

なった。これにより、たばこ葉中に含まれるニコチン量が外箱表示以上に高いと考えられた。

また、たばこ規制枠組条約の第9、10条に基づいて設立されたWHOたばこ研究室ネットワーク (TobLabNet) では、今年度、たばこの含有量測定の一環として、たばこ葉中のニコチンを測定するラウンドロビン研究を実施した。このようにTobLabNetでもたばこ葉のニコチン量を分析、管理することはたばこ対策上必要であると考えている。

本研究では、報告例が少ない国産たばこ外箱表示ニコチン量との関係性の解明を目的として研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. 装置と試薬

ガスクロマトグラフィー/質量分析計 (GC/MS) は、GCがHewlett Packard社製のHP6890、MSがAgilent Technologies社製MSD5973を使用した。分離カラムは、HP-INNOWAX (30 m Length, 0.25 mm Diam., 0.25  $\mu$ m Film, Agilent Technologies社製) を用いた。分析条件は、Table 1に示す。なお測定結果は、たばこ葉重量を0.0001g単位そしてニコチン量は、たばこ葉1 gあたり0.1 mg単位で報告した。

試料調整用の超純水はMillipore製Milli-Qシステムを使用した。ニコチン、*n*-Hexane、2-Propanol、水酸化ナトリウム (NaOH) は、和光純薬製、*n*-Heptadecaneは東京化成工業製を使用した。

### 2. たばこ試料

2006年の国産たばこ売上上位10種類のたばこ試料を測定対象とした。Table 2に測定対象となったたばこ試料を示す。試料はいずれも市場から購入し試験に供した。また、前処理検討に使用したたばこは、Seven Stars Revo、Pianissimo PetilそしてMILD SEVEN Super Lights D-SPECの3銘柄であ

る。

## 3. 試料調整

### たばこ葉の破砕と恒湿化

たばこ葉は、たばこ本体から分離し、ミル付ミキサー (TWINBIRD KC-4508型、ツインバード工業製) で1分間粉末状になるまで粉砕した。粉砕したたばこ葉試料はすべて、ISO3402 (1999) に準拠し、抽出実験前、最低48時間～最大10日間、温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 3\%$ で恒湿化を行い実験に供した。

### 抽出溶液

80 gのNaOHをMilli-Q水1000 mLに溶解し、2M NaOHを作成した。また、0.5 gの*n*-Heptadecaneを1000 mLの*n*-Hexaneに溶解し、0.5 mg/mL *n*-Heptadecaneの抽出溶液を作成した。

### ニコチン標準溶液

200 mgのニコチンを50 mLのMilli-Q水に溶解し、2M NaOH 25 mLと抽出溶液100 mL添加後、 $60 \pm 2$ 分間振とう抽出を行った。有機層を回収し、これをニコチン標準溶液 (2 g/L) とした。

## 4. 前処理操作

恒湿化したたばこ葉1.5 gは、100 mL容の共栓付三角フラスコに入れた。なお、このときたばこ葉は、Mettler Toledo AT 201 (メトラー・トレド社製) を用いて0.001 gまで秤量した。この三角フラスコにMilli-Q水20 mL、抽出溶液40 mLそして2M NaOH 10 mLを添加し、ニコチン標準溶液と同様に振とう抽出した。遠心分離後 (3,500 rpm, 10分間)、有機層を回収し、測定まで $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。なお、有機層は、2-Propanolで2000倍希釈し、GC/MSへ供した。なお、GC/MS測定は、選択イオン検出法 (SIM法) を用い、内部標準法によって定量した。

## C. 結果及び考察

## たばこ葉処理の影響

今年度、本研究班は、たばこ葉中のニコチン測定を実施するWHO TobLabNetラウンドロビン研究に参加した。その結果は、他の研究室と比較すると若干高値になることが分かった。この原因の一つとしてたばこ葉の処理が考えられる。WHOの推奨法では、たばこ葉を4 mm以下にするとなっていたが、我々はより抽出効率を上げるためにより細かくたばこ葉を粉砕するミルを使用した。この操作により、たばこ葉は粉末状になった。そこでまず、たばこ葉の大きさがニコチン測定に与える影響を検討した。Fig. 1は、未処理、4 mm程度そして粉末状のたばこ葉を示している。3条件のたばこ葉について前処理後にニコチン測定を実施した。なお、本研究に使用したたばこは、Seven Stars Revo, Pianissimo PetilそしてMILD SEVEN Super Lights D-SPECの3銘柄である。測定結果をTable 3に示す。Seven Stars Revoでは、未処理が17.1 mg/g, WHO処理が18.4 mg/gそして粉末処理が19.7 mg/gとたばこ葉がより細くなることでニコチン濃度が高くなった。Pianissimo Petilも同様の傾向で18.1, 19.4そして20.2 mg/gであった。一方で、MILD SEVEN Super Lights D-SPEC はたばこ葉処理に関わらず、19.6, 19.8そして19.7 mg/gとほぼ同程度であった。3銘柄中2銘柄は、たばこ葉の処理がニコチン濃度に影響を与える結果が得られた。今後、たばこ葉中のニコチン濃度を分析する場合は、たばこ葉処理を統一することが必要であると考えられた。また、今回の結果より、出来る限りたばこ葉を細かくした方がニコチンの抽出効率が上昇することが示唆された。

## 国産たばこ 10 銘柄のニコチン含有量

Table 4には、国産たばこ10銘柄のたばこ葉1 gあたりのニコチン量を示した。今回の報告のたばこ銘柄は、外箱表示のニコチン量が0.1~1.2 mgを使用した。たばこ外箱ニコチン表示量が0.1 mgの

Pianissimo One, Mild seven oneはそれぞれ、15.9と15.1 mg/gであった。次にたばこ外箱ニコチン表示量が0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7と0.8 mgのたばこ銘柄のたばこ葉ニコチン量は、15.5, 13.7, 15.2, 16.7, 16.1そして15.1 mg/gであった。さらに今回の研究で外箱表示ニコチン量が高いHope, Seven Starsのニコチン量は、17.2と16.1 mg/gであった。以上の結果より、外箱表示量が高いHopeとSeven Starsのたばこ葉ニコチン量は、他の銘柄と比較すると若干高い結果であった。しかしながら、本研究では外箱表示ニコチン量とたばこ葉ニコチン量の関連性は認められなかった。また、10銘柄の平均たばこ葉ニコチン量は、 $15.7 \pm 1.0$  mg/gであった。本研究によって得られた結果は、低ニコチンたばこであっても、外箱ニコチン表示量が高いたばこと同等のたばこ葉ニコチン量が認められていた。よって、たばこ葉ニコチン量は、先行研究でのたばこ主流煙中のニコチン量が、喫煙法によって変動する原因の一つであると考えられる。また、たばこ製品の評価指標として利用できるかと推測できる。

## D. 結論

国産たばこ10銘柄のたばこ葉中ニコチンを測定した。その結果、たばこ外箱表示ニコチン量とたばこ葉中ニコチン量との間には、関連性は認められなかった。以上の結果より、たばこ外箱表示ニコチン量は、喫煙法とたばこフィルター形状によって調節されている可能性があるかと推測された。

## 【引用文献】

[1] ISO Standard 3308. International Organization for Standardization. Routine analytical cigarette smoking machine-definitions and standard conditions, fourth ed. 2000.

