

2.3. 煙草主流煙および空気試料の捕集

DNPH-cartridge の前段に HQ-cartridge を接続し HQ-DNPH-cartridge を作製する。煙草主流煙の測定の際には、自動喫煙装置のフィルターとシリンダーの間のチューブを切断し、HQ-DNPH-cartridge を接続した。試料煙草を自動喫煙装置に取り付け、着火した後、直ちに、たばこ主流煙の測定を開始した。空気試料の測定の際には、HQ-cartridge 側から空気を 0.1~1000 mL/min の流速で一定時間吸引した。捕集を終えた HQ-DNPH-cartridge は DNPH-cartridge 側から、1% のリン酸を含むアセトニトリル溶液 8 mL で溶出する。10 分間放置した後、エタノールを 2 mL 添加し、HPLC で分析した。なお、直ちに分析しない場合は、HQ-DNPH-cartridge を再び分割し、それぞれに密栓をした後、冷暗所に保管した。

3. 結果と考察

3.1. DNPH-cartridge 中におけるアクロレイン誘導体の分解

DNPH-cartridge に 20 ppm のアクロレイン標準ガスを 100 mL/min の流速で 10 分間通気した後、35 °C の恒温槽に保管する。一定時間放置した後、5 mL のアセトニトリルで溶出し、イオンクラティックモードの HPLC で分析した。なお、HPLC のオートサンプラーは 40 °C に設定しておいた。アクロレインは DNPH-cartridge 中で DNPH と反応し、ヒドラゾン誘導体 (ACR-D)

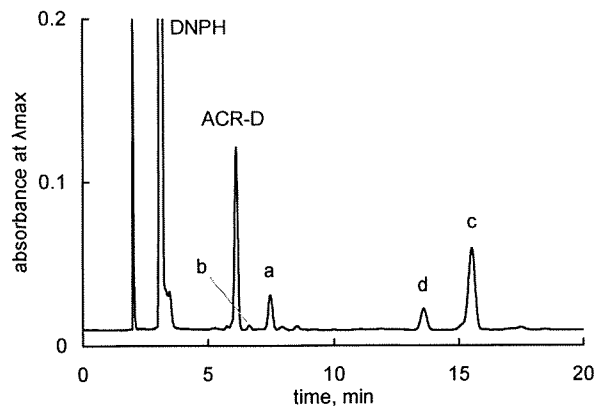
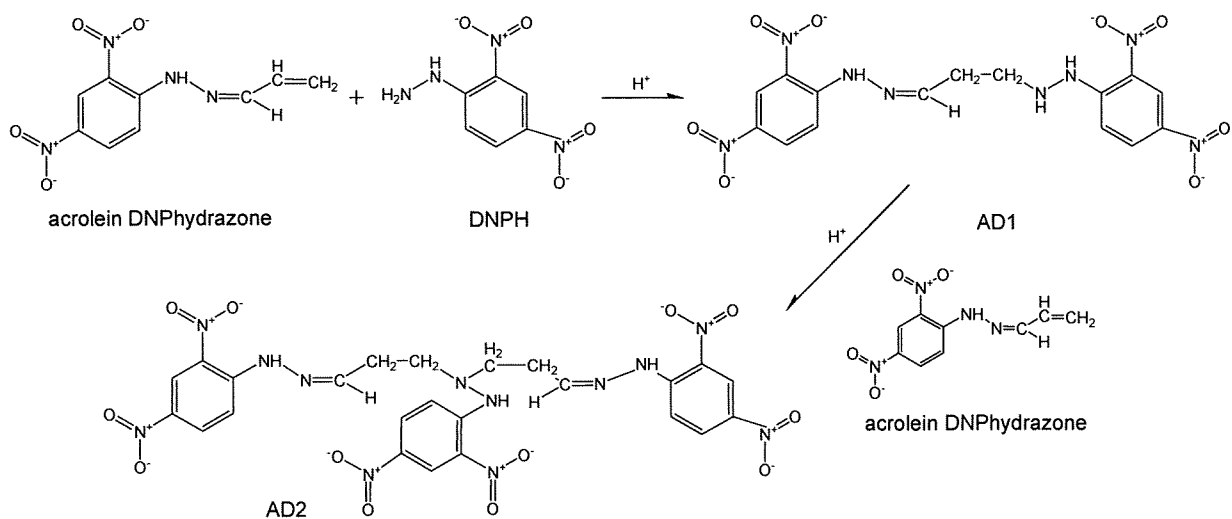


Fig. 1. Chromatographic profile of ACR-D and unknown peaks in the eluate of the DNPH-cartridge 2.4h following acrolein standard gas sampling.

を生成する。しかし、DNPH-cartridge 中では ACR-D の他に不明のピークが検出された。2.4 時間経過した時のクロマトグラムを Fig. 1 に示す。HPLC クロマトグラムには ACR-D の他に 4 つの不明ピーク (a, b, c, d) が検出された。ACR-D, a, b, c, d の極大吸収波長は、それぞれ 373, 356, 350, 353, 350 nm である。不明ピークの a と b, c と b はそれぞれ対になったピークであり、常に一定の比率で存在したことから、C=N 二重結合に起因する幾何異性体であることが推測される [26-29]。Schulte-Ladbeck らは、ACR-D は不安定であり、過剰の DNPH が ACR-D に付加し付加物 (AD1) を生成し、さらに AD1 に ACR-D が付加して AD2 を生成することを報告している [20]。Scheme 1 に ACR-D の DNPH による分解反応を示す。ACR-D の分解反応は、DNPH-cartridge 中、

Scheme 1. Decomposition of acrolein DNPhydrazone with DNPH



アセトニトリル溶出液中の両方で観測されたが、DNPH-cartridge 中での分解速度の方が速い。DNPH-cartridge 中における ACR-D と付加物の経時変化を Fig. 2 に示す。DNPH-cartridge 中の ACR-D 濃度は 10 分後に 86% に、2.4 時間後には 29% に、10 時間後には 12% にまで減少した。AD1 は、最初は急速に増加するが、1 時間後には減少し始め、3 時間後からは、ほぼ一定になった。DNPH-cartridge 中における主要な分解性生物は AD2 であり、ACR-D の減少に対応して増加した。

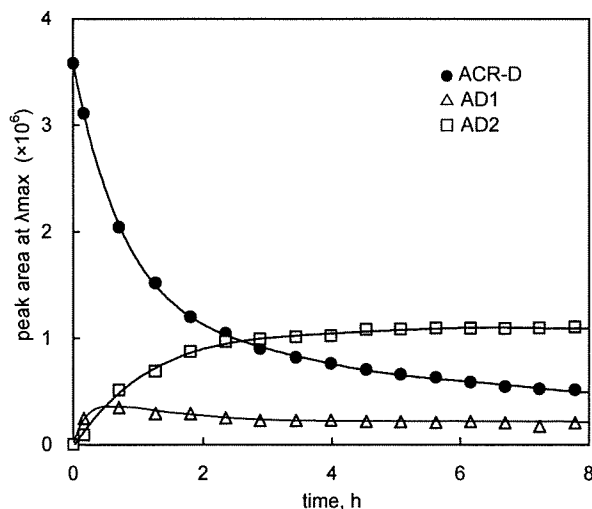


Fig. 2. The decomposition of ACR-D and the formation of adducts (AD1, AD2) in a DNPH-cartridge at 35 °C over time.

3.2. 溶出液中でのアクロレイン誘導体の分解

未使用の DNPH-cartridge をアセトニトリルで溶出し 4.95 mL に定容する。この溶出液に 1 mmol/L の ACR-D アセトニトリル溶液を 50 μL 添加した後、直ちに HPLC で分析した。HPLC はアイソクラティックモードで使用し、オートサンプラーの恒温槽は 25 °C に設定した。60 時間経過したときのクロマトグラムを Fig. 3 に示す。ACR-D の他に付加物 AD1, AD2 が検出されたが、AD1 の方が圧倒的に多い。

溶出液中での ACR-D の分解速度は、触媒である酸（リン酸）の添加で加速される。様々なリン酸濃度における ACR-D, AD1 の経時変化を Fig. 4 に示す。前述したように、DNPH-cartridge 中での ACR-D の分解生成物は AD2 が主であり、AD1 の生成は少ない。しかし、溶出液中での ACR-D の分解生成物は AD1 が主であった。また、

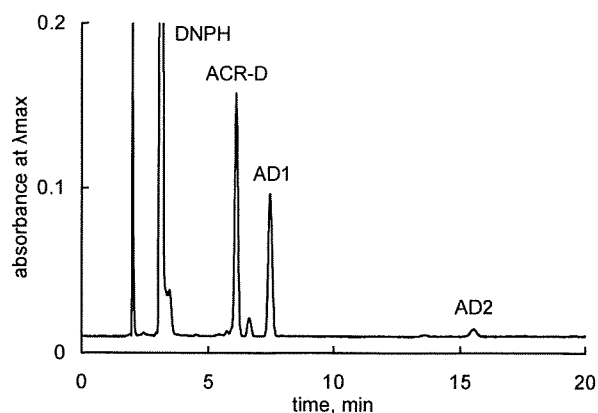


Fig. 3. Chromatographic profile of the DNPH-cartridge eluate of the acetonitrile solution after 60 h at 25 °C.

