

200823002A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

たばこ規制枠組条約に基づく
有害化学物質等の新しい国際標準化試験法に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 遠藤 治

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- たばこ規制枠組条約に基づく有害化学物質等の新しい国際標準化試験法に関する研究
研究代表者 遠藤 治 1

II. 分担研究報告

1. アジア太平洋たばこ研究

- 日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価—
分担研究者 鈴木 元 12

2. アジア太平洋たばこ研究

- 日本人喫煙者の酸化ストレスマーカーの予備的検討—
分担研究者 稲葉洋平 25

3. TobLabNet ラウンドロビン研究

- HCI 法によるタール、ニコチン、一酸化炭素の測定バリデーション—
分担研究者 緒方裕光・後藤純雄 32

4. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ主流煙 DMSO 抽出物の変異原性

- 分担研究者 遠藤 治 47

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 64

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

たばこ規制枠組条約に基づく有害化学物質等の新しい国際標準化試験法に関する研究

研究代表者 遠藤 治 麻布大学 生命・環境科学部 准教授

研究要旨

本研究の目的は、WHOたばこ規制枠組条約第9条に基づいて進められているたばこ製品の含有物及び排出物の新しい国際標準化試験法に関する研究室ネットワーク (TobLabNet) を通じて、国内外の情報を得るとともに、国際貢献の一助となることである。本研究課題3年目にあたる平成20年度は、「アジア太平洋たばこ研究」と「TobLabNet ラウンドロビン研究」を中心に新しい国際標準化試験法に関する研究を行った。「アジア太平洋たばこ研究」は世界のたばこ消費の70%を占めるアジア地域における喫煙行動と曝露バイオマーカーを調査している。今年度は、CRESSmicro装置により測定した喫煙パターンの解析、唾液中コチニン、尿中の酸化ストレスマーカー測定を行なった。その結果、喫煙者が1日に吸い込むたばこ煙量（総吸煙量）は、パッケージ上の表示でニコチン量が低いたばこほど多い傾向が見られた。次に唾液中コチニンを測定したところパッケージニコチン表示量に依存して増加した。唾液中ニコチン量を重回帰分析した結果、総吸煙量、パッケージニコチン表示量と関連性が認められた。しかし、自覚的なたばこの吸い方の強度、たばこ依存性には関連性が認められなかった。一方、喫煙の影響マーカーとして尿中の酸化ストレスマーカー（8-OHdG）の測定を行なったところ、総吸煙量との間に強い関連性がみられた。しかし、曝露バイオマーカーである唾液中コチニン、呼気中CO濃度との関連性はみられなかった。「ラウンドロビン研究」は、5種類のたばこ試料についてカナダ保健省のインテンス（HCI）法によるタール、ニコチン、及び一酸化炭素の測定法バリデーションを目的とする、二段階構成のラウンドロビンが実施された。第一段階として、1種類の標準たばこ（3R4F）を用いたバリデーション能力の評価が実施され、国立保健医療科学院は参加基準をクリアし、第二段階のバリデーションに参加した。第二段階として、さらに4種類のたばこ試料（標準たばこ1R5F、同CM6、英国銘柄マルボロゴールド、及び米国銘柄マルボロレッド）が配布され測定法のバリデーションが行われた。また昨年度に続き、喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ主流煙 DMSO 抽出物の変異原性を調査した。本研究によって、曝露バイオマーカーの有効性や、たばこ製品含有物のパッケージ表示と曝露実態の関連性などを明らかにし、たばこ対策に有用なエビデンスが得られたと考えている。

分担研究者	所属施設名	職名	A. 研究目的
遠藤 治	麻布大学	准教授	本研究の主目的は、たばこ規制枠組条約第9条「たばこ製品の含有物に関する規制」に基づいて進められているたばこ製品の含有物及び排出物の新しい国際標準化試験法に関する研究室ネットワーク TobLabNet に参加し、この問題に対する国外の情報を得るとともに、日本のたばこ製品に関するデータを発信することにより国際貢献の一助となることである。
後藤純雄	麻布大学	教授	
稲葉洋平	国立保健医療科学院 生活環境部	主任研究官	
鈴木 元	国立保健医療科学院 生活環境部	部長	
緒方裕光	国立保健医療科学院 研究情報センター	センター長	

B. 研究方法

1. アジア太平洋たばこ研究

—日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価—

アジア太平洋たばこ研究プロトコルに従って行なった。新聞、ポスター告知等によりボランティアの募集を行い、動員電話調査により国産上位 10 銘柄の喫煙者で、20 歳以上 65 歳未満、最低 1 日 7 本以上の喫煙をするものを対象者とした。最終的に 101 名の喫煙者が参加した。被験者 101 名のうち、喫煙行動パターンの計測は 100 名、唾液中コチニン量の測定は 94 名から測定値が得られた。機械喫煙によるタール、ニコチン及び一酸化炭素 (TNCO) の測定は、ISO 対応型リニア式喫煙装置である Borgwaldt LM1 喫煙装置 (ドイツ Borgwaldt KC 社製) を用い、ISO 及び HCI 条件に準じて実施した。ニコチン分析は GC/MS、水分分析は GC/TCD、CO 分析は非分散型赤外線吸収装置を用いた。統計解析は、統計解析ソフト SPSS 16.0J を用いて行った。本研究は、ボランティアの喫煙者を募り、書面での同意書を得て実行する研究室ベースの疫学研究である。研究は、公的な競争的研究資金によって行われ、主任研究者の在籍するウオータールー大学で倫理委員会の承認を得ている。日本国内で実施する部分に関して、国立保健医療科学院の倫理委員会において審査が行なわれ承認を得た。

2. アジア太平洋たばこ研究

—日本人喫煙者の酸化ストレスマーカーの予備的検討—

アジア太平洋たばこ研究プロトコルに従って行なった。新聞、ポスター告知等によりボランティアの募集を行い、動員電話調査により国産上位 10 銘柄の喫煙者で、20 歳以上 65 歳未満、最低 1 日 7 本以上の喫煙をするものを対象者とした。最終的に 101 名の喫煙者が参加した。被験者 101 名のうち、喫煙行動パターンの計測は 100 名、唾液中コチニン量の測定は 94 名、尿試料は 98 名から測定値が得られた。唾液中コチニン量はマイクロプレート EIA キット (COZART, UK) を用いて測定した。尿中クレアチニンは和光純薬製クレアチ

ニン—テストワコー (Jaffe 法) を用いて測定した。尿中 8-OHdG は、タニタ製前処理キット (US-001) により前処理し、高速液体クロマトグラフィー—電気化学検出器を用いて定量を行った。統計解析は、統計解析ソフト SPSS 16.0J を用いて行った。本研究は、ボランティアの喫煙者を募り、書面での同意書を得て実行する研究室ベースの疫学研究である。研究は、公的な競争的研究資金によって行われ、主任研究者の在籍するウオータールー大学で倫理委員会の承認を得ている。日本国内で実施する部分に関して、国立保健医療科学院の倫理委員会において審査が行なわれ承認を得た。

3. TobLabNet ラウンドロビン研究

—HCI 法による TNCO の測定バリデーション—

5 種類のたばこ試料 (標準たばこ 3R4F、同 1R5F、同 CM6、英国銘柄マルボロゴールド、及び米国銘柄マルボロレッド) を測定対象とした。これらはいずれも TobLabNet 事務局が一括購入し、サンプルを無作為に抽出・混合した後、ラウンドロビン参加機関に発送された。HCI 法による TNCO の測定は同時に配布された標準操作手順書に準じて行われた。国立保健医療科学院では、ISO 対応型リニア式喫煙装置である Borgwaldt LM1 喫煙装置 (ドイツ Borgwaldt KC 社製) を用い機械喫煙が行われた。ニコチン分析は GC/MS、水分分析は GC/TCD、CO 分析は非分散型赤外線吸収装置を用いた。TobLabNet へのデータ報告には Microsoft Excel が使用された。

4. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ主流煙 DMSO 抽出物の変異原性

たばこ試料として国産主要 10 銘柄を試験に供した。TobLabNet プロトコルに従い、同一銘柄 3 ロットのニコチン量、タール量を測定するため、各銘柄とも少なくとも東京地区 3 箇所で購入した。たばこ煙の捕集には、ISO 対応型の Borgwaldt LM1 喫煙装置 (ドイツ Borgwaldt KC 社製) を用いた。総粒子状物質 (TPM₁₀、別名粗タール) は専用のガラス繊維ろ紙 (Cambridge filter pad、直径 44mm) に捕集した。ISO 条件による捕集は

ISO 4387 (2000)に準じた。HCI 条件による捕集はカナダ保健省 T-115 に準じた。TPM 秤量後、DMSO を用いて室温で 20 分間静かに振盪抽出を行った。変異原性試験は、サルモネラ TA100、TA98 及び YG1024 の 3 種類を用い、S9 mix による代謝活性化を行った場合と行わなかった場合の両条件下でブレインキューベーション法により実施した。

C. 研究結果

本年度の研究結果は以下の通りである。

1. アジア太平洋たばこ研究

—日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価—

国産たばこ主要 10 銘柄について、ISO 法と HCI 法による機械喫煙で TNCO 濃度を測定した結果、タール及びニコチン量は ISO 法ではパッケージ表示量とほぼ同じ値が得られたが、HCI 法では、パッケージ表示量よりも高い値となった。一方、CO 濃度は、ISO 法により測定したところ、主流煙中の CO 濃度パッケージ表示ニコチン量に比例して高くなる傾向であった。しかし、HCI 法では、たばこパッケージ表示ニコチン量・タール量に依存することなく平均 33.6 ± 1.3 (mg/cig.) の値を示した。これらの単回帰分析により、ニコチンとタールは両機械喫煙法において正の相関を示し、喫煙者はたばこから必要量のニコチンを取り込むことにより、それと比例した量のタールを取り込むことが考えられる。

また、たばこパッケージ表示ニコチン量と唾液中コチニン量は正の相関、表示ニコチン量と総吸煙量は逆相関を示し、呼気中 CO 濃度は表示ニコチン量に無関係であった。

次に唾液中のコチニン量あるいは呼気中の CO 濃度と相関する因子を多変量回帰分析で検討したところ、唾液中コチニン量は、総吸煙量及びパッケージ表示ニコチン量と正の相関を示し、起床後に最初の 1 本を吸うまでの時間とは有意な負の相関を示した。他方、呼気中 CO 濃度は、総吸煙量及び自覚的なたばこの吸い方の強度と正の相関を示し、起床後に最初の 1 本を吸うまでの時間とは負の相関を示した。

2. アジア太平洋たばこ研究

—日本人喫煙者の酸化ストレスマーカーの予備的検討—

アジア太平洋たばこ研究において得られた 98 名の尿試料について 8-OHdG の測定を行ったところ、平均値が 5.14 ± 2.56 ng/mg Creatinine であった。

尿中 8-OHdG 濃度は、1 日あたりの喫煙本数と正の相関、1 日の総吸煙量と高い相関を示し、年齢、BMI、パッケージのニコチン表示量、たばこの吸い方の強度、唾液中コチニン量および呼気中 CO 濃度とは関連性が認められなかった。

尿中 8-OHdG 濃度および喫煙パターンとバイオマーカーの相関関係を多変量回帰分析で検討したところ、喫煙者全体では、尿中 8-OHdG 濃度が総吸煙量と正の相関を示した。喫煙の曝露マーカーである唾液中コチニン濃度、呼気中 CO 濃度との関連性は認められなかった。また低ニコチン喫煙者グループでは、尿中 8-OHdG 濃度と総吸煙量の相関関係は正の相関が認められたが、高ニコチン喫煙者グループでは、はっきりとした関連性は認められなかった。

3. TobLabNet ラウンドロビン研究

—HCI 法による TNCO の測定バリデーション—

国立保健医療科学院で行なわれたラウンドロビン測定結果 (平均±標準偏差) から、標準たばこ 3R4F の CO 濃度は 38.02 ± 1.61 mg/本、ニコチン量は 1.85 ± 0.09 mg/本、タール量は 22.36 ± 0.81 mg/本であった。同様に、標準たばこ 1R5F の CO 濃度は 29.57 ± 1.12 mg/本、ニコチン量は 1.03 ± 0.07 mg/本、タール量は 14.73 ± 0.59 mg/本、標準たばこ CM6 の CO 濃度は 35.26 ± 0.92 mg/本、ニコチン量は 2.74 ± 0.09 mg/本、タール量は 27.05 ± 0.59 mg/本であった。また英国製マルボロゴールドの CO 濃度は 31.71 ± 1.05 mg/本、ニコチン量は 1.61 ± 0.06 mg/本、タール量は 20.49 ± 0.69 mg/本、米国製マルボロレッドの CO 濃度は 35.87 ± 1.52 mg/本、ニコチン量は 2.39 ± 0.08 mg/本、タール量は 29.94 ± 1.22 mg/本であった。TNCO 測定値の相対標準偏差 (RSD 変動係数%) はいずれのたばこ試料も水分含量を除いてほぼ 5%以内とな

り、変動の少ない良好な測定結果が得られた。また水分含量測定値の RSD もすべて 10%以内となっており、従来の測定結果と比較して良好な測定結果であることが判った。

4. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ主流煙 DMSO 抽出物の変異原性

TA98 及び YG1024 の 2 菌株 (S9 mix 添加条件下) を用いて、4 種類の溶媒 (DMSO、2-プロパノール、メタノール及び DCM) 抽出物の変異原性を比較したところ、ほぼ同様の用量-反応関係が認められ、立ち上がりの直線的な部分から算出した変異原比活性は、いずれも DMSO が他の溶媒に比べて若干高い値を示した。

たばこ試料の DMSO 抽出物の変異原性は、昨年度の 2-プロパノール抽出物と同様、主に TA98 及び YG1024 に対して、S9mix 添加条件下で認められた。これら条件下では、銘柄、捕集条件、製品ロットにかかわらず、試験に供した 60 試料すべて明瞭な変異原性陽性であった。60 試料中最も高い活性を示したものは銘柄 E/製品ロット II/HCI 条件の試料であった。

D. 考察

アジア太平洋たばこ研究より、日本人は低ニコチンたばこ喫煙者ほど compensation smoking をしていることが判った。特に、喫煙している銘柄をもとに喫煙者を Ultra-low/Low 喫煙者と Medium/High 喫煙者に分けて、総吸煙量と唾液中コチニン量の関係を取ると、Ultra-low/Low 喫煙者の方が Medium/High 喫煙者よりも、コチニン量あたりの総吸煙量が 2.7 倍多いことが判った。海外での報告と比較すると、日本人で特に Ultra-low/Low 喫煙者は平均総吸煙量が 1.7 倍 compensation smoking を行っていることがわかる。唾液中コチニン量は、Ultra-low/Low 喫煙者の方が、Medium/High 喫煙者よりも有意に低い値を示し、尿中のコチニン量や血液中的コチニン量を測定した他の研究と同様の傾向を示した。HCI 法による主流煙中の単位ニコチン量当たりのタール量から類推すると、特に低ニコチンたばこの喫煙者は、パッケージ表示ニコチン・タール量以上の