[2] ISO Standard 4387. International Organization for Standardization. Cigarettes-determination of total and nicotine free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine, third ed. 2000.

[3] ISO Standard 10315. International Organization for Standardization. Determination of nicotine in smoke condensates-gas chromatographic method, second ed. 2000.

[4] Method T-115. Health Canada. Determination of “Tar” , nicotine and carbonMonoxide in mainstream tobacco smoke. 1999.

[5] Endo O, Matsumoto M, Inaba Y, Sugita K, Nakajima D, Ogata H, Suzuki G. Nicotine, tar, and mutagenicity of mainstream smoke generated by machine smoking with International organization for standarzation and Health Canada intense regimens of major Japanese cigarette brands. Jornal of Health Science. (2009) 55, 421-7..

#### **E 研究発表**

統括報告書に一括記載した。

#### **F 知的財産権の出願・登録状況**

なし

Table 1 Operating conditions in GC/MS analysis

GC	HEWLETT PACKARD HP 6890
Column	HP-INNOWAX, 30 m x 0.25 mm id, 0.25 µm film
Column temp.	50°C (2 min hold) → (15°C/min) → 180°C → (5°C/min) → 190°C → (30°C/min) → 250°C (1 min hold)
Injection temp.	220°C (Split 10:1)
Injection volume	1 µL
MS	Agilent 5975
Ionization method	EI
Ion source temp.	230°C
Ionizing voltage	70 eV
Mass acquisition Mode	SIM
Target ion (m/z)	Nicotine; 84, 161 n-Heptadecane; 57, 84

Table 2 Japanese cigarette of top ten selling brands, 2006

Brand name	Tar (mg/cig.)	Nicotine (mg/cig.)
Pianissimo One	1	0.1
Mild Seven One	1	0.1
Mild Seven Extra Lights	3	0.3
Caster Mild	5	0.4
Mild Seven Super Lights	6	0.5
Cabin Mild	8	0.6
Mild Seven Lights	8	0.7
Mild Seven Original	10	0.8
Hope	14	1.1
Seven Stars	14	1.2

Table 3 Comparison of Whole Tobacco with different Grinding Condition

	Nicotine (mg/ g)								
	Seven Stars Revo			Pianissimo Petil			MILD SEVEN Super Lights D-SPEC		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	16.7	19.1	20.3	17.7	19.4	20.3	17.9	19.3	19.6
2	17.1	18.6	18.0	17.4	19.8	19.8	19.1	19.7	20.1
3	17.4	18.5	19.7	18.0	19.5	20.6	20.5	18.8	20.9
4	17.6	17.6	19.7	18.8	19.6	20.3	19.9	21.8	18.8
5	16.6	18.2	20.7	18.5	18.4	20.2	20.4	19.7	19.2
Average	17.1	18.4	19.7	18.1	19.4	20.2	19.6	19.8	19.7
S.D.	0.42	0.54	1.04	0.58	0.55	0.29	1.09	1.14	0.82
CV (%)	2.4	3.0	5.3	3.2	2.8	1.4	5.6	5.8	4.1

Nicotine (m/z = 84), Nicotine-d (m/z = 87) を採用して測定。

A :未処理, B:粗い粉碎 (W H O 法), C:粉末

Table 4 Amounts of Nicotine in Japanese cigarette brands

Brand name	Whole Tobacco Nicotine (mg/g)
Pianissimo One	<b>15.9 ± 1.6</b>
Mild Seven One	<b>15.1 ± 0.6</b>
Mild Seven Extra Lights	<b>15.5 ± 0.2</b>
Caster Mild	<b>13.7 ± 0.5</b>
Mild Seven Super Lights	<b>15.2 ± 0.5</b>
Cabin Mild	<b>16.7 ± 0.8</b>
Mild Seven Lights	<b>16.1 ± 1.0</b>
Mild Seven Original	<b>15.1 ± 0.2</b>
Hope	<b>17.2 ± 0.3</b>
Seven Stars	<b>16.1 ± 0.5</b>



A. Untreated

B. WHO method

C. Powder

Fig. 1 Whole Tobacco Grinding conditions

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

国産たばこ主流煙中tobacco-specific *N'*-nitrosaminesの分析

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院  
研究分担者 内山茂久 国立保健医療科学院  
研究分担者 樺田尚樹 国立保健医療科学院  
研究協力者 杉山晃一 麻布大学大学院

### 研究要旨

たばこ主流煙中には、International Agency for Rescarch on Cancer (IARC) の発がん性リスク一覧においてグループ1および3に分類されるたばこ特異的ニトロソアミン類 (tobacco-specific *N'*-nitrosamines ; TSNA) が含まれている。本研究では、国産たばこ販売量上位10銘柄の主流煙中TSNAを測定した。たばこ主流煙はInternational Organization for Standardization (ISO) が定めるISO法およびヒトの喫煙行動に近い方法としてカナダ保健省が提唱する機械喫煙法 (HCI法) により捕集し、TSNAの測定結果を比較した。たばこ主流煙は捕集後、40 mLの酢酸アンモニウム溶液で250 rpm, 30 min振盪抽出した。抽出液10 mLは固相抽出カラム (C18カラム) に導入し、10%メタノール (5 mL) で洗浄後、70%メタノールで溶出した。溶出液は濃縮後、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) に供した。HCI法によるTSNA測定結果は、どの銘柄においてもISO法より高い値を示した。また、ISO・HCI法ともに、TSNA測定結果は、表示タール・ニコチン量との関連性が低いことがわかった。さらに、HCI法の測定結果から、タール量1 mgたばこの喫煙者は、喫煙行動によってタール量14 mgの喫煙者と同濃度のTSNAに暴露される可能性があると考えられた。以上より、ISO・HCI法で主流煙を捕集、分析し、併せて表示することが重要であると考えられた。また、喫煙による有害性を判断するには、タール、ニコチン以外のTSNA等の化学物質を公表することも重要であると考えられた。

### A.研究目的

喫煙の習慣化は発がんリスクを高める可能性があると考えられており[1]、たばこ煙自体もIARCグループ1 (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。たばこ煙には現在知られているものだけでも約4,000種もの化学物質が含まれており、そのうち、発がん性が認められているものは約250種、発がん性が疑われる物質は約50種あるといわれている[2]。このたばこ煙中には、発がん性に関連する物質である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はたばこ葉中のアルカロイド (nicotine, normicotine, anatabineおよびanabasine) と亜硝酸や硝酸が反応することで、上記アルカロイドがニトロソ化し、4種類生成される[3]。なお、TSNAの化学構造と反応経路をFig. 1に示す。

TSNAはたばこの発酵、製造過程やたばこの燃焼時の熱合成により生成されるといわれている[5]。また、TSNAの生成量はたばこ葉の発育環境中の温湿度が高いほど増加する[4]。

