

たばこ主流煙中揮発性ニトロソアミン類の分析法の確立

担当責任者	稲葉 洋平	国立保健医療科学院
担当責任者	樺田 尚樹	国立保健医療科学院
研究協力者	内山 茂久	国立保健医療科学院
研究協力者	杉山 晃一	国立保健医療科学院

研究要旨

たばこ主流煙は、粒子及びガス成分に多くの発がん関連物質を含むことが知られている。発がん関連物質である揮発性ニトロソアミン類（volatile *N'*-nitrosoamines ; VNAs）の国産たばこ主流煙中分析結果は少ない。本研究では、主流煙の捕集は国際標準化機構（International Organization for Standardization ; ISO 法）及びヒトの喫煙行動に近くカナダ保健省が推奨する Health Canada Intense (HCI 法) の両喫煙法に対応するたばこ主流煙中 VNAs の分析法を確立した。VNAs 測定には活性炭カラムとケイソウ土カラムによる 2 段階の前処理法と GC/MS を組み合わせた手法を確立した。本研究の各たばこ主流煙捕集法の喫煙本数（ISO 法 ; 15 本, HCI 法 ; 9 本）を加えて得られた定量下限値は、ISO 法条件下で 0.13 ng/cig, HCI 法では 0.2 ng/cig であった。確立した前処理法を用いたたばこ主流煙中 VNA 分析の精度を検証するため同時再現性試験を行うとともに、主流煙捕集時に VNAs を総て高率で回収するのに必要なインピンジャー本数についても検討を行ったところ、1 本目のインピンジャー溶液中の各 VNAs 濃度は総て定量下限値以上であり、ガス状成分としては比較的精度良く測定できた。また、2 本目に設置したインピンジャーの捕集溶液中 VNAs は、全て検出下限値以下であったため、以後の主流煙中 VNAs 測定はインピンジャー1 本で捕集を行うこととした。

A. 研究目的

喫煙習慣は発がんのリスクを高めることが知られており[1]、その原因となるたばこ煙は国際がん研究機関（IARC）の発がん性リスク一覧においてグループ 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 5,300 種もの化学物質が含まれており、そのうち、発がん性が疑われる物質も約 60 種あるといわれている[2]。また、これらたばこ煙中発がん物質は粒子成分とガス成分に大別され、粒子成分にはたばこ特異的ニトロソアミン、

ベンゾ[a]ピレンを含む多環芳香族炭化水素や重金属類が含まれており、ガス成分には、一酸化炭素やホルムアルデヒドを含むカルボニル化合物なども含まれている。

上記化合物以外にもたばこ煙中には、有害物質が数多く含まれており、発がん性に関連する物質である揮発性ニトロソアミン類（volatile *N'*-nitrosoamines ; VNAs）が、ガス成分に含まれる。現在までたばこ煙中の VNA は、主にたばこの燃焼時の熱合成により生成されることや[3]、さらに VNA の生成量がたばこに含まれる有機態窒素や有機硝酸の量とたばこ葉を生育

した土壌中の窒素源に依存することが報告されている[4]。一方で、たばこフィルターの有無や性能によっては、測定結果に影響があるとの報告もされている。この VNAs は、*N'*-nitrosodimethylamine (NDMA) が IARC グループ 2A (probably carcinogenic to humans. ; ヒトに対する発がん性が恐らくある) に、*N'*-nitrosomethylethylamine (NMEA) , *N'*-nitrosodi-n-propylamine (NDPA) , *N'*-nitrosopiperidine (NPIP) および *N'*-nitrosomorpholine (NMOR) が IARC グループ 2B (possibly carcinogenic to humans. ; ヒトに対する発がん性が疑われる) に分類されている (Fig. 1)。したがって、たばこ主流煙中 VNA 濃度を測定することは他のたばこ煙中の有害化学物質と同様に喫煙者の健康影響を評価する上で必要な資料になる。

現在、国産たばこ外箱に表示されているタール・ニコチン量は、国際標準化機構 (International Organization for Standardization ; 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た値である。これまでの主流煙中 VNAs の測定報告は、ISO 法を用いた外国産たばこに関するもの [3-12] で、日本産たばこ主流煙中 VNAs の測定報告はわずかである。特に、国内における低タール、低ニコチンたばこの販売本数は、増加傾向が続いていることから [21]、このような低タール、低ニコチンたばこを ISO 法により捕集した場合、主流煙中 VNAs の濃度は海外の報告よりも低いと推測している。加えて、国産たばこ主流煙中 VNAs 測定法には濃縮操作を含めた前処理法を確立することが重要であると考えられる。さらに低タール・低ニコチンたばこ喫煙者は、一回の吸煙量が多くなる傾向があると報告されている。この喫煙行動の変化を踏まえて、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。この HCI 法は、一回の吸煙量が 55 mL と ISO 法の 35 mL より多く、喫煙間隔も短く、たばこ吸い口の通気孔を塞ぐ手法である。この喫煙法を用いたたばこ主流煙中のタール、ニコチン、一酸化炭素量において実績があることから、そこで ISO 法に加えて HCI 法を用いて主流煙中 VNAs を測定することは、喫煙者が吸入している VNAs 濃度や曝露実態の推計研究の基礎データになると考えられる。

