

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成10年度 健康科学総合研究事業

タバコ含有物質による健康増進に及ぼす影響に関する研究

(H10-健康-060)

主任研究者 佐竹 元吉

所属施設 国立医薬品食品衛生研究所

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Inhibition by β -carotene of upper respiratory tumorigenesis in hamsters receiving diethylnitrosamine followed by cigarette smoke exposure. J. Jpn. Cancer Res. 90: 154-161	1999		Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Lee, I.-S., Wakabayashi, K. Takahashi, M. and Hirose, M.
: Suppressive effects of josamycin on the development of altered liver cell foci and chronic nephropathy in a carcinogenicity study. Fd. Chem. Toxic. 37: 61-67	1999		Kasahara, K., Nishikawa, A., Furukawa, F., Ikezaki, S., Tanakamaru, Z., Takagi, H., Ikeda, T., Imazawa, T., Takahashi, M.
Specific mutational spectrum of dimethylnitrosamine in the lacI transgene of Big Blue C57BL/6 mice. Mutagenesis 13: 625-630	1998		Wang, X., Suzuki, T., Itoh, T., Honma, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M., Hayashi, M., Kato, T., Sofuni, T.
Enhancing effects of quinacrine on development of hepatopancreatic lesions in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine- treated hamsters. Jpn. J. Cancer Res. 89: 131-136	1998		Furukawa, F., Nishikawa, A., Imazawa, T., Kasahara, K., Takahashi, M.
Histochemical study on enzyme stereoselectivity for esterase in hamster normal pancreas and pancreatic tubular adenocarcinoma. Biotech. Histochem. 73: 23-31	1998		Yamazaki, Furukawa, F., Nishikawa, A., Takahashi, M., Oka, S.
Epithelial cell proliferation in the digestive tract induced by space restriction and water-immersion stress. Cancer Lett. 125: 141-148	1998		Hori, T., Wanibuchi, H., Yano, Y., Otani, S., Nishikawa, A., Osugi, H., Kinoshita, H., Fukushima, S.
Ioannides, C. ed. Nutrition and Chemical Toxicology. John Wiley & Sons, Sussex, 285-299	1998		Mori, H., Nishikawa, A.
Chemopreventive activity of oltipraz against induction of glandular stomach carcinogenesis in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Carcinogenesis 19: 365-368	1998		Nishikawa, A., Tanakamaru, Z., Furukawa, F., Lee, I.-S., Kasahara, K., Ikezaki, S. Takahashi, M.

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）

総括研究報告書

タバコ含有物質による健康増進に及ぼす影響に関する研究研究

主任研究者 佐竹元吉（国立医薬品食品衛生研究所生薬部長）

研究要旨 タバコの健康障害に与える影響に関して、これをめぐるWHOの禁煙運動を始め、多くの健康と喫煙に関する考え方がある。この考え方には科学的研究成果に基づくものと、研究成果が未だ充分でない部分とがある。近年の問題点は副流煙による非喫煙者の健康障害に及ぼす効果である。そこで、主流煙および副流煙の含有成分に関して、化学的、生物学的検討を行った。

分担研究者

西川秋佳（国立医薬品食品衛生研究所）

川島邦夫（国立医薬品食品衛生研究所）

山田 隆（国立医薬品食品衛生研究所）

協力研究者

尹 永淑（国立医薬品食品衛生研究所）

関田節子（国立医薬品食品衛生研究所）

杉本直樹（国立医薬品食品衛生研究所）

米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

タバコの健康障害に与える影響に関して、これをめぐるWHOの禁煙運動を始め、多くの健康と喫煙に関する考え方がある。この考え方には科学的研究成果に基づくものと、研究成果が未だ充分でない部分とがある。近年、問題となっている点は主流煙よりは副流煙による非喫煙者の健康障害に及ぼす効果である。これらに関して、タバコの成分が燃焼によりどのように変わり、この変化体が副流煙の中で人体にどのように影響するかの実験データは我が国では殆ど公開されていない。

タバコの歴史はE.C.Conte Corti の

History of Smoking(1931)に書かれている。タバコ属は世界に60から70種あり、主な分布地は南米熱帯地方であり、その他に北米、オーストラリアがある。タバコの起源植物は南米産で、この種がヨーロッパに持ち込まれ多くの改良品種が出来た。

成分に関する研究は1763年にタバコからnicotineが単離されてから、多くの成分が分離されていて、HeganauerがChemotaxonomie der Pflanzen(IX) 1990にまとめている。アルカロイドとしてはacotine, normicotine, anabesineが主で、その他、anatabine, anataline, 2,3'-bipyridine, myosmine, nicotelline, nicotyrine, ステロイドアルカロイドとして normicotinamide、ジピリジンアルカロイドとして 5-methyl-2,3'-bipyridine類がある。クマリン、トリテルペン類、炭化水素、樹脂成分、糖類が含まれる。含有成分の生合成についてはニコチン類のアルカロイドについて研究がなされている。また、重金属の分析はイスラエルのSathiyamoorthyにより1997年に行われた。

タバコの有害性の研究からタバコ煙による健康への悪影響が指摘されており、過剰な喫煙負荷を用いる動物実験によりその一部が確認されている。特に、米国で発見されたタバコ特異的ニトロサミンなどの発がん物質は、実験動物に実際に発がん性を示すことが明らかにされている。しかし、タバコ煙単独での発がん性は未だ証明されていないことを含め、タバコ煙の安全性評価に関するデータは殆ど公表されていない。本研究の特色は、タバコ煙を物質としての視点から安全性評価を試みる点にある。

研究方法としては、タバコの煙害に関して、未検討のタバコの品種による特異な成分や、栽培条件下で混入する恐れのある農薬及び環境汚染物質、加工過程での添加する物質に関して、成分面からの分析を行い、現在の市場品の成分を精査する。これらの成分が喫煙によりどのように変化するかを明らかにすることを目的に研究を行う。比較対照として、タバコの加工前の成分に関しては、野生地のタバコの葉の成分、加工前の市販葉、国内栽培系統の葉の成分、残留農薬の分析を行う。

また、喫煙により、これらの化合物が人体に吸収されどのような作用を示すかを検討するためにラットやハムスターなどの実験動物におけるタバコ煙の生体影響を主として生殖毒性及び病理学的に検索する。喫煙付加したハムスター及びラットで健康に及ぼす影響を検索する動物実験系を作成するために、5週齢の雄性のラット及びハムスターにハンブルグ型喫煙曝露装置を用いて、タバコ煙を負荷し、血液生化学的及び病理組織学的に検索する。細胞増殖活性、薬物代謝 CYP 酵素などについて免疫組織化学的に検討する。また、動物に種々の発癌物質を投与し、DNA 障害性または発癌性に対するタバコ煙の修飾影響について検索する。さらに、WBN/Kob ラット