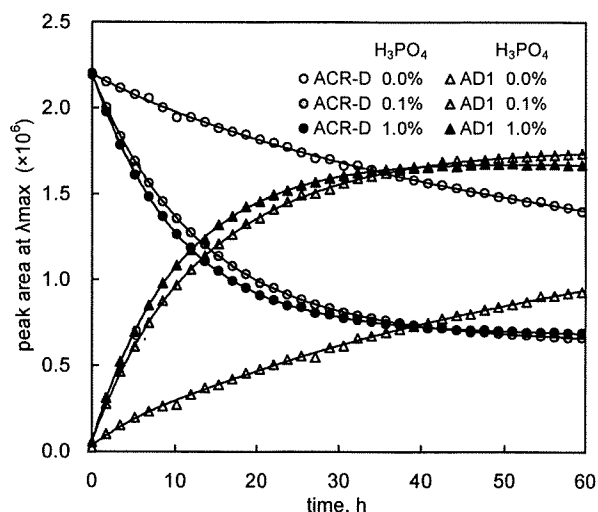


Fig. 4. Decrease of ACR-D and increase of AD1 with time in the acetonitrile eluate at various concentrations of phosphoric acid.

ACR-D の減少に反比例して AD1 は増加したが、分解速度は DNPH-cartridge 中より遅く、10 時間後に 89%、60 時間後に 64% までに減少した。リン酸を添加すると、分解速度は加速され、1% 添加すると ACR-D は 12 時間で 50% に減少した。

3.3. ACR-D の分解阻止 (DNPH-cartridge 中)

アクロレイン捕集時の分解は DNPH-cartridge 中で起こるので、アクロレインを DNPH と隔離して捕集すれば分解を防げる。アクロレインの沸点は 53 °C であり比較的高いので、常温でシリカゲルはアクロレインをトラップできるはずである。そこで、DNPH-cartridge の前段にシリカゲル-cartridge を連結した 2 連カートリッジを検討し

た。また、アクロレインは、ヒドロキシラジカルにより重合や分解することが報告されている [30,31]。さらに、煙草の主流煙からはヒドロキシラジカルを含む多くのフリーラジカルが発生する [32]。そこで、アクロレインの重合や分解を防ぐため、ラジカル捕捉剤であるヒドロキノンシリカゲルに含浸させた HQ-silica を充填した HQ-cartridge を作製し、アクロレイン捕集管とした。

HQ-cartridge と DNPH-cartridge を直列に接続した 2 連カートリッジ HQ-DNPH-cartridge に、HQ-cartridge 側から 20ppm のアクロレイン標準ガスを 100 mL/min の流速で 10 分間吸引した後、各カートリッジを分割して栓をしてから 35 °C の恒温槽に保管した。一定時間経過した後、各カートリッジを再び接続し、1%リン酸を含むアセトニトリル 4.5 mL で溶出する。10 分間放置した後、0.5 mL のエタノールを添加してから、アイソクラティックモードの HPLC で分析を行った。Fig. 5 に ACR-D の経時変化を示す。Fig. 2 とは対照的に ACR-D の付加物 (AD1, AD2) は検出されず、8 時間以上 ACR-D は一定の値を示した。

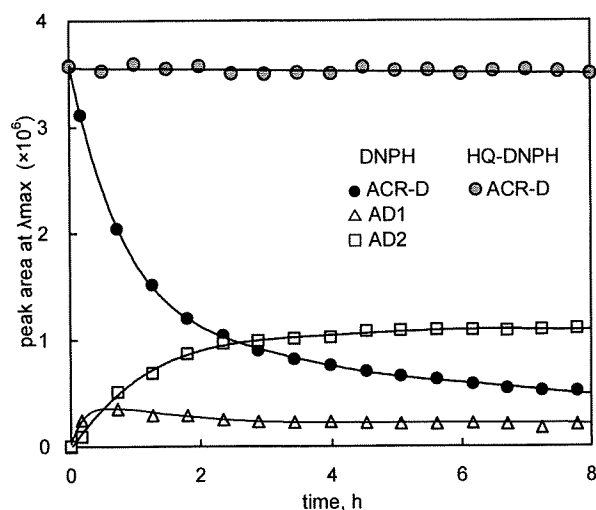


Fig. 5. Changes in ACR-D in a HQ/DNPH dual cartridge method and a DNPH-cartridge method with time at 35 °C over time.

捕集を終えた HQ-cartridge と DNPH-cartridge は、分割して保存すれば最低一週間は安定であり、アクロレインの減少は観測されなかった。しかし、連結して保存した場合、保存中に HQ-silica に吸着したアクロレインが DNPH-cartridge 側に移行し、ACR-D が減少することが確認された。従っ

て、直ちに分析しない場合は、捕集後の HQ-DNPH cartridge を分割して保存しなければならない。

3.4. ACR-D の分解阻止 (溶出液中)

捕集を終えた HQ-DNPH cartridge を溶出する時、HQ-cartridge に吸着したアクロレインは、連結した DNPH-cartridge の DNPH と一緒に溶出されるため、溶出液中で誘導体化反応が起こる。アクロレインなど不飽和アルデヒドは、飽和アルデヒドと異なり、DNPH との反応は比較的遅い。しかし、触媒となる酸を添加することで、反応は速くなる。未使用の DNPH-cartridge を様々なリン酸濃度のアセトニトリル 4.95 mL で溶出し、この溶出液に 1 mmol/L のアクロレインアセトニトリル溶液 50 μ L を添加して、ACR-D の経時変化を測定した。HPLC はアイソクラティックモードで、オートサンプラーの温度を 25 °C に設定して使用した。様々なリン酸濃度におけるアクロレインと DNPH の反応を Fig.6 に示す。

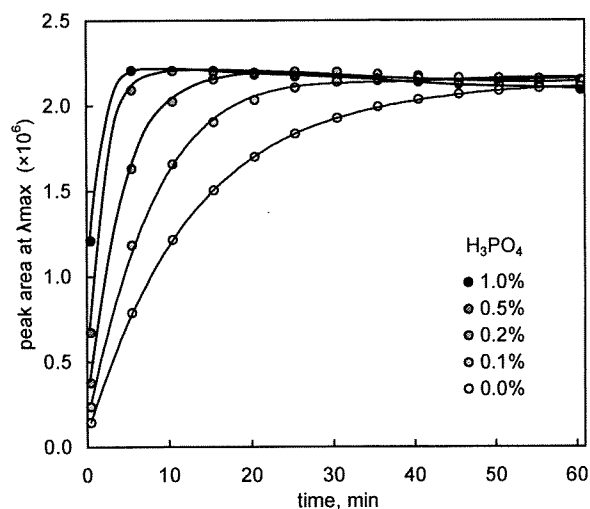


Fig. 6. Rate of reaction of acrolein and DNPH in the eluate with various concentrations of phosphoric acid.

リン酸を含まない溶液では誘導体化反応は非常に遅く、全てのアクロレインが誘導体化するまでに、25 °C で 60 分を要した。しかし、リン酸を添加すると、濃度の増加に伴いアクロレインの誘導体化速度は速くなる。最も効果的なリン酸添加量は 1% であり、5 分で反応は完了した。

前述したように (Fig. 4)、1%のリン酸を含む溶出液中では ACR-D が分解しやすい。そこで、分解を阻止する方法を検討した。未使用 DNPH-

cartridge を、1%のリン酸を含むアセトニトリル溶液 4 mL または 1%のリン酸を含むエタノール溶液 4.5 mL で溶出する。エタノールを最終濃度が 0, 10, 20, 90% になるように添加してから、アセトニトリルで 5 mL に定容した。この溶液に 1 mmol/L の ACR-D アセトニトリル溶液を 50 μ L 添加した後、直ちに HPLC で分析した。HPLC はアイソクラティックモードで使用し、1.7 時間間隔で、60 時間後まで測定を行った。エタノールを添加したときの ACR-D とその付加物の経時変化を Fig. 7 に示す。

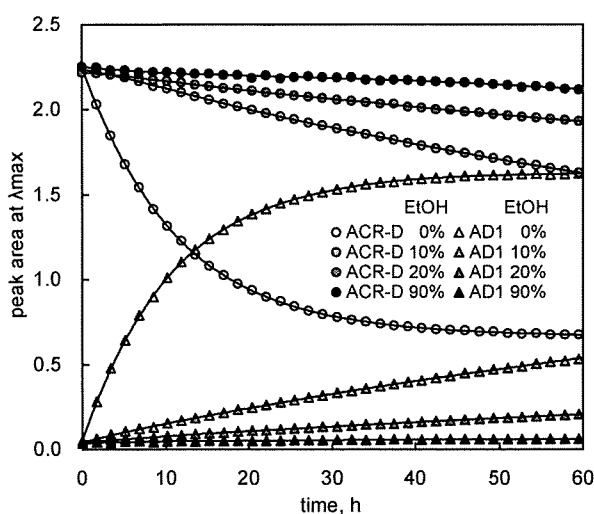


Fig. 7. Decrease of ACR-D and increase of AD1 with time in the acetonitrile eluate containing various concentrations of ethanol.

