable to that of LC-MS and GC-MS, has attracted attention. ELISA has been shown to be useful for evaluating urinary cotinine levels in combustible cigarette smokers; however, its application to heated tobacco product (HTP) users has not yet been examined. Thus, in this study, we aimed to measure urinary cotinine concentrations in HTP users and ascertain whether ELISA is as effective as LC-MS for such measurements.

Methods Urine samples were collected from workers at a certain workplace during lunch breaks on weekdays. In total, 33 participants were analyzed: 11 nonsmokers, 13 cigarette-only smokers, and 9 HTP-only users. Urinary cotinine concentrations were measured using LC-MS and ELISA. The correlation between the measurements obtained using these methods was evaluated using Pearson's correlation coefficient; the agreement was examined using the Bland–Altman analysis.

Results The ELISA and LC-MS results showed a high correlation (cigarette-only smokers: $r = 0.84$, $P < 0.001$; HTP-only users: $r = 0.96$, $P < 0.001$). The Bland–Altman plot showed a high degree of agreement, with 90.9% of the data between both methods falling within the limits of agreement.

Conclusion ELISA was useful for evaluating urinary cotinine levels in cigarette smokers and HTP users. Because of its convenience and low cost, ELISA is expected to be utilized for large-scale epidemiological surveys and promoting smoking control in workplaces.

^{*} Department of Health Development, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan

^{2*} Department of Environmental Oncology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan

^{3*} Department of Work Systems and Health, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan