

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；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

Table 1 Brand name and Characteristics of Cigarettes

Brand Name	Manufacturing country	Tar (mg/cig.)	Nicotine (mg/cig.)
ESSE 0.1	Korea	0.1	0.01
The One 0.1		0.1	0.01
ESSE 0.5		0.5	0.05
The One 0.5		0.5	0.05

Mild Seven One	Japan	1.	0.1
Mild Seven Original		10.	0.8

Table 2 TNCO yields of cigarette brands

Cigarette brands	Smoking protocol	TAR (mg/cig.)			Nicotine (mg/cig.)			CO (mg/cig.)		
		AVE	±	SD	AVE	±	SD	AVE	±	SD
ESSE 0.1	ISO	0.20	±	0.04	0.01	±	0.001	0.20	±	0.05
The One 0.1		0.11	±	0.04	0.01	±	0.001	0.13	±	0.01
ESSE 0.5		0.56	±	0.14	0.06	±	0.010	1.22	±	0.19
The One 0.5		0.56	±	0.07	0.05	±	0.003	0.64	±	0.03
Mild Seven One		1.27	±	0.13	0.13	±	0.016	2.48	±	0.34
Mild Seven Original		10.1	±	0.47	0.79	±	0.051	11.40	±	1.04

ESSE 0.1	HCI	13.9	±	0.37	1.07	±	0.04	27.5	±	1.03
The One 0.1		11.8	±	0.25	0.99	±	0.08	21.3	±	0.57
ESSE 0.5		14.9	±	0.41	1.33	±	0.02	28.8	±	1.62
The One 0.5		11.0	±	0.18	0.84	±	0.04	20.7	±	0.85
Mild Seven One		14.2	±	0.98	1.12	±	0.03	23.7	±	1.67
Mild Seven Original		25.0	±	0.99	2.01	±	0.11	23.4	±	1.96

Table 3 Mutagenic activity of Cigarette brands

Cigarette brands	Smoking protocol	Revertants/cig.					
		TA100		TA98		YG1024	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
ESSE 0.1	ISO	neg	neg	neg	100	30	900
The One 0.1		neg	40	neg	70	neg	400
ESSE 0.5		neg	400	neg	500	90	4,000
The One 0.5		neg	200	40	500	100	3,300
Mild Seven One		(900)	700	90	1,900	100	13,000
Mild Seven Original		neg	2,800	600	7,400	(400)	57,900

ESSE 0.1	HCI	4,700	1,900	1,300	4,700	1,300	34,900
The One 0.1		5,100	(3800)	1,000	3,300	1,000	25,100
ESSE 0.5		6,200	(5700)	2,000	5,800	1,800	35,300
The One 0.5		6,000	(2700)	1,200	2,600	1,300	20,200
Mild Seven One		(6000)	3,300	1,400	11,400	1,000	66,600
Mild Seven Original		11,600	6,800	2,000	20,400	1,500	109,900

Table 4 PAHs in Main Stream Smoke of Cigarette brands

cigarette brands	Smoking Protocol	Pyrene (ng/cig.)	BaA (ng/cig.)	Chrysene (ng/cig.)	BbF (ng/cig.)	BkF (ng/cig.)	BjF (ng/cig.)	BeP (ng/cig.)	BaP (ng/cig.)	INcdP (ng/cig.)	dBahA (ng/cig.)	BghiP (ng/cig.)
ESSE 0.1		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
The One 0.1		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ESSE 0.5		19	7	8	2	ND	1	1	2	2	ND	ND
The One 0.5	ISO	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mild Seven One		9	3	4	ND	ND	ND	ND	1	2	ND	ND
Mild Seven Original		21	8	9	2	1	1	1	3	4	ND	14
ESSE 0.1		21	11	11	4	3	3	2	5	ND	ND	ND
The One 0.1		20	9	10	3	2	2	2	4	ND	ND	ND
ESSE 0.5		23	11	13	3	3	2	2	5	ND	ND	ND
The One 0.5	HCI	15	8	8	2	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND
Mild Seven One		18	10	10	3	2	2	1	5	ND	ND	2
Mild Seven Original		36	17	17	5	3	3	3	8	12	ND	3

BaA:Benzo[a]anthracene, BbF:Benzo[b]fluoranthene, BkF:Benzo[k]fluoranthene, BjK:Benzo[j]fluoranthene, BcP:Benzo[c]pyrene, BeP:Benzo[e]pyrene, BaP:Benzo[a]pyrene, INcdP:Indeno[1,2,3-cd]perylene, dBahA:Dibenz[a,h]anthracene, BghiP:Benzo[ghi]perylene
 NA:Not Analyzed, ND:Not Detected.

たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン測定法の確立及び日本産たばこでの適用

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院

研究分担者 櫻田尚樹 国立保健医療科学院

研究要旨

International Agency for Research on Cancer (IARC) の発がん性リスク一覧においてグループ1及びグループ3に分類されているたばこ特異的ニトロソアミン類 (TSNAs) が、たばこ主流煙中には含有されている。本研究は、測定事例の報告が少ない日本産たばこの主流煙中 TSNAs の測定法の確立および測定を行った。TSNAs の前処理では、新たな固相抽出法を確立した。その条件は、たばこ主流煙を捕集した Cambridge filter pad (CFP) を TSNAs-d 溶液を添加した後、100 mM 酢酸アンモニウム溶液を加え、250 rpm、30 min で振盪抽出を行った。その後、固相抽出カラム Discovery DSC-18Lt に導入した。10%メタノール 5 mL で洗浄後、70%メタノール 5 mL で溶出し、濃縮後、LC/MS/MS に供した。確立した測定法を日本産たばこ 10 銘柄について実施した。その結果は、過去に旧厚生省が実施した測定結果と比較したところ、同銘柄であっても TSNAs 量は、1/3 から 1/2 に低減されていた。今後、喫煙者の TSNAs を曝露評価する場合、低減化されていることを踏まえて慎重に実施する必要がある。さらに、発がん性のある NNN と NNK の総量をパッケージ表示に区分けして評価したところ、Medium たばこが最も高い濃度であった。TSNA 濃度は、たばこのタール・ニコチンのパッケージ表示に依存しないことが示唆された。

今後は、カナダ保健省が提案する喫煙法でたばこ主流煙を捕集し、TSNA の測定を継続する必要があると考えている。これにより、今後、低タールたばこ喫煙者の曝露評価が推定できると考えられる。

A. 研究目的

たばこ主流煙中には多くの化学物質が含まれており、その1グループとしてたばこ特異的ニトロソアミン類 (tobacco specific *N*-nitrosamines、TSNA) が存在する。TSNAはたばこ葉のアルカロイドである nicotine、nornicotine、anatabine、anabasineがニトロソ化することにより4種類生成される。TSNA 4種は各々、4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) がnicotineから、*N*-nitrosanornicotine (NNN)がnicotine、nornicotineから、*N*-nitrosoanatabine (NAT) がanatabineから、*N*-nitrosoanabatine (NAB) がanabasineから生成

される。TSNAはたばこ葉中の上記アルカロイドと亜硝酸や硝酸が反応して生成され[1]、環境中の温湿度が高いほどTSNA量は増加する[2]。また、たばこの発酵、製造過程により生成されるものや、たばこの燃焼時に熱合成により生成されるものもある[3]。

4種のTSNAのうち、NNKとNNNはInternational Agency for Research on Cancerの発がん性リスク一覧においてグループ1 (The agent is carcinogenic to humans.; ヒトに対する発がん性が認められる) に分類されている。一方、NATとNABはグループ3 (The agent is not classifiable as to its carcinogenicity

to humans. ; ヒトに対する発がん性が分類できない) に分類されている。実験動物を用いた報告では、特にNNKはマウス、ラット、ハムスター、ミンクで肺腫瘍を誘起するといった報告や、ラットの肝臓、鼻腔粘膜、膵臓の腫瘍化を引き起こすといった報告もある[4]。また、NNNはラット、ハムスターで鼻腔粘膜の腫瘍を誘起するといった報告もある[5]。したがって、主流煙中TSNAを測定することは喫煙による健康影響を評価するために必要であると考えられる。

これまでにたばこ主流煙中TSNAの測定についての報告が海外で多数されており、主にGC/TEA (Gas chromatography/thermal energy analyzer ; ガスクロマトグラフィー/熱エネルギーアナライザ) を用いて行われており[6-11]、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) /TEAでの報告もされている[12]。しかし、TEAはデッドボリュームが大きく、検出限界値が比較的高いといった欠点があるため、近年ではガスクロマトグラフィー / 質量分析計 (GC/MS) での報告もある[13]。また、更に検出感度が良く選択性の高い高速液体クロマトグラフィー / タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) での報告もされている[3-4,14-15]。しかし、LC/MS/MSによる測定は試料中夾雑物との共溶出により測定結果が高い数値を示すこともある[16]。そのため、抽出方法として振盪抽出後、フィルター濾過を行う方法[17]の他に、液-液抽出法と固相抽出法を組み合わせた方法[18]も報告されている。また、GC/TEAによる測定でも固相抽出法[19]が用いられてきた。これらの手法を用いて、外国産たばこ主流煙中TSNAの測定結果は多数報告されているが、日本産たばこに関する報告はほとんどない。したがって、外国産たばこ銘柄におけるTSNA量から類推することは不可能であり、また、パッケージ表示のタール・ニコチン量とも関連がないことから日本産たばこにおけるTSNA量を類推することは難しい。さらに日本では低タールたばこの販売数、シェア率が増加傾向にあるため、タール量の少ないたばこ銘柄でも測定が可能な方法を検討する必要がある。そこで本研究では、固相抽出による前処理法とLC/MS/MSを組み合わせたTSNAの測定法の最適化を検討した。また、この手法を用いて、国際標準化法 (ISO法)

で捕集した日本産たばこ主流煙中TSNAの測定を行った。

B. 研究方法

(1) HPLC 機器構成

HPLCの装置は以下のものを使用した。デガッサー (HP 1100シリーズ、G1322A、Hewlett Packard社製)、ポンプ (HP 1100シリーズ、G1312A、Hewlett Packard社製)、オートサンプラー (Agilent 1200シリーズ、G1329A、Agilent社製)、カラム恒温槽 (HP 1100シリーズ、G1316A、Hewlett Packard社製)。

(2) HPLC 測定条件

HPLC分離カラムとしてZorbax Eclipse XDB C-18カラム (2.1×150 mm、3.5 μm、Agilent社製) にプレカラムフィルター (0.5 μm、SUPELCO社製) を繋げたものを使用した。また、移動相として、0.1%酢酸水溶液 (A液) と、酢酸0.1%を含むメタノール溶液 (B液) を用いた。送液プログラムは流量を200 μL/minとし、0 min (A液:80%、B液:20%)、0→8 min (A液:40%、B液:60%)、8→10 min (A液:40%、B液:60%)、10→12 min (A液:80%、B液:20%)と設定し、分析時間は合計35 minとした。また、試料注入量は10 μL、カラム温度は40 °Cとした。

(3) 質量分析法

質量分析には三連四重極型質量分析器Micromass Quattro LC (Micromass UK Ltd.) を用いた。大気圧イオン化 (API) ガスはコンプレッサー (SLP-22BD、アネスト岩田株式会社製) により圧縮された空気から窒素を分離し (N₂ Supplier Model 20E、システムインストルメンツ株式会社製)、質量分析部に導入した。圧力は0.69 MPa、流量は100 L/hとした。コリジョンガスはアルゴンを用い、圧力は0.13 MPa、流量は600 L/hとした。イオン化モードはESI+/MRMを用い、キャピラリー電圧は3.5 kV、イオン源温度は130°C、イオン源周囲の温度は450°C、フォトマルチプライヤー検出器の電圧は753 Vに設定し、200 msecでイオンをモニターした。コリジョンエネルギーと

コーン電圧は分析種ごとに適切な条件を設定した (Table 1)。データ解析には MassLynx V4.0 (Micromass UK Ltd.) を用いた。

(4) TSNA 及び各種試薬

TSNAの標準品及び試薬調製には以下の薬品を用いた。NNK、NNN、NAT、NAB (Toronto Research Chemicals Inc.)、NNK-*d*₃、NNN-*d*₄、NAT-*d*₄、NAB-*d*₄ (Toronto Research Chemicals Inc.)、酢酸 (LC/MS用、Wako Pure Chemical Ltd.)、酢酸アンモニウム (HPLC用、Wako Pure Chemical Ltd.)、アセトニトリル (HPLC用、SIGMA-ALDRICH)、メタノール (LC/MS用、Wako Pure Chemical Ltd.)、アセトン (残留農薬濃縮300、Wako Pure Chemical Ltd.) を使用した。

(5) TSNA 標準溶液の作成

上記 NNK、NNN、NAT 及び NAB をアセトニトリルに溶解し、各々1 µg/mL に調製した。作製した試料は分析時までアルミホイルで遮光して-20 ±5°C で冷凍保管した。

(6) 内部標準溶液 (TSNAs-*d* 溶液) の作成

内部標準溶液には上記の各対象物質の重水素体 (*d*体) である NNK-*d*₃、NNN-*d*₄、NAT-*d*₄、NAB-*d*₄ を用いてアセトニトリルに溶解し、各々1 µg/mL に調製した。作製した試料は分析時までアルミホイルで遮光して-20 ±5°C で冷凍保管した。

(7) 検量線の作成用溶液の調製

各 TSNA 溶液を2、5、10、20、50、75、100、150 ng/mL の8段階に、各 TSNA-*d* 溶液を100 ng/mL に調製した。

(8) たばこ主流煙の捕集方法

たばこの恒湿化はISO3402 (1999) [20] に準じ、捕集前に48時間-10日間、温度22 ±2°C、湿度60 ±3%で行った。たばこ主流煙の捕集はW 1.7 m × D 2.4 m × H 3 m の小型チャンバー内に自動喫煙装置 Borgwaldt single channel linear smoking machine model LM1 (Borgwaldt KC GmbH) を設置して行った。捕集中はチャンバー内をISO3308 (2000) [21] に準じ、温度22 ±2°C、湿度60 ±5%に保った。たば

こ主流煙は、吸煙量は35 mL、吸煙時間は2 sec とし、吸煙間隔は60 sec でCambridge filter pad (CFP) (44 mm、Borgwaldt KC GmbH) に捕集し、これを粗タール量として測定した。粗タール量の測定方法はISO4387 (2000)[22] に準じ、[捕集後CFPの重量] - [捕集前CFPの重量] で求めた。重量測定には Mettler Toledo AB265-S (Mettler-Toledo International Inc.) を用い、0.01 mg 単位で記録した。なお、本研究はISO法に準ずるが、今回の負荷液量を含めた他の検討において粗タール量の多い試料も必要であったため、カナダ保健省が提案するCanada Intense protocol T-115 (HCl法) も同時に用いた。HCl法は、吸煙量は55 mL、吸煙時間は2 sec とし、吸煙間隔は30 sec、更にフィルター部に通気孔があるたばこを用いた際はテープで完全に塞いで捕集を行なった。

(9) TSNAsの抽出

自動喫煙装置によりたばこ主流煙を捕集した CFP を100 mL 容共栓付三角コルベンに入れ、上記 TSNAs-*d* 溶液400 µL を添加した後、100 mM 酢酸アンモニウム溶液を40 mL 加えた。三角コルベンをアルミホイルで遮光し、250 rpm、30 min で振盪抽出を行った。振盪後、50 mL 容プラスチック遠沈管に移し、アルミホイルで遮光して4-10°C で一時冷蔵保存した。次に、抽出液10 mL を3000 rpm、5 min で遠心を行い (05P-21、HITACHI社製)、上清を固相抽出カラムDiscovery DSC-18Lt (500 mg/3 mL、SPELCO社製) に供した。固相抽出カラムはバキュームマニホールド (57030-U、SPELCO社製) 内でメタノールとH₂O で活性化を行った後、抽出液を10 mL 導入し、10%メタノール5 mL で洗浄後、70%メタノール5 mL で溶出した。溶出液は窒素気流下にて溶媒留去し、1 mL 以下とした。溶媒留去後、100 mM 酢酸アンモニウム溶液で1 mL 容メスフラスコに定容後、遠心用チューブに移した。この溶液は8,000 rpm、5 min で再度遠心を行い、上清を1 mL シリンジ (ツベルクリン用、TERUMO社製) と濾過フィルター (0.2 µm、13 mm、Millipore社製) で濾過した後、LC/MS/MS に供した。