化学物質の体内への曝露が存在することが示唆された。一方、呼気中 CO 濃度は、たばこパッケージ表示ニコチン量・タール量に依存することなく平均 22.4 ± 10.0 (ppm) の値を示し、多変量解析では、銘柄にかかわらず、総吸煙量と自覚的なたばこの吸い方の強度に関係したことから、低ニコチンたばこ喫煙者はより肺まで深く、多く吸煙することにより、高ニコチンたばこ喫煙者の呼気中 CO 濃度と差異がなかったことが考えられた。また、重回帰分析からも、呼気中 CO 濃度及び唾液中コチニン量は総吸煙量と正の相関があり、喫煙行動パターンが有害化学物質の体内への取り込みに大きく影響することが示唆された。以上の結果は、日本人と欧米人の喫煙行動に大きな差はなく、むしろ、日本人の方が compensation smoking を励行しているようである。

本研究で測定を行った酸化ストレスマーカー 8-OHdG は、生体内の活性酸素種によって DNA より生成され尿中に排泄される安定な化合物である。そのため、喫煙による生体への影響を定量的に測定することに適した化合物であるとも云える。特に通気孔の開いたフィルターを使用する等の独特な国産たばこの喫煙環境への適用は有意義だと考えられる。そこで、喫煙時の各種行動 (喫煙パターン) や同時測定可能な各バイオマーカーとの関連性を解析することは、国産たばこの喫煙影響を推察するのに大いに有用であるものと考えられる。そこで、日本人喫煙者における 8-OHdG 濃度と各種要因との単回帰分析を行った結果、関係性が認められた因子は喫煙本数と総吸煙量の 2 つであった。とくに総吸煙量は、高い相関が認められた。また、パッケージに表示されたニコチン量との関係性は認められないことから、低ニコチンたばこおよび高ニコチンたばこによる 8-OHdG 濃度への影響は示唆されなかった。このことから、低タールたばこが必ずしも害の少ないたばこではないと考えられる。上記以外の他の因子についても特に高い関連性が認められないことから、喫煙本数と総吸煙量に着目して解析することが重要であると考えられる。これを受けて、さらに多変量解析結果を行った結果、唾液中コチニン濃度、呼気中 CO 濃度共に 8-OHdG 濃度と関連性は認めら

ず、また、喫煙による 8-OHdG の生成は、ニコチン、CO の曝露に依存しない化合物の関与の可能性が示唆された。加えて今回の結果をより詳しく解析すると、8-OHdG 濃度は低ニコチンたばこ喫煙者の総喫煙量との関連性が強く示唆される結果となった。しかしながら、低ニコチンたばこ喫煙者と高ニコチンたばこ喫煙者の平均尿中 8-OHdG 濃度は、それぞれ 5.0 と 5.2 ng/mg Creatinine であり有意差は認められなかった。このことは、低ニコチンたばこ定義づけをした 0.6 mg/cig. 以下のたばこの喫煙とその喫煙パターンが 8-OHdG を生成させる化合物を含む喫煙に大きく関与することが示唆された。一方、高ニコチンたばこ喫煙者では、特に 8-OHdG の生成に関連する喫煙パターンやバイオマーカーの有無や強い傾向は確認されなかった。

平成 18 年度の本研究で報告したように、TobLabNet 第 1 回ラウンドロビン測定結果から、主流煙中の TNCO は、いずれも ISO 法より HCl 法で高い濃度であり、測定精度の指標となる RSD も、ISO より HCl 法が優れていることが明らかとなっている。今回の第 2 回ラウンドロビンは、HCl 法による測定手法のバリデーションを目的としており、二段階で構成されるラウンドロビンが実施された。

第一段階として、参加を表明した機関に標準たばこ 3R4F が配布され、バリデーション能力の試験が行われた。国立保健医療科学院は無事参加基準をクリアし、第二段階のバリデーションに参加することとなった。第二段階では、さらに 4 種類のたばこ試料（標準たばこ 1R5F、同 CM6、英国銘柄マルポロゴールド、及び米国銘柄マルポロレッド）が配布され測定法のバリデーションが行われた。

国立保健医療科学院で行なわれた測定結果は、CO が若干高めとなっているが、ニコチン及びタールは大部分が全体平均の 1 標準偏差 (σ) 以内 (1R5F のタール及びマルポロレッドのニコチンのみ 2σ 以内) の範囲に含まれており、新しい国際標準化試験法によるバリデーション結果として、ほぼ平均的な結果が得られたものと考えられる。CO については 1R5F のみ 2σ の範囲内であった

が、いずれの試料も全体平均より高い値を示していた。

今回バリデーションに使用された 5 種類のたばこ試料のうち、3 種類 (3R4F、1R5F、及び CM6) は研究用の標準たばこである。3R4F 及び 1R5F は、米国ケンタッキー大学農学部にあるたばこ研究開発センターから「標準紙巻たばこ計画」の一環として、提供されている。一方 CM6 は、たばこ業界が中心となって設立された CORESTA が公認するモニター用の標準たばこである。これらについては、いずれも ISO/FTC 法による分析結果が公表されている。公表値から、ISO/FTC 法によるニコチン及びタール量は、1R5F < マルポロゴールド < 3R4F < マルポロレッド < CM6 の順であった。これらの数値を TobLabNet 研究活動の一環として行っている国産主要銘柄のタール及びニコチン量測定結果と比較すると、1R5F はマイルドセブンワン、マルポロゴールドはキャビンマイルド、3R4F はマイルドセブンライトないしマイルドセブンオリジナル、マルポロレッドはマイルドセブンオリジナル、CM6 はセブンスターにほぼ相当することが判った。

今回ラウンドロビンに使用した 5 銘柄について HCl 法による実測結果とそれぞれの銘柄について公表されている ISO/FTC 法による分析結果の比率を算出し、またこれら 5 銘柄に相当する上記国産銘柄について、昨年度実施した実測結果から HCl/ISO 比を算出したところ、HCl/ISO 比は ISO 法によるニコチン及びタール量の低い銘柄ほど大きくなることや、その比率は相当する国産銘柄のそれとほぼ同様の数値、傾向を示すことが判った。これらの結果から、今回のバリデーション結果は概ね妥当なものであると考えられることが強く示唆された。また、3 種類の研究用標準たばこも、市販銘柄とほぼ比較可能な数値で分析可能であることも明らかとなった。近年、共通の標準化試料を用いることにより、測定法や測定データの精度保証/精度管理 (QA/QC) を実施することが重要視されている。特に、たばこ試料やたばこ煙のように多種多様な化学物質から構成される試料については、このような QA/QC がより一層重要なものとなると考えられる。

昨年度の本研究報告において、タール量を求めるために必要な水分及びニコチン量を定量する場合、ISO 及び HCl 両法で採用されている 2-プロパノールを用いて抽出した国産たばこ主流煙の変異原性を調べ、主に TA98 及び YG1024 株 S9mix 添加条件下で認められ、いずれも HCl 条件で得られた試料の方が ISO 条件よりも数倍高い活性が得られることや、HCl 条件で捕集された低タールたばこの変異原性は、ISO 条件で捕集されたタール量の多い親銘柄の変異原性よりも高く、“低タール”と表示されているたばこであってもヒトへの曝露量やリスクの低減には必ずしも結びつかないと示唆されることなどを報告した。

DMSO 抽出物の変異原性も、全体的な傾向として、いずれも HCl 条件で得られた試料の方が ISO 条件よりも数倍高い活性が得られることや、HCl 条件で捕集された低タールたばこの変異原性は、ISO 条件で捕集されたタール量の多い親銘柄の変異原性よりも高く、“低タール”と表示されているたばこであってもヒトへの曝露量やリスクの低減には必ずしも結びつかないと示唆されることなど、昨年度の 2-プロパノール抽出物とほぼ同様のパターンを示すことが判った。

今回測定した 10 銘柄、3 ロット、2 喫煙条件、すなわち被験全 60 試料のタール量実測値と変異原比活性を比較すると、タール量の低い領域（主に ISO 条件）では変異原性もタール量にほぼ比例しているのに対し、タール量の高い領域（主に HCl 条件）では明瞭な比例関係が認められなくなることが判った。“低タール”と表示されているライトタイプ銘柄の方がレギュラータイプ銘柄より変異原比活性が高くなることもあり、喫煙条件別にみると、タール量の高いものの方がむしろ変異原比活性は低くなっていることも判った。

