

けて単回帰分析を行った。その結果、Ultra low/Low たばこ喫煙者において喫煙因子との関連が認められた。これらについては Asami らが、喫煙と 8-OHdG の関連性についてヒトの肺細胞において認められることを報告している[13]。つまり肺細胞中の 8-OHdG/10⁵dG は、喫煙本数とプリンクマン係数との間に相関関係があり、特にプリンクマン指数とは、 $r = 0.525$ 、 $p < 0.05$ であった[13]。一方で、Medium/High たばこ喫煙者の尿中 8-OHdG は、どの因子とも関連性が認められていない。喫煙本数において有意差が $p = 0.054$ という結果であったことから考えると総吸煙量と関連性が認められなかった理由として、Medium/High たばこ喫煙者は吸煙量が低い人数が多く、この測定結果の精度が低いため、有意差が認められなかった可能性も考えられる。

本研究では、尿中 8-OHdG 濃度と喫煙との関連性は認められたが、喫煙の曝露因子である唾液中コチニンおよび呼気中 CO との関連性は認められていない。このことから、たばこ主流煙に含まれる、酸化ストレスの発生成成分であるラジカル/ガス成分/間接的にラジカルを発生させる可能性のある化合物等の更なる詳細な調査研究が望まれる。なお Yamaguchi らが、ラットにたばこ主流煙のガス成分を曝露したところ、血清中の 8-OHdG 濃度が経時的に上昇し、120 分後に最大 7.6 倍になったと報告している[14]。ヒトのデータではないが、たばこ主流煙ガス成分により 8-OHdG が増加することが確認されている。以上の報告なども勘案し、今後は、ガス成分代謝物との関連性や別の酸化ストレスマーカーとの関連性も評価する必要があると考えている。

E. 結論

本研究は日本人喫煙者 98 名と非喫煙者 47 名の尿中 8-OHdG の測定及び喫煙に関する因子との解析を行った。喫煙の有無による影響評価において、

非喫煙者と喫煙者の尿中 8-OHdG 濃度は、 3.58 ± 1.90 、 4.85 ± 2.54 ng/mg Creatinine であり、喫煙者の濃度が有意に高いことが認められた。この結果は、従来の ELISA 法と比較して精度の高い機器分析法を用いたことによる成果だと考えられる。次に、日本人喫煙者における尿中 8-OHdG 濃度と各種要因との単回帰分析を行った。その結果、関係性が認められた因子は喫煙本数、プリンクマン指数と総吸煙量の 3 つであった。一方、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かった。日本人喫煙者の 8-OHdG 濃度は、たばこのタール・ニコチン表示量に関連することなく、1 日の総吸煙量に関連性が認められた。特に、この傾向は、0.6 mg/cig.未満のニコチンたばこ喫煙者に確認された。一方、唾液コチニン量、呼気中 CO 濃度との関連性は認められなかった。

一般的に、8-OHdG はマーカーとされることが多い。本研究の結果からは、尿中 8-OHdG が喫煙の影響を評価するのに有効な間接的なマーカーであることが示唆された。

[引用文献]

- [1] Hammond D, Fong GT, Cummings KM and Hyland A, Smoking topography, brand switching, and nicotine delivery: results from an in vivo study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2005) **14**, 1370-1375.
- [2] Jarvis MJ, Boreham R, Primatesta P, Feyerabend C and Bryant A, Nicotine yield from machine-smoked cigarettes and nicotine intakes in smokers: evidence from a representative population survey. *J Natl Cancer Inst* (2001) **93**, 134-138.
- [3] Piliger A, Rüdiger H. W, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environment exposure. *Int Arch. Occip. Environ. Health* (2006) **80**, 1-15.

- [4] 大澤俊彦、大東肇、吉川敏一、がん予防食品、シーエムシー (1999)
- [5] 齋藤秀、山内博、蓮井ゆり、蔵重淳、越智宏倫、吉田勝美、ELISA 法による尿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの定量法、臨床検査 (2000) **44**, 913-916.
- [6] Lengger C, Schoch G and Topp H, A high-performance liquid chromatographic method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine from man and rat. *Anal. Biochem.* (2000) **287**, 65-72
- [7] Inaba Y, Mizushima N, Kimura J, Ito N, Yokoyama K and Karube I, Improvement of urinary 8-OHdG measurement method which combines solid phase extraction. *Chemical Sensors.* (2007) **23**, 118-120.
- [8] 鈴木元、アジア太平洋たばこ研究－研究の概要とアンケート集計結果－、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の新しい国際標準化試験法に関する研究平成19年度総括・分担研究報告書 (2008) 12-44.
- [9] 鈴木元、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－、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 (2009)
- [10] Nakano M, Kawanishi Y, Kamohara S, Uchida Y, Shiota M, Inatomi Y, Komori T, Miyazawa K, Gondo K, Yamasawa I, Oxidative DNA damage (8-hydroxydeoxyguanosine) and body iron status: A study on 2507 healthy people. *Free Radic Biol Med.* (2003) **35**, 826-832.
- [11] Irie M, Tamae K, Iwamoto-Tanaka N, Kasai H, Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci.* (2005) **96**, 600-606.
- [12] Mizoue T, Kasai H, Kubo T, Tokunaga S, Leanness, smoking, and enhanced oxidative DNA damage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2006) **15**, 582-585.
- [13] Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai, Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* (1997) **18**, 1763-1766.
- [14] Yamaguchi Y, Nasu F, Harada A, Kunitomo M, Oxidants in the gas phase of cigarette smoke pass through the lung alveolar wall and systemic oxidative stress. *J Pharmacol Sci.* (2007) **103**, 275-282.

F. 研究発表

稲葉洋平

1. 論文発表

1) Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Matsumoto, M.; Suzuki, G. Reductive Amination of Aldehyde 2,4-Dinitrophenylhydrazones Using 2-Picoline Borane and High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* 2009, **81**, 485-489.

2) Uchiyama, S.; Naito, S.; Matsumoto, M.; Inaba, Y.; Kunugita, N. Improved Measurement of Ozone and Carbonyls Using a Dual-Bed Sampling Cartridge Containing trans-1,2-Bis(2-pyridyl)ethylene and 2,4-Dinitrophenylhydrazine- Impregnated Silica. *Anal. Chem.* 2009, **81**, 6552-6557.

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 International Organization for Standardization and Health Canada

Intense Regimens of Major Japanese Cigarette Brands.
J. Heath Sci. 2009, 55, 421-427.

2. 学会発表

- 1) 内山茂久; 稲葉洋平; 松本真理子; 鈴木元 2-ピコリンボランを用いたカルボニル 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの還元的アミノ化と高速液体クロマトグラフ分析 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月, 日本大学, 日本化学会第 89 春季年会講演予稿集 (CD-ROM)
- 2) 内山茂久; 松本真理子; 稲葉洋平; 鈴木元 アルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの還元的アミノ化と高速液体クロマトグラフ分析 第 18 回環境化学討論会, 2009 年 6 月, つくば国際会議場, 第 18 回環境化学討論会講演要旨集 P120-121.
- 3) 内山茂久; 内藤季和; 稲葉洋平; 樺田尚樹 trans-1,2-ビス (2-ピリジル) エチレンと 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた空气中オゾンとカルボニル化合物の同時分析 第 50 回大気環境学会, 2009 年 9 月, 慶應義塾大学, 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集, p.321
- 4) 樽見和枝; 内山茂久; 稲葉洋平; 樺田尚樹 trans-1,2-ビス (2-ピリジル) エチレンを用いた拡散サンプラーによる空气中オゾンの分析 第 50 回大気環境学会, 2009 年 9 月, 慶應義塾大学, 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集, p.322
- 5) 山田智美; 樽見和枝; 内山茂久; 稲葉洋平; 樺田尚樹; 後藤純雄 室内環境におけるオゾンとアルデヒド類、およびギ酸の挙動 第 50 回大気環境学会, 2009 年 9 月, 慶應義塾大学, 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集, p.323
- 6) 稲葉洋平, 松本真理子, 大久保忠利, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 樺田尚樹, 鈴木元. 低タール・低ニコチン韓国産たばこと日本産たばこの比較. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 134.