C. 研究結果及び考察

(1) 固相抽出のメタノール濃度別溶出試験

今回、測定対象としたTSNAはその物性上、水やメタノールなどの極性の高い溶媒に溶解しやすい。しかしながら、夾雑物の多くも同様の性質を示すため、LC/MS/MSの供するにはある程度の精製が必要である。そこで、固相抽出時における洗浄及び溶出条件の検討を行なった。TSNAs (10 ng/mL)、TSNAs-*d* (10 ng/mL) 溶液を10 mL導入し、5、10、20、30、50、70%メタノールにて溶出試験を行った。なお、メタノール濃度毎に5回測定した。測定結果から、メタノール濃度が5-20%ではTSNA、TSNA-*d*は溶出しなかったが、30%でNNK、NNNとNNK-*d*₃とNNN-*d*₄の一部が溶出し、50-70%ではTSNAs、TSNAs-*d* 全て溶出した (Fig. 1)。また、TSNA、TSNA-*d*が溶出したメタノール濃度50及び70%における回収率はそれぞれ102.0-112.8%、99.8-106.8%であり、ともに高い回収率を示した。上記の結果から、メタノール濃度が20%以下ではTSNAsおよびTSNAs-*d* はいずれも溶出しなことから種々の化学物質が混在するたばこ主流煙の抽出液に含まれる夾雑物を想定して10%メタノールを洗浄液とした。また、メタノール濃度が50%以上においてTSNAsおよびTSNAs-*d* が全て溶出したことから、70%メタノールを溶出液とした。

(2) 固相抽出における試料導入量の検討

今回、対象とした国産たばこ銘柄について、対象物質である4種のTSNAが測定可能となる試料導入量を検討するため、国産たばこ銘柄3種を用いて以下の検討を行なった

国産たばこであるマイルドセブンワン (タール量: 1 mg)、マイルドセブンスーパーライツ (タール量: 6 mg)、セブンスターズ (タール量: 14 mg) 3種の主流煙をISO法及びHCl法で各々フィルター5枚ずつ捕集した。なお得られた粗タール量は、ISO法およびHCl法で各々、マイルドセブンワンで9.41 ± 1.32、63.73 ± 6.20 mg、マイルドセブンスーパーライトで35.65 ± 2.27、109.88 ± 9.80 mg、セブンスターは91.83 ± 3.36、137.57 ± 8.75 mgであった。各々フィルターを100 mMの酢酸アンモニウムで250 rpm、30 minで振盪抽出を行い、続いて3,000

rpm、5 minで遠心し、それぞれ上清のみを200 mL容ねじ口三角コルベンに保存した。この上清を固相カラムにそれぞれ5、10、15、20、30 mLずつ導入した。各試料の導入液量別による結果は、ISO法およびHCl法、また、TSNA各物質による若干の差はあるものの、おおよそどの試料においても20 mL以上導入した場合破過することが認められ、特に粗タール量の多い試料ではその傾向が強く出ていた (Fig. 2)。また、固相カラムに試料液を導入した後の、溶出までにかかる時間は粗タール量にかかわらず導入量が10 mL以下なら固相抽出に費やす時間はおよそ3 h以内であったが、それ以上の導入液量に依存する形で固相抽出時間が増加する傾向 (約4-6 h) にあった。このことから、導入液量は5-20 mLの範囲で行なうことが望ましいと考えられ、また固相抽出時間を考慮した場合、導入液量は10 mLで行なうこととした。

(3) 固相抽出の精度確認

上記の結果1) 及び2) で作成した国産たばこ銘柄における主流煙中TSNAsの固相抽出方法及び化学分析手法の測定精度を確認するために、再度上記手法及び同一試料を用いて測定を行なった。なお、測定回数は7回とした。測定結果をTable 2に示す。TSNAs濃度の変動係数 (coefficient of variation, C.V.) はISO法により捕集したマイルドセブンワンのNAT、マイルドセブンワン、マイルドセブンスーパーライツのNABを除いて10%以下と良好であった。また、HCl法で測定した3銘柄のTSNAsともC.V.が10%以下と良い測定精度を示した。本TSNAs測定法はタール量の少ない日本産たばこでも十分な測定精度で分析が可能であることが分かった。

(4) 日本産たばこ主流煙中 TSNA 測定

上記の結果1)、2) 及び3) により確立した測定方法を用いて、先の3銘柄に、更に7銘柄を加え、2006年度の日本における販売量上位銘柄10銘柄の測定を行った。なお、LC/MS/MSによるTSNAsの検出下限は、0.5 ng/mLであり、定量下限は、2 ng/mLであった。日本産たばこ主流煙の測定結果をTable 3に示す。今回の測定結果の範囲は、NNNが6.7-49.4 ng/cig.、NNKが5.6-31.4 ng/cig.、NATが

11.9–53.8 ng/cig.、最後にNABが2.5–16.7 ng/cig.であった。この結果は、Hyodoらによる国産たばこ主流煙中TSNA測定結果と同様の傾向が認められた。つまり、NNNが6.3–161.3 ng/cig.、NNKがNQ (<12.4) – 102.9 ng/cig.、NATが8.2–166.0 ng/cig.さらにNABがNQ (< 2.0) – 21.7 ng/cig.であった[23]。さらに、今回測定対象とした10銘柄の日本産たばことタール含有量が同じ傾向のアメリカ産たばこTSNA含有量は、その最大値においてNABを除く3種で約3–4倍高い値がCountらによって報告されている。その範囲は、NNNが5.0–195.3 ng/cig.、NNKがNQ (<12.4) – 107.8 ng/cig.、NATが8.0–160.4 ng/cig.、NABがNQ (< 2.0) – 28.5 ng/cig.であった[24]。これは、海外産のたばこにはBurley種等のTSNA含有量が高いたばこ葉が使用されていることに起因されていると考えられる[5]。Table 4に1998年度に旧厚生省が行った調査結果[25]との比較を示した。同銘柄であるにも関わらず、NABを除く3種のTSNA含有量はこの数年のうちに1/3から1/2に低減化されていた。この傾向は海外でも同様な報告があり[4]、この低減化された結果をもとに、今後、喫煙者の曝露評価を行う必要があると考えられる。

Fig. 3は、たばこ銘柄をタール・ニコチンのパッケージ表示によりUltra low、Low、Medium、Highの4つの範囲に区分けを行い、本研究で得られた測定結果をもとに発がん性のあるNNNとNNKの含有量を合計し、測定結果を平均化したものである。最も高い濃度であったのは、タール・ニコチン量Medium範囲における75.2 ng/cig.であった。さらにLowおよびHighの測定結果は、ほぼ同濃度であった。以上の結果より、TSNA濃度は、たばこパッケージに表示されているタール・ニコチン量から推測される曝露量とは異なる傾向が認められた。Ultra lowの測定結果は、他の範囲と比較すると低い濃度であった。しかし、Ultra lowのたばこ喫煙者は、鈴木らの報告によると代償性補償喫煙を行う[26]。そのためたばこ1本あたりの吸煙量が増加し、実際の曝露量は高くなると考えられる。今後は、カナダ保健省が提案する喫煙法でたばこ主流煙を捕集し、TSNAsの測定を継続する必要があると考えている。

D. 結論

本研究は、日本銘柄たばこ主流煙TSNAを機械喫煙にてISO法により捕集・測定し、数少ないデータを開示した。TSNAsの前処理では、新たな固相抽出法を確立した。その条件は、たばこ主流煙を捕集したCFPをTSNAs-d溶液を添加した後、100 mM 酢酸アンモニウム溶液を加え、250 rpm、30 minで振盪抽出を行った。その後、抽出液10 mLを3000 rpm、5 minで遠心を行い、上清10 mLを固相抽出カラムDiscovery DSC-18Ltに導入した。10%メタノール5 mLで洗浄後、70%メタノール5 mLで溶出し、濃縮後、LC/MS/MSに供した。この手法を実施することにより、日本産たばこ主流煙中TSNAsを測定した。過去に旧厚生省が実施した測定結果と比較したところ、同銘柄であってもTSNAs量は、1/3から1/2に低減されていた。この結果は、たばこの測定法に起因するものではないと考えている。今後、喫煙者のTSNAsを曝露評価する場合、低減化されていることを踏まえて慎重に実施する必要がある。また、日本産のたばこは、同銘柄であってもその成分量が変化していることを示唆している。さらに、発がん性のあるNNNとNNKの総量をパッケージ表示により区分けして評価したところ、Mediumたばこが最も高い濃度であった。TSNA濃度は、たばこのタール・ニコチンのパッケージ表示によらないことが示唆された。

