

200823002B

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 18～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 遠藤 治

平成 21 (2009) 年 4 月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 26
III. 研究成果の刊行物・別刷	..... 27

## I. 総合研究報告

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）  
総合研究報告書

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。必要な設備の導入並びに関係機関との調整を図り、TobLabNet への正式参加が承認され、共通のたばこ試料を用いて測定手法の比較を行うラウンドロビン研究に参加した。まず、2種類の研究用たばこを用いて従来型の国際標準試験法である ISO 法及び、カナダ保健省が推奨するインテンス (HCI) 法の2種類のサンプリング条件を用いてタール、ニコチン、一酸化炭素 (TNCO) の測定が行われ、いずれも HCI 法による測定値が高く、変動も少ないことが判った。次に5種類のたばこ試料について HCI 法による TNCO 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。

また、世界のたばこ消費の70%を占めるといわれるアジア地域における調査研究の必要性が提案されたことを受けて、日本、中国、マレーシアにおいて喫煙者の喫煙行動と曝露バイオマーカーを調査する「アジア太平洋たばこ研究」に参加した。その結果、呼気中 CO 濃度は、パッケージ表示タール量等とは相関せず、1日の喫煙本数や喫煙時の吸引力の強さと相関を示すことや、喫煙者が1日に吸い込むたばこ煙量（総吸煙量）は、パッケージ表示ニコチン量が低いたばこほど多い傾向が見られた。また唾液中コチニン量は、パッケージニコチン表示量に依存して増加し、重回帰分析結果から、総吸煙量やパッケージ表示ニコチン量と関連性が認められるものの、自覚的なたばこの吸い方の強度や、たばこ依存性とは関連性が認められなかった。さらに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が、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。

この他、たばこに関する新しい測定手法について研究をすすめ、ニコチンや4-エテニルピリジンの GC/MS 分析カラムや分析手法の最適化を行い、タール中の発がん関連物質について検討を行った。喫煙装置を用いた国産主要10銘柄のたばこタール中の発がん関連物質（変異原性、多環芳香族炭化水素等）の測定結果から、“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ことを明らかにした。また、非意図的にたばこ煙に曝露されてしまう受動喫煙の原因となる環境たばこ煙の曝露マーカーについて、測定法の検討を行うとともに、喫煙率の高い自衛隊関連施設における分煙効果に関する実態調査を行った。

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、今後の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
遠藤 治	麻布大学	准教授
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

## A. 研究目的

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。

## B. 研究方法

### 1. TobLabNet ラウンドロビン研究

#### 1.1 第1回ラウンドロビン

2種類の研究用たばこ（CM4及び1R5F）を分析対象とした。両銘柄とも米国疾病管理センター（CDC）が一括購入したのち、サンプルを無作為包装し、パッケージごとにバーコードによる試料IDを付けて管理された。これをCDCからTobLabNetメンバーとなっている各機関に送付された。各機関はISOに準拠し、送付されたたばこ試料を保管し、喫煙実験前、最低4時間～最大10日間、温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $60\pm 2\%$ でたばこ試料を調整して実験に供した。これら2種類の研究用たばこについて、従来型の国際標準試験法であるISO法及び、カナダ保健省が推奨するインテンス（HCI）法による2種類のサンプリング条件を用いて喫煙された。

タール、ニコチン、一酸化炭素（TNCO）の測定は、ISOに準じた測定手法を実施できることが望ましいとされたが、TNCOを定量できるその他の手法を有していれば参加が認められた。参加研究機関は現在実施されている手法を用いて、

TNCOの分析を実施し、その結果をとりまとめ機関である米国CDCに送付した。個々の測定データは、測定に用いられたろ紙片ごとに算出された。着火の失敗や、指定された吸殻長からの逸脱など、試料捕集あるいは分析途中で明らかな技術上の問題が認められない限り、あらゆる結果を報告することとされた。結果の報告にはMicrosoft Excelが使用された。参加機関の機密保持のため、実験室ごとに「実験室コード」が割り当てられ、結果報告に際して、この実験室コードを各データに付加することとした。

### 1.2 第2回ラウンドロビン（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。

## 2. アジア太平洋たばこ研究

### 2.1 研究の概要とアンケート集計

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。喫煙行動に関する質問票調査及び、喫煙者の喫煙行動（CRESSmicro装置による喫煙パターンの計測、吸殻解析など）と曝露バイオマーカー（呼気中一酸化炭素濃度、だ液および尿中代謝物など）について調査を行った。回収した尿サンプルおよび吸殻は、米国CDCへ送付した。残りのサンプルは、国立保健医療科学院に保管した。参加者が吸

ったたばこと同一銘柄を 15 箱ずつ購入し（異なる 3 カ所の販売所で購入）、ロズウェル・パーク癌研究所に送付した。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。

## 2.2 呼気中 CO 濃度に及ぼす喫煙パラメータの影響

呼気中 CO 濃度がどのような喫煙因子と関連するか予備的検討（重回帰分析）を行った。全てのデータ解析は、統計解析ソフト SPSS13.0J を用いて行った。まず初めに、吸煙量の特性、たばこの特性、自覚的喫煙行動パターンとの関係についてそれぞれ単回帰分析を行い、Pearson の相関係数を求め、2 変量間の直線的関連の強さについて解析した。次に、呼気中 CO 濃度を被説明変数、喫煙行動パターンの各因子を説明変数として重回帰分析を行い、各因子に関して他の因子の影響を取り除き、それぞれの因子との間の関連について解析した。

## 2.3 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ールに従って行なった。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 喫煙装置を用い、ISO 及び HCl 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。

## 2.4 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ールに従って行なった。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。

## 3. 新しい測定手法に関する研究

### 3.1 ニコチン分析用 GC/MS カラムの比較検討

たばこ煙は、定容量型自動喫煙器を用い、ISO3308 に準拠して発生させた。主流煙中の粒子状物質を Cambridge ガラス繊維フィルター (CFP; 44 mmφ) 上に捕集し、その直後に 4%硫酸水素ナトリウム水溶液入りのインピンジャーを連結してガス状物質を捕集した。副流煙についても同様に 2.0 L/min で連続吸引して粒子状及びガス状物質を捕集した。GC/MS 分析用キャピラリーカラムは、分析対象成分が極性物質であることから、微極性の DB-5MS と中極性の DB-17 を用いて比較した。ピーク形状の検討及び定量に用いた測定質量は、ニコチンでは  $m/z = 84$ 、4-エチルピリジンでは  $m/z = 105$ 、イソキノリンでは  $m/z = 129$  とした。ピーク形状の検討には、米国 EPA の方法に準拠して算出した asymmetry factor (ASF) を用いた。