たばこ主流煙中 VNA 測定工程は、主流煙捕集、捕集溶液の前処理、機器分析の 3 つに分けられる。これまでの先行研究では、たばこ主流煙を液体捕集し、前処理方法として、液-液抽出と順相クロマトグラフィーを組み合わせた手法が報告されている [5-8]。しかし、液-液抽出は多くの有機溶媒量を必要とするため、より簡便な手法が望まれている。ケイソウ土処理法は、より簡便な液-液抽出法として使用されている。カナダ保健省は、たばこ葉中のたばこ特異的ニトロソアミンの測定に関する公定法 [9] にケイソウ土を採用し、前処理を行っている。そこで本研究では、主流煙 VNA の前処理にこのケイソウ土を適用した。また、たばこ煙中 VNA の機器分析は、ガスクロマトグラフ/熱エネルギーアナライザ (GC/TEA) [3,5-8,10]、ガスクロマトグラフ/炎光光度検出器 (GC/FPD) [11,12] および高速液体クロマトグラフ/蛍光検出器 (HPLC/FLD) [13] が報告されている。最近では、VNAs はたばこ煙以外の試料においても様々な分野で測定が行われており、GC/MS [14-17]、ガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計 (GC/MS/MS) [18,19] そして高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) [20] 等も用いられている。本研究では、比較的普及の進んだ測定装置である GC/MS を使用し、国産たばこ主流煙中 VNAs

分析を先行研究で行われたインピンジャー法により主流煙ガス中 VNA を捕集後、活性炭カラムとケイソウ土カラムによる 2 段階の前処理法を検討し、主流煙中 VNA 分析法の確立を目的とした。

B. 研究方法

1. 試薬

VNA の標準試薬は、NDMA, NMEA, NDPA, NPIP および NMOR を含む Supelco 社製 VNA 標準溶液を用いた。VNA 測定の内部標準試薬は、Sigma-Aldrich 社製 NDMA 重水素体 (NDMA-*d6*) とナカライテスク社製の *N'*-methylpyrrolidone (NMP) を用いた。たばこ主流煙捕集溶液作製には、和光純薬社製酢酸 (LC/MS 用) および和光純薬社製 L-(+)-アスコルビン酸 (特級) を用いた。また、VNA 前処理溶液作製には、和光純薬社製ジクロロメタン (残留農薬濃縮 300, DCM), 2-プロパノール (精密分析用, IPA), メタノール (LC/MS 用) および国産化学社製アンモニア水 (特級) を用いた。試薬調製用の純水には Millipore 社製の Milli-Q システムを使用した。前処理用カラムには、Supelco 社製の Supelclean ENVI-Carb カラム (250 mg/6 mL 容) と GL Science 社製のケイソウ土カラム InertSep K-solute (10 mL 容) を使用した。

2. 各種試薬および前処理カラムの調製 標準溶液および内部標準溶液

VNA 標準溶液は前述の VNA 標準試薬を IPA にて 1 µg/mL に調製したものを、また内部標準溶液には、NDMA-*d6* および NMP をそれぞれ 1 µg/mL に希釈したものを用いた。また、NDMA-*d6* は、NDMA, NMEA, NDPA の内部標準として使用し、NMP は NPIP と NMOR の内部標準として使用した。

前処理カラムの作製

たばこ主流煙捕集溶液の前処理用カラムには、InertSep K-solute に濾過用ケイソウ土 (GL Science 社製) 3.5 g を追加充填した 18 mL 容の自製カラムを使用した。

3. たばこ試料と主流煙の捕集

たばこ試料は、国内で販売される国産たばこ銘柄を用いた。たばこの恒温・恒湿化は、ISO 3402 (1999) [22] に準じ、たばこ主流煙の捕集前に 48 時間 (最短) から 10 日間 (最長)、温度 22±1°C、湿度 60±3% の環境下で行った。また、たばこ主流煙の捕集は、半自動喫煙装置 (Borgwaldt KC 社製) を用いた。捕集時は ISO 3308 (2000) [23] に準じ、温度 22±2°C、湿度 60±5% を保持し、以下に示す 2 種類の喫煙法で捕集を行った。

1) ISO 法: ISO 4387 (2000) [24] に準じ、以下の条件で捕集した。

- ・吸煙量: 35 mL
- ・吸煙時間: 2 秒
- ・吸煙間隔: 60 秒
- ・フィルター部の通気孔: 塞がずに捕集
- ・たばこ 5 本を捕集して 1 試料とした

2) HCl 法: T-115 (1999) [25] に準じ、以下の条件で捕集した。

- ・吸煙量: 55 mL
- ・吸煙時間: 2 秒
- ・吸煙間隔: 30 秒
- ・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
- ・たばこ 3 本を捕集して 1 試料とした

4. 液体捕集法

たばこ主流煙中 VNA の捕集は、インピンジャー法で実施した。このインピンジャー (30 mL 容) は、たばこ主流煙装置の粒子成分を捕集する cambridge filter pad (CFP) (44 mm 径, Borgwaldt KC