今後は、カナダ保健省が提案する喫煙法でたばこ主流煙を捕集し、TSNAの測定を継続する必要があると考えている。これにより、今後、低タールたばこ喫煙者の曝露評価が推定できると考えられる。

E. 引用文献

- [1] R A Anderson, M J Kasperbauer, H R Burton, J L Hamilton, E E Yoder, Changes in chemical composition of homogenized leaf-cured and air-cured burley tobacco stored in controlled environments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 663-668, 1982.
- [2] H R Burton, G H Childs, R A Anderson, P D Fleming, Changes in composition of burley tobacco during senescence and curing. 3. tobacco-specific nitrosamines, *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry, 37, 426-430, 1989.
- [3] W Wu, L Zhang, R B Jain, D L Ashley, C H Watson, Determination of Carcinogenic Tobacco-Specific Nitrosamines in Mainstream Smoke from U.S.-brand and non-U.S.-brand Cigarettes from 14 Countries, *Nicotine Tob Res*, 7, 443-451, 2005.
- [4] W S Rickert, P J Joza, M Sharifi, J Wu, J H. Lauterbach, Reductions in the tobacco specific nitrosamine (TSNA) content of tobaccos taken from commercial Canadian cigarettes and corresponding reductions in TSNA deliveries in mainstream smoke from such cigarettes, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51(3), 306-310, 2008.
- [5] Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-Nitrosamines, IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 89, 421-587, 2007.
- [6] M E Counts, F S Hsu, S W Laffoon, R W Dwyer, R H Cox, Mainstream smoke constituent yields and predicting relationships from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO smoking conditions, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 111-134, 2004.
- [7] S E Atawodi, R Preussmann, B Spiegelhalter, Tobacco-specific nitrosamines in some Nigerian cigarettes, *Cancer Letters*, 97(1), 1-6, 1995.
- [8] R Kumar, M Siddiqi, A R Tricker, R Preussmann, Tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and mainstream smoke of Indian cigarettes, *Food and Chemical Toxicology*, 29(6), 405-407, 1991.
- [9] S Fischer, A Castonguay, M Kaiserman, B Spiegelhalter, R Preussmann, Tobacco-specific nitrosamines in Canadian cigarettes, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 116, 563-568, 1990.
- [10] E J Mitacek, K D Brunnemann, D Hoffmann, T Limsila, M Suttajit, N Martin, L S Caplan, Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in Thailand, *Carcinogenesis*, 20, 133-137, 1999.
- [11] K D BRUNNEMANN, D Hoffman, Analysis of tobacco-specific nitrosamine in tobacco and tobacco smoke, *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds*, Chapter 45, 369-371, 1994.
- [12] J D Adams, K D BRUNNEMANN, D Hoffman, Chemical studies on tobacco smoke : LXXV. Rapid method for the analysis of tobacco-specific N-nitrosamines by gas-liquid chromatography with a thermal energy analyser, *Journal of chromatography A.*, 256, 347-351, 1983.
- [13] J Zhou, R Bai, Y Zhu, Determination of four tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(24), 4086-4092, 2007.
- [14] M J Morton, S W Laffoon, Cigarette smoke chemistry market maps under Massachusetts Department of Public Health smoking conditions, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51(1), 1-30, 2008.
- [15] W Wu, S Song, D L Ashley, C H Watson, Assessment of tobacco-specific nitrosamines in the tobacco and mainstream smoke of Bidi cigarettes, *Carcinogenesis*, 25, 283-287, 2004.
- [16] A Rfernandez-Alba, A Aguera, NITROSAMINES, *Encyclopedia of Analytical Science*, 197-202, 2005.
- [17] K A Wagner, N H Finkel, J E Fossett, I G Gillman, Development of a quantitative method for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke using isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 77(4)1001-1006, 2005.
- [18] W WU, D L Ashley, C H Watson, Simultaneous determination of five tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 75(18)4827-4832, 2003.
- [19] Determination of tobacco specific nitrosamine in cigarette mainstream smoke – GC/TEA method, CORESTA Recommended method. N° 63, 2005.
- [20] ISO 3402 Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing, International Organization for Standardization,

1999.

- [21] ISO 3308 Routine analytical cigarette - smoking machine - Definitions and standard conditions, International Organization for Standardization, 2000.
- [22] ISO 4387 Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine, 2000.
- [23] T Hyodo, Y Maruta, H Itaya, A Mikita, T Kodaera, M. Meger, Evaluation of functional relationships for predicting mainstream smoke constituent machine yields for conventional cigarettes from the Japanese market, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 48, 194-224, 2007.
- [24] M S Counts, F S Hsu, S W Laffoon, R W Dwyer, R.H. Cox, Mainstream smoke constituent yields and from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO smoking conditions, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 111-134, 2004.
- [25] 厚生労働省 HP, <http://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/houkoku/seibun.html>
- [26] 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 -, 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, 12-24, 2009

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. *Analytical Chemistry* 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.

Analytical Chemistry 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. *Journal of Health Science* 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, 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.
- 10) 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
- 11) 杉山晃一; 稲葉洋平; 大久保忠利; 内山茂久; 高木敬彦; 櫻田尚樹 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; 櫻田尚樹; 後藤純雄 尿中 1-hydroxypyrene の測定法の改良および喫煙者・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; 櫻田尚樹 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

櫻田尚樹

1. 論文発表

- 1) 櫻田尚樹; 小山倫浩; 川本俊弘. 【広範囲血

- 液・尿化学検査 免疫学的検査 その数値をどう読むか】 第7版 生化学的検査 産業医学関連物質 パラニトロフェノール. In: 日本臨牀. vol. 68; 2010: 540-543.
- 2) Win-Shwe TT; Kunugita N; Yamamoto S; Arashidani K; Fujimaki H. Strain differences influence NMDA receptor subunit gene expression in olfactory bulb of an allergic mouse model following toluene exposure. Neuroimmunomodulation 2010; (in press).
- 3) 嵐谷奎一; 秋山幸雄; 櫻田尚樹. 室内環境に関する研究. 室内環境 2009; 12(2):71-86.
- 4) Yoshida Y; Nakano Y; Ueno S; Liu J; Fueta Y; Ishidao T; Kunugita N; Yanagihara N; Sugiura T; Hori H; Yamashita U. Effects of 1-bromopropane, a substitute for chlorofluorocarbons, on BDNF expression. International immunopharmacology 2009; 9(4):433-438.
- 5) Yoshida Y; Liu J; Sugiura T; Ishidao T; Ueno S; Yanagita H; Fueta Y; Kunugita N; Hori H; Yamashita U. The indoor air pollutant 2-ethyl-hexanol activates CD4 cells. Chemico-biological interactions 2009; 177(2):137-141.
- 6) Yamamoto S; Tin Tin Win S; Yoshida Y; Kunugita N; Arashidani K; Fujimaki H. Children's immunology, what can we learn from animal studies (2): Modulation of systemic Th1/Th2 immune response in infant mice after prenatal exposure to low-level toluene and toll-like receptor (TLR) 2 ligand. The Journal of toxicological sciences 2009; 34 Suppl 2:SP341-348.
- 7) Yamamoto S; Tin Tin Win S; Yoshida Y; Kunugita N; Arashidani K; Fujimaki H. Suppression of Th1- and Th2-type immune responses in infant mouse spleen after prenatal and postnatal exposure to low-level toluene and peptidoglycan. Inhalation toxicology 2009; 21(9):793-802.
- 8) Win-Shwe TT; Tsukahara S; Yamamoto S; Fukushima A; Kunugita N; Arashidani K; Fujimaki H. Up-regulation of neurotrophin-related gene expression in mouse hippocampus following low-level toluene exposure. Neurotoxicology 2009; 31(1):85-93.
- 9) Umata T; Kunugita N; Norimura T. A comparison of the mutagenic and apoptotic effects of tritiated

water and acute or chronic caesium-137 gamma exposure on spleen T lymphocytes on normal and p53-deficient mice. International journal of radiation biology 2009; 85(12):1082-1088.

10) 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. Analytical chemistry 2009; 81(15):6552-6557.