4種のTSNAのうち、NNKとNNNはIARCグループ1に、一方、NATとNABはIARCグループ3 (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。したがって、たばこ主流煙中TSNAを測定することは、喫煙者の健康影響を評価する上で重要になると考えられる。

現在、国産たばこ外箱に記載されているタール・ニコチン量は、ISOが定める機械喫煙法 (ISO法) によりたばこ主流煙を捕集し、化学分析手法を用いて測定されている。しかし、これまでに、ISO法を用いたたばこ主流煙中TSNAの測定報告は海外で多数されている[5-14]が、国産たばこ主流煙中TSNA測定に関する報告[15,16]はわずかである。さらに、近年、カナダ保健省はヒトに近い喫煙法として、ISO法とは別の機械喫煙法 (HCI法) を提唱している。先行研究からニコチン量が0.6 mg未満のたばこ喫煙者は、ニコチン欲求を満たすため、1回の吸煙量が多くなる (代償性補償喫煙) 傾向がある[17]。また、その平均吸煙量は58.4 mLと、HCI法での吸煙量に近い。このような吸煙量の増加がTSNAの暴露量の増加に繋がると推測される。したがって、HCI法を用いて主流煙中TSNAを測定することにより、暴露実態の推定に繋がると考えられる。

そこで本研究では、ISO法およびHCI法により捕集した国産たばこ10銘柄の主流煙中TSNAを測定した。

## B. 研究方法

### 1) 各種試薬

TSNAの標準品および試薬調製には以下の薬品を用いた。

- NNK, NNN, NAT, NAB (Tronto Research Chemicals社製)
- NNK-*d*<sub>3</sub>, NNN-*d*<sub>4</sub>, NAT-*d*<sub>4</sub>, NAB-*d*<sub>4</sub> (Tronto Research Chemicals社製)
- 酢酸 (LC/MS用, 和光純薬社製)
- 酢酸アンモニウム (HPLC用, 和光純薬社製)
- アセトニトリル (HPLC用, Sigma-Aldrich社製)
- メタノール (LC/MS用, 和光純薬社製)

### 2) 各種試薬の調製

- HPLCと試薬調整用の純水にはMilli-Qシステム (Millipore社製) を使用した。
- 各TSNA (NNN, NNK, NAT, NAB) およびTSNAの重水素体 (NNN-*d*<sub>3</sub>, NNK-*d*<sub>3</sub>, NAT-*d*<sub>3</sub>, NAB-*d*<sub>3</sub>) はアセトニトリルに溶解し、TSNAとTSNA-*d*は各々1 μg/mLになるよう混合調製した。
- 酢酸アンモニウムはMilli-Q水に溶解して100 mMに調製し、TSNAの抽出に用いた。
- 酢酸およびメタノールはMilli-Q水に溶解して各々0.1%になるように調製し、HPLCの移動相に用いた。

### 3) たばこ試料および主流煙の捕集

**たばこ試料:** 2006年度の国内販売量上位10銘柄

**たばこの恒湿化:** たばこの恒湿化は、ISO 3402 (1999) [18]に準じ、たばこ主流煙の捕集前に以下の条件で行った。

- 温度: 22±2°C
- 湿度: 60±3%
- 期間: 48時間 (最短) から10日間 (最長)

#### たばこ主流煙の捕集

- 捕集装置: 半自動喫煙装置 (Borgwaldt KC GmbH社製)
- 捕集室: 幅 1.7 m×奥行 2.4 m×高さ 3 m  
捕集室内はISO 3308 (2000) [19]に準じ、以下の条件で捕集した。

- 温度: 22±2°C
- 湿度: 60±5%

#### たばこ主流煙の捕集方法

**ISO法:** ISO 4387 (2000) [20]に準じ、以下の条件で捕集した。

- 吸煙量: 35 mL
- 吸煙時間: 2 sec
- 吸煙間隔: 60 sec
- フィルター部の通気孔: 塞がずに捕集



**HCI法**：T-115 (1999) [21]に準じ、以下の条件で捕集した。

- ・ 吸煙量：55 mL
- ・ 吸煙時間：2 sec
- ・ 吸煙間隔：30 sec
- ・ フィルター部の通気孔：セロハンテープで完全に塞いで捕集

上記条件により、たばこ主流煙はCambridge Filter Pad (CFP) (44 mm, Borgwaldt KC社製) 1枚につきたばこ5本分 (ISO法) もしくは3本分 (HCI法) の粒子成分を捕集し、1試料とした。

#### 4) 主流煙中TSNAの前処理

**振盪抽出**：たばこ主流煙を捕集したCFPは、100 mL容共栓付三角コルベンに入れ、TSNA-*d*溶液 (1 µg/mL) 400 µLを添加後、100 mM酢酸アンモニウム溶液を40 mL加えた。三角コルベンはアルミホイルで遮光し、250 rpm, 30 min振盪抽出した。振盪後、抽出液は50mL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で一時的保存した。抽出液は、固相抽出直前に3,000 rpm, 5 min遠心 (05P-21, HITACHI社製) し、上清を回収した。

**固相抽出**：本研究では、稲葉らの報告[22]に準じ、上記の上清10 mLは、3 mLのメタノールとMilli-Q水で活性化を行ったDiscovery DSC-18Ltカラム (500 mg/3 mL, Supelco社製) に導入し、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。得られた溶出液は窒素気流下にて溶媒留去し、1 mL以下にした。この濃縮液は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し、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シリッジと濾過フィルターで濾過し、分析用試料とした。

#### 5) LC/MS/MSによるTSNAの分析

TSNAの分析は、以下の装置および条件で行った。

- ・ デガッサー：HP1100シリーズ, G1322A (Hewlett Packard社製)
- ・ ポンプ：HP1100シリーズ, G1312A (Hewlett Packard社製)
- ・ カラム恒温槽：HP1100シリーズ, G1316A (Hewlett Packard社製)
- ・ オートサンプラー：Agilent1200シリーズ, G1329A (Agilent Technologies社製)
- ・ 分離カラム：Zorbax Eclipse XDB C-18カラム (2.1 ×150 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies社製) にプレカラムフィルター (0.5 µm, Supelco社製) を連結
- ・ 質量分析計：三連四重極型質量分析器, Quattro LC (Micromass UK社製)

#### HPLC条件

- ・ カラム恒温槽温度：40°C
- ・ 注入量：10 µL
- ・ 移動相  
A液：0.1%酢酸水溶液  
B液：酢酸0.1%を含むメタノール溶液
- ・ 流量：200 µL/min
- ・ 送液プログラム  
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%)
- ・ 分析時間：35 min

#### 質量分析条件

- ・ イオン化法：ESI+/MRM
- ・ キャピラリー電圧：3.5 kV
- ・ 各イオンの測定時間：500 msec
- ・ データ解析：MassLynx V4.0 (Micromass UK社製)

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、イオンモニタリング法には、TSNAおよびTSNA-*d*を検出する時間帯ご

とにMRMチャンネルを区切り、各TSNAおよびTSNA-dのみ測定する方法（segment法）を用いた（Table 1）。なお、Fig. 2に得られたクロマトグラフを例示した。