の自然発生腫瘍に対するタバコ煙の影響を検討する。

本年度は以下に示すように、タバコの葉の含有成分の比較及び製品タバコの主成分、タール、添加物と残留農薬の分析を行った。病理学的研究では5週齢の雄性のラット及びハムスターにハンブルグ型喫煙曝露装置を用いて、細胞増殖活性、薬物代謝 CYP 酵素などについて免疫組織化学的に検討を行った。

(1) 成分の研究

タバコの葉の含有成分文献調査及び市販タバコの喫煙による煙成分の比較を行った。対象とする成分は品種特異な道の成分及びアルカロイドとしては nicotine, nornicotine, anabasine が主で、その他、anatabine, anatabine, 2,3'-bipyridine, myosmine, nicotelline, nicotyrine, nicotiamine, nicotianine、ステロイドアルカロイドとして nornicotinamide、ジピリジンアルカロイドとして 5-methyl-2,3'-bipyridine 類、クマリンの scopoletin、トリテルペン類として β -sitosterin, camprestrin, cholesterol、炭化水素として phytadien, duvan、樹脂成分として levantolid, morambreinoid, 12-hydopyl-5-oxo-heanic acid, solanesol, solanon, 2-isopropyl-5-oxo-hezanic acid、糖類として myoinositol, mesoinositol である。これらの製品タバコの主成分、タール、添加物を検討した。

(2) 毒性学的研究 (妊娠と胎児への影響)

妊娠と胎児への影響として、ハムスターの胎児の器官形成期に喫煙曝露して、胚/胎児の発生に対する影響を検討した。

(3) 病理学的研究 (発ガンへの影響)

発ガンへの影響として、喫煙付加したハムスター及びラットの諸臓器から調製した S9 を用いて、各種発ガン物質の変異原性に及

ばす影響を検索する動物実験系を作成したので、これを用いて、5 週齢の雄性のラット及びハムスターにハンブルグⅡ型喫煙曝露装置を用いて、タバコ煙を1 週間ないし4 週間負荷する。実験終了後、血液生化学的及び病理組織学的に検索するとともに、細胞増殖活性、薬物代謝CYP酵素などについて免疫組織化学的に検討した。

平成11年度は以下の項目を計画している。

(1) 成分の研究

タバコの葉の含有成分及び製品タバコの添加物及び農薬の主流煙及び副流煙中の量の比較を行う。また、ラット・ハムスターのハンブルグⅡ型喫煙曝露装置実験時のフィルターにトラップされた化合物について分析を行う。タール、添加物と残留農薬の分析として、生薬分析で対象にしていた農薬を中心に使用の可能性のある有機塩素剤14種、有機リン剤5種及びカルバメート剤1種を検討する。室内での汚染度を環境基準と比較して、検討する。分析用のタバコの栽培を薬用植物栽培試験場で開始する。

(2) 病理学的研究

5 週齢の雄性のラット及びハムスターにハンブルグⅡ型喫煙曝露装置を用いて、引き続き実験を行う。

(3) 毒性学的研究

動物に種々の発がん物質を投与し、DNA 障害性または発がん性に対するタバコ煙の修飾影響について検索する。ニコチンを妊娠ハムスターに強制経口投与し、催奇形性を調べるとともに、胎児へのニコチン移行量を測定し、喫煙により摂取されたニコチンの胎児毒性(催奇形以外に胎児死亡、体重減少、矮小化等を含む)に関する母児相関を検索する。

平成12年度は以下の項目を計画している。

(1) 成分の研究

栽培タバコの葉と製品の成分の比較を行う。

継続的にタバコの成分の燃焼による変化とその量を測定し、国産タバコの主流煙及び副流煙の成分を明らかにし、喫煙の問題点を化学物質の観点から解明する。

(2) 病理学的及び毒性学的研究

5 週齢の雄性のラット及びハムスターにハンブルグⅡ型喫煙曝露装置を用いて、引き続き実験を行う。WBN/Kob ラットの自然発生肺炎に対するタバコ煙の影響を検討し、タバコの成分及び添加物、農薬等の病変原因物質を明らかにする。生殖毒性の試験を行う。

(3) 毒性学的研究

WBN/Kob ラットの自然発生肺炎に対するタバコ煙の影響を検討し、タバコの成分及び添加物、農薬等の病変原因物質を明らかにする。生殖毒性の試験を行う。

B. 研究方法

(タバコの煙の成分)

1) 煙の採取

商品名ショートピース及びマイルドセブンの2種類の日本製タバコを用い、4 週齢のラット(strain :F344rat)10 匹にハンブルグⅡタイプ装置を通じて一日30本ずつ2回に分けて10日間暴露させた。その際、ハンブルグⅡタイプ装置に直径10cm厚さ0.5 mmのフィルターをつけて煙を採取した。

2) 成分分析

抽出および分離は主流煙を採取したフィルター1枚をエーテルで抽出した後、1N HCl及び2N NaOHとCHCl₃で分配した。また、主流煙を包縮したフィルター159枚をメタノールで2回室温抽出した後、CHCl₃と水で分配し、得られたCHCl₃エキスを183.3gをCHCl₃/MeOH系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った結果8個の分画を得た。この8分画を用いGC-Mass分析をした。またこれらの分画の中、ドラー

ゲンドルフ試薬に強い陽性を示した分画をさらに HP-20 カラムクロマトグラフィー及び 1N 塩酸とクロロホルムにて分配し、ジエチルアミンを加えた $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 系の溶媒を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。

ガスクロマトグラフィー及び MS はそれぞれ Shimadzu の GC-17A、GC-MS-QP-5050 型で、また HiCap-CBP20 (Shimadzu) のキャピラリーカラム (25m X 0.25mm) を用い分析を行った。カラム温度は初期温度が 50℃ で 3 分間保持した後 2℃/min. ずつ 240℃ まで上げ、240℃ で 17 分間保持した。インターフェースや気化室の温度は 240℃ に設定した。また、ヘリウムガスをキャリアガスとして 15ml/min ずつ流した。

HP-20 カラムクロマトグラフィー及び 1N 塩酸とクロロホルムにて分配し、ジエチルアミンを加えた $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 系の溶媒を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ったところ、ニコチンが単離された。これは NMR にて確認した。

(妊娠と胎児への影響)

妊娠 2 日のシリアン・ハムスターを購入し、交尾確認日を妊娠 0 日とした。妊娠ハムスターは固形飼料及び水道水を自由に摂取させ、プラスチック製飼育ケージにて個別に飼育した。

ハムスターの妊娠 4 日から妊娠 13 日まで、午前及び午後の 1 日 2 回、ハンブルグ II 型喫煙暴露装置を用いてマイルドセブンの喫煙暴露を行った。対照群のハムスターは喫煙群と同時喫煙暴露装置に保定のみを行った。妊娠 14 日に妊娠ハムスターをエーテル麻酔した後、放血致死させ、開腹して胎児に対する影響を調べた。着床数、吸収胚数、生存胎児数及び死亡胎児数を記録した。生存胎児については外表奇形を調べ、体重測定を行った。