2. 学会発表

1) 小山 倫浩、一瀬 豊日、PHAM Thi Thu Phuong、山口 哲右、松本 明子、市場 正良、樺田 尚樹、永吉 晴奈、松田 知成、川本 俊弘、アセトアルデヒド吸入曝露によるアルデヒド脱水素酵素 2 ノックアウトマウスの臓器内 DNA アダクト、第 82 回日本産業衛生学会、平成 21 年 5 月 20～22 日、福岡市 (福岡国際会議場)、産衛誌 51 巻 (臨増)、p364

2) Yukio Akiyama, Keiichi Arashidani, Naoki Kunugita, Takahiko Katoh, Yuko Yamano, Iwao Uchiyama, Investigation of indoor air quality in specific buildings in Japan, International Conference 2009, Integrating Health and Environment (Korean Society of Environmental Health), 平成 21 年 6 月 4～5 日、韓国 テグカソリック大学、Proceedings of KSEH international conference 2009, p35-38

3) Fujimaki, H, Win-Shwe, T, Yamamoto, S, Kunugita, N, Arashidani, K, Different sensitivity in allergic inflammatory response in congenic mice following exposure to low-level toluene, 28th Congress of the European-Academy-of-Allergy-and-Clinical-Immunology (European Acad Allergy & Clin Immunol), 平成 21 年 6 月 6～10 日, Warsaw, POLAND,

4) Tin Tin Win Shwe, Naoki Kunugita, Shoji Yamamoto, Keiichi Arashidani, Hidekazu Fujimaki, Effects of toluene exposure on developmental immunotoxicity in infant mice brain, 第 16 回日本免疫毒性学会学術大会, 平成 21 年 8 月 27～28 日, 旭川市 (市民文化会館),

5) 山元昭二, ティンティン ウィンシュエイ, 樺田

尚樹, 吉田安宏, 嵐谷奎一, 藤巻秀和, マウス胎仔期・新生仔期・乳仔期における低濃度トルエン曝露が免疫系の発達に及ぼす影響, 第 16 回日本免疫毒性学会学術大会, 平成 21 年 8 月 27～28 日, 旭川市 (市民文化会館),

6) Hidekazu Fujimaki, Tin Tin Win Shwe, Naoki Kunugita, Shoji Yamamoto, Keiichi Arashidani, Strain differences influence synaptic plasticity-related gene expression in olfactory bulb of a mouse model of allergy following toluene exposure, The 13th Congress of the European Federation of Neurological Societies, 平成 21 年 9 月 12～15 日, Florence, Italy, European Journal of Neurology, Vol 16, Suppl. 3, 2009, Page 566

7) Tin Tin Win Shwe, Naoki Kunugita, Shoji Yamamoto, Keiichi Arashidani, Hidekazu Fujimaki, A potential role of hippocampal memory function-related gene expression in developmental neurotoxicity of toluene, The 13th Congress of the European Federation of Neurological Societies, 平成 21 年 9 月 12～15 日, Florence, Italy, European Journal of Neurology, Vol 16, Suppl. 3, 2009, Page 324

8) 大栗隆行、矢原勝哉、文 昇大、山口晋作、興梶征典、柿原ひろ代、法村俊之、樺田尚樹、今田肇、成定宏之、温熱療法と高気圧酸素治療の 2 者併用によるカルボプラチンの増感効果, 日本ハイパーサーミア学会 第 26 回大会, 平成 21 年 9 月 11～12 日, 千葉市

9) Tin Tin Win Shwe, Naoki Kunugita, Shoji Yamamoto, Keiichi Arashidani, Hidekazu Fujimaki, Effect of perinatal toluene exposure at different developmental phases on memory function-related gene expressions in mouse brain, 第 50 回大気環境学会年会, 平成 21 年 9 月 16～18 日, 横浜市 (慶應義塾大学 日吉キャンパス), 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集 p342

10) 樺田尚樹, Tin Tin Win Shwe, 山元昭二, 吉田安宏, 嵐谷奎一, 藤巻秀和, マウス系統差で探るトルエン曝露に対する免疫系感受性要因, 第 50 回大気環境学会年会, 平成 21 年 9 月 16～18 日, 横浜市 (慶應義塾大学 日吉キャンパス), 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集 p343

11) 樽見和枝, 内山茂久, 稲葉洋平, 櫛田尚樹, 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分析, 第 50 回大気環境学会年会, 平成 21 年 9 月 16~18 日, 横浜市 (慶應義塾大学 日吉キャンパス), 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集 p322

12) 内山茂久, 内藤季和, 稲葉洋平, 櫛田尚樹, 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 回大気環境学会年会, 平成 21 年 9 月 16~18 日, 横浜市 (慶應義塾大学 日吉キャンパス), 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集 p321

13) 山田智美, 樽見和枝, 内山茂久, 稲葉洋平, 櫛田尚樹, 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 回大気環境学会年会, 平成 21 年 9 月 16~18 日, 横浜市 (慶應義塾大学 日吉キャンパス), 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集 p323

14) 秋山幸雄, 嵐谷奎一, 櫛田尚樹, 加藤貴彦, 山野優子, 内山巖雄, ホテルの室内空気汚染及び従業員の曝露調査, 第 50 回大気環境学会年会, 平成 21 年 9 月 16~18 日, 横浜市 (慶應義塾大学 日吉キャンパス), 第 50 回大気環境学会年会講演要旨集 p574

15) Y. YOSHIDA, N. DING, J. LIU, J. NOGUCHI, T. SUGIURA, N. KUNUGITA., Formaldehyde inhalation activates signal transducer and activator of transcriptopn 5 in thymocytes., 2nd European Congress of Immunology, 平成 21 年 9 月 13~16 日, ドイツ Berlin, Online 抄録 PD19/41

16) 吉田 安宏, Ding Ning, 野口 順子, 櫛田 尚樹, 杉浦 勉, 化学物質過敏反応における新規バイオマーカーの探索, 第 27 回 産業医科大学学会, 平成 21 年 10 月 6 日, 北九州市,

17) 吉田 安宏, Ding Ning, 野口 順子, 櫛田 尚樹, 杉浦 勉, STAT5 is activated in formaldehyde-exposed mice., 第 59 回日本アレルギー学会秋学期学術大会, 平成 21 年 10 月 29~31 日, 秋田市,

18) 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, 櫛田尚樹, 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第 38 回大会, 平成 21 年 11 月 26~27 日, 静岡市, 日本環境変異原学会第 38 回大会要旨集 p135

19) 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, 櫛田尚樹, 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との比較, 日本環境変異原学会第 38 回大会, 平成 21 年 11 月 26~27 日, 静岡市, 日本環境変異原学会第 38 回大会要旨集 p134

20) 内山茂久, 稲葉洋平, 櫛田尚樹, ハイドロキノン含浸シリカを用いた空气中のアクロレインの分析, 室内環境学会 2009 年度総会, 平成 21 年 12 月 14~15 日, 東大阪市, 2009 年度室内環境学会総会講演集 p180~181

21) 尾上あゆみ, 秋山幸雄, 櫛田尚樹, 嵐谷奎一, 改装された大学食堂内の化学物質濃度, 室内環境学会 2009 年度総会, 平成 21 年 12 月 14~15 日, 東大阪市, 2009 年度室内環境学会総会講演集 p60~61

22) 川部季美, 秋山幸雄, 嵐谷奎一, 戸次加奈江, 櫛田尚樹, 床ワックス清掃作業化学物質曝露評価, 室内環境学会 2009 年度総会, 平成 21 年 12 月 14~15 日, 東大阪市, 2009 年度室内環境学会総会講演集 p166~167

23) 尾上あゆみ, 櫛田尚樹, 秋山幸雄, 嵐谷奎一, 改装された大学食堂内の環境調査, 大気環境学会九州支部第 10 回研究発表会, 室内環境学会九州支部第 3 回研究発表会, 平成 26 年 1 月 27 日, 福岡市 (アクロス福岡),

24) 加來知寿重, 秋山幸雄, 櫛田尚樹, 嵐谷奎一, 自動二輪車使用者の個人曝露調査, 大気環境学会九州支部第 10 回研究発表会, 室内環境学会九州支部第 3 回研究発表会, 平成 26 年 1 月 27 日, 福岡市 (アクロス福岡),

25) 川部季美, 戸次加奈江, 櫛田尚樹, 秋山幸雄, 嵐谷奎一, 床ワックス作業者の個人曝露調査, 大気環境学会九州支部第 10 回研究発表会, 室内環境学会九州支部第 3 回研究発表会, 平成 26 年 1 月 27 日, 福岡市 (アクロス福岡),