銘柄・喫煙条件別に、タール量と変異原比活性のロット間のばらつき (RSD) を比較すると、タール量の RSD は、銘柄・喫煙条件にかかわらず、ほぼ 10%以内となっており、さほど大きなロット間のばらつきは見られなかった。これに対し、変異原比活性は、ロット間で若干大きなばらつきが認められた。TA98 株 S9mix 添加条件下の変異原比活性の RSD から、喫煙条件による差異が見ら

れた。HCl 条件では銘柄間の差異もなく、いずれの銘柄も RSD は 20%以内であった。一方 ISO 条件では、一銘柄を除いて、いずれの銘柄も HCl 条件より大きな RSD が認められ、低タール銘柄ほどその差が大きくなる傾向が認められた。YG1024 株 S9mix 添加条件下の変異原比活性の RSD から、喫煙条件による差異は認められなかったものの、銘柄による差異が若干認められた。すなわち、パッケージ表示タール量が 8mg 以上の銘柄ではいずれの銘柄も RSD は 20%以内であったが、それより低いタール量を謳っている銘柄で比較的大きな RSD を示す場合があった。

今回の変異原性試験の変動を観察するために別途調製した共通たばこ抽出試料の変異原性試験 (YG1024 株 S9mix 添加条件下) 結果から、実験日を変えて行った 4 回にわたる試験結果の RSD は 15%であった。また同じ共通たばこ試料を複数個用いて同一実験日に変異原性試験を行ったところ、試験誤差は YG1024 株 S9mix 添加条件下で 8.6% (n=6)、TA98 株 S9mix 添加条件下で 5.4% (n=6) であったことから、前述の 20%以上の RSD を示したたばこ銘柄では、ロット間の差も反映されている可能性が高いと考えられる。

また、銘柄、捕集条件、製品ロットにかかわらず、試験に供したすべての試料で明瞭な変異原性が認められた TA98 及び YG1024、S9mix 添加条件下以外の試験条件でも、3 ロット間で異なる結果が得られる場合も見られた。これらは明瞭な変異原性が認められる TA98 及び YG1024、S9mix 添加条件下における結果と比較して、陽性例の変異原比活性はかなり低い (1/10 以下のものが多く、中には比活性が二桁低いものもある) ため、たばこ銘柄の総体的な毒性評価を行う上ではさほど大きな障害にはならないと考えられるが、ロット差や試験精度などを考慮する上で今後の課題になると考えられる。

E. 結論

国産銘柄たばこの TNCO を機械喫煙にて ISO 及び HCl 条件により測定し、初めてそのデータを開示した。本研究で対象とした日本人喫煙者の平均吸煙量は 54.3 mL であり、ISO 法よりも HCl

法に近似した喫煙法であることが判った。特に、Ultra-low/Low 喫煙者の平均吸煙量は 58.4 mL であり、より HCI 法に近い喫煙法であることが明らかとなった。このことより、Ultra-low/Low 喫煙者が必要摂取量のニコチンを取り込もうとすると、HCI 法におけるニコチンあたりのタール量及び CO 濃度から、ISO/FTC 法にて測定されたたばこパッケージ表示量よりも、より多くの化学物質に曝露されていることが推察された。また、Ultra-low、Low、Medium、High 喫煙者の唾液中コチニン量及び呼気中 CO 濃度の比較結果からも、Ultra-low/Low 喫煙者は Medium/High 喫煙者と同程度の化学物質を取り込んでいることが示唆された。これらのことより、日本における Ultra-low/Low の銘柄は、たばこ会社が宣伝するように、必ずしもより害の少ないたばこであるとは言えないことが明らかとなった。

また、日本人喫煙者 98 名の尿中 8-OHdG の測定を行った。これまでに本研究班が、この日本人喫煙者において行った質問、測定結果を利用して尿中 8-OHdG との関連性について解析を行った。尿中 8-OHdG 濃度は、パッケージに表示されたニコチン量との関連性が認められないことから、酸化ストレスによる生体への影響は、低ニコチンたばこ喫煙者と高ニコチンたばこ喫煙者でよりリスクが同程度であった。また尿中 8-OHdG 濃度は、総吸煙量と相関関係が認められ、特に 0.6 mg/cig. 以下のニコチン表示たばこの喫煙者において強い相関が認められた。同時に、唾液中コチニン濃度と呼気中 CO 濃度との重回帰分析を行ったが、関連性は認められなかった。これまで評価の指標となってきたコチニン、CO といったバイオマーカーとは異なる化学物質によって尿中 8-OHdG は生成されることが示唆された。8-OHdG は、生体内中に発生する活性酸素種が DNA に作用して生成されるため、今後は活性酸素種を発生させる原因化合物に着目していく必要がある。さらに非喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度測定および比較をすることで喫煙と酸化ストレスとの関係性が解明されると考えている。

TobLabNet ラウンドロビン研究の第 2 回目として 5 種類のたばこ試料(標準たばこ 3R4F、同 1R5F、

同 CM6、英国銘柄マルボロゴールド、及び米国銘柄マルボロレッド)についてカナダ保健省が推奨する HCI 法による測定手法のバリデーションを目的とする、二段階構成のラウンドロビンが実施された。第一段階として、1 種類の標準たばこ(3R4F)を用いたバリデーション能力の評価が実施され、国立保健医療科学院は参加基準をクリアし、第二段階のバリデーションに参加した。第二段階として、さらに 4 種類のたばこ試料が配布され測定法のバリデーションが行われた。全体のバリデーション結果については現在 WHO で解析中であるが、国立保健医療科学院の測定結果から、今回のバリデーション結果は概ね妥当なものであることが強く示唆された。また、3 種類の研究用標準たばこも、市販銘柄とほぼ比較可能な数値で分析可能であることも明らかとなった。

喫煙装置を用いて捕集された国産主要 10 銘柄たばこ主流煙の DMSO 抽出物の変異原性を調べた。WHO プロトコルに従い、国産たばこ売れ筋 10 銘柄を対象とし、各銘柄 3 ロットを集めた。主流煙捕集は、ISO 対応喫煙装置を用い、ISO 及びカナダ保健省の両条件下で行った。DMSO 抽出溶液をサルモネラ TA100、TA98 及び YG1024 の 3 種類を用い、S9 mix による代謝活性化を行った場合と行わなかった場合の両条件下でエームス試験に供した。変異原性は、抽出溶媒の種類に関わらず、主に TA98 及び YG1024 株 S9mix 添加条件下で認められた。最も高い活性を示した銘柄は、昨年度の 2-プロパノール抽出試料では両菌株ともマイルドセブンオリジナルであったが、DMSO 抽出試料ではマイルドセブンスーパーライト(YG1024)とキャビンマイルド(TA98 株)であった。またいくつかの銘柄で、試験に供した 3 ロット間に若干大きな変動が認められた。これらの結果から、銘柄間のみならず、同一銘柄の製品ロット間にも、たばこ煙の毒性に関係する差があることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(研究代表者：遠藤 治)

- 1) 遠藤治. WHO TobReg 提言の解説～Tobacco Control の論文の概要と解説. 日本禁煙医師連盟通信, 17(3) : 4-6 (2008).
- 2) Inoue S, Miyamoto S, Ogasawara M, Endo O, Suzuki G: Simultaneous determination of medicinal ingredients in so-called health-promoting food using liquid chromatography tandem mass spectrometry with a pentafluorophenyl stationary phase. J. Health Sci. (2009 April) in press.
- 3) Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Nicotine, tar and mutagenicity of mainstream smoke generated by machine smoking with ISO and HCI regimens of major Japanese cigarette brands. Journal of Health Science (2009) in press
- 4) Matsumoto M, Inaba Y, Yamaguchi Y, Endo O, Hammond D, Uchiyama S, Suzuki G. The exposure assessment in Japanese smokers using smoking behavior and biomarkers. (in preparation)

(分担研究者：後藤純雄)

- 1) Mineki S, Kawakami Y, Nakajima D, Shiozaki T, Sugita K, Takagi Y, Shiraishi F, Goto S. Recovery Rate in Condensation of Semivolatile Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Solutions. Journal of Environmental Chemistry 18 (1),43-50 (2008)
- 2) Kuramochi H, Nakajima D, Goto S, Sugita K, Wu W, Kawamoto K. HCl emission during co-pyrolysis of demolition wood with a small amount of PVC film and the effect of wood constituents on HCL emission reduction, FUEL 87, 2155-2157 (2008).
- 3) Takagi Y, Nakajima D, Kato Y, Okatani AT,

Kohzaki K, Inaba K, Mineki S, Goto S. Mutagenicity of Surface Sand in Park Sandboxes, Journal of Environmental Chemistry 18 (2),187-195 (2008).