社製)の直後に設置した。ISO法では、たばこ15本分(5本1試料を3回分)、またHCl法での場合は、9本分(3本1試料を3回分)を捕集した。なお、たばこ主流煙捕集溶液には、Milli-Q水にて調製した24.5 mLの0.1%酢酸溶液と0.5 mLの1Mアスコルビン酸溶液を混合したものを使用した。ガス成分捕集後、捕集溶液は50 mL用の遠沈管に移し、さらにインピンジャーを0.1%酢酸溶液2.5 mLで2回洗い込み、回収溶液とした。得られた各たばこ銘柄の回収溶液は、4~10°Cで前処理まで一時保存した。

5. 主流煙中 VNA の前処理

本研究では各種前処理方法を検討した結果、以下の測定妨害物質除去とVNA5種の溶出を目的とした前処理条件を確立した。まず室温に戻した捕集回収溶液にNDMA-d6およびNMP溶液(各1 µg/mL)を0.2 mLずつ添加した。次に、これに10%アンモニア水0.3 mLを添加し、酸性から中性に調整した。上記試料溶液全量は、予めメタノールとMilli-Q水(各3 mL)で活性化を行い、通液させたENVI-Carbカラムに供し、続いてメタノール水溶液5 mLを通液させた。未吸着成分とメタノール水溶液によって溶出成分を合致させVNA5種を回収した。次に、得られた回収液は、分割し2本の自製カラム(18 mL容)に供した。5分間静置後、各自製カラムにDCM/IPA(95/5, v/v)混合溶媒を3 mL/分の速度で通液し、VNAを溶出した。その後、溶出液はエバポレーター(東京理化器械社製)にて2 mL以下まで減圧濃縮した。濃縮液はIPAを用いて2 mL容メスフラスコにて定容し、遠心用チューブに移した後に遠心分離した(12,000 rpm, 10分間, 室温)。遠心終了後、上清をメンブランフィルター(孔径; 0.2 µm, 直径; 13 mm, Millipore社製)で濾過し、これを分析用試料とした。

6. GC/MSによるVNAの分析

VNAの分析には、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)を使用した。GC部がHewlett Packard社製のHP6890とMS部がAgilent Technologies社製のMSD5973で構成した。分離カラムは、HP-INNOWAX(カラム長; 30 m, 直径; 0.25 mm, 膜厚; 0.25 µm, Agilent Technologies社製)を用いた。試料溶液は、スプリットレス注入法を用いて1 µL注入し、注入口温度は220°Cとした。カラム恒温槽の昇温プログラムは、40°C(1分間保持)→(10°C/分)→180°C(5°C/分)→230°C(5分間保持)と設定し、分析時間は合計30分とした。イオン化モードは化学イオン化(EI)法を用い、各VNAイオンは選択イオン検出法(SIM)により100ミリ秒でモニターした。なお、各イオンの測定条件はTable 1に示す。また、イオン源温度は230°C, 四重極の温度は150°Cとした。データ解析は付属のChem Stationソフトウェア(Agilent Technologies社製)を用いた。なお、Fig. 2に標準溶液でのクロマトグラムを示した。

C. 結果及び考察

1. VNA前処理条件の設定

本研究で行ったVNAs前処理法は、VNAs含有量が少なく、測定妨害物質を多く含んだ主流煙ガス成分捕集溶液からVNAsを抽出するために、活性炭を充填したENVI-Carbカラムとケイソウ土を充填した自製カラムを組み合わせで実施した。まず、自製ケイソウ土カラム(18 mL容)を用いると共に、VNAsの溶出に必要なDCM/IPA溶液の溶出液量(40, 50, 60, 70, 80, 90 mL)の検討を行った。その結果、NDPAとNPIPを除くVNAs3種は、溶出液量50 mL以上で安定した溶出結果であった。また、NDPAとNPIPは、70 mL以上の溶出量で一定の溶出結果となったため、自製ケイソウ土カラムでのDCM/IPA溶液の溶出液

量は 80 mL とした。しかしながらケイソウ土カラムのみで前処理した主流煙捕集溶液の分析結果は、測定妨害物質除去が不十分であったことから、GC/MS 測定時に一部の VNAs ピークが測定妨害物質のピークと重なり定量不可能であった。そこで、ケイソウ土カラムでの処理の前段階に更に ENVI-Carb カラムによる前処理を実施することを検討した。内部標準溶液を添加した VNAs 標準溶液 30 mL を作成し、5 本の EVVI-Carb カラムに供した後、各種メタノール溶液（10, 20, 30, 40, 50%）で溶出を行い各メタノール溶液での VNAs を測定した。その結果、NDPA を除く VNAs 4 種と内部標準物質 2 種は ENVI-Carb カラムにほとんど保持されることなく、10%メタノール溶液で溶出されることが認められた。また、残り 1 種の VNA である NDPA が 40%以上のメタノール溶液で 100%に近い回収率を得たことから、EVVI-Carb カラムの VNAs 溶出条件は、50%メタノール溶液を用いることとした。以上 2 つの前処理操作を組み合わせることで、主流煙捕集溶液からの測定妨害物質除去と VNAs 濃縮を同時に行うことが可能となり、低濃度の VNAs を測定することが出来た。本研究で新しく NMOR の測定が可能となり、NMOR 以外の VNAs は、これまでの先行研究で報告された化合物であった。また、確立した上記測定手法と GC/MS での VNAs の定量下限値（2 ng/mL）に、本研究の各たばこ主流煙捕集法の喫煙本数（ISO 法；15 本、HCl 法；9 本）を加えて得られた定量下限値は、ISO 法条件下で 0.13 ng/cig、HCl 法では 0.2 ng/cig であった。本手法の定量限界は、Tricker らの報告[11]（1.0 ng/cig）と比較すると 5~7 倍ほど感度の向上が認められた。