- 7) 越田英史, 荒井理沙, 稲葉洋平, 太田敏博. タバコ副流煙に紫外線照射することで新たに現れる変異原性. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 134.
- 8) 遠藤治, 稲葉洋平, 松本真理子, 杉田和俊, 後藤純雄, 緒方裕光, 鈴木元. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原性. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 135.
- 9) 大久保忠利, 稲葉洋平, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 鈴木元, 樺田尚樹. 薬用吸煙剤の化学分析および変異原性. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 135.
- 10) 稲葉洋平; 内山茂久; 松本真理子; 樺田尚樹; 遠藤治; 緒方裕光; 鈴木元 8-OHdG 分析条件の改良および喫煙者・非喫煙者の尿中濃度の解析 日本薬学会 第 130 回年会, 2010 年 3 月, 岡山, CD 要旨集
- 11) 杉山晃一; 稲葉洋平; 大久保忠利; 内山茂久; 高木敬彦; 樺田尚樹 日本産たばこ主流煙の Tobacco specific-nitrosamine 測定法の検討 日本薬学会 第 130 回年会, 2010 年 3 月, 岡山, CD 要旨集
- 12) 大久保忠利; 稲葉洋平; 内山茂久; 樺田尚樹; 後藤純雄 尿中 1-hydroxypyrene の測定法の改良および喫煙・非喫煙者への適用 日本薬学会 第 130 回年会, 2010 年 3 月, 岡山, CD 要旨集
- 13) 内山茂久; 稲葉洋平; 樺田尚樹 ハイドロキノン含浸シリカおよび 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン含浸シリカを充填したカートリッジによる α, β -不飽和アルデヒドの分析 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月, 近畿大学, 日本化学会第 90 春季年会講演予稿集 (CD-ROM)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

竹田真由

1.論文発表

「臨床化学からみた喫煙障害 喫煙障害の分子機序」竹田真由、船渡忠男、他. 臨床化学, in press

2.学会発表

「GSTA1の一塩基変異の検出方法(MASPER法: modified allele specific primer extension reaction)について」竹田真由、船渡忠男、他. 第16回日本遺伝子診療学会, 2009.07

Table 1 Japanese cigarette of top ten selling brands, 2006.

Brand Name	Categorization	Tar (mg/cig.)	Nicotine (mg/cig.)	Market share (%)	
Pianissimo one	Ultra low	1	0.1	1.5	
Mild Seven One		1	0.1	4.3	a)
Mild Seven Extra lights	Low	3	0.3	3	
CASTER Mild		5	0.4	2.7	
Mild Seven Super lights		6	0.5	6.8	
CABIN Mild	Medium	8	0.6	1.9	
Mild Seven Lights		8	0.7	6.2	
Mild Seven Original		10	0.8	4.9	
HOPE	High	14	1.1	1.3	
Seven Stars		14	1.2	6.8	a)

a) Shares include box type package

Table 2 Characteristics of 101 smokers.

Characteristic	Ultra low	Low	Medium	High
Male/Female	10 / 4	33 / 5	24 / 3	21 / 1
Age (year±SD)	39.2 ± 10.2	40.1 ± 12.6	41.9 ± 11.2	38.0 ± 8.0
Cigarette consumption (Cigarette/Day)	18.7 ± 8.3	17.8 ± 8.2	18.2 ± 6.6	19.3 ± 8.8
BMI (mean±SD)	22.2 ± 2.6	22.8 ± 3.0	23.9 ± 4.6	23.7 ± 4.5

Table 3 Pearson's correlation of smoker's urinary 8-OHdG with each parameter

Variable	Total		Ultra low / Low smokers		Medium / High smokers	
	r	p	r	p	r	p
Age (year)	0.136	0.181	0.264	0.061	-0.018	0.904
BMI (kg/m ²)	-0.108	0.290	-0.119	0.404	-0.084	0.573
Cigarette consumption (cigarette/day)	0.331 **	< 0.001	0.380 **	0.006	0.283	0.054
Brinkman index (cigarette/day X years)	0.280 **	0.005	0.445 **	< 0.001	0.086	0.564
Total puff volume (mL/day)	0.384 **	< 0.001	0.567 **	< 0.001	0.101	0.498
CO in expiratory breath (ppm)	0.099	0.334	0.229	0.106	-0.047	0.756
Salivary cotinine (ng/mL)	0.129	0.223	0.157	0.304	0.186	0.215

**p<0.01

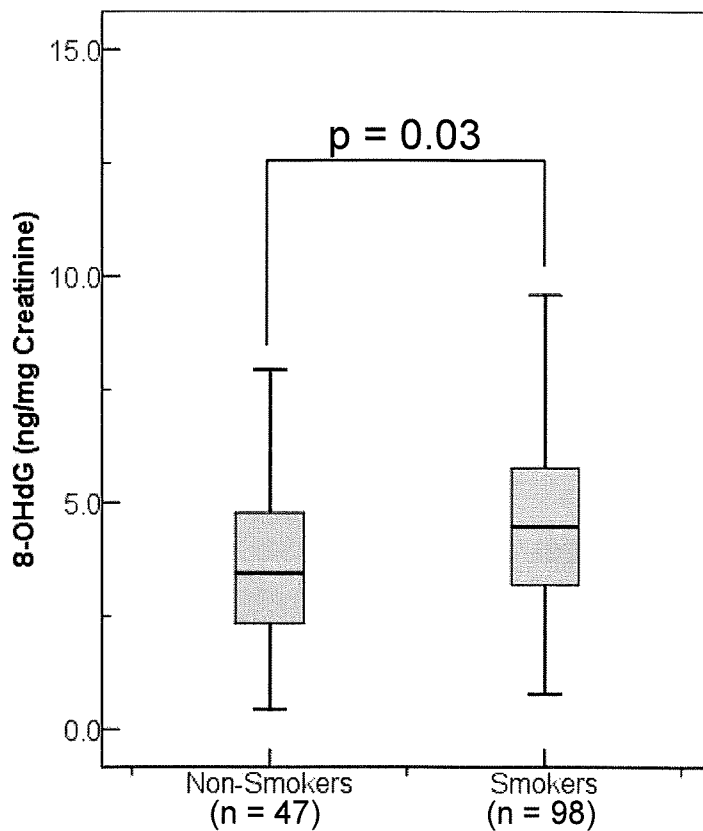


Fig. 1 8-OHdG concentration of Japanese non-smokers and smokers in urine.

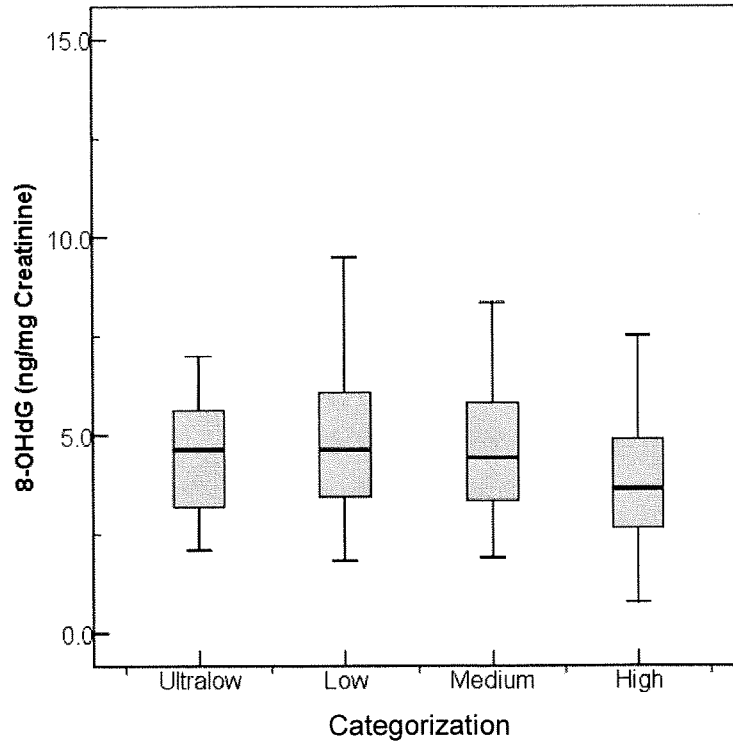


Fig. 2 Urinary 8-OHdG concentration by cigarette categorization.