約半数の生存胎児は骨格検査用にアルコールに固定し、残りの半数の生存胎児は内部器官の検査用にブアン液に固定して保存した。

(発ガンへの影響)

MeIQx およびフィルターなしの紙巻タバコ (ショートピース) は、それぞれ Toronto Research Chemicals Inc. および日本たばこ産業 (株) から購入した。3 週齢の F344 ラットをチャールスリバー (株) から購入し、1 週間の順化期間の後、実験を開始した。MeIQx を基本食オリエンタル MF (オリエンタル酵母 (株)) に 300 ppm の濃度で混じ、MeIQx 食とした。喫煙 (CS) 曝露は、ハンブルグ II 型喫煙装置を用いて、一日一回、一回につき曝露時間 6 分で 1 週間に 7 日連続して行った。曝露条件は以前の実験に合わせて、タバコ 30 本、吸入容量 35ml、吸入速度 17.5 ml/秒、CS の希釈率 1/7 とした。Sham smoking (SS) 処置として、実際には CS 曝露をせずに動物を喫煙装置のチャンバー内で同様に 6 分間拘束した。

105 匹のラットを各群 15 匹の 7 群に分けた。第 1 群には、実験開始時より MeIQx 食を与えると同時に、CS 曝露を 16 週間負荷する。第 2 群には、実験開始時より MeIQx 食を与えると同時に、SS を 16 週間実施する。第 3 群には、実験開始時より MeIQx 食を与えると同時に、CS 曝露を 4 週間負荷し、その後基本食に切り替え、SS を 12 週間行う。第 4 群には、実験開始時より MeIQx 食を与えると同時に、SS を 4 週間実施し、その後基本食に切り替え、CS を 12 週間行う。第 5 群には、実験開始時より MeIQx 食を 4 週間与えた後基本食に切り替え、実験開始時より SS を 16 週間実施する。第 6 群および第 7 群には、基本食のみを与え、実験開始時よりそれぞれ CS 曝露および SS 処置を 16 週間行う。動物の状態は毎日観察し、体重および摂餌量は毎週測定する。実験開始

から16週後に全ての生存動物を剖検し、病理組織学的に検索するとともに、胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P)陽性肝細胞巢を定量評価する。

C. 研究結果

(成分の研究)

(1) GC-Mass

タバコの成分が燃焼にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた8分画に対してGC-Mass分析を行った結果、主成分であるニコチンを始め、メンソール、バニリンなどの香料成分、及び含窒素化合物など文献記載の100余りの化合物の他に、構造の予測できる167の化合物が検出された。

(2)分取クロマトグラフィー

HP-20カラムクロマトグラフィー及び1N塩酸とクロロホルムにて分配し、ジエチルアミンを加えたCHCl₃/MeOH系の溶媒を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ったところ、L-ニコチンが単離された。これはNMRにて確認した。

(妊娠と胎児への影響)

妊娠14日に妊娠ハムスターを開腹し着床数、子宮内胚/胎児死亡数および死亡率、生存胎児数に喫煙群と対照群との間の差は認められなかった。妊娠ハムスターの胎児器官形成期に喫煙暴露を行って、たばこ喫煙の次世代の発生に及ぼす影響を検討した。胚/胎児の子宮内死亡数及び死亡率、生存胎児数、生存胎児体重には喫煙群と同時間保定のみを行った対照群と差は検出されず、喫煙によると考えられる影響は認められなかった。さらに、外表異常を有する胎児数及びその発現頻度にも喫煙群と対照群との間に差はみられなかった。以上の結果から、今回の実験条件下では妊娠ハムスターの次世代の発生に及ぼす喫煙暴露の影響はなかったものと結論される。

(発ガンへの影響)

ラットを喫煙させて、実験開始より現在6週間経過したが、死亡例はみられていない。4週間までは各群間に平均体重の差はなく、それ以降CS負荷群で若干の体重増加抑制の傾向がみられたが、各群間に有意差は認められていない。摂餌量の推移はCS負荷群で若干の摂餌量低下の傾向がみられたが、各群間に有意差は認められていない。一方、シリアンハムスターにタバコ煙を負荷し、肝臓、肺および脾臓から調製したS9を用いてAmes試験を施行した結果、ヘテロサイクリックアミンの変異原性を上昇させたが、ニトロソ化合物を含めたその他の発癌物質の変異原性には影響を及ぼさなかった。それに符合して、ハムスター及びラットにタバコ煙を吸入曝露した結果、肝S9のチトクロームP-450含量が増加し、特にCYP1A1と1A2の有意な誘導がみられたが、N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine (BOP)の活性化に関与するCYP2B1と2E1には変化がなかった。

D. 考察

(成分の研究)

タバコの固有成分のみならず添加物の喫煙による化学的变化に関して、機器分析のデータベースは公表されていない。従って、捉えたピークについての確実な同定にはかなり手間を要することになる。これらの点については、文献検索からの推定と分析方法の確立により補うことが必要となる。GC-Massにより検出された化合物は、現時点では推定された化合物であり、今後入手可能なものから標準品を用い同定する予定である。これらの化合物の中にはニコチンの誘導體以外にも多くの含窒素化合物があり、これらを中心に実験を行う予定である。今回発癌性のN-nitrosamines類は検出されなかったものの、

カラムや検出方法について検討を行う。次年度は主流煙及び環境への副流煙の化学的測定を行う。

(妊娠と胎児への影響)

ハンブルーク II タイプ装置は動物を観察する管が狭く、ハムスタへのストレスの程度が大きく、今回の結果となった。胎児への影響は煙によるものよりストレスによるものと考えられる。しかし、胎児への影響を調べるにはハムスターが最適であるため、実験装置の工夫が不可欠である。次年度はこれらの点の改良を試みる。

(発ガンへの影響)

タバコ燃焼物に含まれるヘテロサイクリックアミンを含め、多環芳香族炭化水素および芳香族アミンなど多くの発癌物質は、齧歯類やヒトの CYP1A1/2 により代謝活性化されることが知られている。したがって、タバコ煙が特異的に CYP1A2 を顕著に誘導することは、その発癌に対する作用を考慮する上でより重要な知見と考えられる。今回の実験成績により、それが確認できる可能性が高い。タバコ煙がメチルコラントレン誘導性のグルクロニルトランスフェラーゼ活性を基質特異的に上昇したことは、CYP で観察された変化と喫煙者の方が非喫煙者に比べてその酵素により触媒される α -naphthol に対する活性が強いことと一致する。現在、実験は開始後 6 週経過後の時点であり、終了まであと 10 週間を残している。実験終了後に、病理組織学的検索および GST-P 陽性肝細胞巢の解析を行い、MeIQx による肝発がん性に対するタバコ煙の修飾影響を最終評価する。