溶液中における ACR-D の分解は、エタノールを添加することで抑制することが出来た。一般に、エタノールのような非プロトン性の極性溶媒中で

は、付加反応が起こりにくいため、分解を抑制できたことが考えられる。エタノールの添加により溶出液が希釈されることを考慮すると、エタノールの添加量は 20% 程度が適当である。

3.5. 実試料（煙草煙）の分析

3.5.1. 標準的な煙草

自動喫煙装置のフィルターとシリンジの間のチューブを切断し、HQ-DNPH-cartridge を取り付け、ISO 法 (35mL puff volume, 2 秒吸引, 60 秒間隔) に従って、主流煙を採取した。この時、DNPH-cartridge は高濃度測定用を使用した。捕集を終えた HQ-DNPH-cartridge は、1%リン酸を含むアセトニトリル 8mL で溶出した後、10 分間放置してからエタノールを 2 mL 添加し、グラジエントモードの HPLC で分析した。

三銘柄の煙草 (マルボロライト, マルボロ, マイルドセブン) の主流煙から発生したカルボニル化合物の測定結果を Table 1 に示す。測定は、温度 22 $^{\circ}$ C, 湿度 60% の条件で、24 時間恒湿化してから行った。また、捕集後の HQ-DNPH-cartridge を分割し、HQ-cartridge には未使用の DNPH-cartridge を接続して、個別に溶出することによって、各捕集管にトラップされた物質を測定した。その結果、アセトアルデヒドを除く全てのカルボニル化合物は HQ-cartridge に吸着 (>99%) し、DNPH-cartridge には検出されなかった。そして、アセトアルデヒドは 89% が HQ-cartridge に吸着したが、11% は HQ-cartridge を通過して DNPH-cartridge にトラップされていることが明らかになった。

Table 2. Amounts of carbonyls in mainstream smoke vapors of cigarettes. n = 10, μ g/cigarette

Compounds	Marlboro Lights puffs: 7.3-8.0			Marlboro puffs: 7.5-8.6			Mild Seven Lights puffs: 6.0-7.0		
	mean	min.	max.	mean	min.	max.	mean	min.	max.
formaldehyde	2.0	1.4	3.1	2.4	1.4	5.5	3.3	2.4	5.1
acetaldehyde	270	230	320	520	490	580	380	310	430
acetone	78	60.	97	140	130	150	130	110	150
acrolein	19	16	22	36	30	44	18	12.	24
propanal	20	16	25	42	39	47	29	24	34
crotonaldehyde	3.4	2.1	4.3	9.4	7.1	11	7.4	5.9	8.9
butanal	12	9.2	15	23	21	27	26	20	31
<i>i</i> -pentanal	4.5	3.0	5.8	11	8.7	12	7.3	6.1	8.6
pentanal	0.3	0.2	0.4	0.8	0.6	1.3	0.6	0.4	0.8
glyoxal	0.2	0.0	0.2	0.1	0.0	0.2	0.5	0.4	0.7
methylglyoxal	0.3	0.1	0.4	0.4	0.3	0.5	0.9	0.5	1.7

3.5.2. 電子煙草

電子煙草は、香港に所在する北京 SBT 如煙科技發展有限公司が 2003 年に世界で初めて開発したとされ、現在、世界各国に普及している。専用カートリッジ内の液体を電氣的に霧状化し、その微粒子を吸引することで煙草の代替とする製品である。HQ-DNPH cartridge に電子煙草(The Plemium Smoker, EPI International Co., Ltd.) を取り付け、500 mL/min で 10 分間吸引を行った。なお、HQ-DNPH cartridge の DNPH-cartridge は低濃度測定用を使用した。捕集後、HQ-DNPH cartridge は 10 分または 16 時間放置した後、前述した条件で溶出し、グラジエントモードの HPLC で分析した。比較として、従来の DNPH-cartridge 単一カートリッジでも同時に捕集を

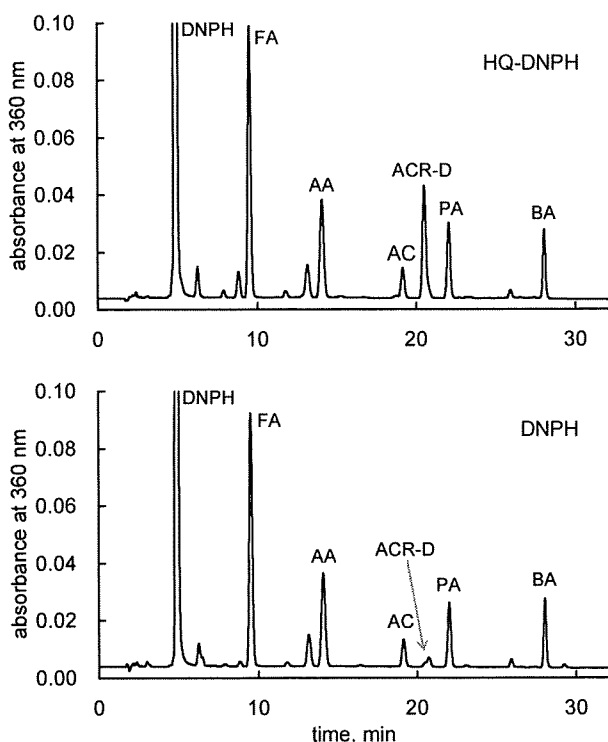


Fig. 8. Chromatographic profiles of acrolein and other carbonyl DNPhydrazones in the eluate of the HQ-DNPH coupled cartridge and DNPH-cartridge 17 h after sample collection.

formaldehyde DNPhydrazone, FA; acetaldehyde DNPhydrazone, AA; acetone DNPhydrazone, AC; acrolein DNPhydrazone, ACR-D; propanal DNPhydrazone, PA; butanal DNPhydrazone, BA; glyoxal DNPhydrazone, GO; methylglyoxal DNPhydrazone, MG

行った。捕集した HQ-DNPH cartridge を 10 分と 16 時間放置した後の HPLC クロマトグラムを Fig. 8 に示す。電子煙草から発生するガスには、

アクロレインを含む様々なカルボニル化合物が検出された。HQ-DNPH カートリッジを用いた場合は、大きな ACR-D のピークが検出されたが、従来の DNPH カートリッジでは ACR-D のピークがほとんど消滅した。Table 3 に電子煙草から発生するカルボニル化合物濃度を、HQ-DNPH 法と DNPH 法で測定したときの値を示す。アクロレインの測定値を除いて、HQ-DNPH 法と DNPH 法はよく一致している。しかし、DNPH 法で測定したアクロレインの値は HQ-DNPH 法の 1/30 程度まで減少してしまので、非常に大きな測定過誤を引き起こしてしまう。

Table 3. Concentrations of carbonyls generated from the electronic cigarette. mg/m³

Compound	HQ-DNPH		DNPH	
	10 min	17 h	10 min	17 h
formaldehyde	8.3	7.9	8.1	7.6
acetaldehyde	11	9.2	10	9.3
acetone	2.9	3.0	2.6	2.4
acrolein	9.3	9.2	6.4	0.3
propanal	8.0	7.4	8.3	7.6
butanal	1.5	1.7	1.7	2.4
glyoxal	1.3	1.3	1.2	1.6
methylglyoxal	4.5	4.2	4.3	4.7

4. 結論

本研究では、アクロレイン等 α,β 不飽和アルデヒドを精度よく分析する方法を開発した。従来の DNPH カートリッジを用いた分析法では、カートリッジ中で ACR-D が急速に分解し、付加物を生成してしまう。そこで、本研究では、DNPH カートリッジの前段にアクロレイン吸着用のカートリッジを取り付け、DNPH と隔離してアクロレインの捕集を行うことを検討した。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ヒドロキノン (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。空気試料や煙草煙は最初に 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。空気試料や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。一方、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 に完全に捕捉される。溶出は DNPH-silica 側から行われる。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、誘導体化反応が開始する。煙草煙中の全てのカルボニル化合物は DNPH と反応し対応するヒドラゾン誘導体を生成する。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。また、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できる。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 mg/m³、アクロレイン 9.3 mg/m³、ホルムアルデヒド 8.3 mg/m³、プロパナール 8.0 mg/m³、メチルグリオキサール 4.5 mg/m³、アセトン 2.9 mg/m³、ブタナール 1.5 mg/m³、グリオキサール 1.3 mg/m³、等の有害な物質を発生していることが明らかになった。