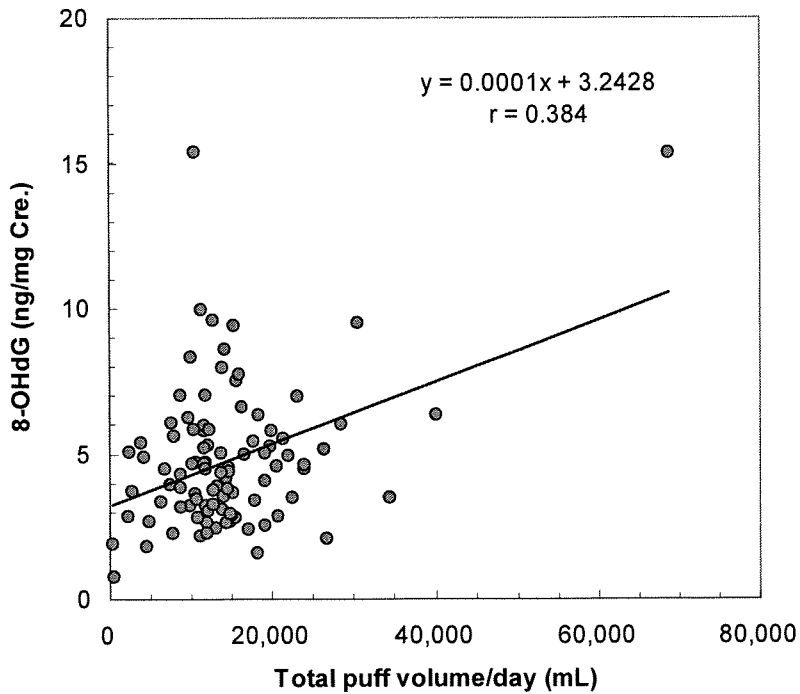


Fig. 3 Correlation of urinary 8-OHdG and Total puff volume of smokers

尿中1-Hydroxypyreneの測定法の改良および喫煙・非喫煙者の尿試料への適用

研究分担者 後藤 純雄 麻布大学
研究協力者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

研究要旨

発がんリスク低減対策に利用可能な尿中曝露マーカー測定法に関する研究の一環として、多環芳香族炭化水素類（PAH）の尿中曝露マーカー1-Hydroxypyrene（1-OHP）を取り上げ、その高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析法について蛍光検出（励起）波長と前処理抽出法を検討した。その結果、従来の励起波長を242 nmから347 nmとすると良好なクロマトグラムが得られること、ブルーレーヨン抽出から固相抽出に変更すると試料量の低減（1/5）や抽出時間の節約が可能となること、測定の変動係数も良好（2.7%）となることなどを認めた。この固相抽出—HPLC/蛍光検出法を非喫煙者10名及び喫煙者10名の尿試料に適用した結果、喫煙者尿の1-OHP濃度は0.07 - 0.51 $\mu\text{g/g}$, creatinine（平均値：0.21 $\mu\text{g/g}$, creatinine）となり、非喫煙者の0.04 - 0.24 $\mu\text{g/g}$, creatinine（平均値：0.09 $\mu\text{g/g}$, creatinine）よりも2倍程度高い値となることを認めた。また、喫煙本数と尿中1-OHP濃度間には良好な相関（ $r = 0.664$ ）も認められた。

A. 研究目的

有機物の不完全燃焼に伴って発生する多環芳香族炭化水素類（PAH）は、Benzo[a]pyreneに代表される発がん物質を含む重要な発がん関連物質群を構成している。数10種のPAHのうちPyreneはPhenanthreneやFluorantheneと共に比較的多量に発生するPAHであることから、尿中1-Hydroxypyrene（1-OHP）は労働環境や大気環境中のPAHの曝露指標として測定されてきた。特に、比較的安価なHPLC/蛍光検出法は尿中1-OHPの分離と高感度検出に優れ、コークオープン作業や喫煙者の発がん物質の曝露評価に多用されてきた[1, 2]。しかし、非喫煙者や燃料転換下の作業者の尿中当該物質を用いる曝露評価には更に高精度・高感度な1-OHPの分析法が必要となってきた。

そこで本研究では、現在多用されているHPLC/蛍光検出法を改良し、非喫煙者の尿中1-OHP分析に適用すべく検討した。

B. 研究方法

(1) 尿試料の採取

2009年に神奈川県相模原市の麻布大学の学生及び職員のうち喫煙者及び非喫煙者（各10名）合計20名に協力を募り被験者とした。今回の被験者は20歳から60歳の健常者であり、喫煙者については1日10本以上を喫煙している者とした。尿試料はプラスチックチューブ（50 mL容）2本に被験者自身が尿採取を行い、分析に供するまで-30 °Cで冷凍保存した。

試料採取と同時に喫煙習慣（自覚的なたばこの吸い方、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等について）や自宅周辺の環境に関するアンケート調査も行った。なお、本調査研究は国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認（NIPH-IBRA#09021）を受けた。

(2) ブルーレーヨンによる1-OHPの抽出

グルクロン酸の脱抱合：採取した尿を解凍後、尿25 mLに0.1 Mリン酸ナトリウム (pH = 6.8) 50 mLを加え混和後、 β -glucuronidase (100,000 units/mL, sigma-aldrich社製, Type IX-A ; from *E. coli*) 50 μ Lを添加して37°Cで12 h反応させて脱抱合を行った。

ブルーレーヨン抽出：脱抱合反応後、ブルーレーヨン0.5 gを浸漬し室温で20 min振盪して1-OHPを吸着させた(2回実施)。ブルーレーヨンを蒸留水で良く洗浄した後、ペーパータオルで水分を取り除いた。このブルーレーヨンにメタノール/アンモニア (100:1, v/v) 50 mLを加え、30 min、室温で振盪抽出を2回行った。抽出液を濾過後、減圧濃縮器で1 - 2 mLに減容し更に窒素気流下で溶媒を留去した。

ブルーレーヨン抽出液のクリーンアップ：抽出物をアセトニトリル/水 (1:1, v/v) 2 mLで再溶解し、予めメタノール (3 mL) と蒸留水 (3 mL) で活性化しておいた固相抽出カラム (YMC GEL 製担体ODS-A 500 mg及びSPELCO製3 mL容濾過チューブ)に通液した。続いて、アセトニトリル/水 (1:1, v/v) 1.5 mLを注入して夾雑物を洗い出した後、アセトニトリル5 mLで1-OHPを溶出した。溶出液を再度窒素気流下で溶媒留去して、アセトニトリル/水 (1:1, v/v) 500 μ Lで溶解して分析用試料とした。

(3) 固相抽出カラムを用いた1-OHPの抽出

抽出用溶液の調製：採取した尿を解凍後、尿5 mLに0.1 M酢酸ナトリウム (pH = 5.0) 1 mLを加え混和後、 β -glucuronidase/arylsulfatase (sigma-aldrich社製, Type HP-2 ; From *Helix pomatia*) 5 μ Lを添加して37°Cで14 h振盪反応した。

振盪後、反応液にメタノール6 mLを加え、混和静置してタンパク質成分等を変性させた。混和液を遠心分離機で変性物質を沈降させて、上澄み液を抽出操作に供した。

固相抽出：予めメタノール (5 mL) とメタノール/水 (50/50, 5 mL) で活性化した固相抽出カラム (SPELCO社製, Discovery[®] DSC-18) に上澄み液全量を導入し、メタノール/水 (50/50) 10 mLで洗浄、メタノール 4 mLで溶出を行った。溶出

液を再度窒素気流下で溶媒留去して、アセトニトリル/水 (1:1, v/v) 250 μ Lで溶解して分析用試料とした。

(4) HPLC/蛍光検出法による1-OHPの分析

1-OHPの分析は、以下の装置及び条件で行った。
HPLC : Agilent Technologies社製1100シリーズ

- ・オートサンプラー : G1313A
- ・分離カラム : Sunrise C28 (ChromaNik technologies社製 250 mm×4.6 mm I.D., 5 μ m)
- ・バイナリーポンプ : G1312A
- ・カラムコンパートメント : G1316A
- ・蛍光検出器 : G1321A

HPLC測定条件

- ・カラム温度 : 40 °C
- ・移動相 : アセトニトリル/水 (6:4)
- ・流速 : 0.7 mL/min
- ・注入量 : 100 μ L
- ・測定波長 : 励起波長 347 nm, 検出波長 388 nm

(5) 尿中クレアチニンの測定

被験者の尿中クレアチニンの測定はJaffé法に基づいた市販キットを用いて行った。

C. 研究結果

(1) HPLC/蛍光検出における励起波長の検討

これまでのHPLC/蛍光検出に汎用されていた1-OHPの励起波長242 nmについて尿の実試料クロマトグラムを比較して検討した。励起波長を242 nmのクロマトグラムと347 nmのそれを図-1に示してある。図-1の様に、励起波長を242 nmとした場合には多くのピークをもつ複雑なクロマトグラムとなったが、励起波長を347 nmとするとピークが少なくなり1-OHPのピークを含む良好なクロマトグラムが得られた。この条件で1-OHPの標準溶液を測定したところ検出下限値は0.02 ng/mL (S/N = 5), 定量下限値は0.05 ng/mLとなり高い検出感度が得られた。このことから以下の検討では蛍光励起波長をこれまでに汎用されていた242 nmから347 nmに変更した。

(2) ブルーレーヨン及び固相抽出法の検討

5種類の尿試料25 mLに1-OHPを2.5 ng加えて、ブルーレーヨン抽出による添加回収試験を行った。更に、1種（混合）の尿試料についてはオクタデシルシリカ系の固相抽出を5回行い添加回収試験を行った。その結果、ブルーレーヨン抽出では平均で73%と比較的良好な回収率が得られたが、固相抽出では更に高い回収率95.7%が得られ、この回収率から求めた変動係数も2.7%となり極めて良好であった。

(3) 固相抽出—HPLC/蛍光検出法の適用

本手法を用いて非喫煙者10名及び喫煙者10名の尿試料を測定した。また、各試料の尿中クレアチニン濃度も測定し、尿中1-OHP濃度の補正に用いた。得られた結果を図-2に示す。図-2から、非喫煙者の尿中1-OHP濃度と喫煙者のそれらとの差が認められ、喫煙者尿の1-OHP濃度は0.07 - 0.51 $\mu\text{g/g}$, creatinine（平均値：0.21 $\mu\text{g/g}$, creatinine）となり、非喫煙者の0.04 - 0.24 $\mu\text{g/g}$, creatinine（平均値：0.09 $\mu\text{g/g}$, creatinine）よりも2倍程度高い値となった。さらに、1日のたばこ喫煙本数と1-OHP濃度との直線回帰を行ったところ、相関係数 $r = 0.664$ と良好な値が得られた。

D. 考察

これまでのHPLC/蛍光検出法による1-OHP分析法の検討では、1-OHPの標準溶液を励起及び蛍光波長の検討に用い、次いで尿試料への適用で確認するという順序で行われてきた。標準溶液では励起波長242 nmが最も検出感度が高くなること[3]から同波長が尿試料でも採用されてきた。しかしながら今回の検討のように尿の実試料の測定では夾雑物のピークとの重なりが多いため低濃度の1-OHPのピーク検出に難点を伴っていたと思われる。今回の検討ではこの励起波長を長波長にシフト（347 nm）したところ、明瞭なピークが検出でき1-OHPの検出能を上げることが可能となった。

一方、ブルーレーヨンを用いた試料抽出では比較的多量の試料及び溶媒と抽出時間が必要となるほか、銅フタロシアニン系誘導体などの夾雑物を除去するため別種の固相抽出カラムで精製しなけ

ればならない難点があった。今回検討したオクタデシルシリカ系の固相抽出では、試料尿量が5 mL程度となりブルーレーヨンを用いる手法の約1/5量に削減可能となった。また、抽出時間も1 h程度と短く、夾雑物の洗浄では物性の差を利用して、50%メタノールで簡易に除去可能となった。なお、これまでも尿中1-OHPのHPLC/蛍光検出法ではカラムスイッチングなどが検討され、更に近年ではSep-Pak C₁₈カラムを用いる固相抽出手法が定着しつつある[4]がこれらの場合でも10 - 25 mLの尿試料量を必要としている。

各10名の喫煙者・非喫煙者の尿試料を対象としてパイロット調査した結果、すべての尿試料（5 mL）中の1-OHP測定が可能であった。更に、当該物質濃度の差異及び喫煙本数との関連も示唆された。今回はChromaNik technologies社製C28カラムを使用しており、この担体は官能基に長鎖アルキル基を固定することで水分が多い移動相での安定した保持が得られる特徴があり、1-OHPの保持と分離能が良くなって今回の様な結果が得られたものと思われる。

今後、尿中の複数のPAH代謝物の測定や他のたばこ喫煙マーカーとの関連などのについて検討していく予定である。

E. 結論

発がん物質の曝露実態把握のための基礎資料作成は発がんリスク低減対策に極めて重要である。本研究では有機物の不完全燃焼に伴って発生するPAHの尿中曝露マーカー1-Hydroxypyrene (1-OHP)を取り上げ、そのHPLC分析法について蛍光検出（励起）波長と前処理抽出法について検討した。その結果、従来の励起波長242 nmを347 nmとすると良好なクロマトグラムが得られること、ブルーレーヨン抽出から固相抽出に変更すると試料量の低減（1/5）や抽出時間の節約が可能となること、測定の変動係数も良好（2.7%）となることなどを認めた。この固相抽出法—HPLC分析法を非喫煙者10名及び喫煙者10名の尿試料に適用した結果、喫煙者の1-OHP濃度は0.07 - 0.51 $\mu\text{g/g}$, creatinine（平均値：0.21 $\mu\text{g/g}$, creatinine）となり、非喫煙者の濃度0.04 - 0.24 $\mu\text{g/g}$, creatinine（平均値：0.09 $\mu\text{g/g}$,

creatinine) よりも2倍程度高い値を示すことや喫煙本数と尿中1-OHP濃度間の良好な相関 ($r = 0.664$) が認められた。このことから、たばこ喫煙などのPAHの曝露実態の基礎資料作成に本固相抽出法—HPLC分析法が有効であると考えられる。

F. 引用文献

- [1] Qui L, Leng S, Wang Z, Dai Y, Zheng Y, and Wang Z: Path Analysis of Biomarkers of Exposure and Early Biological Effects among Coke-Oven Workers Exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**(6), 1193-1199.
- [2] Siwińska E, Mielżyńska D, and Kapka L: Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers. *Occup Environ Med*, 2004, **61**(3).
- [3] Kawamoto T, Yang M, Kim YD, Kim H, Oyama T, Isse T, Matsuno K, Katoh T, and Uchiyama I: Effects of Lifestyle on Urinary 1-hydroxypyrene Concentration. *J Occup Health*, 2007, **49**, 183-189.
- [4] Jongeneelen F J, Anzion R B M, and henderson P T: Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J Chromatogr*, 1987, **413**, 227-232.