E. 結論

成分の研究に関しては 3,000 種類と言われる煙の成分の中で、健康に影響のある成分 (ニコチン等) 及び含有量の多い成分に関

して測定を行い、約 300 種のピークを検出した。これらのうち 100 あまりは文献から検索した。167 種類についてはさらに検索を続行する。

妊娠ハムスターに関しては、妊娠ハムスターと実験機器とが十分ではなく、今回の結論は再検討を要する。

発ガンに関しては、継続的に喫煙実験を実施中のため次年度に成果を報告したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori, H., Tanakamaru, Z. and Nishikawa, A.: Effects of protocatechuic acid, S-methylmethanethiosulfonate or 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)-ethenyl)-2(5H)-furanone (KYN-54) on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* (in press)
- 2) Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I.-S., Kasahara, K., Tanakamaru, Z., Nakamura, H., Miyauchi, M., Kinai, N. and Hirose, M.: Promoting effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* (in press)
- 3) Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Tanakamaru, Z., Miyauchi, M., Nakamura, H., Ikeda, T., Imazawa, T. and Hirose, M.: Failure of phenethyl isothiocyanate to inhibit hamster tumorigenesis induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine when given during the post-initiation phase. *Cancer Lett.* (in

press)

4) Ikezaki, S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Tanakamaru, Z., Mori, H. and Hirose, M.: Influence of long-term administration of 24R, 25-dihydroxyvitamin D3, a vitamin D3 derivative, in rats. *J. Toxicol. Sci.* (in press)

5) Chung, F.-L., Nath, R.G., Nagao, M., Nishikawa, A., Zhou, G.-D., Randerath, K.: Endogenous formation and significance of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts. *Mutat. Res.* (in press)

1) Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Lee, I.-S., Wakabayashi, K., Takahashi, M. and Hirose, M.: Inhibition by β -carotene of upper respiratory tumorigenesis in hamsters receiving diethylnitrosamine followed by cigarette smoke exposure. *J. Jpn. Cancer Res.* 90: 154-161, 1999.

7) Kasahara, K., Nishikawa, A., Furukawa, F., Ikezaki, S., Tanakamaru, Z., Takagi, H., Ikeda, T., Imazawa, T., Takahashi, M.: Suppressing effects of josamycin on the development of altered liver cell foci and chronic nephropathy in a carcinogenicity study. *Fd. Chem. Toxic.* 37: 61-67, 1999.

8) Wang, X., Suzuki, T., Itoh, T., Honma, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M., Hayashi, M., Kato, T., Sofuni, T.: Specific mutational spectrum of dimethylnitrosamine in the lacI transgene of Big Blue C57BL/6 mice. *Mutagenesis* 13: 625-630, 1998.

9) Furukawa, F., Nishikawa, A., Imazawa, T., Kasahara, K., Takahashi, M.: Enhancing effects of quinacrine on development of hepatopancreatic lesions in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-treated

hamsters. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 131-136, 1998.

10) Yamazaki, Furukawa, F., Nishikawa, A., Takahashi, M., Oka, S.: Histochemical study on enzyme stereoselectivity for esterase in hamster normal pancreas and pancreatic tubular adenocarcinoma. *Biotech.*

Histochem. 73: 23-31, 1998.

11) Hori, T., Wanibuchi, H., Yano, Y., Otani, S., Nishikawa, A., Osugi, H., Kinoshita, H., Fukushima, S.: Epithelial cell proliferation in the digestive tract induced by space restriction and water-immersion stress. *Cancer Lett.* 125: 141-148, 1998.

12) Mori, H., Nishikawa, A.: Naturally occurring organosulfur compounds as potential anticarcinogens. In: Ioannides, C. ed. *Nutrition and Chemical Toxicology.* John Wiley & Sons, Sussex, 285-299, 1998.

13) Nishikawa, A., Tanakamaru, Z., Furukawa, F., Lee, I.-S., Kasahara, K., Ikezaki, S., Takahashi, M.: Chemopreventive activity of oltipraz against induction of glandular stomach carcinogenesis in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 19: 365-368, 1998.

2. 学会発表

1) Takahashi, M., Furukawa, F., Nishikawa, A., Wakabayashi, K.: Dose-dependent inhibition of β -carotene of upper respiratory tumorigenesis in hamsters receiving diethylnitrosamine followed by cigarette smoke exposure. 4th AACR/JCA Joint Conference "Molecular Biology of Cancer: Implication for Prevention and Therapy", 1998.

- 2) 古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 北浦敬介, 内田浩二, 泉啓介, 高橋道人: 老齡 LEC ラットおよび F344 ラットの脂質過酸化生成物の免疫組織化学的検討. 第14回日本毒性病理学会, 1998.
- 3) 笠原健一郎, 古川文夫, 西川秋佳, 李仁善, 高橋道人: p53 ノックアウトマウスの MNNG 投与による発がん性の検討. 第14回日本毒性病理学会, 1998.
- 4) 今沢孝喜, 三森国敏, 小野寺博志, 竹川潔, 西川秋佳, 池田尚子, 高橋道人: Thiram の長期反復投与ラットに発現した神経毒性変化の超微形態学的解析. 第14回日本毒性病理学会, 1998.
- 5) 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 田中丸善洋, 池崎信一郎, 今沢孝喜, 李仁善, 谷所達幸, 木苗直秀, 高橋道人: ラット二段階胃発癌モデルにおける水道水中の変異原性物質 MX の影響. 第14回日本毒性病理学会, 1998.
- 6) Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T., Takahashi, M.: Detection of in vivo mutagenicity of MeIQx using lacI transgenic mice. 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-substituted Aryl Compounds, 1998.
- 7) Kasahara, K., Furukawa, F., Nishikawa, A., Tanakamaru, Z., Mori, I., Takahashi, M.: Aberrant crypt foci in the rat colon induced by MeIQx: in comparison with spontaneous focal lesions, 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-substituted Aryl Compounds, 1998.
- 1) 木苗直秀, 谷所達幸, 今村希美, 古郡三千代, 下位香代子, 西川秋佳, 高橋道人: 水道水中の強力な変異原性物質 MX の二段階発がん性, 第32回日本水環境学会, 1998.
- 9) 西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄, 高橋道人: 胃発がん修飾因子の探索に関する実験的検討, 第9回消化器癌発生学会, ラウンドテーブルディスカッション, 1998.
- 10) Koide, A., Fuwa, K., Mori, Y., Furukawa, F., Hirose, M., Nishikawa, A.: Effect of cigarette smoke on mutagenic activation of environmental carcinogens by rodent liver, 3rd International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, 1998.
- 11) Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Uchida, K., Takahashi, M.: Involvement of lipid peroxidation in spontaneous pancreatitis on WBN/Kob rats, 8th International Association of Pancreatology, 1998.
- 12) Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Imazawa, T., Takahashi, M.: specific inhibition by PEITC of initiation phase of BOP-pancreatic tumorigenesis in the hamster, 8th International Association of Pancreatology, 1998.
- 13) 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 今沢孝喜, 李仁善, 木苗直秀, 高橋道人, 広瀬雅雄: 変異原性物質 MX によるラット腺胃発癌の促進, 第57回日本癌学会総会, 1998.
- 14) 古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 李仁善, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスターBOP 膵発癌イニシエーションに対する oltipraz の影響, 第57回日本癌学会総会, 1998.
- 15) 今沢孝喜, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 池田尚子, 高橋道人, 広瀬雅雄: クチナシ青色素の F344 ラットにおける癌原性試験, 第57回日本癌学会総会, 1998.
- 16) 池田尚子, 今沢孝喜, 西川秋佳, 笠原健一郎, 木村修一, 広瀬雅雄: 大豆食で起こるラット甲状腺腫瘍の発現機序に関する検討, 第57回日本癌学会総会, 1998.