2. 同時再現性試験

上記で確立した前処理法を用いたたばこ主流煙中 VNA 測定の精度を検証するため同時再現性試験を行うとともに、主流煙捕集時に VNAs を総

て高率で回収するのに必要なインピンジャー本数についても検討を行った（Table 2）。なお、たばこ主流煙の捕集時のインピンジャーは二連結し、捕集溶液はインピンジャー毎に前処理・分析した。また、たばこ銘柄は HOPE と Marlboro menthol を使用し、銘柄ごとに 5 回測定した。

1 本目のインピンジャーで捕集した主流煙中の各 VNAs の濃度は、HOPE の NDMA, NMEA, NDPA, NPIP と NMOR 濃度が、0.8, 5.8, 5.6, 0.5 そして 1.9 ng/cig であった。また、Marlboro menthol の各 VNAs 濃度は、HOPE と同順で 1.2, 4.3, 2.8, 0.8 そして 3.4 ng/cig であった。各 VNAs 濃度の変動係数（%, HOPE, Marlboro menthol）は、NDMA が 8.5, 9.2%, NMEA は 5.5, 2.5%, NDPA は 3.3, 5.5%, NPIP は 6.5, 3.6%, NMOR は 12.8, 10.8% であった。1 本目のインピンジャー溶液中の各 VNAs 濃度は総て定量下限値以上であり、ガス状成分としては比較的精度良く測定できた。また、2 本目に設置したインピンジャーの捕集溶液中 VNAs は、全て検出下限値以下であったため、以後の主流煙中 VNAs 測定はインピンジャー1 本で捕集を行うこととした。

D. 結論

本研究では、活性炭カラムとケイソウ土カラムによる 2 段階の前処理法と GC/MS を組み合わせた主流煙中 VNA の測定法を確立した。次年度は、本分析法をもとに国産たばこ銘柄の分析を実施する計画である。

E 研究発表

委託業務成果報告（総括）に一括記載した。

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

G 参考文献

- [1] 浅野牧茂 (2003): たばこ煙に含まれる物質. 成人病と生活習慣病 33: 769-778
- [2] 厚生労働省 (2011): 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] Tricker AR, Dittrich C & Preussmann R (1991): N-nitroso compounds in cigarette tobacco and their occurrence in mainstream tobacco smoke. *Carcinogenesis* 12: 257-261
- [4] Rhoades JW & Johnson DE (1972): N-dimethylnitrosamine in tobacco smoke condensate. *Nature* 236: 307-308
- [5] Brunnemann KD & Hoffman D (1994): Nitrosamines and related N-nitroso compounds: Chemistry and Biochemistry: Analysis of tobacco-specific nitrosamine in tobacco and tobacco smoke. ACS Symposium Series 553: 369-371
- [6] Brunnemann KD, Yu L & Hoffmann D (1977): Assessment of carcinogenic volatile JV-nitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes. *Cancer Res* 37: 3218-3222
- [7] Tricker AR & Preussmann R (1992): Volatile N-nitrosamines in mainstream cigarette smoke: occurrence and formation. *Clin Investig* 70: 283-289
- [8] Truhaut R, Lich NP, Castegnaro M, Bourgadez MC & Martin C (1984): Volatile nitrosamines in the mainstream smoke of black tobacco. *J Cancer Res Clin Oncol* 108: 157-159
- [9] T-309 (1999): Determination of nitrosamines in whole tobacco. Health Canada
- [10] Miřáček EJ, Brunnemann KD, Hoffmann D, Limsila T, Suttajit M, Martin N & Caplan LS (1999): 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
- [11] Kataoka H, Kurisu M & Shindoh S (1997): Determination of volatile N-nitrosamines in combustion smoke samples. *Bull Environ Contam Toxicol* 59: 570-576
- [12] Kataoka H, Shindoh S & Makita M (1996): Selective determination of volatile N-nitrosamines by derivatization with diethyl chlorothiophosphate and gas chromatography with flame photometric detection. *J Chromatogr A* 723: 93-99
- [13] Cárdenes L, Ayala JH, González V & Afonso AM (2002): Fast microwave-assisted dansylation of N-nitrosamines analysis by High-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 946: 133-140
- [14] Pérez DM, Alatorre GG, Álvarez EB, Silva EE & Alvarado JFJ (2008): Solid-phase microextraction of N-nitrosodimethylamine in beer. *Food Chem* 107: 1348-1352
- [15] Yurchenko S & Mölder U (2005): N-nitrosodimethylamine analysis in estonian beer using positive-ion chemical ionization with gas chromatography mass spectrometry. *Food Chem* 89: 455-463
- [16] Yurchenko S & Mölder U (2006): Volatile N-nitrosamines in various fish products. *Food Chem* 96: 325-333
- [17] Yurchenko S & Mölder U (2007): The occurrence of volatile N-nitrosamines in estonian meat products. *Food Chem* 100: 1713-1721
- [18] Hung HW, Lin TF, Chiu CH, Chang YC & Hsieh TY (2010): Trace analysis of N-nitrosamines in water using solid-phase microextraction coupled with gas chromatograph-tandem mass spectrometry. *Water Air Soil Pollut* 213: 459-469
- [19] Hu R, Zhang L & Yang Z (2008): Picogram determination of N-nitrosodimethylamine in water. *Water Sci Technol* 58: 143-151