26) 北田雅子, 稲葉洋平, 内山茂久, 吉見逸郎, 浅野牧茂, 櫛田尚樹, 手製イタドリタバコの標準的試験法によるタール量・ニコチン量について,

第 19 回日本禁煙推進医師歯科医師連盟総会・学術総会, 平成 22 年 2 月 27~28 日, 新潟市,

27) 稲葉洋平、内山茂久、松本真理子、櫛田尚樹、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 年会, 平成 22 年 3 月 28~30 日, 岡山市, 日本薬学会 第 130 回年会 CD 要旨集

28) 大久保忠利、稲葉洋平、内山茂久、櫛田尚樹、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 年会, 平成 22 年 3 月 28~30 日, 岡山市, 日本薬学会 第 130 回年会 CD 要旨集

29) 杉山晃一、稲葉洋平、大久保忠利、内山茂久、高木敬彦、櫛田尚樹, 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 年会, 平成 22 年 3 月 28~30 日, 岡山市, 日本薬学会 第 130 回年会 CD 要旨集

30) 内山茂久、稲葉洋平、櫛田尚樹, 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, 平成 22 年 3 月 26~29 日, 東大阪市 (近畿大学), 日本化学会第 90 春季年会講演予稿集 (CD-ROM)

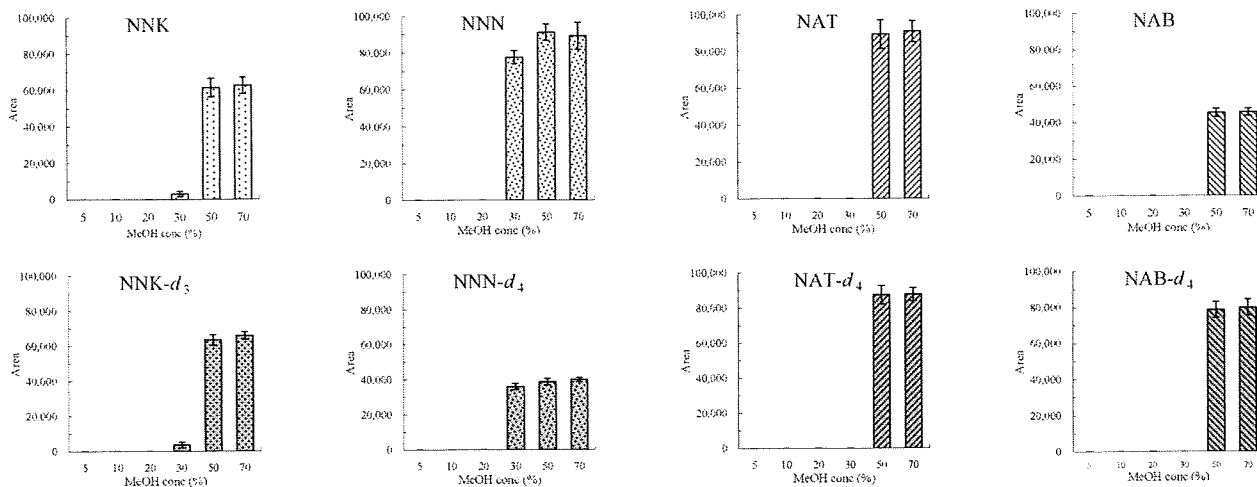


Fig. 1 Results of solid phase extraction with each MeOH concentration (n=5)
4 graph show native TSNAs (above). 4 graph show deuterium TSNAs. (below)

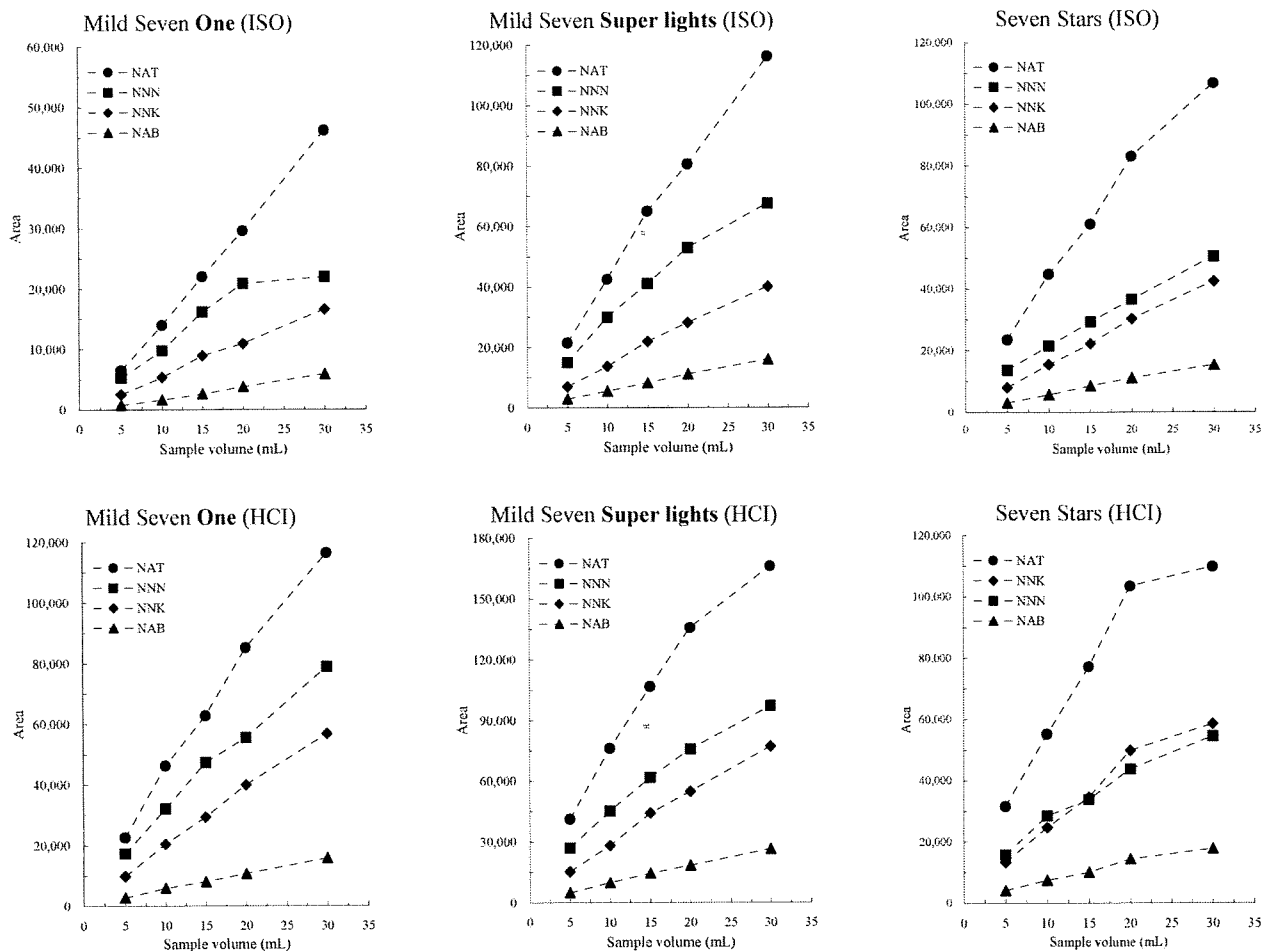


Fig. 2 Results of evaluation of each load volume of smoke extracts for SPE tube.