- 17) 笠原健一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 李仁善, 今沢孝喜, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター-BOP発癌ポストイニシエーションにおける PEITC の影響, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
- 18) 松永研吾, 西川秋佳, 山田泰広, 川端邦裕, 杉江茂幸, 森秀樹: NNK 誘発マウス肺発癌における S-methylmethane thiosulfonate (MMTS), protocatechuic acid, KYN-54 の修飾作用, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
- 19) 堀高明, 市原敏夫, 森村圭一郎, 鰐淵英機, 西川秋佳, 福島昭治: ラット食道発癌におけるエタノール摂取の影響, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
- 20) 李仁善, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 金秀彦: 生薬 *Selaginella tamariscina* の p53 遺伝子発現, G1 停止および胃粘膜上皮細胞増殖に及ぼす影響, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
- 21) 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 高橋道人, 広瀬雅雄: BOP 誘発 DNA 障害に対する PEITC の抑制効果, 第 5 回日本がん予防研究会, 1998.
- 22) 古川文夫, 笠原健一郎, 西川秋佳, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター-BOP 膵発癌イニシエーション期における PEITC の影響, 第 5 回日本がん予防研究会, 1998.
- 23) 古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 千原猛, 新保寛, 別府秀彦, 葛谷博磁, 広瀬雅雄: ハムスター-BOP膵発癌に及ぼすキダチアロエの影響, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
- 24) 笠原健一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 池崎信一郎, 田中丸善洋, 李仁善, 今沢孝喜, 高橋道人, 広瀬雅雄: ジョサマイシンのラットへの 52 週間投与による組織学的変化, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
- 25) 今沢孝喜, 池田尚子, 西川秋佳, 笠原健一郎, 木村修一, 広瀬雅雄: 大豆食で惹起されるラット甲状腺および下垂体の超微形態学的変化, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
- 26) 高木久宜, 三森国敏, 西川秋佳, 小野寺博志, 古川文夫, 安原加壽雄, 笠原健一郎, 広瀬雅雄: p53 ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA マウスにおける N-methyl-N-nitrosourea (MNU) の発癌感受性, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
- 27) 中村英明, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 宮内慎, 高橋道人, 広瀬雅雄: 新生児マウス二段階発癌モデルによる PhIP のリスク評価, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
- 28) 宮内慎, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 中村英明, 高橋道人, 広瀬雅雄: 新生児マウス二段階発癌モデルによる MeIQx のリスク評価, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）

分担研究報告書

タバコ含有物質による健康増進に及ぼす影響に関する研究

主任研究者 佐竹元吉
国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
協力研究員 関田節子
協力研究員 尹 永淑

研究要旨

タバコの健康障害に与える影響に関して、これをめぐるWHOの禁煙運動を始め、多くの健康と喫煙に関する考え方がある。この考え方には科学的研究成果に基づくものと、研究成果が未だ充分でない部分とがある。近年、問題となっている点は主流煙よりは副流煙による非喫煙者の健康障害に及ぼす効果である。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた8検体に対してGC-Mass分析を行った。主成分であるニコチンを始め、メンソール、バニリンなどの香料成分、及び含窒素化合物など167の化合物が検出された。HP-20カラムクロマトグラフィー及び1N塩酸とクロロホルムにて分配し、ジエチルアミンを加えたCHCl₃/MeOH系の溶媒を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ったところ、ニコチンが単離された。これはNMRにて確認した。

1. 研究の目的

我が国はタバコが専売制度であったため、タバコに関する成分やその作用に関する実験データはタバコ専売公社の公社内の情報とされ、その後、民間企業への移行の時にそれらの実験データはそのまま、移行されたか、廃棄され、総ての情報が公表されているわけではない。

タバコの煙害に関して、タバコ自身が持っている成分や、栽培条件下で混入する恐れのある農薬及び環境汚染物質、加工過程での添加する物質に関して、成分面からの分析を行い、現在の市場品の構成成分を明らかにする。これらの成分が喫煙によりどのように変化する

かをあきらかにする。

また、喫煙により、これらの化合物が人体に吸収されどのような作用を示すかを、ハンブルグ型喫煙曝露装置を用いて、主流煙の成分を明らかにし、ラットやハムスターなどの実験動物におけるタバコ煙の生体影響を主として病理学的に検索と同時に行った。

国内産の市販タバコに関しては、フィルターのあるものと無いもので検討をおこなった。今回、市販されている日本産ショートピースを用い、主流煙の成分検討を行った。特に、成分の抽出方法及び成分の分画を行い、山田班で検討したGC-MSの測定条件を用いて、成分の検索を行った。

2. 実験方法

1) 煙の採取

商品名ショートピース及びマイルドセブンという 2 種類の日本製タバコを用い、4 週齢のラット (strain: F344 rat) 10 匹にハンブルーグ 2 タイプ装置を通じて一日 30 本ずつ 2 回に分けて 10 日間暴露させる。その際、ハンブルーグ II タイプ装置に直径 10 cm 厚さ 0.5 mm のフィルターをつけて煙を採取した。

2) 成分分析

(1) 抽出および分離

GC-Mass 分析のため、主流煙を包縮したフィルター 1 枚をエーテルで抽出した後、1N HCl 及び 2N NaOH と CHCl_3 で分配した。また、主流煙を包縮したフィルター

159 枚をメタノールで 2 回室温抽出した後、 CHCl_3 と水で分配し、得られた CHCl_3 エキス (183.3g) を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 系の溶媒を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った結果 8 個の分画を得た。この 8 分画を用い GC-Mass 分析をした。またこれらの分画の中、ドラーゲンドルフ試薬に強い陽性を示した分画をさらに HP-20 カラムクロマトグラフィー及び 1N 塩酸とクロロホルムにて分配し、ジエチルアミンを加えた $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 系の溶媒を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。

(2) GC-Mass

ガスクロマトグラフィー及び MS はそれぞれ Shimazu の GC-17A、GC-MS-QP-5050 型で、また HiCap-CBP20 (Shimazu) のキャピラリーカラム (25m X 0.25mm) を用い分析を行った。カラム温度は初期温度が 50°C で 3 分間保持した後 2°C/min. ずつ 240 °C まで上げ、240°C で 17 分間保持した。インターフェースや気化室の温度は 240 °C に設定した。また、ヘリウムガスをキャリアガスとして 15 ml/min ずつ流した。