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Goto S, Ogata H, and Suzuki G: Nicotine, tar and mutagenicity of mainstream smoke generated by machine smoking with International Organization for Standardization and health Canada intense regimens of major Japanese cigarette brands. *J Health Sci*, 2009, **55**(3), 421-427.
- [2] Goto S, Nagaosa D, Kageyama S, Nakajima D, Mineki S, Yamamura T, Endo O, Kohzaki K, and Takagi Y: Mutagenicity and PAH Content of Soil in Forests or Planted Areas. *Bul. Environ Contam*

Toxicol, 2009, **83**(5), 742-746.

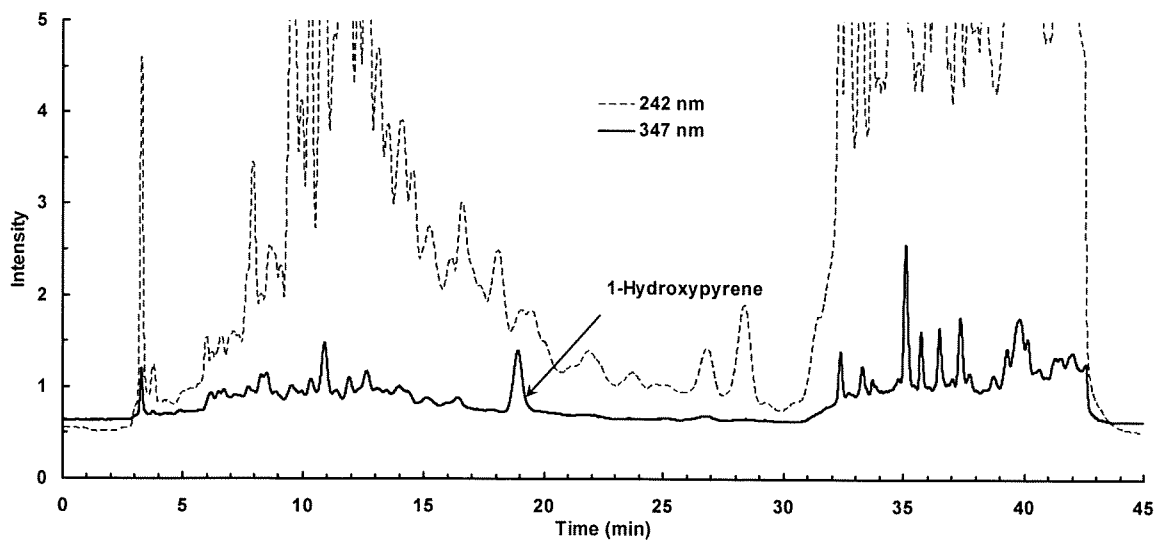
- [3] Nakajima D, Tsukahara S, Hojo R, Kageyama S, Goto S, Shiraishi H, Shiraishi F, and Fujimaki H: Measurement of Toluene Concentrations in the Blood of Fetuses of Pregnant Rats Exposed to Low Concentration Toluene using Headspace - Solid Phase Micro Extraction - Gas Chromatograph-Mass Spectrometry, *J Health Sci*, 2009, **55**(1), 50-55.

2. 学会発表

- [1] 山田智美, 樽見和枝, 内山茂久, 稲葉洋平, 櫻田尚樹, 後藤純雄: 室内環境におけるオゾンとアルデヒド類, およびギ酸の挙動, 第50回大気環境学会, 2009年9月, 慶應義塾大学, 第50回大気環境学会年会講演要旨集, p. 323.
- [2] 大久保忠利, 稲葉洋平, 内山茂久, 櫻田尚樹, 後藤純雄: 尿中1-hydroxypyreneの測定法の改良および喫煙・非喫煙者への適用, 日本薬学会第130回年会, 2010年3月, 岡山, CD要旨集.
- [3] 遠藤治, 稲葉洋平, 松本真理子, 杉田和俊, 後藤純雄, 緒方裕光, 鈴木元: 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙DMSO抽出物の変異原性, 日本環境変異原学会, 2009年11月, 静岡, 第38回大会, プログラム・要旨集, p. 135.
- [4] 松本陽子, 戸塚ゆ加里, 増田修一, 加藤達也, 能美健彦, 後藤純雄, 杉村隆, 若林敬二: ナノ粒子により誘発されるin vivo遺伝毒性, 日本環境変異原学会第38回大会, 静岡, 2009年11月26・27日, プログラム・要旨集, p. 134.
- [5] 兼島公香, 平野幹尚, 中島大介, 稲葉洋平, 内山茂久, 後藤純雄: 木材等の不完全燃焼に伴うレテンの生成について, 炭と環境, 炭と微生物による環境保全研究会第1回シンポジウム, 立川, 2009年5月2日, 予稿集, p. 17-18.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



**Fig.1 Chromatograph of urinary 1-OHP on measurement
in two excitation wave length
(emmission wave length = 388 nm)**

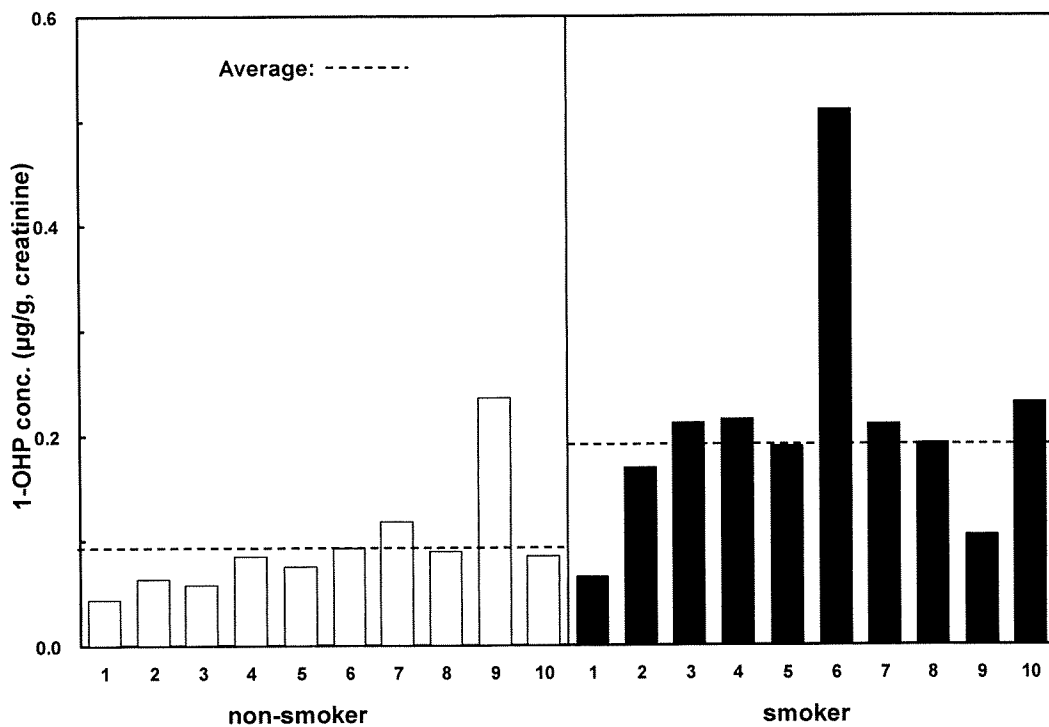


Fig.2 1-Hydroxypyrene concentration corrected with creatinine in urine sample (Azabu University)

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）
分担研究報告書

0.01、0.05 mgニコチンたばこを喫煙した喫煙者の曝露量推計

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院
研究分担者 鈴木元 国際医療福祉大学
研究分担者 緒方裕光 国立保健医療科学院