## C. 研究結果

### 1) 同時再現性試験

まず初めに、国産たばこのうち、マイルドセブンワン（タール；1 mg）、マイルドセブンスーパーライト（タール；6 mg）、セブンスター（タール；14 mg）3銘柄の主流煙抽出液を用いて、主流煙中TSNAの同時再現性を確認した。本研究では、稲葉らの報告[22]のうち、LC/MS/MSによるイオンモニタリング法を改良し、segment法での測定を行った。なお、試料毎に7回測定した。

各TSNAの濃度は、NNNが9.4～86 ng/cig、NNKが6.4～58 ng/cig、NATが11～100 ng/cig、NABが3.1～29 ng/cigであった。また、各TSNA濃度の変動は、NNNが2.1～7.5%、NNKが1.1～1.9%、NATが0.9～2.4%、NABが1.6～4.9%であった（Table 2）。

### 2) 国産たばこ主流煙中TSNAの測定

Table 3に国産たばこ10銘柄の主流煙中TSNAを測定した結果を示す。なお、本実験は試料毎に5回測定した。ISO法では、NNNが9.4～46 ng/cig、NNKが6.3～31 ng/cig、NATが11～54 ng/cig、NABが3.1～15 ng/cigであった。一方、HCI法では、NNNが43～110 ng/cig、NNKが36～70 ng/cig、NATが65～130 ng/cig、NABが12～36 ng/cigであった。

また、Fig. 3は、たばこ外箱表示タール量の分類（4区分）と総TSNA濃度との関係を示した。横軸は、各たばこ外箱表示タール量を基にUltra low（1 mg）、Low（3～6 mg）、Medium（8～10 mg）、High（14 mg）の4区分に分類した。一方、縦軸は、各銘柄の総TSNA濃度を分類ごとに平均した値である。ISO法によるUltra low、Low、MediumおよびHighの測定結果は、各々31、72、140および89 ng/cigであった。一方、HCI法の測定結果は各々210、240、330および180 ng/cigであった。

## D. 考察

稲葉らの報告[22]では、本実験と同じたばこ銘柄（マイルドセブンワン、マイルドセブンスーパーライト、セブンスター）および2喫煙法（ISO、HCI法）を用いて同時再現性試験を行っている。その結果、各TSNA濃度の変動は、NNNが3.5～6.3%、NNKが5.4～8.1%、NATが2.0～10%、NABが6.5～12%であった。本実験結果と上記結果を比較すると、本手法は主流煙中TSNA測定の変動が比較的小さくなることが認められた。したがって、segment法による測定は、主流煙中TSNAを比較的安定して測定することができると考えられる。

Table 3より、ISO法による国産たばこ主流煙中TSNA濃度は、Hyodo *et al.*の国産たばこ主流煙中TSNA測定結果[15]と同様の傾向が認められた。このことから、本測定法は、たばこ主流煙中TSNAを適切に測定していると考えている。

Fig. 3より、HCI法によるTSNA濃度は、ISO法の測定結果と比較してUltra lowが6.6、Lowが3.4、Mediumが2.5、Highが2.0倍高い値を示し、吸煙量の増加に伴い、TSNA濃度も増加した。さらに、各分類の倍率はタール・ニコチン量の低いものほど高い傾向がみられた。タール・ニコチン量の少ないたばこ銘柄はフィルター部の通気孔の数が多く設計されているため、TSNAの濃度は通気孔を塞ぐことにより高くなったと考えられる。このことからTSNAの暴露量は喫煙行動の変化によって変動すると考えられるため、ISO法とHCI法で主流煙を捕集、分析し、併せて表示することが重要であると考えられた。

ISO・HCI法による主流煙中のTSNA濃度は、ともにたばこ外箱表示タールおよびニコチン量との関連性は低く、Mediumに分類したたばこ主流煙の濃度が高い傾向にあり、HighではMediumのたばこよりも低い結果であった（Fig. 3）。喫煙による有害性を推測するために、喫煙者はたばこ外箱の表示タール・ニコチン量のみを参考にすると考え

られる。しかし、TSNAのようなタール・ニコチン量との関連性が低い化学物質は外箱に表示されていない。そのため、喫煙による有害性を判断するには、タール、ニコチン以外の化学物質を公表することも重要であると考えられる。さらに、HCl法により捕集したたばこ主流煙中TSNA濃度は、Ultra lowたばこのTSNA濃度が210 ng/cigであり、Highの180 ng/cigと同等の濃度であった。Ultra lowたばこの喫煙者は、代償性補償喫煙を行う傾向があるため、Highの喫煙者と同濃度のTSNAに暴露される可能性があると考えられる。

現在、たばこ主流煙中TSNAのリスク評価書は作成されていないため、生体影響評価をすることは難しいが、今回の研究データが喫煙者の生体影響評価に資するデータになるものと期待している。

#### E. 結論

今回、ISO・HCl法によりたばこ主流煙を捕集し、国産たばこ10銘柄の主流煙中TSNAを測定した。その結果、HCl法によるTSNA濃度は、ISO法に比べUltra lowが6.6、Lowが3.4、Mediumが2.5、Highが2.0倍高い値を示したことから、TSNA濃度はISO・HCl法ともに表示タール・ニコチン量との関連性が低いこと、HCl法の測定結果はUltra lowたばこのTSNA濃度がHighの銘柄と同等の濃度であることがわかった。以上から、TSNAの暴露量は喫煙行動の変化によって変動すると考えられるため、ISO・HCl法で主流煙を捕集、分析し、併せて表示することが重要であると考えられた。また、喫煙による有害性を判断するためには、タール、ニコチンだけでなく、外箱に表示されていないTSNAを含む他の化学物質を公表することも重要であると考えられた。さらに、Ultra lowたばこの喫煙者は、喫煙行動によってHighの喫煙者と同濃度のTSNAに暴露される可能性があると考えられた。

#### F. 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] 厚生労働省a. 厚生労働省の最新たばこ情報 -発がん性-

<http://www.health-net.or.jp/tobacco/risk/rs180000.htm>

[3] Anderson, R. A.; Kasperbauer, M. J.; Burton, H. R.; Hamilton, J. L.; Yoder, E. E. 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.

[4] Burton, H. R.; Childs, G. H.; Anderson, R. A.; Fleming, P. D. Changes in composition of burley tobacco during senescence and curing. 3. tobacco-specific nitrosamines, *Journal of agricultural and food chemistry*, 37, 426-430, 1989.

[5] Wu, W.; Zhang, L.; Jain, R. B.; Ashley, D. L.; Watson, C. H. Determination of carcinogenic tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke from U.S.-brand and non-U.S.-brand cigarettes from 14 countries, *Nicotine tobacco research*, 7, 443-451, 2005.