3. 結果

(1) GC-Mass

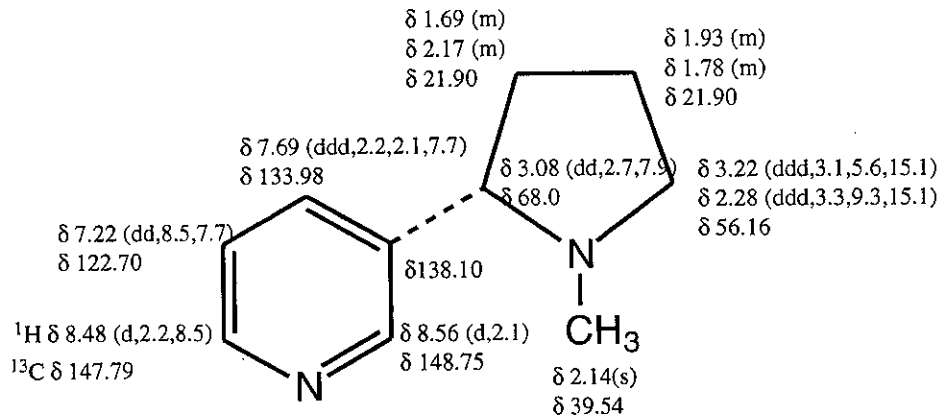
シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた 8 検体に対して GC-Mass 分析を行った結果、代表的な化合物を Table 1 に示した。主成分であるニコチンを始め、メンソール、バニリンなどの香料成分、及び含窒素化合物など 167 の化合物が検出された。

(2) クロマトグラフィー

HP-20 カラムクロマトグラフィー及び 1N 塩酸とクロロホルムにて分配し、ジエチルアミンを加えた $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 系の溶媒を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ったところ、ニコチン (1) が単離された。これは NMR にて確認した。(Fig. 1)

Table 1 Already-known Compounds

No.	compound	No.	compound	No.	compound
1	3-Vinylpyridine	46	Heptadecanoic acid	91	Benzoic acid,4-nitro-
2	2,3-Dimethylcyclopent-2-en-1-one	47	Octadecanoic acid	92	Pentanoic acid, 4-methyl
3	Propanoic acid, 2-hydroxy-,methyl ester	48	Oleic acid	93	4-Pentenoic acid
4	2-Furanmethanol	49	9,12-Octadecanoic acid	94	Heptanoic acid, methyl ester
5	Nicotine	50	Undecane	95	Benzoic acid, 2-methyl-
6	Benzyl alcohol	51	Naphtalene, 1-methyl-	96	Benzoic acid, 3-methyl-
7	Isoquinoline	52	3-Undecane, 9-methyl-	97	Benzenoacetic acid, methyl ester
8	Cotinine	53	4,4'-Dimethylbiphenyl	98	Benzenepropanoic acid, methyl ester
9	3,7-dimethyl-1,6-Octadiene	54	Decanoic acid, methyl ester	99	Ethanone, 1-(3-methylphenyl)-
10	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	55	Undecanoic acid, methyl ester	100	Benzoic acid, 3,5-dimethyl-
11	Quinoline, 5,6,7,8-tetrahydro-3-methyl	56	9-Hexadecenoic acid, methyl ester	101	Cedrol
12	Quinoline, 4-methyl	57	9,3-Pentadecatrien-2-one, 6,10,14-trimethyl-	102	2-Propenoic acid, 3-phenyl-
13	Quinoline, 3-methyl	58	1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl-	103	Anabasine
14	(1'S, 2'S)-Nicotine-N'-Oxide	59	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	104	Dodecane
15	Myosmine	60	Phenol, 4-ethyl-	105	Tetradecane
16	Pyridine,3-phenyl-	61	Dodecanoic acid, 2-methyl-	106	Farnesyl acetone
17	1,1'-Biphenyl-4-amine	62	2-Isopropylpyrazine		
18	1H-Pyrazole, 3-methyl-1-phenyl-	63	Benzenaldehyde, 2-methyl		
19	2,2'-Bipyridine	64	Pyrazine, 2,3-dimethyl-		
20	Phenylethylalcohol	65	Methylamine, N-cyclopentylidene		
21	Benzonitrile, 3-methyl	66	Benzenethanamine		
22	Benzenepropanenitrile	67	Acetic acid		
23	Megastigmatrienone	68	Butanedioic acid		
24	Hexadecanoic acid, methyl ester	69	Butanedioic acid, 2-methyl-		
25	Octadecanoic acid, methyl ester	70	Benzoic acid		
26	Indole	71	Acetic acid, phenyl ester		
27	1-indole, 5-methyl-	72	Propyl alcohol		
28	1-indole, 3-methyl-	73	Crotonic acid		
29	Caryophyllene oxide	74	2-Butenoic acid		
30	Formamidine,N'(m-acetylphenyl)-N,N-dimethyl-	75	Pyrrolidine, 1-methyl-		
31	(-)-Menthol	76	Succinic acid, monomethyl ester		
32	Mequinol	77	Pentanedioic acid, monomethyl ester		
33	Phenol	78	Propanoic acid		
34	Phenol, 2-methyl-	79	Butanedioic acid, 3-methyl-		
35	Phenol, 3-methyl-	80	Pentanoic acid, 3-methyl-		
36	Phenol, 4-methyl-	81	Hexanoic acid		
37	Benzofuran	82	2-Pentenoic acid		
38	2-Hydroxypyridine	83	Glutamine		
39	Octadecanoic acid, ethyl ester	84	Methyl Nicotinate		
40	2-furancarboxyaldehyde, 5-hydroxymethyl	85	Cotinine		
41	Vanillin	86	Benzeneethanol, 2-hydroxy-		
42	3',5'-Dimethoxyacetophenone	87	Pentanoic acid		
43	Tetradecanoic acid	88	Pyrazine, trimethyl-		
44	Hexadecanoic acid	89	Normicotine		
45	Ethanone,1-2,3-dihydroxy-2-(1-methylethenyl-5-benzofuranyl-	90	Benzoic acid, 3-nitro-		



L-Nicotine

Fig 1 . Structure of N-Nicotine

3. 今後の計画

GC-Mass により検出された化合物はまだ推定された化合物であり、今後標準品を用い同定する予定である。これらの化合物の中にはニコチンの誘導体以外にも多くの含窒素化合物があり、これらを中心に実験を行う予定である。今回発癌性の N-nitrosamines 類は検出されなかったものの、カラムや検出方法について検討を行う。また、各画分を分離精製し構造決定を行う予定である。