### 3.2 喫煙装置を用いて捕集されたたばこ主流煙中多環芳香族炭化水素の分析

国産たばこ主要 10 銘柄を用いて、ISO 法及び HCl 法に規定された喫煙条件により燃焼させた時に発生する主流煙を採取し、試料に含まれる発がん関連物質群である多環芳香族炭化水素 (PAH) 類を測定し比較検討した。PAH 類の抽出は、CFP に 2-プロパノール 20 mL を加えて振盪抽出を行った。得られた粗抽出液のうち 1 mL を PAH 分析用試料とし、これをシリカゲルカートリッジを用いて精製した。N<sub>2</sub> 気流下で溶媒を留去した後、d8-Naphthalene, d10-Chrysene 及び d12-Benz[a]pyrene を内部標準として添加し、GC/MS 測定に供した。GC/MS 測定は選択イオン検出法 (SIM 法) を用い、内部標準法により定量を行った。

### 3.3 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 プロトコールに従い、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 喫煙装置を用いた。総粒子状物質 (TPM、別名粗タール) は CFP に捕集した。ISO 条件による捕集は ISO 4387 (2000) に準じた。HCl 条件による捕集はカナダ保健省 T-115 に準じた。TPM 秤量後、2-プロパノールを用いて室温で 20 分間静かに振盪抽出を行った。2-プロパノール抽出液中のニコチン量は ISO 10315 (2000) に準じて、若干の改良を加えた GC/MS 法により分析した。2-プロパノール抽出液中の水分量は ISO 10362-1 (1999) に準じて、GC/TCD を用いて測定した。各銘柄 3 ロットのうち 1 ロットを変異原性試験に供した。DMSO に転溶した後、プレインキュベーション法により試験した。菌株はサルモネラ 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実施した。

### 3.4 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

たばこ試料及び TPM 捕集方法は 3.3 と同様に行った。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。変異原性試験も 3.3 と同様に、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プレインキュベーション法により実施した。

### 3.5 海上自衛隊における分煙効果に関する研究

空気試料捕集対象施設は、自衛隊病院 2 施設、護衛艦及び潜水艦とした。これら施設内における分煙状況を明らかにするため、それぞれ喫煙区画及び非喫煙区画数箇所で約 1.5m の高さで空気捕集を実施した。空気捕集は、パーソナルミニポンプを 2 台用い、同時に 2 試料捕集した。捕集ヘッドのテフロン製フィルターホルダーには直径 25mm の石英繊維フィルター 3 枚を装着した。すなわち、吸気側 1 段目は粒子状物質捕集用フィルター、第 2 段目、3 段目の 2 枚はガス状ニコチン

捕集用に硫酸水素ナトリウムを含浸させたフィルターを用いた。空気吸引速度は 1.0 L/min とし、空気試料を 24 時間、4~5 回捕集した。捕集試料は、抽出操作に供するまで、できるだけ冷暗所で保管した。粒子状物質を捕集した吸気側 1 段目のフィルターは半分は切断し、一方を GC/MS によるニコチン分析に、もう一方を HPLC/分光蛍光検出法による PAH 分析に供した。

## C. 研究結果

### 1. TobLabNet ラウンドロビン研究

#### 1.1 第 1 回ラウンドロビン

国立保健医療科学院で行なわれたタール及びニコチン測定結果から、フル・フレイバー・タイプ CM4 を ISO 法により捕集した場合、TPM 量は 17.532~20.480 (平均 19.167±標準偏差 0.824) mg/本、水分含量は 0.322~2.273 (平均 0.743±標準偏差 0.507) mg/本、ニコチン量は 0.875~1.108 (平均 0.999±標準偏差 0.058) mg/本となり、タール量は 15.919~18.799 (平均 17.426±標準偏差 0.845) mg/本であった。ウルトラ・ライト・タイプ 1R5F の場合、TPM 量は 2.804~3.886 (平均 3.305±標準偏差 0.319) mg/本、水分含量は 0.000~0.454 (平均 0.112±標準偏差 0.130) mg/本、ニコチン量は 0.088~0.129 (平均 0.110±標準偏差 0.011) mg/本となり、タール量は 2.684~3.562 (平均 3.083±標準偏差 0.269) mg/本であった。これらの結果から、両たばこ試料とも水分含量測定値に比較的大きな変動が見られ、タール量に影響を及ぼすことが判った。

ISO 及び HCl 両条件を用いて、フル・フレイバー・タイプ CM4 たばこ及びウルトラ・ライト・タイプ 1R5F たばこの主流煙中の TNCO を分析し、CDC が取りまとめた結果から、主流煙中の測定対象物質濃度はいずれも、ISO 条件と比較して HCl 条件で増加した。喫煙条件・測定対象が同一の場合、HCl 条件による CO 濃度を除いて、相対標準偏差はフル・フレイバー・タイプ CM4 たばこと比較してウルトラ・ライト・タイプ 1R5F たばこの方が有意に高い値を示した。反対に、測定対象・たばこ銘柄が同一の場合、ウルトラ・ライト・タイプ 1R5F たばこの CO 濃度を除いて、ISO 及び

HCI 両条件とも相対標準偏差はほぼ同程度であった。

## 1.2 第2回ラウンドロビン (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  $38.02 \pm 1.61$  mg/本、ニコチン量は  $1.85 \pm 0.09$  mg/本、タール量は  $22.36 \pm 0.81$  mg/本であった。同様に、標準たばこ 1R5F の CO 濃度は  $29.57 \pm 1.12$  mg/本、ニコチン量は  $1.03 \pm 0.07$  mg/本、タール量は  $14.73 \pm 0.59$  mg/本、標準たばこ CM6 の CO 濃度は  $35.26 \pm 0.92$  mg/本、ニコチン量は  $2.74 \pm 0.09$  mg/本、タール量は  $27.05 \pm 0.59$  mg/本であった。また英国製マルボロゴールドの CO 濃度は  $31.71 \pm 1.05$  mg/本、ニコチン量は  $1.61 \pm 0.06$  mg/本、タール量は  $20.49 \pm 0.69$  mg/本、米国製マルボロレッドの CO 濃度は  $35.87 \pm 1.52$  mg/本、ニコチン量は  $2.39 \pm 0.08$  mg/本、タール量は  $29.94 \pm 1.22$  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。

## 2. アジア太平洋たばこ研究

### 2.1 研究の概要とアンケート集計

日本における喫煙者からの吸い殻、尿、だ液サンプルの回収は、2007年4月17日から9月14日にかけて行なわれ、回収した尿サンプルおよび吸い殻は、米国CDCへ直接送付した。