- 4) Mineki S, Kobayashi A, Kageyama S, Nakajima D, Shiraishi F, Takagi Y, Onodera S, Takeda K, Goto S. Detection of mutagenicity by Ames preincubation method of fine commercial particles, Material Technology 26(6): 303-310 (2008).
- 5) Nakajima D, Tsukahara S, Hojo R, Kageyama S, Goto S, Shiraishi H, Shiraishi F, Fujimaki H. Volatile Measurement of Toluene Concentrations in the Blood of Fetuses of Pregnant Rats Exposed to Low Concentration Toluene using Headspace Solid Phase Micro Extraction Gas Chromatograph Mass Spectrometry. Journal of Health Science 55(1): 50-55 (2009)
- 6) Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Nicotine, tar and mutagenicity of mainstream smoke generated by machine smoking with ISO and HCI regimens of major Japanese cigarette brands. Journal of Health Science (2009) in press

(分担研究者：稲葉洋平)

- 1) Uchiyama S, Inaba Y, Matsumoto M, Suzuki G. Reductive amination of carbonyl 2,4-dinitrophenylhydrazones using 2-picoline borate and high-performance liquid chromatographic analysis. Analytical Chem, 81: 485-9, (2009).
- 2) Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Nicotin, tar and its mutagenicity of mainstream smoke generated by machine smoking with ISO and HCI regiments of major Japanese cigarette brands. , J. Health Sci. (2009) in press.

- 3) Matsumoto M, Inaba Y, Yamaguchi Y, Endo O, Hammond D, Uchiyama S, Suzuki G. The exposure assessment in Japanese smokers using smoking behavior and biomarkers. (in preparation)

(分担研究者：鈴木 元)

- 1) Ohishi W, Fujiwara S, Colonge JB, Suzuki G, Akahoshi M, Nishi N, Takahashi I, Chayama K: Risk factors for hepatocellular carcinoma in a Japanese population: a nested case-control study, *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 17(4): 846-854 (2008).
- 2) Tatsukawa Y, Yamada M, Hsu W-L., Colonge JB, Suzuki G et al.: White blood cell count, especially neutrophil count as a predictor of hypertension incidence among Japanese population. *Hypertens Res* 31:1391-1397 (2008).
- 3) Fujiwara S, Suyama A, Colonge JB, Akahoshi M, Yamada M, Suzuki G, Koyama K, Takahashi N, Kasagi F, Grant EJ, Lagarde F, Hsu WL, Furukawa K, Ohishi W, Tatsukawa Y, Neriishi K, Takahashi I, Ashizawa K, Hida A, Imamizumi M, Nagano J, Cullings HM, Katayama H, Ross P, Kodama K: Prevalence of adult-onset multifactorial disease among offspring of atomic bomb survivors. *Radiat Res* 170: 451-457 (2008).
- 4) Uchiyama S, Inaba Y, Matsumoto M, Suzuki G. Reductive amination of carbonyl 2,4-dinitrophenylhydrazones using 2-picoline borate and high-performance liquid chromatographic analysis. *Analytical Chem*, 81: 485-489 (2009).
- 5) Inoue S, Miyamoto S, Ogasawara M, Endo O, Suzuki G: Simultaneous determination of medicinal ingredients in so-called health-promoting food using liquid chromatography tandem mass

spectrometry with a pentafluorophenyl stationary phase. *J. Health Sci.* (2009 April) in press.

- 6) Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Nicotin, tar and its mutagenicity of mainstream smoke generated by machine smoking with ISO and HCI regiments of major Japanese cigarette brands. *J. Health Sci.* (2009) in press.
- 7) Matsumoto M, Inaba Y, Yamaguchi Y, Endo O, Hammond D, Uchiyama S, Suzuki G. The exposure assessment in Japanese smokers using smoking behavior and biomarkers. (in preparation)

(分担研究者：緒方裕光)

- 1) Nakajima H, Mizuta N, Fujiwara I, Sakaguchi K, Ogata H, Magae J, Yagita H and Koji T. Blockade of the Fas/Fas ligand interaction suppresses hepatocyte apoptosis in ischemia-reperfusion rat liver. *Apoptosis* 13: 1013-1021 (2008).
- 2) Otsuka K, Koana T, Tomita M, Ogata H and Tauchi H. Rapid Myeloid Recovery as a Possible Mechanism of Whole-Body Radioadaptive Response. *Rad. Res.* 170: 307-315 (2008).
- 3) Abe T, Ohde S, Ishimatsu S, Ogata H, Hasegawa T, Nakamura T and Tokuda Y. Effects of meteorological factors on the onset of subarachnoid hemorrhage: A time-series analysis. *J Clinical Neuroscience* 15:1005-1010 (2008).
- 4) Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Nicotin, tar and its mutagenicity of mainstream smoke generated by machine smoking with ISO and HCI regiments of major Japanese cigarette brands. *J. Health Sci.* (2009) in press.

2. 学会発表

(研究代表者：遠藤 治)

- 1) Endo O, Inaba Y, Matsumoto M, Sugita K, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Mutagenicity of DMSO extract of mainstream smoke from major cigarettes in Japan with smoking machine: Abstracts of 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 2008 Dec., Okinawa

- 2) 松本真理子、遠藤治、山口一郎、稲葉洋平、緒方裕光、鈴木元. 日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

- 3) 稲葉洋平、松本真理子、遠藤治、杉田和俊、後藤純雄、緒方裕光、鈴木元. 酸化ストレスを指標とした喫煙による生体への影響. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

(分担研究者：後藤純雄)

- 1) Endo O, Inaba Y, Matsumoto M, Sugita K, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Mutagenicity of DMSO extract of mainstream smoke from major cigarettes in Japan with smoking machine: Abstracts of 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 2008 Dec., Okinawa

- 2) 稲葉洋平、松本真理子、遠藤治、杉田和俊、後藤純雄、緒方裕光、鈴木元. 酸化ストレスを指標とした喫煙による生体への影響. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

(分担研究者：稲葉洋平)

- 1) Endo O, Inaba Y, Matsumoto M, Sugita K, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Mutagenicity of DMSO extract of mainstream smoke from major cigarettes in Japan with smoking machine: Abstracts of 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 2008 Dec.,

Okinawa

- 2) 松本真理子、遠藤治、山口一郎、稲葉洋平、緒方裕光、鈴木元. 日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

- 3) 稲葉洋平、松本真理子、遠藤治、杉田和俊、後藤純雄、緒方裕光、鈴木元. 酸化ストレスを指標とした喫煙による生体への影響. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

(分担研究者：鈴木 元)

- 1) Endo O, Inaba Y, Matsumoto M, Sugita K, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Mutagenicity of DMSO extract of mainstream smoke from major cigarettes in Japan with smoking machine: Abstracts of 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 2008 Dec., Okinawa

- 2) 松本真理子、遠藤治、山口一郎、稲葉洋平、緒方裕光、鈴木元. 日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

- 3) 稲葉洋平、松本真理子、遠藤治、杉田和俊、後藤純雄、緒方裕光、鈴木元. 酸化ストレスを指標とした喫煙による生体への影響. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

(分担研究者：緒方裕光)

- 1) 星佳芳、吉見逸郎、緒方裕光. 保健所における「がん情報」と「たばこ情報」のインターネット配信状況. 第 67 回日本公衆衛生学会総会; 2008.10; 福岡. 抄録集 p.229.