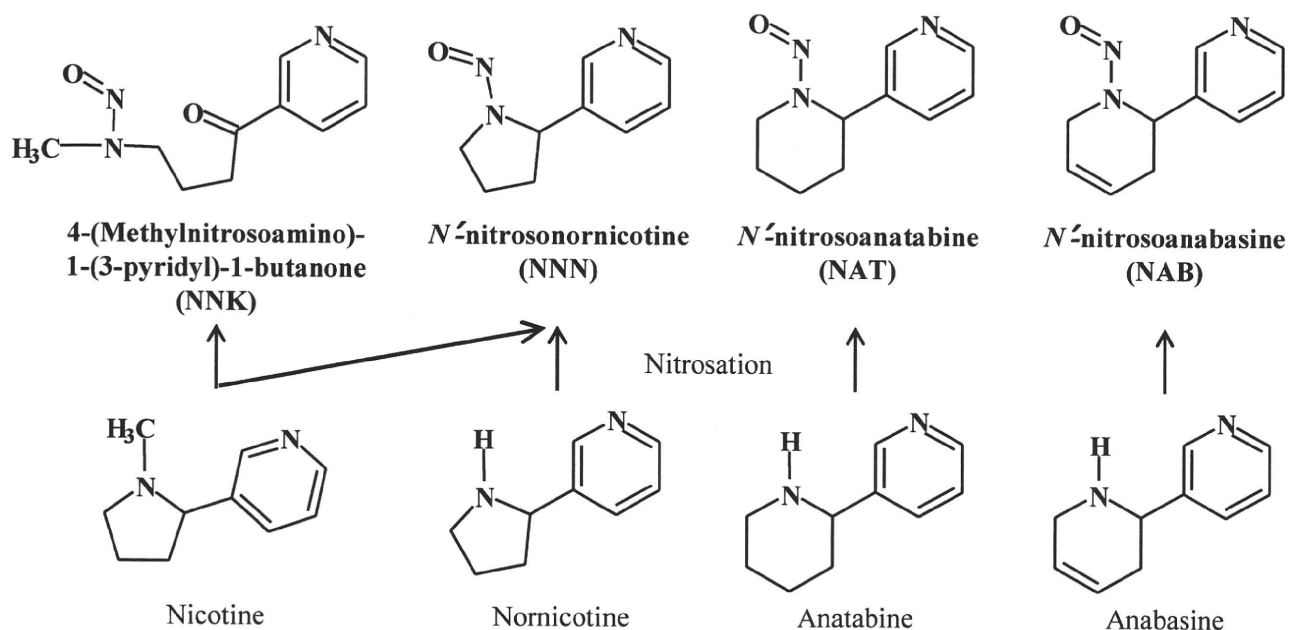
[6] Adams, J. D.; Brunemann, K. D.; Hoffman, D. Chemical studies on tobacco smoke : LXXV. Rapid method for the analysis of tobacco-specific N-nitrosamines by gas-liquid chromatography with a thermal energy analyser, *Journal of chromatography A.*, 256, 347-351, 1983.

[7] Atawodi, S. E.; Preussmann, R.; Spiegelhalder, B. Tobacco-specific nitrosamines in some Nigerian cigarettes, *Cancer letters*, 97, 1-6, 1995.

[8] Brunemann, K. D.; Hoffman, D. Analysis of tobacco-specific nitrosamine in tobacco and tobacco smoke, *Nitrosamines and related N-nitroso compounds*, 45, 369-371, 1994.

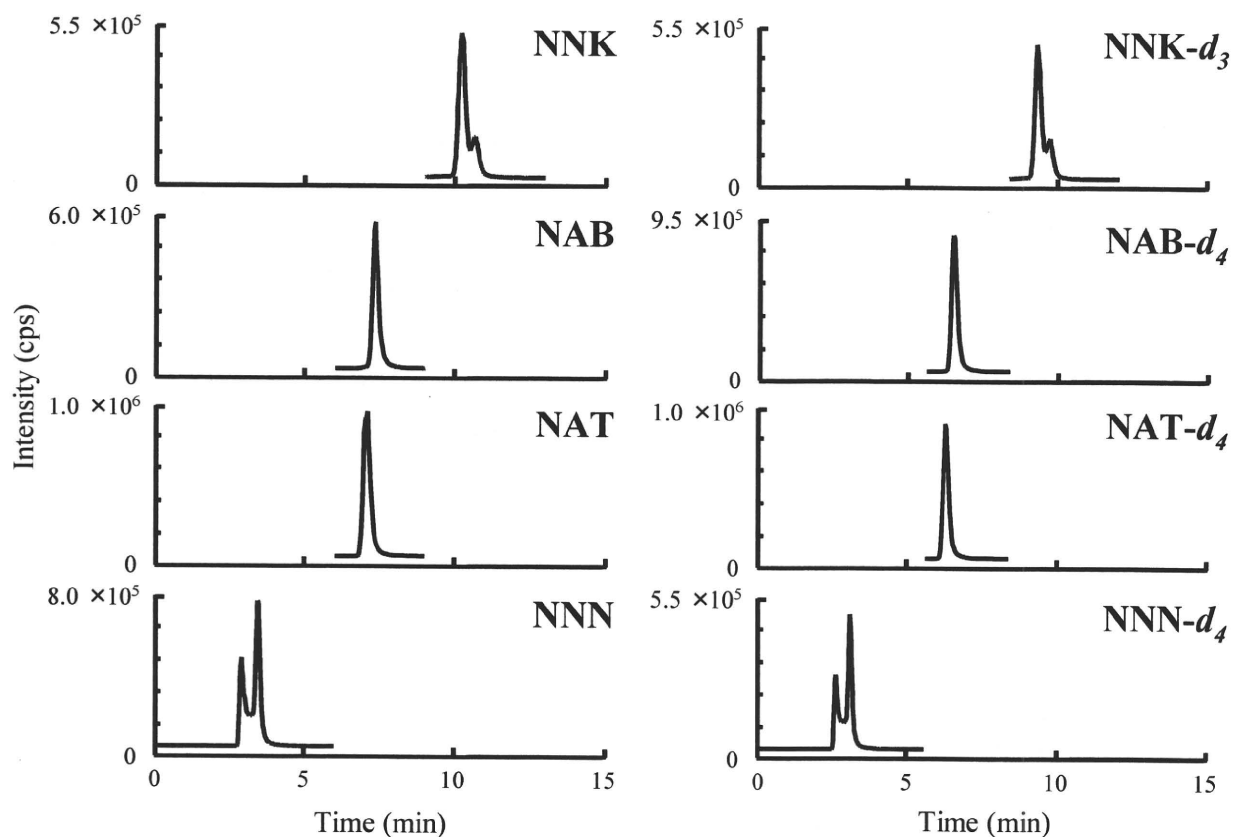
[9] Brunemann, K. D.; Yu, L.; Hoffmann, D. Assessment of carcinogenic volatile JV-nitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes, *Cancer research*, 37, 3218-3222, 1977