アンケート集計の結果、本研究協力者は、101名 (男性88名、女性13名) であった。年齢構成は、30代がもっとも多く36名で、続いて40代の25名、20代の18名となった。60-65歳はもっとも少なく6名であった。BMIの分布から、BMI基準値が「普通」と判断される18.5-25の参加者が最も多く76名であった。「肥満」と判断される25以上の人数は21名で全体の20%であった。1日の喫煙本数は約半数の50名が16-20本を喫煙する結果が得られた。喫煙者の傾向をみると、22名が過去5年間で禁煙を試みており、現在も28名が禁煙をしたいと考えていた。過去5年

間に禁煙を試みて、現在も禁煙を計画している喫煙者は、11名であった。89名が同一の銘柄を過去3ヶ月間にわたり継続して使用していた。たばこから得られる満足感は、93%であった。たばこの味に関しては、66%が旨いと感じていた。また、現在の銘柄に変更した理由には、変更した69名中27名にあたる39.1%が健康志向で、また半数近い35名が風味の変更であった。起床後、喫煙者が最初の喫煙までの時間について2日間にわたり質問をしたところ、1日目が68.3%、2日目が66.7%の人が30分以内に喫煙をしていた。また、85%近い人が60分以内には最初の喫煙を終了していた。

### 2.2 呼気中 CO 濃度に及ぼす喫煙パラメータの影響

CReSSmicroより得られた吸煙量に対して、たばこの特性 (パッケージ表示タール量、ニコチン量、通気孔数)、呼気中のCO濃度 (喫煙後)、自覚的喫煙行動パターンの因子との関係について、Pearsonの相関係数を求めた。吸煙量は、有意確率  $p < 0.0001$  でタールとニコチンとは高い負の相関、通気孔数とは高い正の相関を示した。およその傾向を見るために  $p < 0.1$  を基準 (suggestive level) とした場合、吸煙量は、1日の喫煙本数、吸引の強さ (CReSSmicro使用時)、吸入深さ (通常の喫煙)、たばこの吸い方の強度 (通常の喫煙とCReSSmicro使用時) とは正の相関の傾向を示した。たばこのタール量と、ニコチン量および通気孔数との各関係について、Pearsonの相関係数を求めたところ、タールはニコチンとは高い正の相関、通気孔数とは高い負の相関を示した。相関係数は、1%水準で有意であった (両側検定)。自覚的喫煙行動パターン (吸引の強さ、吸入深さ、吸い方の強度) 間の各関係について、Pearsonの相関係数を求めたところ、CReSSmicroを使用するかしないかに関わらず、自覚的な喫煙行動は同様であった。被説明変数として喫煙後の呼気中CO濃度を、説明変数として、①吸煙量、②通気孔数、③1日の喫煙本数、④喫煙後の経過時間、⑤たばこの吸い方の強度 (通常の喫煙) を用いて重回帰分析を行った。説明変数は、各々被説明変数と単重回帰させたとき、片側検定で  $p < 0.1$  (suggestive

level) であったものを選択した。その結果、喫煙後の呼気中 CO 濃度は、吸煙量と自覚的なたばこの吸い方の強度とは正の相関を示し、通気孔数と喫煙後の経過時間とは負の相関を示した。なお、1 日の喫煙本数とは相関関係を示さなかった。

### 2.3 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 HCl 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、HCl 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、HCl 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  $33.6 \pm 1.3$  (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。

### 2.4 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  $5.14 \pm 2.56$  ng/mg Creatinine であった。

尿中 8-OHdG 濃度は、一日あたりの喫煙本数と正の相関、一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. 新しい測定手法に関する研究

### 3.1 ニコチン分析用 GC/MS カラムの比較検討

2 種類のカラムを用いてニコチン、4-エテニルピリジン及び、イソキノリンを分析して得られた ASF は、DB-5MS カラムを用いた場合、ニコチンでは 1.8 (相対標準偏差 16%)、4-エテニルピリジンでは 2.6 (24%)、イソキノリンでは 2.1 (21%) であったのに対し、DB-17 カラムを用いた場合には、ニコチンでは 1.3 (11%)、4-エテニルピリジンでは 1.6 (14%)、イソキノリンでは 1.4 (15%) となり、測定対象とした 3 物質ともに DB-17 カラムの方が DB-5MS よりもピーク形状が鋭く良好な結果を示した。

上記の 2 種類のカラムを用いてニコチン及び 4-エテニルピリジンの定量下限値 (検量線作成時の最低濃度を用い、内部標準イソキノリンとの面積比から求め、10 回の測定を行い得られた標準偏差の 10 倍値) を求めた結果、ニコチンの定量下限値は、DB-5MS では  $0.58 \mu\text{g/ml}$ 、DB-17 では  $0.29 \mu\text{g/ml}$  となり、DB-17 の方が 2 倍程度高感度に定量できることが判った。また、4-エテニルピリジンの定量下限値は、DB-5MS では  $0.30 \mu\text{g/ml}$ 、DB-17 では  $0.28 \mu\text{g/ml}$  となり、いずれのカラムを用いても比較的高感度に定量できることが判った。

DB-17 カラムを用いてマイルドセブン (表示タール量 10mg、ニコチン量 0.8mg) 煙中のニコチン及び 4-エテニルピリジン濃度を測定したところ、ニコチンは主流煙のガス状成分を除く 3 試料で検出されたのに対し、4-エテニルピリジンは副流煙のガス状成分のみに検出された。主流煙のニコチ

ン濃度では粒子状成分のみで 0.94mg とパッケージ表示値 (0.8mg) と同程度か若干高めであったが、副流煙のそれは粒子状成分だけで 2.41mg、ガス状成分を加えると 3.15mg となり主流煙の 2.5~3 倍の量が副流煙に含まれていることが判った。4-エテニルピリジンは、主流煙では粒子・ガス状成分ともに定量下限以下であったが、副流煙のガス状成分のみで検出され、その発生量は 0.30mg/本であった。