文 献

- [1] Hecht, S. S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91* (14), 1194-1210.
- [2] Doll, R.; Peto, R.; Boreham, J.; Sutherland, I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *Br. med. J.* **2004**, *328* (7455), 1519-1527.
- [3] Feng, Z.; Hu, W.; Hu, Y.; Tang, M. S. Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (42), 15404-15409.
- [4] Nordman, H.; Keskinen, H.; Tuppurainen, M. Formaldehyde asthma - rare or overlooked? *J. Allergy Clin. Immunol.* **1985**, *75*, 91-99.
- [5] Kerns, W. D.; Pavkov, K. L.; Donofrio, D. J.; Gralla, E. J.; Swenberg, J. A. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 4382-4392.
- [6] Allen, C. F. H. *J. Am. Chem. Soc.* The identification of carbonyl compounds by use of 2,4-dinitrophenylhydrazine. **1930**, *52* (7), 2955-2959.
- [7] Brady, O. L. The use of 2,4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for carbonyl compounds. *J. Chem. Soc.* **1931**, 756-759.
- [8] Grosjean, D. Formaldehyde and other carbonyls in Los Angeles ambient air. *Environ. Sci. Technol.* **1982**, *16* (5), 254-262.
- [9] Andersson, G.; Andersson, K.; Nilsson, C. A.; Levin, J. O. Chemosorption of formaldehyde on Amberlite XAD-2 coated with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Chemosphere* **1979**, *8* (10), 823-827.
- [10] Andersson, K.; Hallgren, C.; Levin, J. O.; Nilsson, C. A. Solid chemisorbent for sampling sub-ppm levels of acrolein and glutaraldehyde in air. *Chemosphere* **1981**, *10* (3), 275-280.
- [11] Beasley, R. K.; Hoffmann, C. E.; Rueppel, M. L.; Worley, J. W. Sampling of formaldehyde in air with coated solid sorbent and determination by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1980**, *52* (7), 1110-1114.
- [12] Guenier, J. P.; Simon, P.; Delcourt, J.; Didierjean, M. F.; Lefevre, C.; Muller, J. Air-sampling of aldehydes - Application to chromatographic determination of formaldehyde and acetaldehyde. *Chromatographia* **1984**, *18* (3), 137-144.
- [13] Grosjean, D.; Fung, K. Collection efficiencies of cartridges and microimpingers for sampling of aldehydes in air as 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Anal. Chem.* **1982**, *54* (7), 1221-1224.
- [14] Kuwata, K.; Uebori, M.; Yamasaki, H.; Kuge, Y.; Kiso, Y. Determination of aliphatic aldehydes in air by liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1983**; *55* (12), 2013-2016.
- [15] Lipari, F.; Swarin, S. J. 2,4-Dinitrophenylhydrazine-coated Florisil sampling cartridges for the determination of formaldehyde in air. *Environ. Sci. Technol.* **1985**, *19* (1), 70-74.
- [16] Levin, J. O.; Andersson, K.; Lindahl, R.; Nilsson, C. A. Determination of sub-part-per-million levels of formaldehyde in air using active or passive sampling on 2,4-dinitrophenylhydrazine-coated glass fiber filters and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (6), 1032-1035.
- [17] U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. Determination of Formaldehyde in Ambient Air Using Adsorbent Cartridge Followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Compendium method TO-11A; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development: Research

Triangle Park, NC, 1999.

[18] Tejada, S. B. Evaluation of silica gel cartridges coated in situ with acidified 2,4-dinitrophenylhydrazine for sampling aldehydes and ketones in air. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1986**, *26* (2), 167-185.

[19] Goelen, E.; Lambrechts, M.; Geyskens, F. Sampling intercomparisons for aldehydes in simulated workplace air. *Analyst* **1997**, *122*, 411-419.

[20] Schulte-Ladbeck, R.; Lindahl, R.; Levin, J. O.; Karst, U. Characterization of chemical interferences in the determination of unsaturated aldehydes using aromatic hydrazine reagents and liquid chromatography. *J. Environ. Monit.* **2001**, *3*, 306-310.

[21] Huynh, C. K.; Vu-Duc, T. Intermethod comparisons of active sampling procedures and analysis of aldehydes at environmental levels. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 654-657.

[22] Possanzini, M.; Di Palo, V. Determination of olefinic aldehydes and other volatile carbonyls in air samples by DNPH-coated cartridges and HPLC. *Chromatographia* **1995**, *40* (3-4), 134-138.

[23] Possanzini, M.; Di Palo, V. Short-term measurements of acrolein in ambient air. *Chromatographia* **1996**, *43*, 433-435.

[24] Risner, C. H.; Martin, P. Quantitation of formaldehyde, acetaldehyde, and acetone in sidestream cigarette smoke by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1994**, *32* (3), 76-82.

[25] Risner, C. H. High-performance liquid chromatographic determination of major carbonyl compounds from various sources in ambient air. *J. Chromatogr. Sci.* **1995**, *33* (4), 168-176.

[26] Behforouz, M.; Bolan, J. L.; Flynt, M. S. 2,4-Dinitrophenylhydrazones: a modified method for the preparation of these derivatives and an explanation of previous conflicting results. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (8), 1186-1189.

[27] Grosjean, E.; Green, P.G.; Grosjean, D. Liquid chromatography analysis of carbonyl (2,4-dinitrophenyl) ydrazones with detection by diode array ultraviolet spectroscopy and by atmospheric pressure negative chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (9), 1851-1861.

[28] Tayyari, S. F.; Speakman, J. L.; Arnold, M. B.; Cai, W.; Behforouz, M. A comprehensive investigation of variations in melting ranges and NMR data of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2195-2200.

[29] Uchiyama, S.; Andon, M.; Aoyagi, S. Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **2003**, *996*

(1-2), 95-102.

[30] Grosjean, D. Atmospheric chemistry of toxic contaminant. 3. Unsaturated aliphatics: acrolein, acrylonitrile, maleic anhydride. *J. Air Waste Manage Assoc.* **1990**, *40*, 1664-1668.

[31] Olivella, S.; Sole, A. Mechanisms for the reactions of hydroxyl radicals with acrolein: A theoretical study. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4* (6), 941-95.

[32] Lyons, M. J.; Gibson, J. F.; Ingram, D. J. Free-radicals produced in cigarette smoke. *Nature* **1958**, *181*, 1003-1004.

本研究に関する研究発表

論文発表

1) 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.

2) 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.

学会発表

1) 内山茂久 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 第70回分析化学討論会, 2009年5月, 和歌山大学, 第70回分析化学討論会講演要旨集

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; 松本真理子; 稲葉洋平; 鈴木元 大気中のオゾンとアルデヒドの同時分析 第18回環境化学討論会, 2009年6月, つくば国際会議場

4) 大坪泰文; 橋本真吾; 内山茂久 拡散サンプラーによる大気中硫化水素の測定 第19回環境工学総合シンポジウム2009, 2009年9月, 沖縄県男女共同参画センター

5) 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

6) 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

7) 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

8) 内山茂久 *trans*-1,2-ビス (2-ピリジル) エチレン含浸シリカと 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン含浸シリカを 2 層に充填したカートリッジを用いたオゾンとカルボニル化合物の同時分析 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月, 北海道大学

9) 内山茂久; 稲葉洋平; 樺田尚樹 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 12 月, 近畿大学

10) 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

11) Desorcie, J.; Sidisky, L.; Uchiyama, S. Determination of Airborne Ozone and Carbonyls Using a Two-Bed Sampling Cartridge Containing *trans*-1,2-Bis(2-pyridyl)ethylene and 2,4-Dinitrophenylhydrazone. *Pittsburgh Conference* 2010, February 28 - March 5, 2010, Orlando, USA.