4 .Refrence

1. D.Hoffmann, I.Hoffmann, The changing cigarette, 1950-1995, J.of Toxicology and Enviromental Health, 50;307-364, 1997.
2. Cigar, U.S. Department of Health and Human Services, NCI, 1997.
3. M.V.Djordjevic, J.Fan, S.Ferguson and D.Hoffmann, Self-reuglation of smoking intensity.Smoke yield of the low-nicotine, low-Tar cigarette, Carcinogenesis, 16(9), 2015-2021, 1995.
4. H.C.Pillsbury, C.C.Bright, K.J.O'connor, and F.W.Irish, Journal of the AOAC, 52(3), 458-462, 1969.
5. P.Jacob III, A.T. Shulgin, L.Yu and N.L.Benowitz, Determiation of the nicotine metabolite trans-3'-hydroxycotinine in urine of smokers using gas chromatograpgy with nitrogen-selective detection or selected ion monitooring, J.of Chromatography, 583, 145-154, 1992.
6. M.V.Djordjevic, C.W.Sigountos, K.D.Brunnemann, and D.Hoffmann, Formation of 4-(Methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butyric andi in Vitro and in Mainstream Cigarette Smoke, J.Agric. Food Chem.,39, 209-213, 1991.
7. M.V.Djordjevic, K.D.Brunmeman and D.Hoffmann, Identification and analysis of a nicotine-derived N-nitrosamino acid and other nitrosamino acid in tobacco, Carcinogenesis, 10(9), 1725-1731, 1989.
8. N.L.Benowitz, P.Jacob III, I.Fong and S.Gupta,

Nicotine Metabolic Profile in Man: Comparison of Cigarette Smoking and Transdermal Nicotine, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 268(1), 296-303, 1994.

9. K.D.Brunnemann, J.E.Cox and D.Hoffmann, Analysis of tobacco-specific N-nitrosamines in indoor air, Carcinogenesis, 13(12), 2415-2418, 1992.

タバコの葉の添加物の分析

分担研究者 山田 隆 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部部長
協力研究者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部研究員
米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長

研究要旨 タバコの煙中の化学成分について 1998 年までに公表された情報をもとに GC/MS による分析方法を検討した。主流煙の分析条件を検討し、煙中の化合物として既に報告されている既知化合物を 106 種類を確認した。さらに、NIST ライブラリ検索を行った結果、タバコ煙中に現在までに報告されていない 165 種類の化合物の存在が推察された。

A. 研究目的

近年、女性の喫煙者の増加や喫煙の初心年齢の低下などタバコに対する消費、または、認識の変化が見られる。長期間にわたって喫煙することが、健康に有害であることは多く報告されているが、喫煙をしない人においても、いわゆる着火端から立ち昇る煙である副流煙による健康被害を懸念している。公衆衛生的には、非喫煙者への配慮として喫煙場所の設置などを考えなければならない。このような背景より、タバコの害に対して社会的に関心が持たれ、特にタバコの煙中の化学成分に対する関心が高まっている。

一方、最近の健康志向を背景に低ニコチン・低タールタバコへと消費が移行している。当然のことながら低ニコチン・低タールであるということ自体はタバコ本来の香りと味が乏しいことであり、タバコらしい香味を付加する目的として多彩な香料を添加することが一般的になり

つつある。¹⁾ 実際、タバコには、主成分であるニコチン以外にも数百種類の香料が添加され、製品によって異なっている。²⁾

タバコの煙中に存在の確認された化学成分の総数は約 2,000 であり、未同定の微量成分を含めると、数万にのぼるものと推定される。³⁾ これは、糖、アミノ酸、セルロース、リグニン等の不揮発性物質の熱分解生成物が煙に移行するためであると考えられる。さらに、最近では、前記したように香料としての添加物が、熱分解あるいは熱反応によって化学構造が変換され、煙中にどのような化合物で存在するのか検討されておらず、ますます複雑さを増していると考えられる。

タバコの煙には、副流煙と主流煙があり、さらに主流煙にはガス相、蒸気相および粒子相で分けられるが、およそ 3,500 種類以上の成分が存在すると言われている。

本研究では、タバコの煙中の化学成分を明らかとするため、ガスクロマトグラム/質量分析計 (GC/MS) を用いた分析方法の開発について検討し、分析条件の設定を行った。さらに、設定した条件において、今回は、主流煙の化学成分について検討を行った。

B. 研究方法

1) 煙の包縮

商品名ショートピースの日本製タバコを用い、4週齢のラット (Strain: F344 Rat) 10匹にハンブルグ II タイプ装置を通じて1日30本ずつ2回に分けて10日間暴露させた。その際、ハンブルグ II タイプ装置に直径10cm厚さ0.5mmのガラス繊維フィルターをつけて主流煙を包縮した。

2) 成分分析

(1) 抽出および分離

主流煙を包縮したガラス繊維フィルター1枚をEt₂Oで抽出した後、1N HCl水溶液及び2N NaOH水溶液とCHCl₃で分配した。また、主流煙を包縮したガラス繊維フィルター159枚をCH₃OHで2回室温抽出した後、CHCl₃とH₂Oで分配した。得られたCHCl₃抽出物(183.3g)をCHCl₃/MeOH系の溶媒を用い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、8個のフラクションを得た。

(2) GC/MS 分析条件

GC/MSには、Shimadzu GCMS-5050A system (島津製作所製ガスクロマトグラフ: GC-17A), インテグレーター及びデータ解析システムとして Class-5000 ソ

フトウェア (島津製作所製) を接続したものをを用いた。各フラクションの分析は、以下の条件で行った。

分析条件 A: 低極性・中極性成分

GC conditions; column: CBP-1 (0.25 mm i.d. x 25 m) (Shimadzu), inj. temp., 250°C, column temp.: 100°C (3 min)→(2°C/min)→240°C (17 min), carrier gas: He 2.0 ml/min, detect. temp.: 250°C

分析条件 B: 高極性成分

GC conditions; column: CBP-20 (0.25 mm i.d. x 25 m) (Shimadzu), inj. temp., 250°C, column temp.: 100°C (3 min)→(2°C/min)→240°C (17 min), carrier gas: He 2.0 ml/min, detect. temp.: 250°C

C. 研究結果及び考察

主流煙を包縮したフィルターをCH₃OHで抽出したものをGC/MSによって分析を行ったところ、多量のニコチンが検出された。その他の成分は、ニコチンの含量に対して非常に微量な多成分の混合物であることが推察された。複雑な微量成分の分析には、相対量として非常に多いニコチンが、分析を阻害した。そこで、抽出物をシリカゲルカラムクロマトに付し、分画を行い、ニコチンを除き、8個の画分を得た。また、低極性成分の分析では、別に主流煙を包縮したフィルター1枚をEt₂Oで抽出し、抽出物を濃縮後、1N HCl及び2N NaOHとCHCl₃で分配しアルカリ性成分及び酸性成分に分画した。