- [10] Counts, M. E.; Hsu, F. S.; Laffoon, S. W.; Dwyer, R. W.; Cox, R. H. Mainstream smoke constituent yields and predicting relationships from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO smoking conditions, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 39, 111-134, 2004.
- [11] Fischer, S.; Castonguay, A.; Kaiserman, M.; Spiegelhalder, B.; Preussmann, R. Tobacco-specific nitrosamines in canadian cigarettes, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 116, 563-568, 1990.
- [12] Kumar, R.; Siddiqi, M.; Tricker, A. R.; Preussmann, R. Tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and mainstream smoke of indian cigarettes, *Food and chemical toxicology*, 29, 405-407, 1991.
- [13] Mitacek, E. J.; Brunnemann, K. D.; Hoffmann, D.; Limsila, T.; Suttajit, M.; Martin, N.; Caplan, L. S. 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.
- [14] Wu, W.; Song, S.; Ashley, D. L.; Watson, C. H. Assessment of tobacco-specific nitrosamines in the tobacco and mainstream smoke of bidi cigarettes, *Carcinogenesis*, 25, 283-287, 2004.
- [15] Hyodo, T.; Maruta, Y.; Itaya, H.; Mikita, A.; Kodera, T.; Meger, M. 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.
- [16] 厚生労働省b. 平成11-12年度 たばこ煙の成分分析について (概要)  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/houkoku/seibun.html>
- [17] 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.
- [18] ISO 3402. Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing, ISO, 1999.
- [19] ISO 3308. Routine analytical cigarette - smoking machine - Definitions and standard conditions, ISO, 2000.
- [20] ISO 4387. Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine, ISO, 2000.
- [21] T-115. Determination of tar, nicotine and carbon monoxide in mainstream tobacco smoke, Health Canada, 1999.
- [22] 稲葉 洋平,; 樺田 尚樹. たばこ主流煙中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, 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21年度 総括・分担研究報告書, 40-54, 2010.



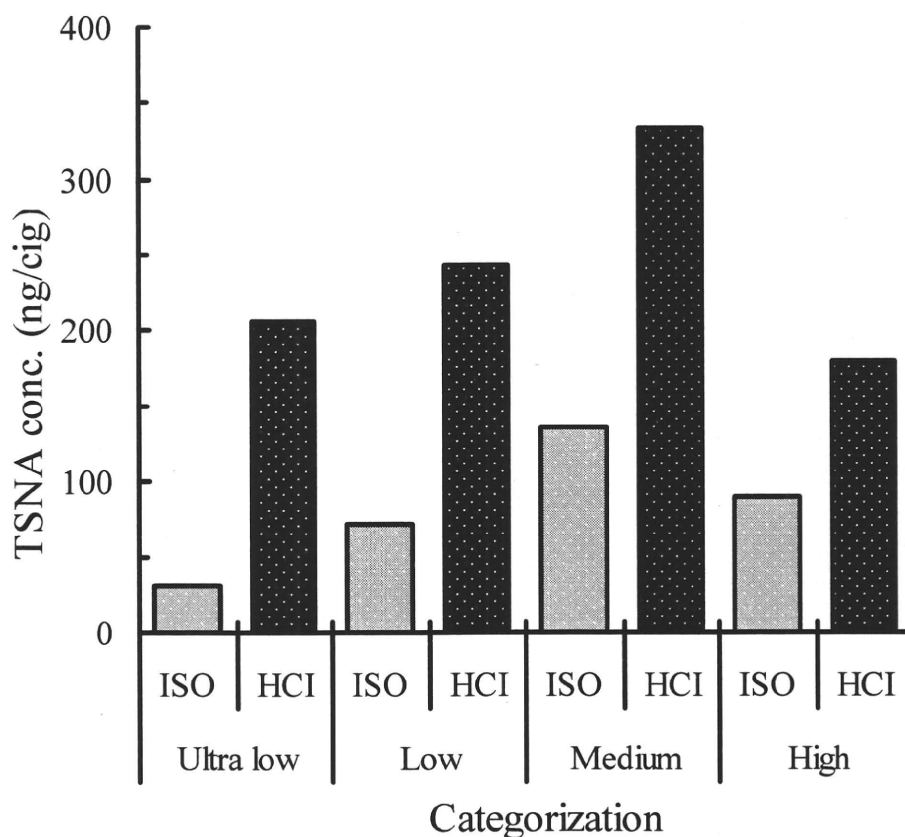
**Fig. 1 Formation and generation of TSNA**

4 tobacco-specific *N'*-nitrosamines (above), 4 tobacco alkaloids (below)



**Fig. 2 Chromatogram of TSNA by LC/MS/MS**

The concentration of TSNA and TSNA-*d* is 100 ng/mL



**Fig. 3** Amounts of TSNA of mainstream smoke in Japanese cigarettes  
 Categorization is Ultra low (tar ; 1 mg), Low (tar ; 3 ~ 6 mg), Medium (tar ; 8 ~ 10 mg)  
 and High (tar ; 14 mg).

**Table 1** Monitoring conditions of 4 TSNA and its internal standards

Analyte	<i>m/z</i>		(min)	(eV)	(V)
	Precursor ion	Product ion	Monitoring time	Collision energy	Cone voltage
NNN	178	> 148	0 - 6	10	17
NNN- <i>d</i> <sub>4</sub>	182	> 152		11	17
NAT	190	> 160	6 - 9	10	17
NAT- <i>d</i> <sub>4</sub>	194	> 164		10	17
NAB	192	> 162		11	12
NAB- <i>d</i> <sub>4</sub>	196	> 166		11	12
NNK	208	> 122	9 - 13	12	17
NNK- <i>d</i> <sub>3</sub>	211	> 122		11	17

**Table 2 Results of simultaneous reproductivity of TSNA analysis in mainstream smoke of Japanese cigarette ( $n=7$ )**

Cigarette brands	TSNA (ng/cig)											
	NNN			NNK			NAT			NAB		
	Ave	SD	CV (%)	Ave	SD	CV (%)	Ave	SD	CV (%)	Ave	SD	CV (%)
Mild Seven One	9.4 ± 0.2	2.1	2.1	6.4 ± 0.1	1.9	1.9	11 ± 0.1	1.2	1.2	3.1 ± 0.1	2.4	2.4
Mild Seven Super lights	31 ± 1.0	3.3	3.3	18 ± 0.3	1.7	1.7	33 ± 0.5	1.5	1.5	10 ± 0.2	2.1	2.1
Seven Stars	25 ± 1.9	7.5	7.5	19 ± 0.3	1.5	1.5	38 ± 0.5	1.4	1.4	10 ± 0.2	1.9	1.9
Mild Seven One	58 ± 1.2	2.0	2.0	42 ± 0.6	1.3	1.3	59 ± 0.5	0.9	0.9	17 ± 0.6	3.8	3.8
Mild Seven Super lights	86 ± 3.1	3.6	3.6	58 ± 0.7	1.1	1.1	100 ± 2.5	2.4	2.4	29 ± 0.5	1.6	1.6
Seven Stars	57 ± 2.0	3.5	3.5	50 ± 0.8	1.5	1.5	78 ± 1.9	2.4	2.4	21 ± 1.0	4.9	4.9