- [20] Plumlee MH, López-Mesas M, Heidelberger A, Ishida KP & Reinhard M (2008): N-nitrosodimethylamine (NDMA) removal by reverse osmosis and UV treatment and analysis via LC-MS/MS. *Water Res* 42: 347-355
- [21] 日本たばこ協会 (2011): 紙巻たばこ統計データ. <http://www.tioj.or.jp/data/index.html>
- [22] ISO 3402 (1999): Tobacco and tobacco products - Atmosphere for conditioning and testing. ISO
- [23] ISO 3308 (2000): Routine analytical cigarette - smoking machine - Definitions and standard conditions. ISO.
- [24] ISO 4387 (2000): Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine. ISO
- [25] T-115 (1999): Determination of tar, nicotine and carbon monoxide in mainstream tobacco smoke. Health Canada

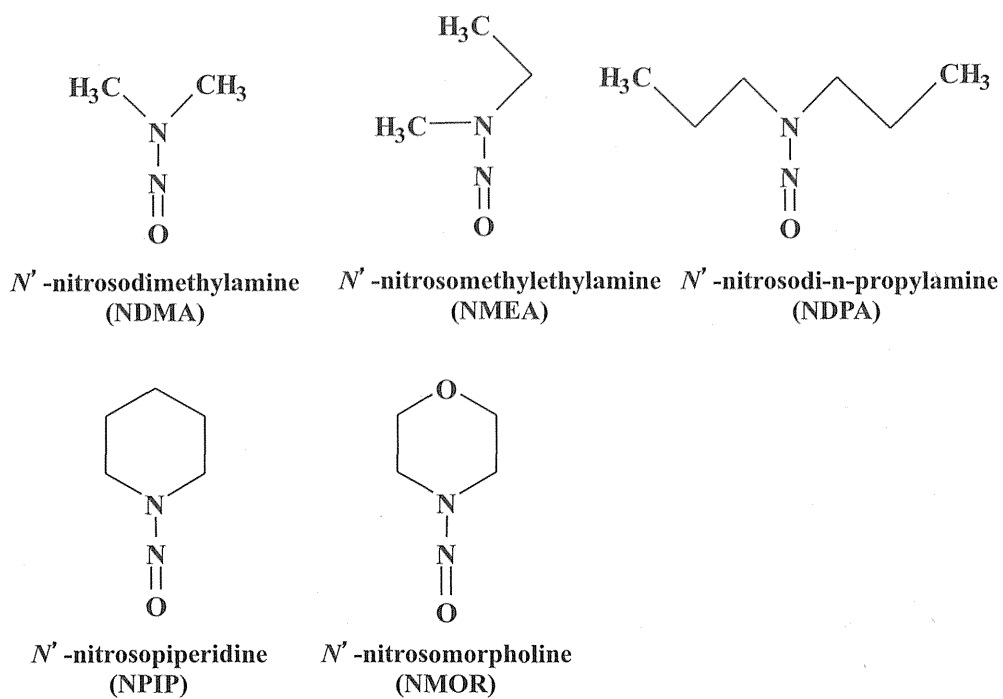


Fig. 1 Chemical structure of VNA

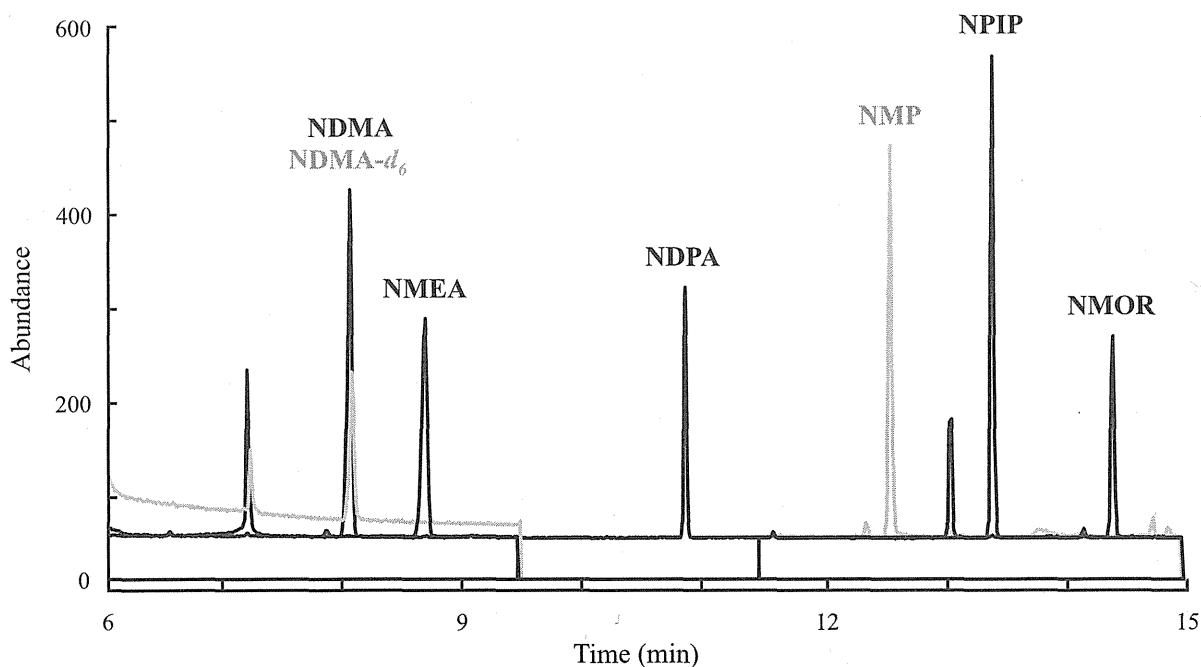


Fig 2. Chromatogram of VNA by GC/MS
 VNA, NDMA-*d*₆ and NMP concentration of 100 ng/mL

Table 1 The condition of mass spectrometric measurement of 5 VNAs

Analyte	<i>m/z</i>		(min) Monitoring time
	Measurement Ion	Verification Ion	
NDMA	74	42	
NDMA- <i>d</i> ₆	46	80	6.0 - 9.5
NMEA	88	42	
NDPA	130	70	9.5 - 11.5
NMP	98	99	
NPIP	114	42	11.5 - 15.0
NMOR	116	56	

Table 2 Results of simultaneous reproductivity of VNA in mainstream smoke of cigarettes with HCl regimen (n=5)