- 2) Endo O, Inaba Y, Matsumoto M, Sugita K, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Mutagenicity of DMSO extract of mainstream smoke from major cigarettes in Japan with smoking machine: Abstracts of 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 2008 Dec.,

Okinawa

- 3) 松本真理子、遠藤治、山口一郎、稲葉洋平、緒方裕光、鈴木元. 日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- 4) 稲葉洋平、松本真理子、遠藤治、杉田和俊、後藤純雄、緒方裕光、鈴木元. 酸化ストレスを指標とした喫煙による生体への影響. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

アジア太平洋たばこ研究

—日本人喫煙者の喫煙行動パターン及びバイオマーカーを用いた曝露評価—

分担研究者 鈴木 元 国立保健医療科学院 生活環境部長
研究協力者 David Hammond、山口一郎

研究要旨

本研究は、「より害の少ないたばこ」を定義づけるための基礎的な研究として、国際共同研究であるアジア太平洋たばこ研究の一環として実施された。国産銘柄を喫煙する日本人へのたばこ煙由来化学物質の曝露量は依然として不明瞭である。そこで、たばこの銘柄や喫煙行動パターンとたばこパッケージ表示量との関連性を評価するため、バイオマーカーとして喫煙者の呼気中一酸化炭素（CO）濃度と、唾液中ニコチン代謝物（コチニン量）を測定した。国産主要10銘柄のたばこを喫煙する101名を被験者とした。喫煙後の呼気中CO濃度は簡易型測定器（Smokerlyzer）により測定し、唾液中のコチニン量は、ELISA法により測定した。また、喫煙者の1日の総吸煙量は、CRESSmicro装置を用いて測定した。たばこのパッケージ表示のニコチン量により、Ultra-low（0.0-1.0 mg/cig.）、Low（<0.1-0.6 mg/cig.）、Medium（0.6-1.0 mg/cig.）、High（ ≥ 1.0 mg/cig.）の4群に分けて、表示量と呼気中CO濃度、唾液中コチニン量及び総吸煙量との間に相関があるか分散分析で検討した。その結果、ニコチン表示量と唾液中コチニン量（ $p=0.002$ ）については正の相関が、ニコチン表示量と総吸煙量（ $p=0.001$ ）については逆相関が認められたが、ニコチン表示量と呼気中CO濃度については相関が認められなかった（ $p=0.508$ ）。また、重回帰分析より、被説明変数を各々、唾液中コチニン量、呼気中CO濃度とした場合、いずれの変数とも総吸煙量と正の相関を示した。さらに、機械喫煙により研究対象とした国産主要10銘柄のタール、ニコチン及びCO（TNCO）濃度の測定をISO法及びHCI法にて測定した。HCI法の測定結果から、ニコチンあたりのタール量及びCO濃度は、銘柄によって差異は無く、むしろ、低ニコチンたばこほど高濃度になる結果となった。以上の結果より、喫煙行動パターンに準じて低ニコチンたばこ、高ニコチンたばこの差異に関わらず同程度に化学物質に曝露することが示唆された。

A. 研究目的

たばこ煙には4000種以上の化学物質が含まれており、その有害性評価は米国連邦取引委員会（FTC）及び国際標準化機構（ISO）で定められた機械喫煙法を用いて、たばこ1本当たりのタール、ニコチン、及び一酸化炭素量（TNCO量）の測定により行われてきた[1]。喫煙による体内への有害物質の取り込みの低減を目標として、これまで、たばこ主流煙中の化学物質のうち、タール量とニコチン量の低下に集中してきた。このため、たばこ会社は、紙巻たばこのフィルター部分に通

気孔を設けたり、活性炭を織り交ぜるなど、たばこデザインを工夫する事により、低タール・低ニコチンたばこを開発してきた。今日では、多種多様なタール・ニコチン量を有するたばこが存在する。その結果として、FTCの機械喫煙法によるたばこ主流煙のタール排出量の平均値は、1968年から1997年までで44%以上低下した[2]。

他方、これまでの研究より、喫煙者が日常的に用いているたばこから低タール・低ニコチンのたばこに代えたとき、必要摂取量のニコチンを体内へ取り込もうとするため、喫煙行動パターンが変

化することが分かっている (compensation smoking)。具体的には、吸煙回数が増加したり、一服をより強く、深く吸い込むといった変化が生じることが報告されている[3]。よって、たばこパッケージに表示されているニコチン量とタール量は、体内への曝露量を反映していない。特に、ニコチン量とタール量が少ないとされる Ultra-low (ニコチン量 ≤ 0.1 mg/cig., タール ≤ 1 mg/cig.) 銘柄は、たばこ会社が宣伝するように、必ずしもより害の少ないたばこであるとは言えない。よって、市場に出回るたばこ製品の FTC/ISO 機械喫煙法におけるタール排出量の低下は、喫煙者のリスク低減に繋がってこなかった。

低タール・低ニコチンたばこが健康リスク低減に作用しなかった原因のひとつは、主流煙中の化学物質量を FTC 及び ISO の定めた機械喫煙法を用いて評価したことに起因する。たばこ製品規制に関する WHO たばこ製品規制専門家パネル (TobReg) は、この問題を解決するため、WHO たばこ規制枠組条約 (FCTC) 第 9 条のために新しい勧告を策定している。これまでの機械喫煙法による評価に限界があることから、より喫煙者の吸煙パターンに近いカナダ保健省・インテンス (HCI) 法による機械喫煙評価が近年行われ始めた。喫煙者における実際の曝露量を定量的に評価する方法として、呼気や血液、尿、唾液を用いたバイオマーカー計測が頻繁に用いられてきた。主なバイオマーカーは、呼気中一酸化炭素濃度や血液、尿、唾液中のニコチン量及びコチニン量であった。コチニンは、ニコチンの主要な代謝物であり、半減期が 16-20 時間あり、ニコチンの体内への取り込み量を測る有用なバイオマーカーである[4]。また、曝露の指標として、自己申告制のアンケートによる 1 日の喫煙本数が多用されてきた[5]が、近年、吸煙量などを実測できる携帯型の測定装置が開発されたため、喫煙行動パターンをより詳細に解析することが可能となった[6]。

日本は 1969 年よりチャコールフィルターたばこが普及している。また日本は欧米に比較してたばこの肺癌寄与リスクが低いことが知られている。しかし、その理由がたばこのデザインによるのか、日本人の喫煙行動パターンの特性によるの

か、その他の生活習慣あるいは遺伝的背景によるのか明らかではない。本研究では、第一に FTC/ISO 法及び HCI 法の条件下の機械喫煙条件で日本たばこ市場の 40% を占める日本産たばこ主要 10 銘柄の特性を明らかにする。第二に、主要 10 銘柄を喫煙する 101 名の喫煙者の喫煙行動パターン及び呼気中 CO 及び唾液中コチニンを解析する。これらの解析により日本たばこの特性及び日本人の喫煙行動パターンが欧米のたばこの特性及び喫煙行動パターンと差があるかどうか検討する。