3 graph show in order of left that total particle matter weight is 9.41mg/filliter, 35.65mg/filliter, 91.83mg/filliter. (above)
3 graph show in order of left that total particle matter weight is 63.73mg/filliter, 109.88mg/filliter, 137.57mg/filliter. (below)

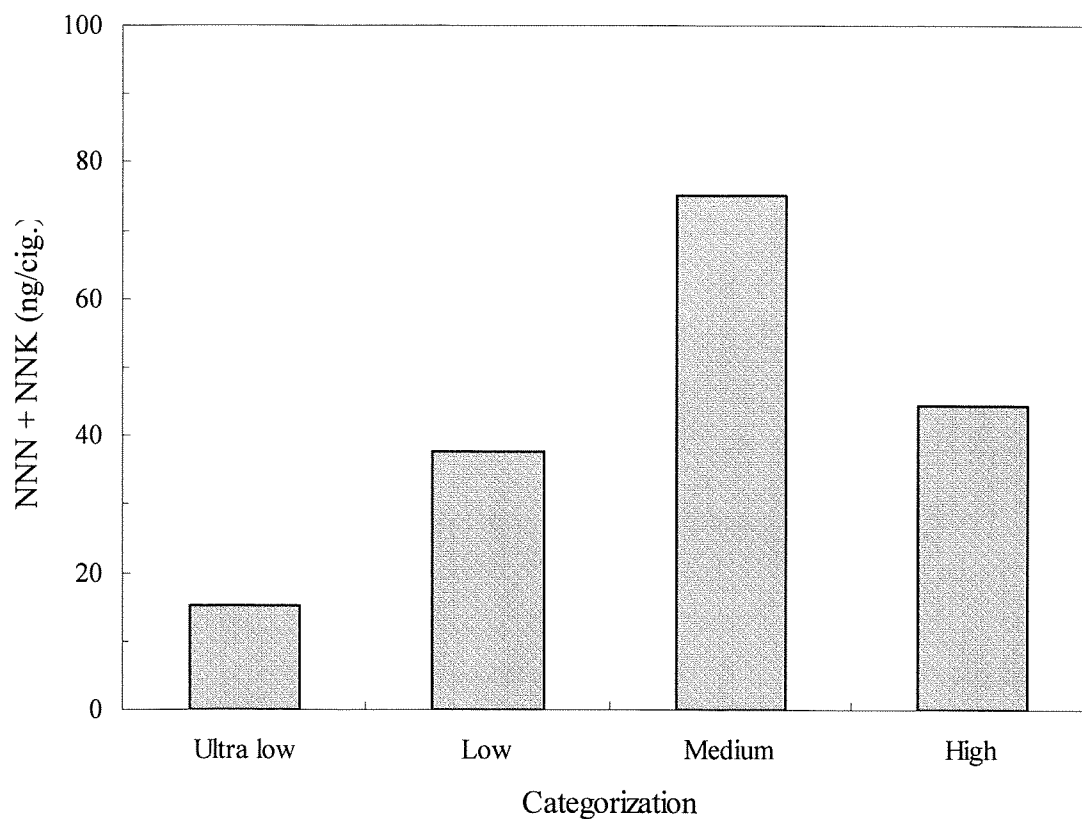


Fig. 3 Amount of NNN and NNK of mainstream smoke in Japanese cigarettes

Table 1 Operating conditions of analysis of TSNA and its deuterium

Analyte	<i>m/z</i>		Collision energy (eV)	Cone voltage (V)
	Precursor ion	Product ion		
NNK	208	> 122	12	17
NNN	178	> 148	10	17
NAT	190	> 160	10	17
NAB	192	> 162	11	12
NNK- <i>d</i> ₃	208	> 122	11	17
NNN- <i>d</i> ₄	182	> 152	11	17
NAT- <i>d</i> ₄	194	> 164	10	17
NAB- <i>d</i> ₄	196	> 166	11	12

Table 2 Precision of method for using mainstream smoke of Japanese cigarette (n=7)

Regimen	Sample	TSNAs (ng/cig.)											
		NNN			NNK			NAT			NAB		
		Ave	S.D	c.v (%)	Ave	S.D	c.v (%)	Ave	S.D	c.v (%)	Ave	S.D	c.v (%)
ISO	Mild Seven One	9.5 ± 0.6	6.1	6.3	5.5 ± 0.4	8.0	8.0	10.5 ± 1.1	10.1	10.1	2.5 ± 0.3	11.1	
	Mild Seven Super lights	28.2 ± 1.4	5.1	5.1	16.7 ± 1.4	8.1	8.1	32.8 ± 1.7	5.1	5.1	8.8 ± 1.1	12.1	
	Seven Stars	25.7 ± 1.5	6.0	6.0	19.6 ± 1.4	7.3	7.3	36.2 ± 1.4	3.9	3.9	9.6 ± 0.8	8.4	
HCI	Mild Seven One	55.5 ± 3.5	6.3	6.3	42.0 ± 2.5	5.9	5.9	57.2 ± 3.3	5.7	5.7	15.8 ± 1.0	6.5	
	Mild Seven Super lights	92.9 ± 4.0	4.3	4.3	60.2 ± 3.2	5.4	5.4	97.0 ± 5.0	5.1	5.1	29.6 ± 2.0	6.8	
	Seven Stars	57.3 ± 2.0	3.5	3.5	51.5 ± 4.0	7.7	7.7	76.3 ± 1.6	2.0	2.0	21.0 ± 1.8	8.6	

Table 3 Results of TSNAs in mainstream smoke of Japanese Top 10 seller brands at 2006 (n=5)

Cigarette Brands	Tar (mg/cig.)	Nicotine (mg/cig.)	Categorization	NNN (ng/cig.)			NNK (ng/cig.)			NAT (ng/cig.)			NAB (ng/cig.)		
				mean.	SD		mean.	SD		mean.	SD		mean.	SD	
Pianissimo One	1	0.1	Ultra low	6.7 ± 0.8	0.8		9.1 ± 1.1	1.1		11.9 ± 0.5	0.5		2.5 ± 0.3	0.3	
Mild Seven One	1	0.1		8.9 ± 2.0	2.0		5.6 ± 0.4	0.4		12.9 ± 2.2	2.2		2.9 ± 0.4	0.4	
Mild Seven Extra lights	3	0.3	Low	20.6 ± 6.3	6.3		9.7 ± 1.9	1.9		20.9 ± 1.9	1.9		5.8 ± 0.8	0.8	
CASTER Mild	5	0.4		16.0 ± 1.2	1.2		9.8 ± 0.8	0.8		20.3 ± 2.2	2.2		5.6 ± 0.5	0.5	
Mild Seven Super lights	6	0.5		37.0 ± 4.0	4.0		19.9 ± 1.2	1.2		36.2 ± 2.1	2.1		10.3 ± 0.6	0.6	
CABIN Mild	8	0.6	Medium	42.7 ± 4.0	4.0		25.6 ± 2.7	2.7		43.9 ± 3.9	3.9		13.7 ± 1.4	1.4	
Mild Seven Lights	8	0.7		49.4 ± 5.0	5.0		31.4 ± 6.4	6.4		45.4 ± 3.9	3.9		13.1 ± 2.4	2.4	
Mild Seven Original	10	0.8		48.1 ± 5.1	5.1		28.5 ± 3.9	3.9		53.8 ± 5.9	5.9		16.7 ± 1.9	1.9	
HOPE	14	1.1	High	25.7 ± 2.2	2.2		20.8 ± 3.9	3.9		38.7 ± 1.2	1.2		12.3 ± 0.5	0.5	
Seven Stars	14	1.2		23.0 ± 4.0	4.0		19.1 ± 2.0	2.0		35.0 ± 3.3	3.3		11.0 ± 1.6	1.6	

Ave;Average, S.D;Standard Deviation, c.v;coefficient of variation

Table 4 Comparison of TSNAs in mainstream smoke of Japanese cigarette brand at 1998 or 2006

Sample	Tar (mg)		Nicotine (mg)		NNN (ng/cig.)		NNK (ng/cig.)		NAT (ng/cig.)		NAB (ng/cig.)	
	2006	1998	2006	1998	2006	1998	2006	1998	2006	1998	2006	1998
Mild Seven Extra lights	3	3	0.3	0.3	21.1 ± 5.2	45.6 ± 3.2	10.3 ± 1.9	27.7 ± 1.9	18.5 ± 2.7	44.4 ± 3.5	5.7 ± 0.6	9.9 ± 1.3
Mild Seven Super lights	6	5	0.5	0.4	33.6 ± 1.8	47.8 ± 2.2	19.5 ± 1.7	28.1 ± 4.1	35.5 ± 2.5	55.5 ± 2.7	10.1 ± 0.9	11.7 ± 1.6
CABIN Mild	8	9	0.6	0.7	44.7 ± 3.0	116.0 ± 6.9	31.2 ± 5.5	52.8 ± 3.6	44.2 ± 4.7	84.0 ± 3.9	12.3 ± 2.2	15.7 ± 0.6
Mild Seven Original	10	12	0.8	1.0	44.9 ± 4.4	81.0 ± 4.3	28.6 ± 3.8	47.7 ± 3.5	52.2 ± 6.0	96.2 ± 6.5	15.6 ± 1.7	15.9 ± 1.1
Seven Stars	14	16	1.2	1.4	23.0 ± 3.5	65.0 ± 6.1	19.5 ± 1.9	40.3 ± 3.2	33.2 ± 3.3	77.6 ± 4.6	10.3 ± 1.4	13.1 ± 1.9