Impinger	Sample	VNA (ng/cig)														
		NDMA			NMEA			NDPA			NPIP			NMOR		
		Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
<i>First</i>	HOPE	0.8 ± 0.07		8.5	5.8 ± 0.32		5.5	5.6 ± 0.18		3.3	0.5 ± 0.03		6.5	1.9 ± 0.24		12.8
	Marlboro menthol	1.2 ± 0.11		9.2	4.3 ± 0.11		2.5	2.8 ± 0.15		5.5	0.8 ± 0.03		3.6	3.4 ± 0.36		10.8
<i>Second</i>	HOPE		nd			nd			nd			nd			nd	
	Marlboro menthol		nd			nd			nd			nd			nd	

※ n.a ; not analytical n.d ; not detected
 LOQ ; 0.2 ng/cig , LOD ; 0.1 ng/cig

刻みたばこ葉中のニコチンとたばこ特異的ニトロソアミンの分析

担当責任者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院
担当責任者 樺田 尚樹 国立保健医療科学院
研究協力者 内山 茂久 国立保健医療科学院
研究協力者 大久保忠利 国立保健医療科学院

研究要旨

手巻きたばこの材料となる「刻みたばこ」中のニコチンとたばこ特異的ニトロソアミン (tobacco-specific nitrosamine:TSNA) の分析を目的とした。こいきのたばこ葉中ニコチン量 (mg/g) が 18.1 ± 0.2 、こいき松川刻が 23.2 ± 0.3 、黒船が 20.2 ± 0.4 と宝船が 20.4 ± 0.2 であった。刻みたばこのニコチン量は、国産紙巻たばこ銘柄の平均ニコチン量 15.7 ± 1.2 mg/g と比較すると高値であった。刻みたばこのたばこ葉中 TSNA 分析結果を示す。こいきは各成分とも低値であり、TSNA 合計量 (ng/g) は本分析対象銘柄で最も低い 713 ± 9.3 であった。こいき松川刻は若干高い 1032 ± 24.6 であった。黒船は、各 TSNA が最も高値となり、TSNA 合計量は 4408 ± 58.0 となった。刻みたばこは、たばこ税が低く、低価格で手巻きたばこの原料となるために、今後、たばこの増税が行われるに伴って、販売量が増加すると考えられる。早急に有害化学物質の実態解明とたばこ税の公平化が望まれる。本研究のたばこ葉中ニコチンの分析結果が、「平成 26 年度税制改正（租税特別措置）要望事項」No.6 国民の健康の観点からたばこの消費を抑制することを目的とした、たばこ税の税率の引上げの根拠として利用された。