### 3.2 喫煙装置を用いて捕集されたたばこ主流煙中 PAH の分析

たばこ主流煙の粗抽出液は茶褐色に着色していたため、シリカゲルカートリッジを用いた前処理を行い、着色成分を除去した。また、実試料の測定に先立ち、たばこ煙抽出液 (n=5) に混合溶液 (各 PAH21 化合物 20 ng) を添加し、シリカゲルカートリッジ処理における PAH の回収率を求めた。その結果、Biphenyl ではほとんど回収されず、環数が 2 環あるいは 3 環の一部の PAH では非常に低い回収率となり、そのばらつきも大きかった。一方、発がんに関連性の高い 4 環以上の PAH では回収率はほぼ 80% 以上となり、変動係数も約 10% 程度の良好な結果が得られた。この前処理過程を行なった場合、定量可能と考えられるのは Pyrene(4 環)から、BghiP(6 環)までの 11 成分であった。PAH 類の GC-MS と HPLC-蛍光検出器の比較を行った結果、Pyrene 及び BaA ではほぼ同等の測定値が得られたが、BaP では GC/MS 法が HPLC-法よりも若干低い値を示す傾向があった。主流煙中 PAH 類の GC/MS による測定結果から、各銘柄とも主流煙 1 本あたりの PAH 量は ISO 法で得られた試料より HCl 法で得られたものが大変に高い濃度を示した。また、各成分の濃度は、IARC より報告されている濃度とほぼ同じレベルであった。今回測定した 11 種の PAH の存在比率は喫煙条件の違いではあまり変わらないことや Pyrene, BaA 及び Chrysene が主成分であることが判った。基本データのタール量やニコチン量が多い試料では PAH 濃度が高い状況であったため、そのニコチン量と今回測定した PAH 濃度との関係を調べたところ、ニコチン量と総 PAH 濃度はどちらの喫煙条件でも良い相関が認められた(ISO 法:  $R^2 = 0.845$ 、

HCl 法:  $R^2 = 0.682$ )。

### 3.3 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のニコチン、タール及び 2-プロパノール抽出物の変異原性

ニコチン及びタール量測定結果から、ISO 条件による測定結果はたばこ試料のパッケージに表示されている値とほぼ一致していた。これに対して、HCl 条件による測定結果は、測定したすべての銘柄で ISO 条件による測定結果よりも高い値を示した。3 ロットの相対標準偏差 (RSD) は、TPM では 1.2% (最小) ~ 22.4% (最大)、ニコチンでは 1.1~15.8%、水分では 3.3~58.3%、タール量では 1.5~27.7% であった。一般的に、水分の RSD は TPM やニコチン、タールのそれより高い値を示すことが報告されており、今回の測定結果と同程度であった。

変異原性試験結果から、たばこ試料の変異原性は、主に TA98 及び YG1024 に対して、S9mix 添加条件下で認められた。試験に供したすべての銘柄がフレームシフト型の突然変異を検出する菌株 (TA98 及び YG1024) に対して、S9 mix 添加条件下で変異原性が認められたのに対し、S9 mix 無添加条件下では殆どの試料で変異原性が認められなかった。塩基対置換型の突然変異を検出する TA100 株に対して、S9 mix 無添加条件下では被験 20 試料中 9 試料が陽性、7 試料が擬陽性、4 試料が陰性となった。また S9 mix 添加条件下では被験 20 試料中 7 試料が陽性、8 試料が擬陽性、5 試料が陰性となった。10 銘柄のうち最も高い活性を示した銘柄は YG1024+S9 で、たばこ 1 本当りの復帰突然変異コロニー数は 205,000 であった。

### 3.4 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/HCl 条件の試料であった。

### 3.5 海上自衛隊における分煙効果に関する研究

自衛隊病院におけるニコチン及び PAH 濃度測定結果から、定量下限値未満の試料が多い一部 PAH では変動係数が大きくなっているものもあるが、ニコチンや代表的な発がん物質である BaP では比較的定量性の良好な結果が得られ、測定地点間の濃度比較に使用できることが判った。喫煙区画のニコチン濃度は、他の地点の平均値より高いことが認められ、各々喫煙区画との間に有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。一方 BaP 濃度は、喫煙所内部と大気及び非喫煙区画との間に有意差が認められなかった。

護衛艦においては、前部洗面所と後部の洗面所 2 箇所が喫煙所に設定されているが、ニコチンは定量性の良好な結果が得られ、測定地点間の濃度比較に使用できることが判った。しかし、境界及び非喫煙区画において、BaA、BaP、dBahA、BbC、BghiP 及び dBaeP は、測定値のほとんどが定量下限値未満となり、変動係数が大きくなっているものもあった。BaP に関しては、境界と非喫煙区画の定量性が低かったため、BkF を用いて測定地点間の濃度比較を行うこととした。ニコチンの濃度は、後部洗面所に設けられた閉鎖型空間の喫煙区画の平均で  $25.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であり、他のいずれの地点よりも有意に高かった ( $p < 0.001$ )。また、境界は  $0.39 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (喫煙区画の 1/60 の濃度) であった。また、境界と非喫煙区画の間にもかなり明確な有意差が認められ ( $p < 0.001$ )、非喫煙区画は  $0.025 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (喫煙区画の 1/1000 の濃度) であった。また、BkF 濃度に関しても、喫煙区画と境界、及び喫煙区画と非喫煙区画の間に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。境界と非喫煙区画において有意差はないが、非喫煙区画は  $0.04 \text{ ng}/\text{m}^3$  で境界の  $0.06 \text{ ng}/\text{m}^3$  よりも低かった。

潜水艦においては、後部の密閉区画が喫煙所に設定されている。護衛艦同様、ニコチンについて

は定量性の良好な結果が得られ、測定地点間の濃度比較に使用できることが判った。一方、境界と非喫煙区画における BaP、dBahA、BbC、BghiP 及び dBaeP は、測定値のほとんどが定量下限値未満となったため、護衛艦同様 BkF を用いて測定地点間の濃度比較を行うこととした。

潜水艦におけるニコチン濃度は、閉鎖型空間となっている喫煙区画の平均は  $9.51 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であり、他の艦内いずれの地点よりも有意に高かった ( $p < 0.001$ )。また、境界では  $0.08 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (喫煙区画の 1/120 の濃度) であった。一方、非喫煙区画は  $0.07 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で、境界との間には有意差が認められなかった。また、BkF 濃度に関しても、喫煙区画の濃度が高く、他のいずれの地点よりも有意に高かった ( $p < 0.05$ )。さらに、潜水艦の喫煙区画の BkF や BaP の濃度は、他の 3 施設の喫煙区画と比較してほぼ同程度であったが、Py と BaA の濃度は数倍程度大きい値であった。

## D. 考察

### 1. TobLabNet ラウンドロビン研究

TobLabNet ラウンドロビン研究においては、試験用のたばこ試料を用いるため、実際に含有される化学物質量の“真値”を求めることははなはだ困難である。そこで本研究目的に応じて、コンセンサスミーンを算出し、これをもって精確さを表すための真値と定義することとした。コンセンサスミーンを見出すために、所定の手順に従うことが可能であった機関の全データを一括してプールし、このプールされたデータから外れ値を検出し除外する操作を、外れ値が無くなるまで繰り返すこととした。外れ値の定義は、平均値から±標準偏差の 2.58 倍以上逸脱する値とした。すなわち、外れ値検出の確率率は約 1% である。