研究要旨

日本たばこ協会の調査によるとパッケージ表示ニコチン量が 0.5 mg/cig.以下のたばこのシェア率は 53.8%（2008年）であり、特にニコチン量が 0.1 mg/cig.たばこは 21.3%と最も多いと報告されている。加えて、これまでのタール・ニコチン含有量の加重平均値推移と合わせて考慮すると低ニコチン化が進んでいる傾向があると考えられる。本研究班では、これまでの研究においてパッケージ表示ニコチン量が、0.5 mg/cig.以下のたばこ喫煙者（低ニコチンたばこ喫煙者）は、1服あたりの平均吸煙量が 58.4 mL であり、補償喫煙行動を伴う傾向があると報告した。一方、近年、我が国渡航者が多い大韓民国ではタール表示値が 0.1 及び 0.5 mg/cig.のたばこが販売されている。今後、低ニコチン・低タールたばこのトレンド化が進む日本の市場において、同様の製品が販売される可能性があることを勘案して、韓国産低ニコチン・低タールたばこの主流煙の化学成分の評価を行い、変異原性試験も合わせて実施し、曝露される化学物質量を推計した。

曝露量評価には、韓国産たばこ 4 銘柄と日本産たばこを 2 銘柄の計 6 銘柄を用いた。本研究では機械喫煙装置を使用し、国際標準機構の喫煙法（ISO）と代償性補償喫煙行動に近いカナダ保健省が推奨する方法（HCI 法）でタール、ニコチン、一酸化炭素濃度及び多環芳香族炭化水素類の捕集及び測定を行なった。さらに微生物試験として主流煙の変異原性試験を実施した。ISO 法で捕集した主流煙は、タール、ニコチン量ともにパッケージの表示量と同じ値が得られた。一方、HCI 法における測定結果では、タール量は 0.1 から 1 mg ニコチン表示量の間ではほぼ一定で平均 1.07 mg/cig.であり、特に CO 濃度では 0.1 から 1 mg タール表示量の間において大きな差は認められなかった。また、2つの喫煙法（ISO 法と HCI 法）について各化学物質曝露量を比較したところ、パッケージ表示量が低いたばこほど喫煙法による差は大きい結果が得られた。さらにタール表示量が 100 倍異なるたばこの変異原活性の差は、3.6 倍と推計された（タール表示量 0.1 と 10 mg/cig.）。以上の結果より、低ニコチンたばこ喫煙者の曝露量はパッケージ表示から推測される値と比較すると吸煙行動によって大きく変動することが推測された。

F. 研究目的

たばこ煙には、多くの有害化学物質が含まれていることが報告されており、その生体への影響が

広く議論されている。そのため国内たばこの外箱には、たばこ1本当たりのニコチン、タール量が表示されている。この数値は、米国連邦取引委員

会（FTC）及び国際標準化機構で定められた機械喫煙法（ISO法）と化学分析から得られている。しかしながらこの機械喫煙法は、実際の人の喫煙行動に沿っていないとの指摘を受けており、カナダ保健省（Health Canada）から新たな機械喫煙法（HCI法）も提案されている。

日本たばこ協会の統計によると2008年度タール・ニコチン量（パッケージ表示）の平均値は、それぞれ6.6 mgと0.55 mgであり、1994年度の9.5 mgと0.78 mgから徐々に低下してきている。これに呼応するかのように日本では、低タール・低ニコチンたばこの喫煙者が増えている傾向が認められている。このように、日本では多くの低ニコチンたばこが販売されているが、このたばこはISO法での測定及び検定において含有ニコチン量などを低減させるためにフィルター部分に多くの通気孔が設けられている。このように設計された低ニコチンたばこの喫煙者はたばこからの満足感を得るためにISO法以上の吸い込み量、吸煙本数になると考えられる報告がされている [1]。同様に昨年度の我々の「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に関する研究」にて報告した結果では、パッケージ表示ニコチン量が0.6 mg以下の喫煙者は、ニコチンを体内に取り込むために「代償性の自己調節機能」が認められた。さらに、喫煙行動パターンは、HCI法に近い結果が得られた。そのため低ニコチンたばこの喫煙者の体内への曝露量は、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を反映してないと考えられ、低ニコチンたばこが影響の少ないたばこであるとは一概には言えない。

近年、日本人渡航者が多い大韓民国では、タール・ニコチンのパッケージ表示量が、0.1 mgと0.01 mg、0.5 mgと0.05 mgなど非常に表示値が低いたばこが販売されている。このような超低ニコチン・タールたばこを個人で購入・使用することを鑑み

て、今回これら製品からの曝露量を推計することを目的とした。さらに低ニコチン・低タールたばこのトレンド化が進む日本の市場において、今後、同様の製品が販売される可能性があることを勘案して、韓国産低ニコチン・低タールたばこの主流煙の化学成分の評価を行い、変異原性試験も合わせて実施した。また、低ニコチン・低タールたばこ喫煙者は、HCI法に近い喫煙になることから、機械喫煙法もISO法とHCI法の両手法で主流煙の捕集を行ったので報告する。

仮説

超低ニコチン・タールたばこ喫煙者は、代償性補償喫煙行動を行う可能性が高い。その場合、喫煙行動はカナダ保健省が提案する喫煙法に近くなる。その際の化学物質の曝露量は、パッケージ表示に依存せず、さらにISO法による測定結果よりはるかに高くなる。

G. 研究方法

(1) たばこ試料

4種類の韓国産たばこ（ESSE 0.1、ESSE 0.5、The One 0.1とThe One 0.5）と2種類の日本産たばこ（Mild Seven One、Mild Seven Original）の計6種類のたばこ試料を評価対象とした。Table-1に測定を行ったたばこ試料の概要を示す。

(2) たばこ主流煙の捕集

たばこ煙の捕集は、ISO対応型のBorgwaldt LM1喫煙装置（独Borgwaldt KC社製）を用いた。たばこ試料はISO 3402（1999）[2]に従って恒湿化を行った。ISO/FTC条件による捕集はISO 4387（2000）[3]に準じ、総粒子状物質（TPM;ほぼタール）は、ガラス繊維ろ紙（Cambridge filter pad、直径44mm）に捕集した。カナダ保健省（HCI）条件による捕集はカナダ保健省T-115 [4]に準じた。

(3) タール、一酸化炭素、ニコチンの測定

TPM秤量後、2-プロパノール (20 mL) を用いてガラス繊維フィルターより室温で20分間振盪抽出を行った。2-プロパノール抽出液中のニコチン濃度はISO 10315 (2000) [5] に準じて、若干の改良を加えたガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 法 [6]により測定を行った。2-プロパノール抽出液中の水分量はISO 10362-1 (1999) [7] に準じて、ガスクロマトグラフィー熱伝導度検出器 (GC/TCD) を用いて測定した。ニコチン、水分を定量後、粗タール量からニコチン、水分量を差し引いた値をタール量とした。

(4) PAHの測定

得られた2-プロパノール抽出液のうち1 mLをPAH分析用試料とし、シリカゲルカートリッジ (Sep-Pak[®] Plus: Waters製) を用いて固相抽出を行った。つまり、2-プロパノール抽出液を窒素気流下で溶媒を留去した後、*n*-ヘキサンに再溶解し、活性化を行ったSep-Pak[®] Plusに導入した。次に、ヘキサン:ジクロロメタン (9:1) で溶出させ、窒素気流下で再度溶媒を留去した後、*d*₈-Naphthalene、*d*₁₀-Chrysene 及び *d*₁₂-Benzo[*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。測定方法は、後藤らの方法に従った[8]。

(5) 変異原性試験

変異原性測定には、Amesらのプレインキュベーション法を用いた。菌株には、サルモネラ菌TA98、TA100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。変異原性比活性は、用量-反応曲線の直線的な部分から最小自乗法による直線回帰式を求め、その傾きからたばこ1本当たりの復帰突然変異コロニー数 (Revertants/cig.) と