A. 研究目的

最近、2010 年のたばこの増税後に手巻きたばこの販売量が増えている。手巻きたばこは、たばこ葉を購入し紙巻たばこを自作すると、1 本あたりの単価が、市場で販売される紙巻たばこ製品より安くなるためと考えられる。しかしながら、これまで我が国では、手巻きたばこの原料となるたばこ葉中の有害化学物質の調査及び報告は行われていない。そこで本研究では、市場で販売される刻みたばこを対象として、たばこ特異的な成分であるニコチンとたばこ特異的ニトロソアミン類 (tobacco-specific nitrosamine) の分析を目的とした。

B. 研究方法

1. 装置と試薬

N'-nitrosonornicotine (NNN),
4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), *N'*-nitrosoanatabine (NAT) と *N'*-nitrosoanabasine (NAB) および TSNA の重水素体 (NNN-*d*4, NNK-*d*3, NAT-*d*4, NAB-*d*4) は Toronto Research Chemicals 製を使用した。ニコチン、水酸化ナトリウム (NaOH), L-アスコルビン酸, リン酸水素二カリウムとクエン酸は、和光純薬工業製の試薬特級を使用した。メタノールおよび酢酸は和光純薬工業製の LC/MS 用を、*n*-ヘキサンとジク

ロロメタンは和光純薬工業製の残留農薬・PCB 試験用を、ジメチルスルホキシドはダイオキシン類分析用を、そして2-プロパノールは和光純薬工業製の精密分析用を使用した。アセトニトリルは Sigma-Aldrich 製の HPLC 用を、n-ヘプタデカン は東京化成製を使用した。なお、HPLC と試薬調製の超純水には Millipore 製の Milli-Q システムを使用した。

2. たばこ試料

4 種類の刻みたばこ銘柄（こいき、こいき松川刻、黒船及び宝船）を市場から購入し、測定対象とした。購入後のサンプルはすべてプラスチック製の袋に入れて、 -20°C 以下の冷凍庫内に保存した。

3. 試料調整

たばこ葉の恒湿化

たばこ葉は、紙巻たばこ製品本体から分離し、ISO3402 に準拠し、抽出実験前、最低 48 時間～最大 10 日間、温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $60\pm 3\%$ で恒湿化を行い実験に供した (1)。

4. たばこ葉のニコチン分析

たばこ葉のニコチン測定は、CORESTA の手法 (2) を若干改良し行った。恒湿化したたばこ葉 1.5 g を 200 mL 容の共栓付三角フラスコに入れた。次に、Milli-Q を 20 mL と 2M の NaOH を 10 mL を加えた。さらに、n-ヘプタデカンを 0.5 mg/mL になるように溶解した n-ヘキサン溶液を 40 mL を加えた後に振とう抽出を 60min 行った。遠心分離後 (3,500 rpm, 10 min)、有機層を回収し、2-プロパノールで 2,000 倍希釈し、ガスクロマトグラフ/水素炎イオン化型検出器 (GC/FID) へ供した。GC/FID は島津製作所製 GC-2014 を使用し、カラムはアジレントテクノロジー製 HP-INNOWAX (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm) を用いた。測定条

件はカラム温度 50°C (2 min 保持) -50°C から 200°C (昇温速度 $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$) -200°C から 250°C (昇温速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) -250°C (5 min 保持) とした。GC の気化室温度は 250°C 、注入条件はスプリットレスとした。

5. たばこ葉の TSNA 測定

たばこ葉の 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行った。まず恒湿化したたばこ葉 1.0 g を 200 mL 容の共栓付三角フラスコに入れた。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、振とう抽出を 180 rpm, 60 min で行った。振とう終了後、濾過を行い、この抽出液 10 mL を珪素土カラム (K-Solute, 10 mL 容, GL サイエンス製) 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) 50 mL で溶出を行った。溶出液はエバポレータで減圧濃縮後、窒素気流下で溶媒留去した。溶媒留去後、10 %メタノール溶液 1 mL で再溶解したものを高速液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) に供し、TSNA の測定を行った (4)。

C. 結果及び考察

刻みたばこ葉中ニコチン分析結果を Table 1 に示す。たばこ銘柄ごとに 5 回前処理・測定を実施した。その結果、こいきのたばこ葉中ニコチン量 (mg/g) が 18.1 ± 0.2 、こいき松川刻が 23.2 ± 0.3 、黒船が 20.2 ± 0.4 と宝船が 20.4 ± 0.2 であった。刻みたばこのニコチン量は、国産紙巻たばこ銘柄の平均ニコチン量 15.7 ± 1.2 mg/g と比較すると高値であった。我が国のたばこ税は、パイプたばこ及び葉巻たばこは 1 g を 1 本に、刻みたばこ、かみ用及びかぎ用の製造たばこは 2 g を 1 本に、それ

ぞれ換算されている。これまでの研究からたばこ1本あたりの重量（添加物、水分量を含む）は、約600mgである。以上の結果を考慮すると刻みたばこ製品や本研究では分析対象とはしなかったが、かぎ用たばこ、かみ用たばこは、重量あたりのニコチン量は、紙巻たばこよりも多くなることが推測された。