※ Ave, Average ; SD, Standard Deviation ; CV, coefficient of variation

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

Regimen	Cigarette brands	Tar (mg)	Nicotine (mg)	Categorization	TSNA (ng/cig)							
					NNN		NNK		NAT		NAB	
					Ave	SD	Ave	SD	Ave	SD	Ave	SD
ISO	Pianissimo One	1	0.1		10	± 1.6	8.4	± 0.1	11	± 0.4	3.1	± 0.1
	Mild Seven One	1	0.1	Ultralow	9.4	± 1.7	6.3	± 0.5	12	± 1.4	3.3	± 0.3
	Mild Seven Extra Lights	3	0.3		20	± 4.6	10	± 1.9	22	± 2.9	6.3	± 0.9
	Caster Mild	5	0.5	Low	18	± 1.2	10	± 0.8	20	± 1.5	5.7	± 0.6
	Mild Seven Super Lights	6	0.5		35	± 1.4	20	± 0.4	39	± 0.6	11	± 0.6
	CABIN Mild	8	0.6		46	± 5.5	31	± 6.7	45	± 4.2	13	± 1.0
	Mild Seven Lights	8	0.7	Medium	43	± 2.3	26	± 2.4	45	± 2.9	12	± 0.6
	Mild Seven Original	10	0.8		46	± 3.4	28	± 4.2	54	± 6.4	15	± 1.9
	HOPE	14	1.1	High	26	± 3.0	20	± 3.1	38	± 3.2	10	± 0.5
	Seven Stars	14	1.2		21	± 3.0	18	± 1.9	36	± 2.5	9.3	± 1.0
HCI	Pianissimo One	1	0.1		59	± 4.8	67	± 12	65	± 2.5	16	± 1.1
	Mild Seven One	1	0.1	Ultralow	67	± 3.9	49	± 3.7	78	± 3.0	12	± 0.6
	Mild Seven Extra Lights	3	0.3		85	± 17	45	± 3.8	89	± 10	24	± 2.7
	Caster Mild	5	0.5	Low	53	± 3.2	36	± 2.9	66	± 3.3	18	± 1.0
	Mild Seven Super Lights	6	0.5		100	± 7.0	63	± 4.9	120	± 7.2	31	± 2.5
	CABIN Mild	8	0.6		110	± 12	68	± 5.9	110	± 16	32	± 4.9
	Mild Seven Lights	8	0.7	Medium	98	± 8.2	67	± 9.0	120	± 4.7	33	± 1.7
	Mild Seven Original	10	0.8		110	± 6.6	70	± 8.9	130	± 2.6	36	± 1.0
	HOPE	14	1.1	High	43	± 3.1	36	± 4.1	65	± 6.4	18	± 2.2
	Seven Stars	14	1.2		55	± 5.2	40	± 3.0	82	± 2.8	22	± 1.4

※ Ave, Average ; SD, Standard Deviation



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

国産たばこ銘柄のたばこ葉中たばこ特異的ニトロソアミンの測定

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  
研究協力者 大久保忠利 国立保健医療科学院

**研究要旨**

世界保健機関（WHO）の定める「たばこ規制枠組条約」（FCTC）は、第9条「たばこ製品の含有物に関する規制」と第10条「たばこ製品についての情報の開示に関する規制」を規定している。本研究班では、これまでに上記条項に基づいたWHOたばこ研究室ネットワーク（TobLabNet）に参画しており、今年度も主流煙中たばこ特異的ニトロソアミン（TSNA）測定を実施した。さらに国産たばこ銘柄の適用も行ってきた。TSNAは、発がん性物質を含む有害化学物質であるため、主流煙ばかりでなく発生源であるたばこ葉中の濃度を測定することは重要である。本研究では、たばこ葉中TSNAの前処理を含めた測定法の確立を行い、国産たばこ銘柄のたばこ葉中TSNA濃度を測定した。たばこ葉の抽出には、珪藻土カラムを使用し、日差再現性の評価を行なった（7日間）。その平均濃度は、NNKが180、NNNが480、NATが770とNABが75 ng/gであった。そのときのばらつきは、それぞれ2.8、4.1、1.8と3.6%であり、安定した結果が得られた。次に国産たばこ10銘柄の測定を行った。たばこ葉中TSNA量は、たばこ外箱表示タール・ニコチン量と関連性は認められず、低タール・低ニコチンたばこであっても他のたばこと変わらないTSNA濃度であった。本研究成果は、たばこ主流煙の喫煙法を吸煙量の多い喫煙法に変更すると上昇する原因の一因であると推測された。

**A 研究目的**

たばこ主流煙中には、発がん関連物質である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で生成される。TSNAには4種あり、上記アルカロイドと亜硝酸や硝酸が反応して、各々4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）がnicotineから、*N*-nitrosonornicotine（NNN）がnicotineとnornicotineから、*N*-nitrosoanatabine（NAT）がanatabineから、*N*-nitrosoanabatine（NAB）がanabasineから生成さ

れる。TSNA4種は、NNKとNNNがInternational Agency for Research on Cancer（IARC）の発がん性リスク一覧においてGroup 1（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、NATとNABがGroup 3（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。

一方、たばこ規制枠組条約（FCTC）の第9条「たばこ製品の含有物に関する規制」と第10条「たばこ製品についての情報の開示に関する規制」に基づいてたばこ製品の含有物及び排出物の測定法の確立が求められている。主流煙中TSNAは、上述したようにIARCグループ1に指定されているた

め、その発生源であるたばこ葉中のTSNAの測定手法を確立し、国産たばこ銘柄のたばこ葉TSNAを測定することは重要であると考えている。そこで、本報告では、たばこ葉TSNA測定法の確立と国産たばこ銘柄への適用を実施した。

## B 研究方法

### (1) たばこ試料

2006年の国産たばこ売上上位10種類のたばこ試料を測定対象とした。Table 1に測定対象となったたばこ試料を示す。試料はいずれも市場から購入し試験に供した。また、前処理検討に使用したたばこは、Pianissimo Petil Menthol One, Mild Seven OriginalそしてMarlboro Redの3銘柄である。

### (2) HPLC機器構成

高速液体クロマトグラフィー／質量分析計(LC/tandem MS)のHPLC装置には以下のものを使用した。デガッサー (HP1100シリーズ, G1322A, Hewlett Packard社製), ポンプ (HP1100シリーズ, G1312A, Hewlett Packard社製), オートサンプラー (Agilent1200シリーズ, G1329A, Agilent Technologies社製), カラム恒温槽 (HP1100シリーズ, G1316A, Hewlett Packard社製)。

### (3) HPLC測定条件

HPLC分離カラムとしてZorbax Eclipse XDB C-18カラム (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm, Agilent Technologies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。

### (4) 質量分析法

質量分析装置には三連四重極型質量分析器Micromass Quattro LC (Micromass UK社製) を用いた。測定条件は2010年度の本研究班分担研究「たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン (TSNA) 測定法の確立及び日本産たばこでの適用」を参照した[1]。つまり、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 (N<sub>2</sub> Supplier Model 20E, システムインスツ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。データ解析にはMassLynx V4.0 (Micromass UK社製) を用いた。

### (5) 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社製), NNK-*d*<sub>3</sub>, NNN-*d*<sub>4</sub>, NAT-*d*<sub>4</sub>, NAB-*d*<sub>4</sub> (Toronto Research Chemicals社製), 酢酸 (LC/MS用, 和光純薬社製), 酢酸アンモニウム (HPLC用, 和光純薬社製), アセトニトリル (HPLC用, Sigma-Aldrich社製), メタノール (LC/MS用, 和光純薬社製) を使用した。