ISO 法は歴史的に蓄積された報告例も多数あり、良好な再現性が得られているのに対し、HCl 法は歴史も浅くそれに見合った標準法とはなっていないという指摘がある。ISO 及び HCl 両喫煙条件を用いて分析が実施された機関による ISO 法と HCl 法の比較結果から、6 例中 5 例が HCl 法よりも ISO 法を用いた場合に平均相対標準偏差が高くなっていた。またいずれの場合も、HCl 法と

ISO法の相対標準偏差の差異はさほど大きなものではなかった。

HCI法とISO法間の相対標準偏差の差異は、1R5Fたばこを分析した場合の方が大きく、通気孔を遮蔽することによって煙の供給量が増加することや、ISO条件下では煙発生量が非常に低くなっている1R5Fたばこにおいても、HCI条件下では吸引回数が増加することが示唆された。

自動喫煙装置にはリニア式とロータリー式2種類のタイプがあるが、このような装置の違いが測定データ変数(CO、タール、ニコチン)の平均及び分散(変動)の決定要因となりうるか検討した。この検討を実施するため、リニア式喫煙装置の全データとロータリー式喫煙装置の全データを一緒にプールした。リニア式対ロータリー式の平均値の差を比較するため、t検定を用いて有意差を求め、平均値に対する95%信頼区間を算出した。その結果、大部分の分析対象物質、評価に用いたたばこ、及び喫煙条件に対して、両者の間に統計的に有意な差異があることが認められた。この差異の一部は統計学的な検出力に起因するもので、比較的大規模な参加機関の数に由来するサンプル数により分析が行われたことが関係しているものと思われる。その差異は統計的には有意なものではあったが、殆どすべての場合その差異の大きさは僅かなものであったことに留意すべきであると考えられた。

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HCI法で高い濃度であり、測定精度の指標となるRSDも、ISOよりHCI法が優れていることが明らかとなっている。第2回ラウンドロビンは、HCI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。

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( $\sigma$ )以内(1R5Fのタール及びマルボロレッドのニコチンのみ2 $\sigma$ 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2 $\sigma$ 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 < マルボロゴールド < 3R4F < マルボロレッド < 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、マルボロゴールドはキャンピングマイルド、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、マルボ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。

第2回ラウンドロビンに使用した5銘柄についてHCI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HCI/ISO比を算出したところ、HCI/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、傾向を示すことがわかった。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。

## 2. アジア太平洋たばこ研究

アジア太平洋たばこ研究のアンケート集計結果によれば、電話による問い合わせ総数は86名であった。そのうち適格者は19名であり、不適格者は67名であった。不適格者理由の54名は銘柄違いによるものであった。1日の喫煙本数について16-20本が最も多い結果であった理由は、おそらく1日1箱を目安に喫煙をしていると考えられる。習慣的に喫煙を行なっている10%が、過去に禁煙経験があり、現在も禁煙を計画していた。起床後、60分以内に85%の喫煙者が、喫煙をすることからたばこの依存性の高さが伺われた。現在の銘柄へ変更した理由の39%が健康志向のためとなっていた。これは、低タール、低ニコチンのたばこへの変更または、「マイルド」「ライト」といった名称への変更と考えられる。しかし、これまでの報告にもあるように、低タール、低ニコチンのたばこであっても深く、強く吸い込むことにより、高タール、高ニコチンのたばこと代わらない吸入を行なっている可能性があるため、CReSSmicroにより評価を進めていくことが重要である。また、たばこのパッケージにも記載されているように「名称が健康への悪影響を低い製品であると示しているものではない」ことを再認識する必要もある。また、風味の変更が半数近いことから、たばこの嗜好の多様化が起り、それに対応するようにたばこ会社が開発を進めていることと考えられる。これまで銘柄の変更を行なったことがない喫煙者が、32名いたことから、銘柄決定の理由を得ることにより新たな知見が得られると考えている。本研究に使用した対象たばこの特性から、タール、ニコチン量が低い銘柄であるB,Cは通気孔数が100-200であり、タール量が多い

銘柄の通気孔数より多い傾向が得られた。10銘柄市場のシェアと本研究での対象者シェアが近い傾向を示した。本研究において使用した主要10銘柄中8銘柄がチャコールフィルターを使用しており、国産銘柄でのチャコールフィルターの使用率が高いことを示唆している。今後、得られた測定結果をもとにチャコールフィルターの効果についても評価していく必要があると思われる。

前述のように、喫煙者の実際の吸煙量はたばこの特性と関係していることがわかった。すなわち、低タール・低ニコチンたばこで、通気孔数が多いほど、吸煙量が増加する傾向を示した。これは、たばこの特性に応じて、喫煙者が満足するニコチン量を摂取するために、喫煙方法が変化することを示唆している。吸煙量と喫煙後のCO濃度とは、若干の正の相関の傾向が見られたが、明確な傾向は見られなかった。その理由として、COの体内における挙動が、体内に取り込まれるたばこ有害物質であるニコチンやその代謝物であるコチニンなどとは異なることが考えられる。低タールたばこを喫煙しても、高タールたばこを喫煙した場合と同程度の呼気中CO濃度を示すという報告もあることから、単回帰分析では明確な傾向が見られなかったと考えられる。実際の吸煙量と喫煙行動パターンとを比較した場合、吸引の強さ(通常の喫煙)を除いて、他の因子(1日の喫煙本数、CReSSmicro使用時の吸引の強さ、通常の喫煙時の吸入深さ、たばこの吸い方の強度とは正の相関の傾向を示した。このことから、喫煙時に主流煙を肺まで吸い込まずに口から吐き出す口腔喫煙よりも、主流煙を肺まで吸い込む肺喫煙の喫煙法で、かつ、自覚的な喫煙回数が多いほど、吸煙量が増加することが示唆された。また単回帰分析により、タール量の低いたばこほど、ニコチン量も少なく、通気孔数が多いデザインであることが示された。これは、実際のたばこデザインとも一致し、妥当な結果であった。自覚的な喫煙行動パターンの関係をみると、通常の喫煙とCReSSmicro使用時の喫煙の吸引の強さ、吸入の深さ、たばこの吸い方の強度に関して、各因子間の関係を調べた結果、それぞれ高い正の相関を示し、自覚的な喫煙行動パターンについては、一貫性があることが示唆され