分析条件A及びBを用い、低～高極性成分の分析を行うことにより、構成成分を推定した。得られたGC/MSクロマトグラムは、良好な分離を示したが、非常

に多数のピークが検出された。各ピークについて、NIST パブリックライブラリ (NIST62, NIST12)を用い、類似度約 80 以上を検索した。また、それぞれのマスフラグメントスペクトルより構造を推定した。検出された化合物の内、既にタバコ煙中にその存在が報告されている化合物を Table 1^{4,5,6,7)}に、Table 2 に現時点までに報告されていない化学成分を示した。

主成分であるニコチンを始め、メンソール、バニリンなどの香料成分、及び含窒素化合物など、多くの化合物が検出された。ニコチンの誘導体以外にも多くの含窒素化合物も検出されたが、タバコ煙中の発癌性物質とされる N-nitrosamine 類は検出されなかった。また、フェノール類、カルボン酸類及びそのエステルなどが検出された。低極性成分としては、炭化水素類が検出された。

D. 結論

GC/MS により、タバコ煙中に既に報告されている化学成分として 106 種類、また、現時点までに報告されていない化学成分として、165 種類の化合物を検出した。しかしながら、検出された化合物は、すべて NIST パブリックライブラリを用いた推定、もしくはマスフラグメントパターンより推定された化合物であり、確実な同定までは至っていない。煙中の

化合物の確実な同定には、標準品との保持時間の比較及びそれぞれのマスフラグメントパターンの比較を行わなければならないと考えられる。また、得られた GC/MS クロマトグラムは非常に複雑な混合物であることを示し、今回検出した化合物以外にも多数の超微量化学成分の存在が示唆された。従って、微量成分を示す各ピークの同定には、抽出方法、検出方法及び分析条件をさらに検討する必要がある。同時に、各成分の単離・生成を行い、核磁気共鳴スペクトル(NMR)等を用い、構造決定を行わなければならない。今後、以上の点について検討を行う予定である。

E. 参考文献

- 1)金子肇, 香料, **128**, 23 (1980).
- 2)TR Staff Report, 1994, pp.32.
- 3)R. L. Stedman, *Chem. Rev.*, **68**, 153 (1968).
- 4)I. Schmeltz, D. Hoffmann, *Chem. Rev.*, **77**, 295 (1977).
- 5)H. Sakuma, M. Kusama, T. Obsumi, S. Sugawara, *Beitrage zur Tabakoforschung International*, **12(2)**, 63 (1983).
- 6)H. Sakuma, M. Kusama, K. Yamaguchi, T. Matsuki, S. Sugawara, *Beitrage zur Tabakoforschung International*, **12(4)**, 199 (1984).
- 7)H. Sakuma, M. Kusama, K. Yamaguchi, S. Sugawara, *Beitrage zur Tabakoforschung International*, **12(5)**, 251 (1984).

Table 1 Already-known Compounds

No.	compound	No.	compound	No.	compound
1	3-Vinylpyridine	46	Heptadecanoic acid	91	Benzoic acid,4-nitro-
2	2,3-Dimethylcyclopent-2-en-1one	47	Octadecanoic acid	92	Pentanoic acid, 4-methyl
3	Propanic acid, 2-hydroxy-,methyl ester	48	Oleic acid	93	4-Pentenoic acid
4	2-Furanmethanol	49	9,12-Octadecanoic acid	94	Heptanoic acid, methyl ester
5	Nicotine	50	Undecane	95	Benzoic acid, 2-methyl-
6	Benzyl alcohol	51	Naphtalene, 1-methyl-	96	Benzoic acid, 3-methyl-
7	Isoquinoline	52	3-Undecane, 9-methyl-	97	Benzeneacetic acid, methyl ester
8	Cotinine	53	4,4'-Dimethylbiphenyl	98	Benzenepropanic acid, methyl ester
9	3,7-dimethyl-1,6-Octadiene	54	Decanoic acid, methyl ester	99	Ethanone, 1-(3-methylphenyl)-
10	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	55	Undecanoic acid, methyl ester	100	Benzoic acid, 3,5-dimethyl-
11	Quinoline, 5,6,7,8-tetrahydro-3-methyl	56	9-Hexadecenoic acid, methyl ester	101	Cedrol
12	Quinoline, 4-methyl	57	9,3-Pentadecatrien-2-one, 6,10,14-trimethyl-	102	2-Propenoic acid, 3-phenyl-
13	Quinoline, 3-methyl	58	1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl-	103	Anabasine
14	(1'S, 2'S)-Nicotine-N'-Oxide	59	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	104	Dodecane
15	Myosmine	60	Phenol, 4-ethyl-	105	Tetradecane
16	Pyridine,3-phenyl-	61	Dodecanoic acid, 2-methyl-	106	Farnesyl acetone
17	1,1'-Biphenyl-4-amine	62	2-Isopropylpyrazine		
18	1H-Pyrazole, 3-methyl-1-phenyl-	63	Benzenaldehyde, 2-methyl		
19	2,2'-Bipyridine	64	Pyrazine, 2,3-dimethyl-		
20	Phenylethylalcohol	65	Methylamine, N-cyclopentylidene		
21	Benzonitrile, 3-methyl	66	Benzenethanamine		
22	Benzenepropanenitrile	67	Acetic acid		
23	Megastigmatrienone	68	Butanedioic acid		
24	Hexadecanoic acid, methyl ester	69	Butanedioic acid, 2-methyl-		
25	Octadecanoic acid, methyl ester	70	Benzoic acid		
26	Indole	71	Acetic acid, phenyl ester		
27	1-indole, 5-methyl-	72	Propyl alcohol		
28	1-indole, 3-methyl-	73	Crotonic acid		
29	Caryophyllene oxide	74	2-Butenoic acid		
30	Formamidine,N'-(m-acetylphenyl)-N,N-dimethyl-	75	Pyrrolidine, 1-methyl-		
31	(-)-Menthol	76	Succinic acid, monomethyl ester		
32	Mequinol	77	Pentanedioic acid, monomethyl ester		
33	Phenol	78	Propanic acid		
34	Phenol, 2-methyl-	79	Butanedioic acid, 3-methyl-		
35	Phenol, 3-methyl-	80	Pentanoic acid, 3-methyl-		
36	Phenol, 4-methyl-	81	Hexanoic acid		
37	Benzofuran	82	2-Pentenoic acid		
38	2-Hydroxypyridine	83	Glutamine		
39	Octadecanoic acid, ethyl ester	84	Methyl Nicotinate		
40	2-furancarboxyaldehyde, 5-hydroxymethyl	85	Cotinine		
41	Vanillin	86	Benzeneethanol, 2-hydroxy-		
42	3',5'-Dimethoxyacetophenone	87	Pentanoic acid		
43	Tetradecanoic acid	88	Pyrazine, trimethyl-		
44	Hexadecanoic acid	89	Nornicotine		
45	Ethanone,1-2,3-dihydroxy-2-(1-methylethenyl-5-benzofuranyl)-	90	Benzoic acid, 3-nitro-		