して算出した。なお結果表中で括弧内の数値は、擬陽性例 (溶媒対照値の1.5~2倍のコロニー数値が認められ、用量-反応関係が認められるもの) であり、陰性例 (コロニー計数値が溶媒対照値の1.5倍に満たないもの) はnegとしてある。

H. 研究結果

(1) TNCO (Tar, Nicotine, Carbon monoxide)

今回測定を実施した銘柄については、各々5回捕集を行い各捕集毎に抽出・測定を行った。Table-2に測定結果を示す。ISO法に準拠した捕集サンプルでは、タール、ニコチン量共にほぼパッケージ表示と同じ値であった。一方、HCI法により捕集を行った捕集サンプルでは、0.01、0.05、0.1、1 mgニコチンたばこのタール量は、それぞれの平均値が、12.84、12.94、14.20、24.98 mg/cig.であった。また、ニコチン量についても1.03、1.09、1.14、2.01 mg/cig.であり、パッケージ表示よりも高い値を示した。一酸化炭素 (CO) については、それぞれ24.40、24.76、23.7、23.4 mg/cig.であり、COに関しては、パッケージ表示から考えられる5、10、100倍といった差は無く、測定結果はほぼ一定となった。

(2) PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon、多環芳香族炭化水素)

今回測定を実施した銘柄については、各5回ずつ捕集を行いそれぞれ捕集ごとにPAHの抽出及び測定を行った。PAHの代表的なものとしてBenzo[*a*]pyrene (BaP) があり、これら化合物は発癌性、変異原性、内分泌かく乱作用を示すことも知られている。このBaPはISO条件においては、超低ニコチン・タールたばこの、The One 0.5以外のたばこでは検出されなかった。一方、HCI条件で捕集した試料は、超低ニコチン・タールたばこであってもPAH類の定量が可能であった。また、その濃度は、パッケージ表示から類推される比率と

は異なり、濃度差はほとんど認められなかった。燃焼により発生するPAH類の生成時に主反応物質となるPyreneは、最も高い濃度であった。

(3) 変異原性試験結果

Table-3に、韓国及び日本産たばこ6銘柄の変異原性試験結果を示した。たばこ試料の変異原性は、銘柄に関わらずフレームシフト型の突然変異を検出する菌株 (TA98とYG1024) に対して認められた。特に、YG1024のS9mix添加条件下で強い活性を示した。HCl条件で捕集された韓国産たばこ (タール表示量; 0.1、0.5 mg) の変異原活性平均値が、YG1024株の+S9条件下で30,000、27,800 revertants/cig.、また日本産たばこ (タール表示; 1、10 mg) の同値が、66,600と109,900 revertants/cig.であり、ISO法で捕集したたばこ試料の変異原性に比べて、1.9–62.8倍と高い値を示した。一方、S9mix無添加条件下 (-S9) では同様の傾向は認められなかった。塩基対置換型の突然変異を検出するTA100株の試験結果では、-S9条件が+S9条件と比較すると変異原性活性が強い傾向となった。

I. 考察

今回測定を行った韓国産超低タールたばこの喫煙者は、代償性補償喫煙行動を起こすと考えられる。鈴木らは、ニコチン表示が0.6 mg/cig.未満たばこの喫煙者が、1回の吸煙量が58.4 mLでHCl法の喫煙量に近いことを報告している。この結果を踏まえるとさらにニコチン表示の低い今回のたばこ銘柄は、喫煙者がHCl法に近い喫煙を行うことが推測される。そこで、本研究においてHCl条件で捕集した主流煙中の各測定結果を、パッケージのタール表示量別に示した (Table 3)。パッケージ表示が0.1mgたばこの変異原活性平均値は30,000 revertants/cig.であり、0.5 mgたばこの27,800 revertants/cig.と同程度の活性であった。さらに、1、10 mgたばこは、66,600、109,900 revertants/cig.と

なり、0.1 mgたばこの活性と比較するとそれぞれ2.2、3.6倍となった。同様に1、10 mgたばこの変異原活性平均値を0.5 mgたばこの同値と比較したところ、2.4、4.0倍となった。このことから変異原性試験の結果では、パッケージ表示から考えられる曝露量の差は、認められなかった。次に、タール、ニコチン及びPAHのうちPyreneについては (Table 2、4)、HCl条件下でパッケージ表示タール量が10倍異なる0.1と1 mgたばこであっても同程度の濃度であり、さらに100倍異なる0.1と10 mgたばこであっても2倍以下の差であった。一方、COの測定結果は全タバコ試料とも、20 mg/cig.強とほぼ同値になり、パッケージ表示量に依存しない結果となった (Table 2)。この結果は、近年米国で販売されている有害性を低減する可能性のあるたばこ製品 (Potential Reduced Exposure Products; PREP) の喫煙者は、ニコチン表示が0.05、0.3、0.6 mgに関らず、CO曝露量がほぼ一定である結果[9]と同様の傾向であった。本研究の測定結果は、パッケージ表示量が低いたばこを喫煙することが必ずしも生体への影響を低減することに繋がらないことを示唆している。特に、パッケージ表示がタール1 mg、ニコチン0.1 mg以下のたばこは、代償性喫煙によって曝露量の変動が小さくなると考えられる。

今回の研究において、測定対象成分が主にタールに含まれる粒子状成分であり、ガス成分としてはCOのみであった。このCO測定結果は曝露量がパッケージ表示に依存しなかった。このことを踏まえ、今後はガス成分で発がん性のあるとされているホルムアルデヒドをはじめとするアルデヒド類を中心に測定を実施する計画である。

J. 結論

韓国産低ニコチン・低タールたばこの主流煙の化学成分の評価を行い、変異原性試験も合わせて実施した。また、低ニコチン・低タールたばこ喫

煙者は、喫煙者が代償性補償喫煙を行い、HCl法に近い喫煙になることから、喫煙法もISO法とHCl法の両手法で主流煙の捕集を行った。現在、日本国内で販売されているたばこの最もタール・ニコチン表示量が低いものは、1、0.1 mgである。このたばこ今回測定を実施したタール・ニコチン表示量が、それぞれ0.01、0.1 mg及び0.05、0.5 mgたばこの曝露量は、変異原性活性以外のタール、ニコチン、Pyrene、COにおいて差は認められなかった。さらには、10 mgタール表示たばこもCOについては差がなかった。

[引用文献]

- [1] 浅野牧茂. たばこ煙に含まれる物質:成人病と生活習慣病, 33: 769-778, 2003
- [2] ISO 3402; Tobacco and Tobacco Products – Atmosphere for conditioning and testing. 4th ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999
- [3] ISO 4387; Cigarettes – Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine. 3rd ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2000
- [4] Health Canada, Determination of "tar", nicotine and carbon monoxide in mainstream tobacco smoke. Official method T-115, 1999.
- [5] ISO 10315; Cigarettes – Determination of nicotine in smoke condensates gas- chromatographic method. 2nd ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2000
- [6] 松本真理子、杉田和俊、小谷野道子、遠藤治、後藤純雄、鈴木元: ニコチン分析に用いるGC/MSカラムの比較検討. 平成18年度室内環境学会総会・研究発表会公演集9: 48-49, 2006
- [7] ISO 10362-1; Cigarettes – Determination of water in smoke condensates – Part 1: Gas- chromatographic

method. 2nd ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999

[8] 後藤純雄, 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, 第3次対がん総合戦略研究事業 平成19年度 総括・分担研究報告書, 68-79, 2008

[9] Strasser AA, Lerman C, Sanborn PM, Pickworth WB, Feldman EA: New lower nicotine cigarettes can produce compensatory smoking and increased carbon monoxide exposure; Drug Alcohol Depend, 86: 294-300, 2007

F. 研究発表

稲葉洋平

1. 論文発表

1) Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Matsumoto, M.; Suzuki, G. Reductive Amination of Aldehyde 2,4-Dinitrophenylhydrazones Using 2-Picoline Borane and High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. Anal. Chem. 2009, 81, 485-489.