た。重回帰分析の結果、実際のたばこの吸煙量、自覚的な吸煙回数、吸い込みの強さなどが多いほど、喫煙後の呼気中 CO 濃度が高くなることがわかった。これより、呼気中 CO 濃度は、喫煙行動のうち 1 日の喫煙本数よりも、1 本のたばこをどのように喫煙するかといったその喫煙法に関係することが示された。また、喫煙後の呼気中 CO 濃度は、たばこの通気孔数に依存するという結果が得られ、通気孔数が多いほど通気孔からの流入空気により希釈され、結果として CO 取り込み量が減少するという、たばこ特有のデザインも関係することが判った。しかし、この結果が CO 以外のたばこ由来化学物質の曝露量が同じ様に低下するか否かは、今後の検討が必要である。その一例として、喫煙後の呼気中 CO 濃度とたばこ表示タール量の関係から、低タールたばこであるにも関わらず、高タールたばこと同程度の CO 濃度に達する喫煙者がいることが判る。一般的に、低タール・低ニコチンのたばこほど通気孔数の多いデザインであるが、単回帰分析の結果、喫煙法として通気孔数の多いデザインのたばこを用いる喫煙者ほど、吸煙量が増加する傾向があった。実際に体内に取り込まれるタール量は測定できないため、CO をその代替指標とする報告例もある (CO とタール間の相関係数は 0.94)。これらのことから、通気孔数の多いたばこを喫煙しても、その吸煙量が多ければ、体内へ取り込まれる化学物質も増加し、たばこパッケージに記載されているタール量やニコチン量とは独立した取り込み挙動が推測された。

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 をしていることが分かった。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 倍多いことが分かった。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のコチニン量を測定した他の研究と同様の傾向を示した。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。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  $22.4 \pm 10.0$  (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れず、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吸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、低ニコチンたばこと定義づけをした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吸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。

### 3. 新しい測定手法に関する研究

ニコチン分析に用いるGC/MS分析用カラムの最適条件を求めることを目的として、極性の異なる2種類のキャピラリーカラムを用い、ピーク形状や検出感度などについて比較検討を行った。クロマトピークの形状はベル型の正規分布形状が理想とされ、その目安としてピーク形状の非対称性を数値化したAsymmetry factor (ASF)やTailing factorなどが用いられている。今回はASFを指標として、微極性のDB-5MSと中極性のDB-17の両カラムの比較を行った。国際純正応用化学連合ではASFを「ピークの頂点から基線に垂線を下ろしたとき、下から10%高さの位置におけるピーク幅を、垂線によって分割された後半の線分の長さを前半のそれと除した値」と定義されている。数値が1に近いほど対称性の良いピーク形状であることを示し、米国EPAの基準では0.8~2.0の範囲内であることが推奨されている。測定対象とした3物質(ニコチン、4-エテニルピリジン、イソキノリン)とともにDB-17カラムはEPAの基準を満たしており、DB-5MSよりも良好な結果を示した。ま

た検出感度の面でも、定量下限値や検量線の比較検討結果から、両カラムとも比較的高感度に分析できることが判ったが、ニコチンの定量下限値は、DB-5MSよりもDB-17の方が1/2程度となり、高感度に定量できることなどから、総合的に判定してDB-17の方が適していることが示唆された。

このDB-17カラムを用いたたばこ煙(主流煙及び副流煙)中のニコチン及び4-エテニルピリジンの同時分析を行ったところ、ニコチンは主流煙のガス状成分を除く3試料で検出されたのに対し、4-エテニルピリジンは副流煙のガス状成分のみで検出された。4-エテニルピリジンはニコチンよりも含有量が低く主にガス相中に存在することが示唆され、今後これらの指標物質を併用してETSの影響を調べる場合、ガス状成分の捕集量や方法にも留意する必要があると考えられる。またニコチンは主流煙のガス状成分からは検出されなかったが、副流煙のガス状成分では主流煙の粒子状成分に匹敵する濃度が検出されており、通常の粒子状成分の採取ばかりでなく、ガス状成分を採取し分析する必要があることが示唆された。

主流煙中に含まれるPAH類のGC/MSによる測定について検討したところ、たばこ煙試料は妨害物質が非常に多く、シリカゲルカードリッジなどによる前処理が必要であった。添加回収試験から、3環以下のPAH類では回収が低くなり、シリカゲルカートリッジ処理濃縮操作による損失が考えられた。また、測定可能と判断された成分はPyrene等4環以上の11成分であった。今回検討したGC/MS法はHPLC法ともほぼ良好な相関関係を示すことが認められた。以上のことから、たばこ煙中で発がんに関連性の高い4環以上のPAH化合物の多成分一斉分析がGC/MS法でも可能であることが認められた。たばこ10銘柄のISO法及びHCl法で得られた試料の測定結果を比較すると、ISO法に比べ実際の喫煙条件に近いHCl法でPAH濃度は高い濃度となったが、どちらの条件においても、Pyrene, BaA及びChryseneなどの主成分存在比率はあまり変わらなかった。また、得られた総PAH濃度とニコチン濃度(基本データ)の関係から、ニコチン量が多いたばこの銘柄ほど高濃度のPAHが主流煙中に含まれていることも認めら

れた。HCl法で高い総PAH量を示した原因のひとつとして、HCl法ではフィルター部の穴を塞いだ形で試験しており、主流煙の希釈がISO法の場合よりも低くなったことが考えられた。更に、HCl法では、たばこ燃焼部の空気供給量が増えており、燃焼部での温度もISO法の場合よりも高くなっていったものと考えられる。従って、フィルター部の穴を塞いだ様なHCl方式による喫煙は、当該物質の曝露リスクを大幅に上昇されるものと思われた。

わが国初のフィルター付たばこ銘柄「ホープ」が発売されたのは1957年だが、国内でフィルター付たばこのシェアが増大し始めたのは比較的最近のことである。1960年フィルター付たばこの国内シェアは3%に過ぎなかったが、以降そのシェアは諸外国に比べて急激に増大し、1973年には96%にまで達している。このような装置測定によるタール量やニコチン量が低減化された背景には、たばこ産業による製品加工、特に高性能フィルターチップや、通気孔による空気希釈、通気性のよい巻紙の使用などの変化が挙げられている。本研究で測定対象とした10銘柄はいずれもフィルター付たばこであり、パッケージに表示されているニコチン量・タール量は、通気孔の数などに比例して低減化されている。我々の測定結果でも、ISO条件下ではパッケージ表示量とほとんど一致するものであった。これに対して、HCl条件による測定結果は、すべての銘柄でISO条件よりも高い値を示した。その比(HCl/ISO)は、ニコチン量では1.99(銘柄J)~5.11(B)、タール量では1.97(J)~14.96(A)となり、低用量銘柄ほどHCl/ISOの比率が高い値を示している。