知的財産権の出願・登録状況

1) Uchiyama, S. Method and device for detecting ozone and carbonyl-containing compounds, US Patent, International Application No.: PCT/US2008/088018 Publication Date: 09.07.2009

2) 内山茂久 アルデヒド又はケトン化合物量の測定方法及び大気中濃度測定用ガス吸引カートリッジ 特開 2010-8311, 2010 年 1 月 14 日

3) 内山茂久 気体分析用カルボニル化合物捕集管及び気体試料の分析方法 特願 2009-270849 2009 年 11 月 27 日

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

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

研究分担者 遠藤 治 麻布大学

研究要旨

たばこ煙は喫煙者が直接吸引する主流煙と、置きたばこなどから発生する副流煙とに大別される。これまでに、ISO 対応喫煙装置を用いて捕集された国産たばこ主流煙の変異原性を報告してきた。今回は受動喫煙の要因となっているたばこ副流煙の変異原性を調べた。

主流煙同様、国産たばこ売れ筋 10 銘柄を対象とし、各銘柄 3 ロット以上を集めた。副流煙の捕集は魚尾状煙突を備えた ISO 対応喫煙装置を用い、ISO 及びカナダ保健省の両条件下で行った。DMSO 抽出試料をサルモネラ TA100、TA98 及び YG1024 の 3 菌株を用い、S9mix 添加・無添加両条件下でプレインキュベーション法によるエイムス試験に供した。

主流煙の変異原性が主に TA98 及び YG1024 株 S9mix 添加条件下で認められたのに対し、副流煙は菌株・S9mix 添加の有無にかかわらず殆どすべてが変異原性陽性（一部擬陽性）であった。また、その活性も殆どの試料で主流煙より副流煙の方が高かった。主流煙と副流煙の変異原性の相関は、ISO 条件では認められたが、実際のヒトの喫煙に近いとされる HCl 条件では認められなかった。これらの結果から、副流煙は主流煙よりも多種多様で強い変異原を有すること、副流煙の毒性は吸煙の仕方によって左右されること、などが示唆された。

A. 研究目的

たばこ煙中には夥しい種類の有害化学物質が存在している[1]。たばこ煙は喫煙者が直接吸引する主流煙と、置きたばこなどから発生する副流煙とに大別される。これまでに、ISO 対応喫煙装置を用いて捕集された国産たばこ主流煙の変異原性を報告してきた[2,3]。一方、副流煙は非喫煙者に対する受動喫煙の要因となっている。そこで今年度は、喫煙装置を用いて捕集された国産主要 10 銘柄たばこ副流煙の変異原性を調べた。

B. 研究方法

(1) 試葉類

溶媒：ジメチルスルホキシド（DMSO、同仁化学製蛍光分析用）を用いた。

代謝活性化酵素系：エームステスト用 S9/コファクターAセット（S9 mix；オリエンタル酵母工業製）を用いた。

(2) たばこ試料

主流煙の変異原性試験に用いたものと同一の国産主要 10 銘柄を試験に供した。これらは日本たばこ産業(株) (JT) 公表値に基づく 2006 年度国内販売実績上位国産 10 銘柄である。TobLabNet プロトコルに従い、同一銘柄 3 ロットを測定するため、各銘柄とも少なくとも東京地区 3 箇所で購入した。Table 1 に試験に供したたばこの特徴をまとめた。

(3) 喫煙装置によるたばこ煙の捕集

たばこ煙の捕集には、魚尾状煙突を備えた ISO 対応型の Borgwaldt LM1 喫煙装置（ドイツ Borgwaldt KC 社製）を用いた。たばこ試料は ISO 20773 (2007) [4]に従って調製した。発生させた副流煙のうち、ガラス繊維ろ紙（Cambridge filter pad、直径 44mm）に捕集した総粒子状物質（TPM；いわゆる粗タール）を変異原性試験試料とした。ISO/FTC 条件による捕集は ISO 4387

(2000) [5]に準じた。カナダ保健省 (HCI) 条件による捕集はカナダ保健省 T-115 [6]に準じた。

(4) 抽出

変異原性試験用試料は、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。

(5) 変異原性試験

変異原性試験は、プレインキュベーション法[7]により試験した。菌株はサルモネラ TA100、TA98 及び YG1024 [8] 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。

C. 研究結果

変異原性試験により得られた用量-反応曲線の例を Fig.1 に示す。たばこ主流煙の変異原性が主に TA98 及び YG1024、S9mix 添加条件下で認められる[2,3]のに対し、Fig.1 から、副流煙は試験を実施した 3 菌株に対して、S9mix 添加の有無にかかわらず、良好な用量-反応関係を示した。

Table 2 に、TPM 及び変異原性の測定結果を示す。銘柄ごとに、ISO 及び HCI 両喫煙条件下における、供試 3 ロットの測定結果を示してある。TPM はたばこ 1 本当たりの重量で表した。変異原比活性は用量-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として算出した。括弧内の数値は擬陽性例 (溶媒対照値の 2 倍には満たないが、良好な用量-反応関係が認められるもの) である。

この表から、たばこ副流煙は、試験に供した全 60 試料で変異原性が認められた。特に、YG1024 株では、S9mix 添加の有無にかかわらず、すべての銘柄、捕集条件、製品ロットで明瞭な変異原性陽性であった。この YG1024 の親株で、同じくフレームシフト型の突然変異を検出する TA98 株に対しても、S9mix 添加条件下では 60 試料すべて明瞭な変異原性陽性、S9 mix 無添加条件下では 60 試料中 59 試料が変異原性陽性、1 試料のみ擬陽性であった。一方、塩基対置換型の突然変異を検出する TA100 株に対しては、S9 mix 無添加条件下では被験 60 試料中、陽性 51 例、擬陽性 9 例であった。また S9 mix 添加条件下では、陽性 56

例、擬陽性 4 例であった。陰性と判断されたものは一例もなかった。60 試料中最も高い活性を示したものは銘柄 H/製品ロット II/ISO 条件の試料であった (YG1024+S9 で 249,000 rev./cigarette)。

D. 考察

2007 年、副流煙中の無ニコチン乾燥粒子状物質 (NFDPM、いわゆるタール) およびニコチンを測定する国際標準法 (ISO20773) が公表された[4]。また同時に副流煙中の一酸化炭素を測定する国際標準法 (ISO20774) も公表されている[9]。これらはいずれも、魚尾状煙突を備えた定常分析線形喫煙器を用いる方法で、化学物質の分析手法は主流煙のそれらを踏襲したものとなっている。しかしながら、タールおよびニコチンでは測定対象に主流煙と若干の相違がみられる。すなわち、主流煙のタールがガラス繊維ろ紙に捕集された TPM のみを対象としているのに対し、副流煙ではこれに加えて魚尾状煙突に付着したのも測定対象としている。またニコチンは、これらに加えてドレッセル型のガラスインピンジャー (溶媒は 2-プロパノール) を用いて捕集したのも測定対象としている。今回は主流煙と比較することを考慮して、ガラス繊維ろ紙に捕集された TPM を対象として変異原性試験を実施した。

研究結果の項でも述べたように、たばこ副流煙は、試験に供した全 60 試料に変異原性が認められた。特に、YG1024 株 (±S9mix)、TA98+S9mix の 3 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。またそれ以外の 3 条件下でも陰性例はなかった。試験条件 (菌株・代謝活性化の有無) 別に変異原比活性を比較すると、いずれの試料も YG1024 株 S9mix 添加条件下で最も高い値を示し、フレームシフト型の突然変異を検出する TA98 及び YG1024 に対してはすべて S9mix 添加条件下の方が高い (数倍~10 数倍) 活性を示した。一方、塩基対置換型の突然変異を検出する TA100 株に対しては、同一銘柄でもロットにより、S9mix 添加条件下の方が高い場合と無添加条件下の方が高い場合の両方が認められた。両者の比活性の差は大きいものでも 2 倍程度で

あったが、半数以上が S9mix 無添加条件下で高い比活性を示した。これらの中には TA98 株より高い比活性を示す試料もあった。平成 20 年度に実施したたばこ主流煙の変異原性試験結果では、主に TA98 及び YG1024 に対して、S9mix 添加条件下で変異原性が認められ、S9mix 無添加条件下あるいは TA100 (±S9mix) では陰性例が多く認められた[3]。これらの結果から、副流煙には主流煙よりも多種多様な変異原性物質が発生していることや、菌株 (特に TA100 株) によっては、銘柄のみならずロットによる差が認められることが示唆された。

Table 3 は、TPM 及び変異原性の測定結果 (Table 2) から、各銘柄、ISO 及び HCI 両喫煙条件下における、供試 3 ロットの平均および標準偏差を算出したものである。Table 3 から、TPM や、YG1024+S9mix、TA98+S9mix に対する変異原性は比較的ロット間の差が小さく、相対標準偏差 (RSD) は最大でもそれぞれ 25.3%、25.3%、35.2%であった。これらは主流煙の結果とほぼ同様であった[3]。これに対して、同じ菌株 (YG1024、TA98) でも代謝活性化を行わない試験条件下では若干のロット差が認められ、一部試料 (銘柄 D・ISO 条件の TA98-S9、同 YG1024-S9、銘柄 E・ISO 条件の TA98-S9) では 50%を越える RSD が認められた。さらに TA100 株に対しては、全体的に大きな RSD (20 試料中、代謝活性化を行わない試験条件下では 9 試料、代謝活性化条件下では 7 試料で 50%以上) が認められた。

副流煙の国際標準 (ISO20773 および ISO20774) は、1999~2002 年、CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco の略称で、1956 年たばこ業界が中心となって設立された組織) メンバーで組織された特別調査委員会による共同研究成果に基づいて作成されたものである。これら ISO の中で、副流煙は主流煙と比較して本質的に変動要因が大きく、定量分析における精度管理は主流煙以上に重要であることが述べられている[4,9]。これらのことを考え合わせると、人工喫煙による副流煙の評価を行う上でロット差や試験精度なども考慮しつつ、基礎データを引き続き集積することが必要