B. 研究方法

(1) 被験者

2007 年に、埼玉県和光市周辺にて 101 名の被験者を募った。20 歳から 65 歳の常習喫煙者であり、心肺の疾病経歴が無く、国産主要 10 銘柄のたばこを 3 ヶ月以上喫煙している者を対象とした。被験者は、本研究所に所属し、同意書を確認した後、喫煙習慣に関するアンケートに協力した。本研究に参加した被験者 101 名のうち、呼気中 CO 濃度は 101 名、喫煙行動パターンの計測は 100 名、唾液中コチニン量の測定は 94 名分を得た。本研究は、公的な競争的研究資金によって行われ、主任研究者の在籍する University of Waterloo (ORF file #13284; 11/14/06, "Asia Pacific Smoking Study") にて倫理委員会の承認を得ている。また、日本国内で実施する部分に関しては、国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認 (NIPH-IBRA#06012) を受けて行われた。

(2) 喫煙習慣に関するアンケート

自覚的なたばこの吸い方の強度を 0 (弱い) から 100 (強い) の数値で申告してもらった。また、1 日の喫煙本数や起床後に最初のたばこを吸うまでの時間についても回答してもらった。

(3) 唾液の採取

被験者はラテックス手袋をして無菌の綿を含んだプラスチックチューブである "Salivette" (SARSTEDT, Germany) を二分間口の中に入れて唾液試料を回収した。採取した試料は分析まで -30°C で保管された。

(4) 唾液中コチニン量の測定

唾液試料を含んだ綿を解凍した後、 4°C 、1,000

×gにて2分間遠心分離することにより唾液試料を回収した。唾液試料はリン酸緩衝生理食塩水 (Wako Pure Chemical Ltd., Japan) で適宜10倍に希釈した後、10 μLをマイクロプレートEIAキット (COZART, UK) に供し、450 nmにおける吸光度を Ultrospec Visible Plate Reader II 96 (GE Healthcare UK Ltd., UK) で測定してコチニン量を求めた。マイクロプレートEIAキットの定量範囲はコチニン量 5 ng/mL から 50 ng/mLであった。5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mLにおける吸光度の平均値および95%信頼区間は、各々、 0.987 ± 0.036 、 0.716 ± 0.053 、 0.292 ± 0.017 であった (各n=16)。検量線の濃度範囲を逸脱した試料については、唾液の希釈倍率を変えて測定した。

(5) 呼気中CO濃度の測定

喫煙した直後の呼気中のCO濃度を“MicroIV Smokerlyzer” (Bendfont Scientific Ltd, UK) を用いて二度測定した。データ解析には、二回測定した値の平均値を用いた。

(6) 喫煙行動パターンの計測

喫煙行動パターンの計測は、CRESSmicro装置 (Plowshare Technologies, Inc., Baltimore, Maryland) を用いて行った。CRESSmicroは電池式の携帯型の装置 (2.5×2.2×1.2 inch, 3.1 oz) であり、パイプにたばこを挿してそこから喫煙することにより、吸煙量 (mL/puff)、吸煙回数、吸煙間隔 (ms)、平均流量 (mL/sec)、日時などを喫煙者ごとに測定した[3]。1日の総吸煙量 (mL) は、たばこ1本あたりの吸煙量 (mL/cigarette) に1日の喫煙本数を掛けて求めた。

(7) 機械喫煙によるTNCOの測定

自動喫煙装置Borgwaldt single channel linear smoking machine model LM1 (Borgwaldt KC GmbH, Germany) を用いて、ISO法及びHCl法によりTNCOの測定を行った。ISO法 (一服につき2秒間で35 mL吸引、60秒ごとに一服させ、通気孔は開放状態) はISO 4387 (2000) に、HCl法 (一服につき2秒間で55 mL吸引、30秒ごとに一服させ、通気孔は全封鎖状態) はHealth Canada Intense protocol T-115[7]に準拠して行った。たばこは、ISO 3402 (1999) に従ってサ

ンプリング前にコンディショニングを行い、たばこ主流煙中の総粒子状物質 (TPM) は44 mm Cambridge filter pad (Borgwaldt KC GmbH, Germany) で捕集し、20 mLの2-プロパノール (Wako Pure Chemical Ltd., Japan) で20分間振とう抽出した。

ニコチン分析は、抽出液の50 μLを内部標準として1 μg/mLイソキノリン (Tokyo Chemical Industry CO., LTD., Japan) を含む5 mLの2-プロパノールに溶解して、1 μLをGC/MS分析に供した。GC/MSの分析条件を下記に示した：

<GC : Hewlett Packard社製 HP 6890>

- ・注入 250°C スプリットレス (オートサンプラー : Agilent社製 7683B)
- ・カラム DB-17 (J&W Scientific社製 30 m×0.25 mm I.D.×0.25 μm、昇温プログラム : 50°C (2分保持) → (15°C/分) → 200°C → (5°C/分) → 280°C (5分保持)、ヘリウムガス 流速 1.0 mL/分)

<MS : Agilent社製 5975 inert/N>

- ・選択イオン検出法 (SIM法)
- ・測定質量 (m/z) ニコチン : 84, 161 ; 内部標準 : 129

抽出液中の水分量の分析は、ISO 10362-1 (1999) に準拠してGC/TCDで測定した。

タール量は、ISO 4387 (2000) に準じて、TPMからニコチン量と水分量を差し引くことにより求めた。

COの測定は、ISO 8454 (1995) と同様の原理で測定した。

(8) 統計解析

たばこパッケージ表示ニコチン量に従って Ultra-low (0-0.1 mg/cig.)、Low (<0.1-<0.6 mg/cig.)、Medium (0.6-<1.0 mg/cig.)、High (≥1.0 mg/cig.) の4群に分けて[8, 9]、呼気中CO濃度、唾液中コチニン量及び総吸煙量について一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Bonferroni法を用いて多重比較を行った。また、唾液中のコチニン量と関係する因子について単回帰分析を行い、顕著に (p < 0.05) あるいは suggestive level (p < 0.1) で相関のあった因子について重回帰分析を行った。同様な解析を呼気中CO濃度についても行った。全て

の統計解析は、統計解析ソフト SPSS 16.0J を用いて行った。

C. 研究結果

(1) 機械喫煙装置による測定

日本産たばこ主要 10 銘柄 (Table 1) について、ISO 法と HCI 法にて機械喫煙でタール・ニコチン・CO 濃度を測定した。その測定結果を、たばこパッケージ表示ニコチン量に従って Ultra-low、Low、Medium、High の 4 群に分けた。ニコチン量を比較すると、ISO 法ではパッケージ表示ニコチン量とほぼ同じ値が得られたが、HCI 法では、Ultra-low では 5.0 倍、Low では 3.3 倍、Medium では 2.3 倍、High では 1.9 倍と、ISO 法よりも HCI 法の方が高い値となった (Fig.1a)。同様に、タール量については、ISO 法ではパッケージ表示タール量とほぼ同じ値が得られたが、HCI 法では、Ultra-low では 11.9 倍、Low では 3.9 倍、Medium では 2.7 倍、High では 2.1 倍と、ISO 法よりも HCI 法の方が高かった (Fig.1b)。一方、CO 濃度は、ISO 法により測定したところ、主流煙中の CO 濃度は Ultra-low では 3.5 (mg/cig.)、Low では 8.2 (mg/cig.)、Medium では 10.8 (mg/cig.)、High では 13.7 (mg/cig.) となり、パッケージ表示ニコチン量に比例して高くなる傾向であった。しかし、HCI 法では、たばこパッケージ表示ニコチン量・タール量に依存することなく平均 33.6 ± 1.3 (mg/cig.) の値を示した。ISO 法におけるニコチン、タール、CO 濃度を単回帰分析により Pearson の相関係数を用いて検討すると、ニコチンとタールは $r = 0.997$ ($p = 0.003$)、ニコチンと CO 濃度は $r = 0.962$ ($p = 0.038$)、タールと CO 濃度は $r = 0.979$ ($p = 0.021$) と、強い正の相関を示した。一方、HCI 法では、ニコチンとタールは $r = 0.998$ ($p = 0.002$) と強い正の相関を示したが、CO 濃度とはニコチン及びタールのどちらも相関を示さなかった。