たばこ喫煙に関するもう一つの問題は代償的喫煙行動である。喫煙者は低ニコチンまたはニコチン抜ききたばこには満足せず、そのニコチン吸入量を調整するためにその喫煙パターンを修正(1服の量を増やす、吸引回数を増やす、より深く吸い込む、フィルターを換気孔を塞ぐ、1日の喫煙本数を増やすなど)することが知られている。レギュラータイプの製品からライトタイプの製品に切り替える喫煙者の多くは、このような代償的喫煙行動を取り入れ、ライトタイプたばこを吸い続ける限り、このような行動を維持することとなる。

前述の「アジア太平洋たばこ研究」においても同様の結果が得られつつある。

今回試験した銘柄はいずれも代謝活性化によりフレームシフト型の突然変異を誘発し、その活性はISO法よりもHCl法で高い値を示した。その比(HCl/ISO)は、TA98に対しては1.5(銘柄G)~7.8(A)、YG1024株に対しては1.4(J)~9.1(A)となり、ニコチン量・タール量と同様に、低用量銘柄ほどHCl/ISOの比率が高い値を示している。国産たばこ主要10銘柄のタール量と、YG1024株S9mix添加条件下の変異原比活性を比較すると、タール量はISO及びHCl両条件ともにパッケージ表示量にしたがって増加している。一方、レギュラータイプの銘柄(I及びJ)の変異原比活性は、ライトタイプの銘柄(G及びH)のそれに比べてむしろ低い値を示した。特に、レギュラータイプの銘柄J(パッケージ表示タール量14mg)をHCl条件で捕集した場合の変異原比活性は、ライトタイプの銘柄G(8mg)やH(10mg)をISO条件で捕集した場合より低い値を示した。さらに、銘柄B(1mg)、C(3mg)、E(6mg)、G及びHをHCl条件で捕集した試料の変異原比活性は、銘柄JをISO条件で捕集した試料の変異原比活性より高い値を示した。これら銘柄(B、C、E、G及びH)は、銘柄Jのライトタイプのシリーズである。換言すれば、低タールと記されている、実際の喫煙者の行動様式に近いとされるHCl条件で捕集した場合、その変異原比活性はレギュラータイプの親銘柄と比較して低いものではない。これらの結果から、“低タール”と表示されてい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いていないことが示唆された。国産のフィルター付きたばこが諸外国のそれと大きく異なる相違点のひとつとして、チャコールフィルターの使用が挙げられる。今回試験に供したたばこのうち、銘柄IとJはともにパッケージに表示されたタール量が14mgであるが、それらの変異原比活性には若干の相違が認められた。銘柄Iは活性炭が入っていないブレンフィルターであり、Jはチャコールフィルターを使用している。同様の結果が、AとB(タール量は同じ1mgだが、ブレンフィルターとデュアルチャコールフィル

ターを使用)、FとG(タール量8mgだが、ネオチャコールフィルターとデュアルチャコールフィルター)においても認められた。これらの結果から、たばこ喫煙に伴い排出される化学物質の性状がフィルタータイプにより何らかの影響を受けていることが示唆された。

今回の試験結果から、たばこ主流煙に含まれる主要な変異原は、代謝活性化によりフレームシフト型の突然変異を誘発する物質(群)であることが示唆された。これらはまた、 $\alpha$ -アセチルアミノ転移酵素の存在により、その活性が増強されている。このような特性を有する代表的ながん・変異原性物質として、ヘテロサイクリックアミン類が挙げられる。しかしながら、今回試験に供した銘柄の中には、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、主に塩基対置換型突然変異を検出するTA100株に対して強い変異原性を示すものも認められた。これらの結果から、たばこ煙中にはヘテロサイクリックアミン類以外にも、ニトロソアミン特にたばこ特異的ニトロアミンなど、多種多様ながん・変異原性物質が存在されることが示唆された。

また、たばこ製品には風味の付与や保存性を目的として多くの添加物が使用されており、それらの中には、単独では無害であっても、燃焼に伴い他の物質との共存により、あるいは新たな燃焼産物となって有害化する可能性が懸念されている。したがって、たばこ企業には、パッケージに表示されたタール・ニコチン以外の更なる毒性情報の開示が望まれる。

前述のように、たばこ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HCI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たところ、主にTA98及びYG1024株S9mix添加条件下で認められ、いずれもHCI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、HCI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が判った。

DMSO抽出物の変異原性も、全体的な傾向として、いずれもHCI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、HCI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HCI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。HCI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HCI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、たばこ銘柄の総合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。

海上自衛隊における分煙効果に関する実態調査から、いずれの施設においても喫煙区画の喫煙による空気汚染が示唆された。

自衛隊病院Aにおいては、喫煙所を屋外に設けているため、ある程度効果的な分煙ができていますが、渡り廊下に喫煙区画の若干のニコチンが流入していることが示唆された。今回の測定結果から推定される流入量は、喫煙区画のニコチン濃度の17%であり、この渡り廊下を病院職員ばかりでなく一般患者も利用していることも考え合わせると、改善の余地があると考えられた。

一方、喫煙区画内部では喫煙に由来するBaP汚染が示唆されるものの、境界も含め非喫煙区画への汚染はニコチンほど明瞭ではないことが判った。この理由は必ずしも明確ではないが、BaPの汚染源は喫煙以外にも車の排気ガスや調理等があり、一般空气中に広く存在することが考えられる。すなわち、ETSとしてのBaPの室内環境濃度への

寄与率は5%程度と低く、特異性に欠けたことが一因であると考えられる。さらに、今回測定した大気中のBaP濃度は5日間の平均で0.14 ng/m<sup>3</sup>となっており、東京都環境局の報告値（平成16年の区部の1年平均値は0.22 ng/m<sup>3</sup>、世田谷区世田谷は0.18 ng/m<sup>3</sup>）と同程度か若干低い値であったが、大気浮遊粒子中のBaP濃度は、日間変動や季節間変動があるため、今回の測定値は妥当な値であると考えた。

自衛隊病院Bにおいては、回収吸殻が自衛隊病院Aの1/2の量だったのに対し、喫煙区画内のニコチン濃度は1/10となった。このことから、自衛隊病院Aが半閉鎖型の喫煙所であるのに対し、自衛隊病院Bは屋外階段で開放系の空間であるため、ニコチンなどの汚染空気が大気に拡散しやすいことが示唆された。また、喫煙区画と境界のニコチン濃度に有意差が認められた（p<0.001）が、境界は0.33 µg/m<sup>3</sup>（喫煙区画の1/4の濃度）であった。このことから、自衛隊病院Bでは、ある程度効果的な分煙ができているものの、喫煙区画の汚染空気の25%が流入していることが示唆された。これは、既存の空間を利用し、気流などの条件をあまり考慮していないためと考えられる。このような汚染を改善するためにはさらなる調査が必要であるが、常に非喫煙区画から喫煙区画に向けて風が流れる場所に喫煙場所を設置したり、人工的に気流を作りその風量を調整することも分煙の効果を上げる一助になると考えられる。