であると思われる。

Fig. 2 は ISO 条件、Fig. 3 は HCI 条件で、それぞれ人工喫煙した場合の国産たばこ主要 10 銘柄の主流煙および副流煙の DMSO 抽出物の変異原比活性 (YG1024 株 S9mix 添加条件下) をプロットしたものである。横軸はパッケージに表示されたタール量で、主流煙 (平成 20 年度の実験結果) は△、副流煙 (本研究結果) は○で示してある。これらの図から、同一銘柄で比較すると、いずれの銘柄も副流煙は主流煙より強い変異原性を示すことが判る。また Fig. 2 から、ISO 条件で人工喫煙させて発生した主流煙の変異原性はパッケージに表示されたタール量にほぼ比例しているが、副流煙では低タール表示のたばことレギュラータイプのたばこに大差がなく、パッケージに表示されたタール量にかかわらず、いずれの銘柄も強い変異原性が認められた。一方 Fig. 3 から、HCI 条件で人工喫煙させて発生したたばこ煙の変異原性は、主流煙も副流煙もパッケージに表示されたタール量との比例関係は認められなかった。また ISO 条件の場合と比較して主流煙と副流煙の差も小さくなっており、パッケージ表示タール量 6~8mg の、いわゆる中程度の銘柄では、製品ロットによって主流煙と副流煙が逆転する場合も認められた。

Fig. 4 は、Fig. 2 および Fig. 3 のデータから、国産たばこ主要 10 銘柄の主流煙および副流煙の DMSO 抽出物の変異原比活性の相関を示したものである。横軸に主流煙、縦軸に副流煙の変異原比活性をとり、ISO 条件は●、HCI 条件は□でプロットした。また喫煙条件別に相関係数を算出し、併せて回帰直線も示してある。Fig. 4 から、主流煙と副流煙の変異原性の相関は、ISO 条件では $R^2=0.2416$ ($p<0.001$) で認められたが、HCI 条件では $R^2=0.0121$ ($p>0.1$) となり、相関は認められなかった。このように喫煙条件により変異原性の現れ方が異なることから、吸煙の仕方が変異原性を含む毒性発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。特に、HCI 条件は ISO 条件よりも実際のヒトの喫煙に近いとされており、これらのことも考え合わせると、副流煙は主流煙以上に複雑な毒性を有するものと推測される。

たばこ副流煙の変異原性については、これまでもいくつかの報告がある[1,10]。これらは国際標準法が確立される以前のものであるが、いずれも主流煙と比較して変異原性が高いことが報告されている。また、たばこ煙の有害物質についても、主流煙と比較して、副流煙の方が多量であることが報告されている[11]。本研究結果においても、副流煙の変異原性は主流煙よりも高く、また多種多様な変異原性物質が発生していることが示唆された。前述のように、今回はガラス繊維ろ紙に捕集された TPM のみを対象として変異原性試験を実施したので、魚尾状煙突に付着した成分も合わせると、その毒性はさらに増すことが予想される。これについては、魚尾状煙突に付着した成分の試料調製法も含めて、今後検討していく必要があると考えている。また、吸煙の仕方によって変異原性が左右されることも示唆されており、変異原性に及ぼす喫煙パラメータの影響についても、より詳細な検討が必要であると思われる。さらに実際のヒトへの変異原性物質の曝露実態を明らかにするために、バイオマーカー（尿中変異原など）を指標とした検討も進めていくことが重要であると考えられる。

E. 結論

(1) 主流煙の変異原性が主に TA98 及び YG1024 株 S9mix 添加条件下で認められたのに対し、副流煙は菌株・S9mix 添加の有無にかかわらず殆どすべてが変異原性陽性であった。

(2) 最も高い活性を示した銘柄はマイルドセブンオリジナル(ISO 条件・YG1024+S9 で 249,000 rev./cigarette) で、殆どの試料で主流煙より副流煙の方が高い活性を示した。

(3) 主流煙と副流煙の変異原性の相関は、ISO 条件では認められたが、実際のヒトの喫煙に近いとされる HCI 条件では認められず、これらの結果から、副流煙は主流煙よりも多種多様で強い変異原を有すること、副流煙の毒性は吸煙の仕方によって左右されること、などが示唆された。

[引用文献]

- 1) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2004) VOLUME 83 Tobacco Smoke and Involuntary Smoking, WHO IARC, Lyon, France
- 2) Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Goto S, Ogata H, Suzuki G (2009) 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* 55, 421-427
- 3) 遠藤治(2009) 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、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 47-63
- 4) ISO 20773 (2007) Cigarettes – Determination of Nicotine-Free Dry Particulate Matter and Nicotine in Sidestream Smoke – Method Using a Routine Analytical Linear Smoking Machine Equipped with a Fishtail Chimney. 1st ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 5) ISO 4387 (2000) Cigarettes – Determination of Total and Nicotine-Free Dry Particulate Matter Using a Routine Analytical Smoking Machine. 3rd ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 6) Health Canada (1999) Determination of “Tar”, Nicotine and Carbon Monoxide in Mainstream Tobacco Smoke. Official method T-115, pp.1-7.
- 7) Maron D M, Ames B N (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, 173-215
- 8) 能美健彦(1993) ニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ菌株の開発、*環境変異原研究*, 15, 1-11
- 9) ISO 20774 (2007) Cigarettes – Determination

of Carbon Monoxides in Sidestream Smoke – Method Using a Routine Analytical Linear Smoking Machine Equipped with a Fishtai Chimney. 1st ed., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

- 10) 高木敬彦, 高橋清, 遠藤治, 後藤純雄, 光崎研一, 松下秀鶴 (1996) タバコ副流煙の粒子状およびガス・蒸気状物質の変異原性, 日本獣医師会雑誌, 49, 661-665
- 11) USEPA (1993) Respiratory Health Effects of Passive Smoking ; Lung Cancer and Other Disorders. The Report of the U.S. Environmental Protection Agency, p.364

F. 研究発表

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. Journal of Health Science (2009) 55, 421-427.

2. 学会発表

- 1) Endo O, Inaba Y, Matsumoto M, Sugita K, Goto S, Ogata H, Suzuki G. Mutagenicity of DMSO extract of sidestream smoke from major cigarettes in Japan with smoking machine. 日本環境変異原学会第 38 回大会, 2009 年 11 月, 静岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

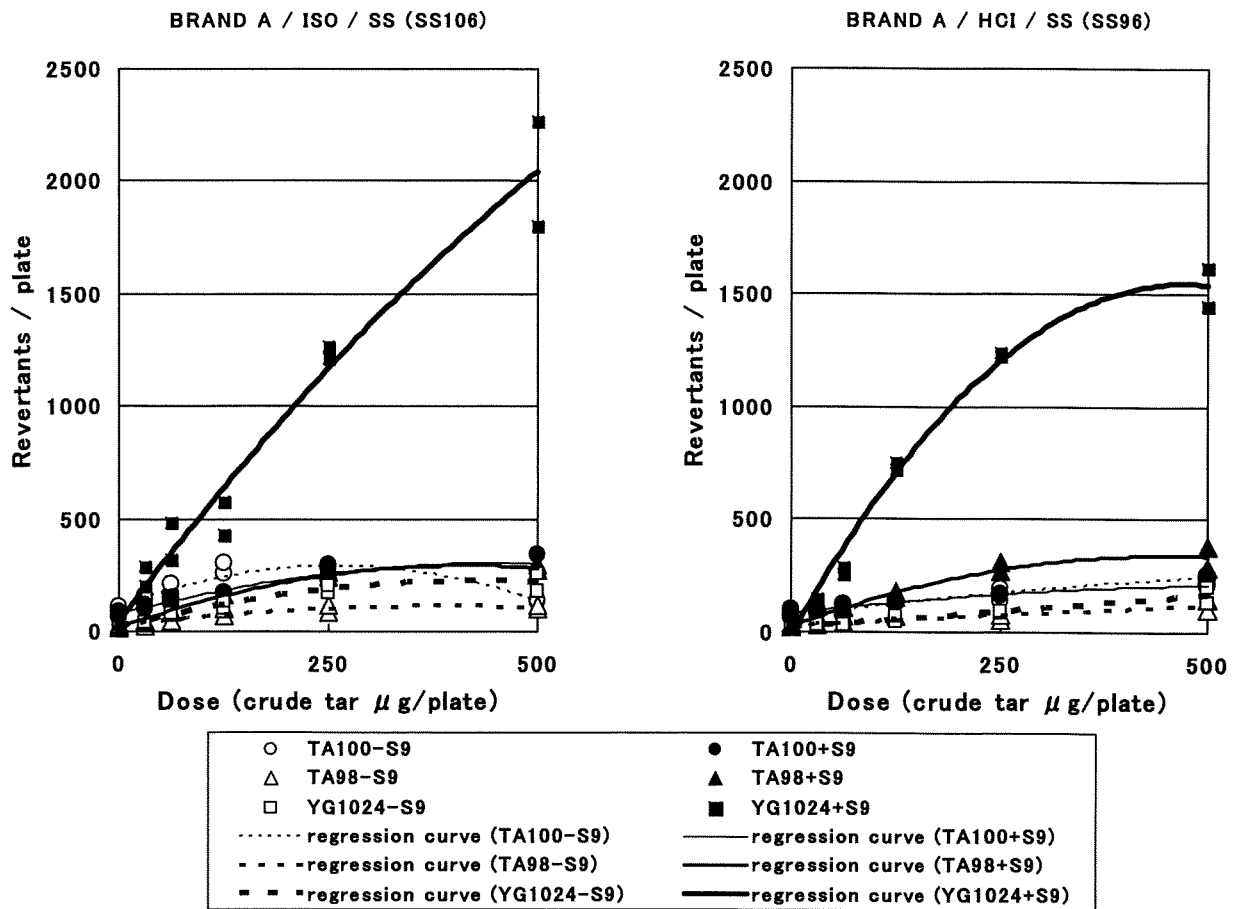


Fig. 1 Example dose-response of mutagenicity of cigarette sidestream smoke
 Assay was conducted by a preincubation method using Salmonella TA100, TA98 and YG1024 strains under the conditions of both with and without rat liver S9 mix.