ニコチンとタールは両機械喫煙法において正の相関を示したため、喫煙者はたばこから必要量のニコチンを取り込むことにより、それと比例した量のタールを取り込むことが考えられる。よって、2 つの喫煙条件ごとにニコチン量あたりのタール

量を算出したところ、HCI 法は銘柄に関係なく 14-15 と一定であったが、ISO 法では、Ultra-low が 6、Low が 11、Medium が 12、High が 13 と、ニコチン量の増加に伴い、タール/ニコチン量の比の増加が認められた (Fig.2a)。仮に喫煙者が HCI 法に類似した喫煙モードで吸煙した場合、ニコチンあたりのタールに含まれる化学物質の吸入量は、変わらないこととなる。他方、ニコチンあたりの CO 濃度は、低タール・低ニコチンたばこほど、高い値を示した (Fig.2b)。そこで、喫煙者の喫煙モード、本数、唾液中コチニン量が喫煙するたばこの表示ニコチン量で変化するかを検討した。

(2) 喫煙者のバイオマーカー

たばこのパッケージ表示ニコチン量から、被験者を Ultra-low、Low、Medium、High の 4 群 (Table 2) に分け分析した結果、表示ニコチン量と唾液中コチニン量は正の相関 ($p = 0.002$) (Fig.3a)、表示ニコチン量と総吸煙量は逆相関 ($p = 0.001$) (Fig.3b) を示した。また、呼気中 CO 濃度は表示ニコチン量に無関係であることが確認された (Fig.3c)。この結果、低タール・低ニコチンたばこ喫煙者ほど、総吸煙量が高い、すなわち compensation smoking していることが示唆された。

次に唾液中のコチニン量あるいは呼気中の CO 濃度と相関する因子を多変量回帰分析で検討した。これらの因子は、プレリミナリーな単回帰分析で有意ないし suggestive level ($p < 0.1$) であった因子である。総吸煙量、パッケージ表示ニコチン量、自覚的なたばこの吸い方の強度及びニコチン中毒の指標である起床後に最初の 1 本を吸うまでの時間 [20] である (Table 3)。唾液中コチニン量は、総吸煙量 ($B = 0.27$, $p = 0.009$) 及びパッケージ表示ニコチン量 ($B = 0.44$, $p < 0.001$) と正の相関を示し、起床後に最初の 1 本を吸うまでの時間とは有意な負の相関 ($B = -0.18$, $p = 0.05$) を示した (Table 3A)。他方、呼気中 CO 濃度は、総吸煙量 ($B = 0.27$, $p = 0.008$) 及び自覚的なたばこの吸い方の強度 ($B = 0.30$, $p = 0.003$) と正の相関を示し、起床後に最初の 1 本を吸うまでの時間とは負の相関 ($B = -0.19$, $p = 0.03$) を示した (Table 3B)。

D. 考察

今回の研究より、日本人は低ニコチンたばこ喫煙者ほど compensation smoking をしていることが判った。特に、Fig.4 のように、喫煙している銘柄をもとに喫煙者を Ultra-low/Low 喫煙者と Medium/High 喫煙者に分けて、総吸煙量と唾液中コチニン量を取ると、Ultra-low/Low 喫煙者の方が Medium/High 喫煙者よりも、コチニン量あたりの総吸煙量が 2.7 倍多いことが判った ($p = 0.024$)。海外の報告によると、1日の平均喫煙本数は 17 本前後であり[5]、カナダで行われた研究[3]では、たばこ 1 本あたりの総吸煙量は 596 mL であった。このことから、海外の喫煙者の 1 日あたりの平均総吸煙量は 10,100 mL (= 596 mL/cig. × 17 本) と仮定され、それと比較すると、日本人で特に Ultra-low/Low 喫煙者は平均総吸煙量が 16,700 mL (10,600 mL (25%), 19,800 mL (75%)) であることから 1.7 倍 compensation smoking を行っていることがわかる。

唾液中コチニン量は、Ultra-low/Low 喫煙者の方が、Medium/High 喫煙者よりも有意に低い値を示し (Fig.3a)、尿中のコチニン量[8]や血液中のコチニン量[9]を測定した他の研究と同様の傾向を示した。また、Jarvis et.al.[4]らの結果と同様に、あるいはより顕著に、たばこパッケージ表示ニコチン量と唾液中コチニン量の間には単回帰分析 ($r = 0.384, p < 0.001$) においても、さらには本研究では重回帰分析 ($\beta = 0.439, p < 0.001$) からも強い正の相関関係が得られた。しかし、Ultra-low 喫煙者の唾液中コチニン量の中央値 124.0 ng/mL と、High 喫煙者の唾液中コチニン量の中央値 368.4 ng/mL を比較すると、パッケージ表示ニコチン量では 10 倍以上の差があるにもかかわらず、実際の摂取量は 3 倍の違いしかなかった (Fig.3a)。この結果は、Nakazawa et.al.[10]らが尿中のコチニン量を測定し、Ultra-low 喫煙者と High 喫煙者の間に 2 倍程度の差しかなかったことと同様の傾向を得た。HCl 法による主流煙中の単位ニコチン量当たりのタール量から類推すると、特に低ニコチンたばこの喫煙者は、パッケージ表示ニコチン・タール量以上の化学物質の体内への曝露が存在することが示唆された。

他方、呼気中 CO 濃度は、唾液中コチニン量とは異なり、たばこパッケージ表示ニコチン量・タール量に依存することなく平均 22.4 ± 10.0 (ppm) の値を示した (Fig.3c)。また、この結果は他の研究と同様の傾向を得た[8,9]。多変量解析では、呼気中 CO 濃度は、銘柄にかかわらず、総吸煙量と自覚的なたばこの吸い方の強度に関係した (Table 3B)。このことから、低ニコチンたばこ喫煙者はより肺まで深く、多く吸煙することにより、高ニコチンたばこ喫煙者の呼気中 CO 濃度と差異がなかったことが考えられた。また、重回帰分析からも、呼気中 CO 濃度及び唾液中コチニン量は総吸煙量と正の相関があり、喫煙行動パターンが有害化学物質の体内への取り込みに大きく影響することが示唆された。

以上の結果は、日本人と欧米人の喫煙行動に大きな差はなく、むしろ、日本人の方が compensation smoking を励行しているようである。また、ISO法、HCl法による TNCO の測定結果も欧米の報告と同様であった。今後、たばこの特異的ニトロソアミン (TNSA) やアクロレイン等の化学物質の測定値が日本製と欧米の銘柄で差があるか否か検討することが重要である。

現段階では、種類の異なるたばこ製品を使用している喫煙者間で、たばこ関連疾病のリスクの差を表す信頼できる独立した予測因子として評価されているものはまだ何もない[11]。健康傷害度の計測や、疾病リスクのバイオマーカーについても、将来的に評価の確立が期待されている[12]。

本研究で測定を行った酸化ストレスマーカー 8-OHdG は、生体内の活性酸素種によって DNA より生成され尿中に排泄される安定な化合物である。そのため、喫煙による生体への影響を定量的に測定することに適した化合物であるとも云える。特に通気孔の開いたフィルターを使用する等の独特な国産たばこの喫煙環境への適用は有意義だと考えられる。そこで、喫煙時の各種行動 (喫煙パターン) や同時測定可能な各バイオマーカーとの関連性を解析することは、国産たばこの喫煙影響を推察するのに大いに有用であるものと考えられる。そこで、日本人喫煙者における 8-OHdG 濃度と各種要因との単回帰分析を行った結果、関係