Ave:Average, S.D:Standard Deviation

煙草から発生するアクロレイン等 α,β 不飽和アルデヒドの分析

研究分担者 内山茂久 国立保健医療科学院

研究要旨

煙草煙から発生するアクロレイン等 α,β 不飽和アルデヒドを、高い精度で分析する方法（二連カートリッジ法）を開発した。二連カートリッジは、それぞれ試薬を含浸させたシリカゲルから構成される。一段目のカートリッジには、アクロレインの重合を防ぐために重合禁止剤ハイドロキノン（HQ）を含浸させたシリカを充填し、二段目のカートリッジにはカルボニル化合物の誘導体化試薬 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）を含浸させたシリカゲルを充填した。測定時に、煙草煙は最初に HQ を含浸させたシリカゲル（HQ-silica）を通過してから、二段目の DNPH を含浸させたシリカゲル（DNPH-silica）を通過する。このとき、煙草煙中のアクロレイン等 α,β 不飽和アルデヒドは一段目の HQ-silica に完全に捕捉されるため過剰の DNPH が付加することは無い。アセトアルデヒドの一部は、HQ-silica を通過するが二段目の DNPH-silica に完全に捕捉され、ヒドラゾン誘導体を生成する。溶出は捕集時とは逆に DNPH-silica 側から行う。溶出液中には、HQ-silica に捕捉されたアクロレインを含むカルボニル化合物と未反応の DNPH が含まれるので、誘導体化反応が開始する。煙草煙に含まれる全てのカルボニル化合物は、DNPH と反応して対応するヒドラゾン誘導体を生成する。そして、これらのヒドラゾン誘導体は高速液体クロマトグラフィーで分析することが可能である。本研究で開発した HQ-DNPH 法は、アクロレインなどの α,β 不飽和アルデヒドばかりでなく、広範囲のカルボニル化合物も同時に分析することが可能である。本法を用いて電子煙草から発生するカルボニル化合物を測定したところ、アセトアルデヒド 11, アクロレイン 9.3, ホルムアルデヒド 8.3, プロパナール 8.0, メチルグリオキサール 4.5, アセトン 2.9, ブタナール 1.5, グリオキサール 1.3 mg/m³ など、有害な物質を発生していることが明らかになった。

1. はじめに

煙草の煙には少なくとも 50 種類の発ガン性物質と 3500 種類以上の化学物質が含まれ、ガンによる死の 30%の原因となっている[1,2]。多くの化学物質が煙草の燃焼で発生するが、それらの中でもカルボニル化合物は、濃度が比較的高く人に対するリスクが高い物質である。カルボニル化合物の中でも、アクロレインやクロトンアルデヒドなどの α,β 不飽和アルデヒドは反応性が高く、人への影響が懸念されている。最近、Feng らは、煙草煙中のアクロレインが肺がんのリスクを増加させることを報告している[3]。また、比較的高濃度のホルムアルデヒドやアセトアルデヒドの暴露は、喘息[4]やガン[5]のリスクを高めることも知られている。

したがって、カルボニル化合物の人に対する健康影響や生成機構を解明することは重要であり、そのためには、精度の高い分析方法が要求される。

カルボニル化合物と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）の誘導体化反応は、有機化合物の定性・定量法の一つとして重要である。DNPH 誘導体化法は、様々なアルデヒド類、ケトン類を同時に分析できる利点があり、1930年に Allen [6]と Brady [7]が最初に報告した。空気中のカルボニル化合物の捕集には、当初、DNPH の酸性溶液のインピンジャー法[8]が行われていたが、現在は DNPH を含浸させた担体を用いた固体捕集法が主流となっている。固体捕集法に用いられる DNPH の担体には、XAD-2 [9,10]、シリカゲル

[11,12], ガラスビーズ [13], オクタデシルシラン結合シリカゲル [14], フロリジル [15], ガラスファイバーフィルター [16]など多くの種類が使われてきた。最近では、シリカゲルが最も多く使われており、DNPH を含浸させた DNPH-silica が主流となっている。この DNPH-silica を捕集剤とし、分析には紫外吸収検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる方法が、世界各国の公定法に採用されている[17]。

アクロレインやクロトンアルデヒドなどビニル基を持つ α,β 不飽和アルデヒドの分析には、誘導体の不安定性や保存性などの多くの問題が報告されている[18–21]。また、分析法に関する矛盾点[18, 19, 22–25]も多く報告されている。Tejada [18]は、DNPH-silica カートリッジ中で試料を保存すると、アクロレイン DNPH 誘導体のピークが減少し、不明の反応性生物が出現することを報告している。また、Possanzini と DiPalo [22, 23]は、アクロレインやクロトンアルデヒドの DNPH 誘導体が *syn* と *anti* の異性体を持つことを報告した。Risner と Martin [24]や Risner [25]はアクロレインが DNPH と反応する前に、2分子のアクロレインが重合して二量体(2-formyl-3,4-dihydro-2H-pyran)を生成するため、回収率が低下することを報告している。このように、アクロレインを含む α,β 不飽和アルデヒドの分析は非常に困難であり、現在のところ精度の高い分析方法は無い。

DNPH によるアクロレインの分析法の大きな問題点は、空気捕集時における DNPH-cartridge 中でのアクロレイン誘導体の分解である。従って、DNPH と隔離してアクロレインを捕集すれば、問題を解決できる。本研究では、アクロレインの捕集剤として、ヒドロキノンを含浸させたシリカ (HQ-silica)の適用を検討した。DNPH-cartridge の手前に、HQ-silica を充填したカートリッジ (HQ-cartridge)を接続することによって、DNPH-cartridge 中での分解を防ぎ、アクロレイン等 α,β 不飽和アルデヒドを含む広範囲のカルボニル化合物の分析方法を可能にした。

2. 実験

2.1. 装置と試薬

HPLC は、LC-20AD 送液ポンプを二台、SPD

M20A フォトダイオードアレイ検出器を備えた島津製作所製 Prominence LC-20 を使用した。分離カラムは Ascentis Express RP-Amide (2.7 μm particle size, 150 mm \times 4.6 mm i.d., Supelco 社製) を用い、カラムオープン温度を 40 $^{\circ}\text{C}$, 注入量を 10 μL とした。グラジェントモードの移動相にはアセトニトリル (40%) と水 (60%) の混合溶液 (A 溶液) と 5 mmol/L の酢酸アンモニウムを含むアセトニトリル (75%) と水 (25%) 混合溶液 (B 溶液) を用い、A 溶液 100% を 8 分間保ち、37 分間で B 溶液 100% にした後、15 分間 B 溶液 100% を保った。アイソクラティックモードでは、5 mmol/L の酢酸アンモニウムを含むアセトニトリル (75%) と水 (25%) 混合溶液を使用した。

自動喫煙装置は Borgwaldt Technik GmbH 製 (model LM1/PLUS) を使用し、一回の吸煙を 35 mL, 吸煙間隔を 1 分間に設定した。

HPLC, 試料調整用の純水は Millipore 製 Milli-Q システムを使用した。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩は東京化成工業製、ヒドロキノン、リン酸 (85%), エタノールは Sigma-Aldrich 製の特級を使用した。シリカゲルは AGC Si-Tech 製の 60/80 mesh, 120 \AA を使用した。

2.2. DNPH-cartridge および HQ-cartridge の作製

DNPH-cartridge : 高濃度測定用と低濃度測定用の二種類の DNPH-cartridge を作製した。シリカゲル 50 g を純水 500 mL で 3 回洗浄する。次に 500 mL のメタノールで 2 回洗浄した後、500 mL のアセトニトリルで 2 回洗浄する。2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩を、低濃度測定用の場合は 0.25 g, 高濃度測定用の場合は 1 g をアセトニトリル 100 mL に溶かす。この溶液を洗浄シリカに添加した後、40 $^{\circ}\text{C}$ に設定したロータリーエバポレーターでアセトニトリルを留去した。この DNPH-silica を 280mg 秤量し、1 mL のレゾリアンチューブに充填して DNPH-cartridge とした。

HQ-cartridge : ヒドロキノンを 0.05 g 秤量し 50 mL のアセトニトリルに溶かす。この溶液を洗浄シリカ 50 g に添加した後、40 $^{\circ}\text{C}$ に設定したロータリーエバポレーターでアセトニトリルを留去した。この HQ-silica を 280 mg 秤量し、1 mL のレゾリアンチューブに充填して HQ-cartridge とした。