護衛艦においては、自衛隊病院2施設よりもニコチン濃度の希釈率が高く、効果的な分煙が行われていることが示唆された。これは、艦内換気により発生する前から後ろへの気流が奏効していると考えられる。換気により強制的に随時新鮮な空気が取り入れられるために、分煙がより一層効果的になっているためと推察された。しかしながら、喫煙区画として利用されている洗面所は、多数の隊員が利用する場所であり、非喫煙者の受動喫煙の機会が増えることを考え合わせると、改善の余地があると思われる。

潜水艦においては、今回測定した施設の中でもっともニコチン濃度の希釈率が高く、効果的な分煙が行われていることが示唆された。前述の護衛

艦とこの潜水艦の希釈率の差は、行動態様によって防水扉の開閉の割合がそれぞれ異なることによる密閉性の差違があらわれたと推察された。

## E. 結論

### 1. TobLabNet ラウンドロビン研究

TobLabNet ラウンドロビン研究の第1回目として2種類の研究用たばこについて従来の国際標準試験法であるISO法及びHCI法の2種類のサンプリング法を用いてTNCOの測定が行われた。その結果、主流煙中のタール、ニコチン、及び一酸化炭素は、いずれもISO法よりHCI法で高い濃度であった。喫煙条件・測定対象が同一の場合、相対標準偏差はフル・フレイバーたばこと比較してウルトラ・ライトたばこの方が有意に高い値を示した。反対に、測定対象・たばこ銘柄が同一の場合、ISO及びHCI両条件とも相対標準偏差はほぼ同程度であった。また、リニア式装置とロータリー式装置の比較を行ったところ、大部分の分析対象物質、たばこ試料、及び喫煙条件に対して、両者の間に統計的に有意な差異があることが認められたが、その差異は僅かなものであり、統計学的な検出力に起因するものであることに留意すべきと考えられた。

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。

### 2. アジア太平洋たばこ研究

アジア太平洋たばこ研究の研究進捗状況と参加した喫煙者に関するアンケートを集計した。研究協力者総数は101名であり、男性が88名で、女性が13名であった。年齢構成は、30代がもっとも多く36名で、続いて40代の25名、20代の18名となった。60-65歳はもっとも少なく6名であった。1日の喫煙本数について16-20本が最も多く、1日1箱を目安に喫煙をしていると考えられた。喫煙者の10%が、過去に禁煙経験があり、現在も禁煙を計画していた。起床後、60分以内に85%の喫煙者が、喫煙をすることからたばこの依存性の高さが伺われた。現在の銘柄へ変更した理由の39%が健康志向のために行なっており、低タール、低ニコチンのたばこへの変更または、「マイルド」「ライト」といった名称への変更と考えられた。

アジア太平洋たばこ研究の予備的検討結果から、たばこ煙に含まれる化学物質が実際にどの程度体内に取り込まれているか、また喫煙の行動パターンがたばこのフィルターの形状と関係しているか等の問題を検討した。CRESSmicroから求めた実際の吸煙量に対するたばこの特性、呼気中のCO濃度、自覚的喫煙行動パターンの因子との関係について単回帰分析を行った結果、低タール・低ニコチンたばこで、通気孔数が多いほど、吸煙量が増加する傾向が認められた。また、口腔喫煙よりも肺喫煙による喫煙法で、かつ自覚的な吸煙回数が多いほど、吸煙量が増加することも示唆された。また、喫煙後の呼気中CO濃度に関して重回帰分析を行った結果、以下のような結論が得られた。

- ①呼気中CO濃度は、喫煙行動のうち1日の喫煙本数よりも、1本のたばこをどのように喫煙するかといったその喫煙法に關係する。
- ②通気孔数の多いたばこほど、呼気中CO濃度が減少する傾向にあり、たばこデザインがCO濃度と關係する。
- ③単回帰分析を行った結果と合わせて考察すると、低タール・低ニコチンたばこであっても、吸煙量などの喫煙法が強くなることにより、たばこ由来化学物質の曝露量が増加することが示唆され、たばこパッケージに記載されているタール量やニコチン量とは独立した取り込み挙動が推測された。

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 HCl 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、HCl 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 喫煙者の唾液中ニコチン量及び呼気中 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、唾液中ニコチン濃度と呼気中 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ニコチン、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。

### 3. 新しい測定手法に関する研究

E T S の受動喫煙マーカーとなるニコチンや 4-エテニルピリジンの GC/MS 分析のカラムについて検討を行った。分析対象成分が極性物質であることから、微極性の DB-5MS と中極性の DB-17 を用いて比較検討した結果、ピーク形状や検出感度などを総合的に判断すると DB-17 カラムの方が DB-5MS よりも適していることが明らかとなった。この DB-17 カラムを用いてたばこ煙試料を分析した結果、ニコチンは主流煙のガス状成分を除く 3 試料で検出されたのに対し、4-エテニルピリジンは副流煙のガス状成分のみに検出された。

たばこ主流煙中 PAH の GC/MS 測定法について検討したところ、シリカゲル固相処理を行うことにより発がんに関連性の高い 4 環以上の PAH11 成分の測定が可能であった。検討した手法を用いて、ISO 法及び HCl 法で得られたたばこ主流煙に含まれる PAH 量を測定したところ、①ISO 法より HCl 法で得られた試料に含まれる PAH 濃度が高いこと、②基本データでニコチン量やタール量が多い銘柄ほど主流煙に含まれる PAH 濃度も高くなることが認められた。以上のことから、タール分の多い銘柄のたばこ喫煙は、人の健康への影響が大きいことが示唆された。また、主流煙中のニコチン量はフィルター部の穴の数にも影響されることも考えられたが、喫煙状態(条件)にも大きく影響されることが認められた。したがって、実際の喫煙状態やたばこ銘柄等を把握し、実状に合った試料採集や分析条件での評価が必要であると考えられる。

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について、ニコチン量、タール量を測定したところ、ニコチン及びタール量ともに HCl 条件で得られた試料の方が ISO 条件よりも高濃度であった。ISO 条件ではパッケージ表示量と同程度であった。一方それらの変異原性は、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た。最も高い活性を示した銘柄は H で、YG1024 株 S9 mix 添加