### (6) TSNA標準溶液の作成

上記NNK, NNN, NAT及びNABの標準品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℃で冷凍保管した。

#### (7) 内部標準溶液 (TSNA-*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*<sub>3</sub>, NNN-*d*<sub>4</sub>, NAT-*d*<sub>4</sub>, NAB-*d*<sub>4</sub> 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℃で冷凍保管した。

#### (8) 検量線の作成用溶液の調製

各TSNA溶液を1, 2, 5, 10, 20, 50, 75, 100及び150 ng/mLの8段階に希釈し、それぞれに対応するTSNA-*d*溶液を100 ng/mLになるよう添加し調製した。

#### (9) 試料調整法

##### たばこ葉の破碎と恒湿化

たばこ葉は、たばこ本体から分離し、ミル付ミキサー (TWINBIRD KC-4508型, ツインバード工業製) で1分間粉末状になるまで粉碎した。粉碎したたばこ葉試料はすべて、ISO3402 (1999) に準拠し、抽出実験前、最低48時間〜最大10日間、温度22±2℃, 相対湿度60±3%で恒湿化を行い実験に供した[2]。

#### (10) TSNAの抽出

たばこ葉中のTSNA抽出は、カナダ保健省が作成したたばこ葉中TSNA測定法 (T-309) [3]に改良を加えた手法で実施した。まず恒湿化したたばこ葉1.0 gは、200 mL容の共栓付三角フラスコに入れた。このときたばこ葉は、Mettler Toledo AT 201 (メトラー・トレド社製) を用いて0.001 gまで秤量した。次にTSNA-*d*溶液0.5 mLを添加した後、クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.3) 50 mLと1Mアスコルビン酸溶液1 mLを加えた。三角フラスコをアルミホイルで遮光し、180 rpm, 60 minで振盪抽出を

行った。振盪終了後、ろ過を行い、50mL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℃で一時冷蔵保存した。次に、抽出液10 mLを珪素土カラム (K-Solute, GL Science社製) に供した。抽出液導入後5分間静置し、ジクロロメタン/2-プロパノール (95/5) 30 mLで溶出を行った。溶出液はエバポレーターで減圧濃縮後、窒素気流下にて溶媒留去した。溶媒留去後、10%メタノール溶液1 mLで再溶解したものをLC/tandem MSに供した。

## C 結果及び考察

### 前処理条件の検討

Table 2に、前処理に使用する珪藻土カラム (K-Solute) に添加したTSNAの溶出溶液量の最適条件検討を示す。溶出液量を20〜50 mLまで10 mLごとに変動させ、回収量を評価した。4種類のTSNAについて、NNKは450〜500, NNNは400〜460, NATが900〜930とNABが88〜91 ng/gであり溶出液量の増加による効果は認められず、ほぼ一定の回収濃度であった。そこで、試料量10 mLの3倍量である30 mLを溶出液量とした。次に確立した前処理法を用いて、たばこ葉中TSNA量の日差再現性の評価を行なった (Table 3)。連日、たばこ葉サンプル (Mild Seven Original) を5回抽出及び測定を7日間繰り返して実施した。その平均濃度は、NNKが190, NNNが480, NATが770とNABが75 ng/gであった。そのときのばらつきは、それぞれ2.8, 4.1, 1.8と3.6%であり、安定した結果が得られた。前処理を含めた本手法は、たばこ葉TSNA測定に適用することが可能であると考えられる。たばこ葉TSNAは、たばこ葉特有の有害化学物質成分となっている。一方で、含有量の管理濃度等は設けられていないため、同銘柄であっても製造番号によっては異なる濃度になる可能性もある。そこで、国際的に販売されているMarlboro Redで10ロットについて測定をおこなった (Table

4)。その平均値は、NNKが300、NNNが440、NATが820そしてNABが73 ng/gであった。そのばらつきは、8.0, 7.1, 5.9そして6.0%であった。ばらつきの結果は、日差再現性より高い数値となっている。ロットごとのばらつきは若干あるもののほぼ一定のTSNA濃度であると考えられた。

### 国産たばこ銘柄測定結果

最後に国産たばこ10銘柄のたばこ葉中TSNA濃度を測定した (Table 5)。4種類のTSNA濃度が最も低かったのは、Seven Starsであり、今回の研究において最も高いタール・ニコチン表示量のたばこ銘柄であった。一方で、タール・ニコチン表示量が低いPianissimo Oneは、NNNが980、NNKが410、NATが930とNABが110 ng/gで今回の研究では比較的高値であった。また、Pianissimo Oneと同表示量のMild Seven Oneは、NNNが900、NNKが230、NATが780とNABが88 ng/gであった。この2銘柄を比較するとNNKとNATの値に140~180 ng/g程度の差が認められた。たばこ製品は、いくつかのたばこ葉銘柄の配合で調製されていると考えられるので、この配合比率などによって濃度差が確認されたと推測される。Fig. 1は、測定を行ったたばこ銘柄を便宜上、Ultra low, Low, Medium, Highの4区分し、算出した総TSNA量を示す。Ultra lowが2200, Lowが1700, Mediumが2100とHighが940 ng/gであった。この測定結果は、今年度の報告書 (たばこ主流煙中TSNAの測定) に近い傾向が認められた。たばこ葉中TSNA量は、たばこ外箱表示タール・ニコチン量と関連性は認められなかった。このことから、低タール・低ニコチン表示たばこを吸煙量が多い喫煙法で主流煙を捕集するとTSNA量が増加する要因であると考えられる。

### D 結論

今回、FCTCの第9, 10条に基づきたばこ葉中の

TSNA測定法の確立と国産たばこ銘柄への適用を行った。測定対象のたばこ銘柄は、2006年度販売量上位10銘柄の国産たばこを使用した。確立した前処理法は、カナダ保健省の手法に改良を加えたものであり、安定した測定結果が得られた。また、たばこ銘柄のロット間の差が若干認められたが、ほぼ一定のTSNA濃度であった。国産たばこ銘柄の測定結果は、たばこ外箱表示タール・ニコチン量との関連性は認められず、低タール・低ニコチンたばこ銘柄のたばこ葉TSNA濃度が高い値を示した。たばこ主流煙中のTSNA量が、吸煙量の多い喫煙法によって捕集すると上昇した結果が得られていることから、本研究結果のたばこ葉中TSNA量と関連があると考えられる。

### [引用文献]

- [1] 稲葉洋平；樺田尚樹，たばこ主流煙に含まれるたばこ特異的ニトロソアミン (TSNA) 測定法の確立及び日本産たばこでの適用，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国際標準化試験法及び受動喫煙対策を主軸とした革新的ながん予防に関する研究平成21年度 総括・分担研究報告書，40-54，2010
- [2] ISO 3402 Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing, International Organization for Standardization, 1999
- [3] T-309 Determination of Nitrosamines in Whole Tobacco, Health Canada, 1999

### E 研究発表

統括報告書に一括記載した。

### F 知的財産権の出願・登録状況

なし