2) Uchiyama, S.; Naito, S.; Matsumoto, M.; Inaba, Y.; Kunugita, N. Improved Measurement of Ozone and Carbonyls Using a Dual-Bed Sampling Cartridge Containing trans-1,2-Bis(2-pyridyl)ethylene and 2,4-Dinitrophenylhydrazine- Impregnated Silica. Anal. Chem. 2009, 81, 6552-6557.

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 International Organization for Standardization and Health Canada Intense Regimens of Major Japanese Cigarette Brands. J. Health Sci. 2009, 55, 421-427.

2. 学会発表

1) 内山茂久; 稲葉洋平; 松本真理子; 鈴木元 2-ピコリンボランを用いたカルボニル 2,4-ジニトロ

フェニルヒドラゾンの還元的アミノ化と高速液体クロマトグラフ分析 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月, 日本大学, 日本化学会第 89 春季年会講演予稿集 (CD-ROM)

2) 内山茂久; 松本真理子; 稲葉洋平; 鈴木元 アルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの還元的アミノ化と高速液体クロマトグラフ分析 第 18 回環境化学討論会, 2009 年 6 月, つくば国際会議場, 第 18 回環境化学討論会講演要旨集 P120-121.

3) 内山茂久; 内藤季和; 稲葉洋平; 樺田尚樹 trans-1,2-ビス (2-ピリジル) エチレンと 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた空气中オゾンとカルボニル化合物の同時分析 第 50 回大気環境学会, 2009 年 9 月, 慶應義塾大学, 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集, p.321

4) 樽見和枝; 内山茂久; 稲葉洋平; 樺田尚樹 trans-1,2-ビス (2-ピリジル) エチレンを用いた拡散サンプラーによる空气中オゾンの分析 第 50 回大気環境学会, 2009 年 9 月, 慶應義塾大学, 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集, p.322

5) 山田智美; 樽見和枝; 内山茂久; 稲葉洋平; 樺田尚樹; 後藤純雄 室内環境におけるオゾンとアルデヒド類、およびギ酸の挙動 第 50 回大気環境学会, 2009 年 9 月, 慶應義塾大学, 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集, p.323

6) 稲葉洋平, 松本真理子, 大久保忠利, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 樺田尚樹, 鈴木元. 低タール・低ニコチン韓国産たばこと日本産たばこの比較. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 134.

7) 越田英史, 荒井理沙, 稲葉洋平, 太田敏博. タバコ副流煙に紫外線照射することで新たに現れる変異原性. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 134.

8) 遠藤治, 稲葉洋平, 松本真理子, 杉田和俊, 後藤純雄, 緒方裕光, 鈴木元. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原性. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 135.

9) 大久保忠利, 稲葉洋平, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 鈴木元, 樺田尚樹. 薬用吸煙剤の化学分析および変異原性. 日本環境変異原学会; 2009 年 11 月; 静岡. 第 38 回大会 プログラム・要旨集. p. 135.

10) 稲葉洋平; 内山茂久; 松本真理子; 樺田尚樹; 遠藤治; 緒方裕光; 鈴木元 8-OHdG 分析条件の改良および喫煙者・非喫煙者の尿中濃度の解析 日本薬学会 第 130 回年会, 2010 年 3 月, 岡山, CD 要旨集

11) 杉山晃一; 稲葉洋平; 大久保忠利; 内山茂久; 高木敬彦; 樺田尚樹 日本産たばこ主流煙の Tobacco specific-nitrosamine 測定法の検討 日本薬学会 第 130 回年会, 2010 年 3 月, 岡山, CD 要旨集

12) 大久保忠利; 稲葉洋平; 内山茂久; 樺田尚樹; 後藤純雄 尿中 1-hydroxypyrene の測定法の改良および喫煙・非喫煙者への適用 日本薬学会 第 130 回年会, 2010 年 3 月, 岡山, CD 要旨集

13) 内山茂久; 稲葉洋平; 樺田尚樹 ハイドロキノン含浸シリカおよび 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン含浸シリカを充填したカートリッジによる α, β -不飽和アルデヒドの分析 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月, 日本大学, 日本化学会第 90 春季年会講演予稿集 (CD-ROM)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

鈴木元

1. 論文発表

- 1) Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Matsumoto, M.; Suzuki, G. Reductive Amination of Aldehyde 2,4-Dinitrophenylhydrazones Using 2-Picoline Borane and High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* 2009, 81, 485-489.
- 2) 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 International Organization for Standardization and Health Canada Intense Regimens of Major Japanese Cigarette Brands. *J. Heath Sci.* 2009, 55, 421-427.
- 3) Suzuki G, Cullings H, Fujiwara S, Ohishi W, Matsuura S, Kishi T, Akahoshi M, Hayashi T, and Tahara E: LTA 252GG and GA genotypes are associated with diffuse type noncardia gastric cancer risk in Japanese population. *Helicobacter*, 14(6): 571-9, 2009.
2. 学会発表
- 1) 内山茂久; 稲葉洋平; 松本真理子; 鈴木元 2-ピコリンボランを用いたカルボニル2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの還元的アミノ化と高速液体クロマトグラフ分析 日本化学会第89春季年会, 2009年3月, 日本大学, 日本化学会第89春季年会講演予稿集 (CD-ROM)
- 2) 稲葉洋平, 松本真理子, 大久保忠利, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 櫻田尚樹, 鈴木元. 低タール・低ニコチン韓国産たばこと日本産たばこの比較. 日本環境変異原学会; 2009年11月; 静岡. 第38回大会 プログラム・要旨集. p. 134.
- 3) 遠藤治, 稲葉洋平, 松本真理子, 杉田和俊, 後藤純雄, 緒方裕光, 鈴木元. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原生. 日本環境変異原学会; 2009年11月; 静岡. 第38回大会 プログラム・要旨集. p. 135.
- 5) 大久保忠利, 稲葉洋平, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 鈴木元, 櫻田尚樹. 薬用吸煙剤の化学分析および変異原性. 日本環境変異原学会; 2009年11月; 静岡. 第38回大会 プログラム・要旨集. p. 135.
- 6) 稲葉洋平; 内山茂久; 松本真理子; 櫻田尚樹; 遠藤治; 緒方裕光; 鈴木元 8-OHdG 分析条件の改良および喫煙者・非喫煙者の尿中濃度の解析 日本薬学会 第130回年会, 2010年3月, 岡山, CD 要旨集
- 緒方裕光
1. 論文発表
- 1) 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 International Organization for Standardization and Health Canada Intense Regimens of Major Japanese Cigarette Brands. *J. Heath Sci.* 2009, 55, 421-427.
2. 学会発表
- 1) 稲葉洋平, 松本真理子, 大久保忠利, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 櫻田尚樹, 鈴木元. 低タール・低ニコチン韓国産たばこと日本産たばこの比較. 日本環境変異原学会; 2009年11月; 静岡. 第38回大会 プログラム・要旨集. p. 134.
- 3) 遠藤治, 稲葉洋平, 松本真理子, 杉田和俊, 後藤純雄, 緒方裕光, 鈴木元. 喫煙装置を用いて捕集された国産主要銘柄たばこ副流煙 DMSO 抽出物の変異原生. 日本環境変異原学会; 2009年11月; 静岡. 第38回大会 プログラム・要旨集. p. 135.
- 5) 大久保忠利, 稲葉洋平, 杉田和俊, 内山茂久, 吉見逸郎, 緒方裕光, 鈴木元, 櫻田尚樹. 薬用吸煙剤の化学分析および変異原性. 日本環境変異原学