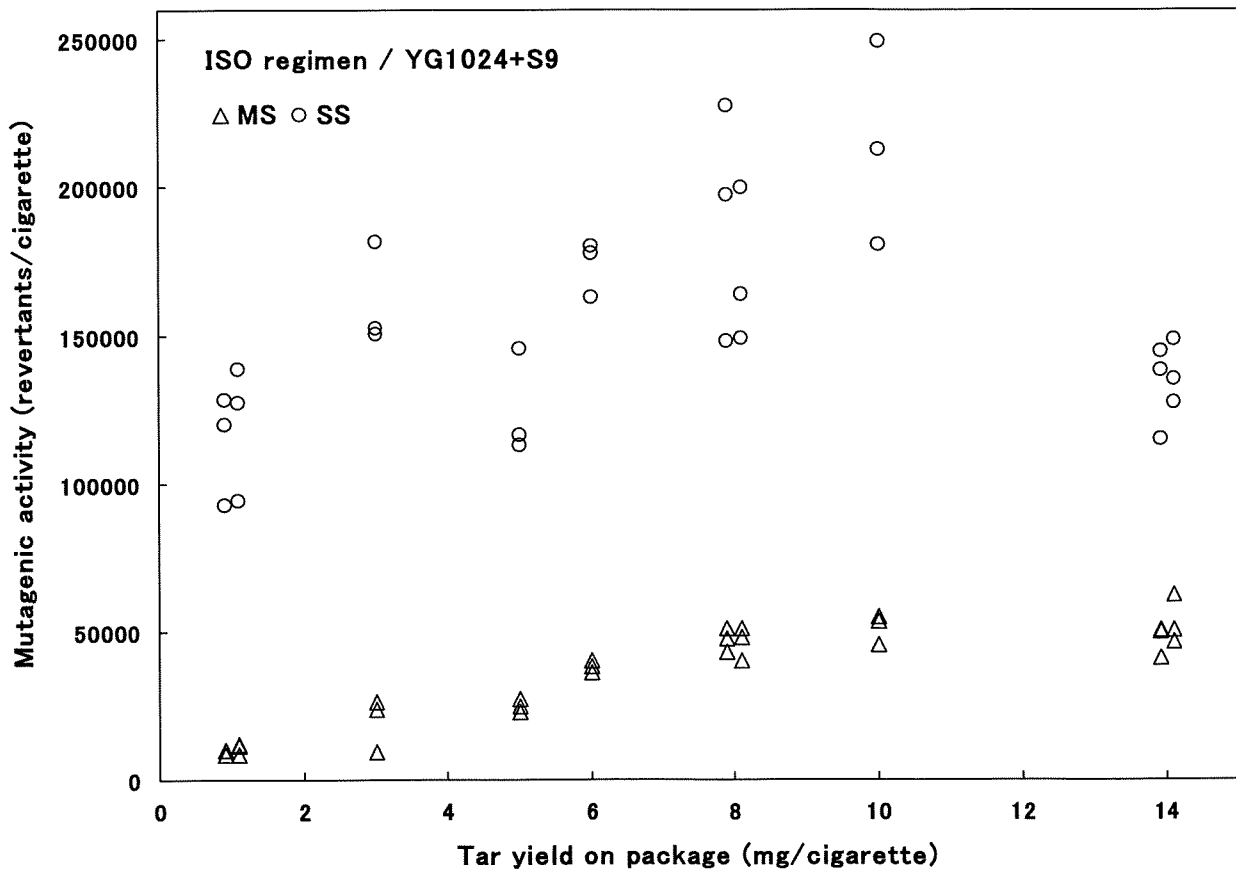


Fig. 2 Mutagenic activity of cigarette smoke with ISO regimen
 The triangle represents results of mainstream smoke (MS) and the circle represents those of sidestream smoke (SS). Mutagenicity test was conducted by preincubation procedure using Salmonella YG1024 strains with S9 mix.

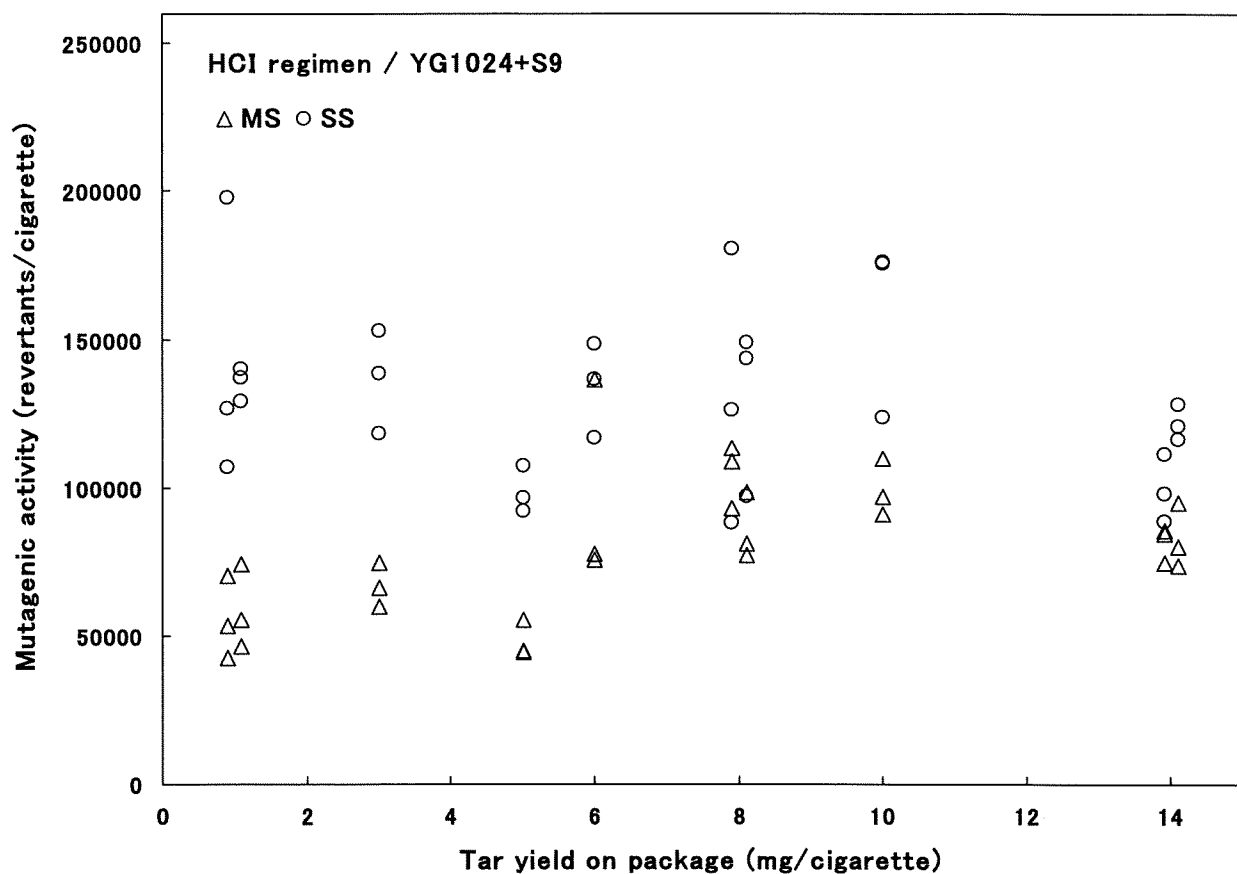


Fig. 3 Mutagenic activity of cigarette smoke with HCl regimen
 The triangle represents results of mainstream smoke (MS) and the circle represents those of sidestream smoke (SS). Mutagenicity test was conducted by preincubation procedure using Salmonella YG1024 strains with S9 mix.

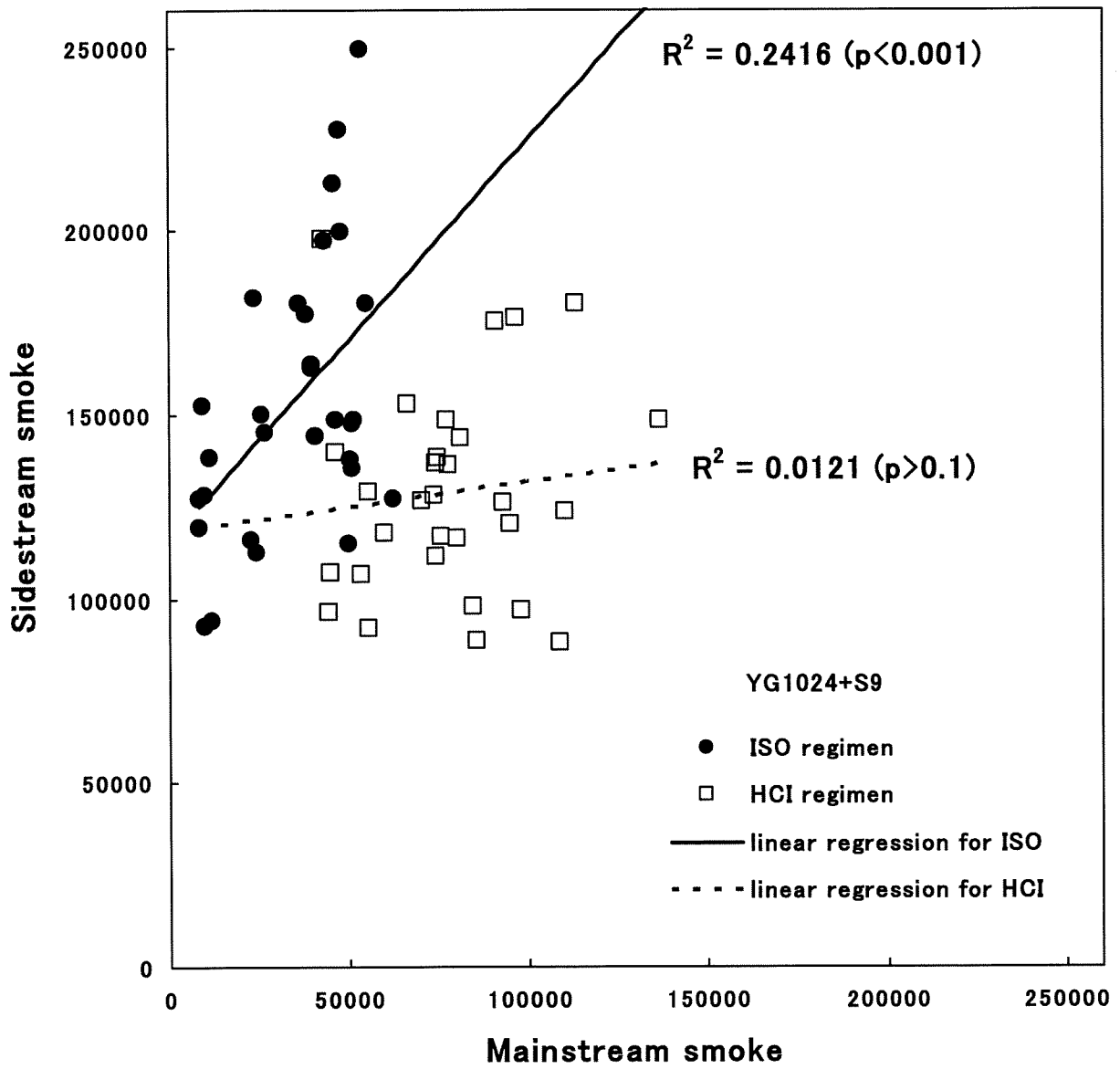


Fig. 4 Correlation of mutagenic activity between mainstream and sidestream smokes

Table 1 Cigarette samples tested

Brand name	Tar (mg/cig)	Nicotine (mg/cig)	Filter type (a)	Vent. Hole	Market Share (%)	Product lots
A PIANISSIMO One	1	0.1	P	2	1.6	I 01767019, II 01727027, III 01767P04
B MILD SEVEN ONE	1	0.1	DC	4	3.8	b I 35057P03, II 08237P16, III 35017P04
C MILD SEVEN EXTRA LIGHTS	3	0.3	DC	2	3.5	I 30817020, II 30817028, III 30747022
D Caster MILD	5	0.4	NC	2	2.9	I 01517022, II 29247P04, III 30847005
E MILD SEVEN SUPER LIGHTS	6	0.5	DC	2	7.7	I 01547016, II 01547008, III 01547012
F CABIN MILD	8	0.6	NC	1	1.9	I 37517P02, II 37537P02, III 37537P06
G MILD SEVEN LIGHTS	8	0.7	DC	1	7.3	I 30717026, II 01557P05, III 01567P04
H MILD SEVEN ORIGINAL	10	0.8	DC	1	6	I 29277023, II 01517006, III 01547028
I HOPE	14	1.1	P	0	1.4	I 371327027, II 371217P12, III 371227P09
J Seven Stars	14	1.2	DC	0	6.8	b I 37577026, II 37577P04, III 37587P15

a) P: plain, DC: dual charcoal, NC: neo charcoal

b) Shares include box type package

Table 2 Mutagenic activity of side stream extracts of 10 major cigarettes in Japan

Brand	Regimen	Lot	TPM mg/cig	Mutagenicity (revertants per cigarette)						
				TA100		TA98		YG1024		
				-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
A	ISO	I	13.8	22100	18400	7900	20700	10400	128000	
		II	14.4	23600	9300	6910	18000	18800	119000	
		III	15.5	22200	11300	6630	17200	12800	92300	
	HCl	I	15.5	19700	9400	5120	29900	5780	198000	
		II	16.9	21500	19100	4650	20400	5700	127000	
		III	19.5	6800	4950	3570	20300	5670	107000	
	B	ISO	I	21.7	23800	14500	3390	24900	7990	138000
			II	35.6	14400	7830	4130	19900	12600	127000
			III	26.4	10700	22300	4540	18100	10100	94000
HCl		I	29.3	11400	6090	3900	23600	3600	140000	
		II	23.6	15700	13200	2620	20000	3700	137000	
		III	18.3	8160	7610	2150	18300	5740	129000	
C		ISO	I	23.5	21100	17200	5860	29400	8120	150000
			II	24.7	17800	23300	4600	28300	14600	181000
			III	24.9	10800	8380	2090	18400	7740	152000
	HCl	I	21.6	(5770)	8430	2070	26000	5160	153000	
		II	21.6	15300	11500	2570	21900	4380	138000	
		III	21.8	(3940)	8850	2440	17100	6360	118000	
	D	ISO	I	21.8	11500	(7100)	4210	22600	6580	116000
			II	22.4	21200	26600	7270	23000	18500	145000
			III	24.4	(7480)	19200	1780	17900	6380	113000
HCl		I	22.6	8380	4620	3010	15800	4410	96600	
		II	24.1	20400	18400	2030	15600	3620	107000	
		III	20.5	8200	3580	3190	17300	4710	92100	

Table 2 (Continued)

Brand	Regimen	Lot	TPM mg/cig	Mutagenicity (revertants per cigarette)							
				TA100		TA98		YG1024			
				-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		
E	ISO	I	24.0	24700	14200	3340	23500	8330	180000		
		II	25.0	17300	10500	4370	28300	11800	177000		
		III	26.5	(8360)	11700	3550	17300	7960	163000		
	HCl	I	21.9	(7770)	8510	7020	22600	5470	137000		
		II	22.6	23600	20500	2690	29000	4180	148000		
		III	21.0	4560	(7780)	2080	21300	4860	117000		
	F	ISO	I	21.9	20500	13000	5740	26200	7140	197000	
			II	22.9	25200	23600	5390	29100	10500	227000	
			III	24.8	10800	15100	4510	26100	11700	148000	
HCl		I	19.9	18300	16900	4790	30800	6060	126000		
		II	19.9	19200	20700	3460	27400	6880	180000		
		III	22.3	4590	8420	2700	28500	4410	88200		
G		ISO	I	23.3	19200	18700	4800	25400	7710	164000	
			II	23.8	21400	24100	6170	27800	12100	200000	
			III	26.3	(9670)	24000	4050	17600	12000	149000	
	HCl	I	27.3	13600	11600	3730	21600	4470	149000		
		II	25.9	22200	14200	3440	17800	5000	143000		
		III	21.9	4980	4850	2940	19000	4150	96800		
	H	ISO	I	25.6	19500	22000	5890	29800	8640	213000	
			II	26.3	21100	19500	5650	35000	11700	249000	
			III	36.7	(18400)	13700	3230	25100	7310	180000	
HCl		I	19.6	8840	6110	4020	27800	5760	176000		
		II	23.6	26000	20100	4470	26900	5200	175000		
		III	25.9	5880	6500	4560	29300	4300	124000		