Table 2は、刻みたばこのたばこ葉中TSNA分析結果を示す。こいきは各成分とも低値であり、TSNA合計量（ng/g）は本分析対象銘柄で最も低い713±9.3であった。こいき松川刻は若干高い1032±24.6であった。黒船は、各TSNAが最も高値となり、TSNA合計量は4408±58.0となった。本研究のTSNA分析結果は、黒船の分析結果は、明らかに高値であるものの、これまで本研究班が報告した紙巻たばこの分析結果に近い数値であった（5）。手巻きたばこのたばこ葉の銘柄は多く、有害化学物質の実態を把握できていないのが現状である。今後は規模を拡大して実施する必要がある。

D. 結論

市場で販売される刻みたばこ4製品のニコチンとTSNAの分析を行ったところ、市場で販売されるニコチン、TSNAに近い含有量であることが分かった。刻みたばこは、たばこ税が低く、低価格で手巻きたばこの原料となるために、今後、たばこの増税が行われるに伴って、販売量が増加すると考えられる。早急に有害化学物質の実態解明とたばこ税の公平化が望まれる。たばこ成分（たばこ葉中のニコチン）の分析結果が、「平成26年度税制改正（租税特別措置）要望事項」No.6 国民

の健康の観点からたばこの消費を抑制することを目的とした、たばこ税の税率の引上げの根拠として利用された。

E 研究発表

委託業務成果報告（総括）に一括記載した。

F 知的財産権の出願・登録状況 なし

G 参考文献

- (1) ISO 3402. Tobacco and tobacco products -- Atmosphere for conditioning and testing. 1999.
- (2) CORESTA RECOMMENDED METHOD N° 62. Determination of nicotine in tobacco and tobacco products by gas chromatographic analysis. 2005.
- (3) Health Canada Test Method T-115. Determination of nitrosamines in whole tobacco. 1999.
- (4) 杉山晃一, 稲葉洋平, 大久保忠利, 内山茂久, 高木敬彦, 樺田尚樹. 国産たばこ主流煙中たばこ特異的ニトロソアミン類の異なる捕集法を用いた測定. 日本衛生学雑誌 2012;67: 423-430.
- (5) 稲葉洋平, 大久保忠利, 内山茂久, 樺田尚樹. 国産たばこ銘柄のたばこ葉に含有されるニコチン, たばこ特異的ニトロソアミンと変異原性測定. 日本衛生学雑誌. 2013;68:46-52.

Table 1 刻みたばこのニコチン含有量

たばこ銘柄	ニコチン含有量 (mg/g)		
	Mean	±	SD
こいき	18.1	±	0.2
こいき 松川刻	23.2	±	0.3
黒船	20.2	±	0.4
宝船	20.4	±	0.2

Table 2 刻みたばこのたばこ特異的ニトロソアミン含有量

たばこ銘柄	ng/g (n=5)														
	NNN			NAT			NAB			NNK			Total		
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD
こいき	235	±	5.4	317	±	5.6	18	±	0.6	142	±	5.9	713	±	9.3
こいき 松川刻	456	±	19.7	423	±	6.8	28	±	0.8	126	±	6.5	1032	±	24.6
黒船	2568	±	44.3	1285	±	10.9	105	±	1.6	450	±	9.8	4408	±	58.0
宝船	705	±	15.1	429	±	6.2	24	±	1.2	128	±	4.8	1286	±	12.0

低タール低ニコチンたばこのフィルター通気率の分析

担当責任者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

担当責任者 戸次加奈江 国立保健医療科学院

研究協力者 内山 茂久 国立保健医療科学院

研究要旨

最近、外箱表示量ニコチン 0.1 mg, タール 1 mg の紙巻たばこ製品（低タール・低ニコチンたばこ）が、我が国の紙巻たばこ製品の販売量上位 25%を占めるようになった。低タール・低ニコチンたばこは、たばこ吸い口部分のフィルターに通気孔が数多く設けられているため、ISO 法で主流煙を捕集するとこの通気孔から流入する空気によって主流煙が希釈されてしまうと指摘がある。さらに、喫煙者は生体内により多くのニコチンを取り込もうと喫煙行動するため、代償性補償喫煙行動をすると報告もある。このような指摘があるたばこ製品にもかかわらず、我が国では、これらたばこ製品は、喫煙者のタール・ニコチンの曝露量が低いたばこ製品という印象を与えかねない状況が続いている。そこで、本研究は我が国で販売される低タール・低ニコチンたばこ 56 銘柄を対象としてフィルター通気率の実態調査を行ったところ、通気率は 73.1~90.5%であった。この結果から、低タール・低ニコチンたばこは、ISO 法で喫煙した場合、主流煙の 73.1~90.5%がフィルター通気孔から流入する空気希釈されることが分かった。よって低タール・低ニコチンたばこのフィルター通気孔が主流煙を希釈する根拠の一因であると考えられた。一方で、最近販売開始された新規紙巻たばこのフィルターには、ISO9502 では分析が難しい構造を有する製品が販売されており、通気孔以外にもフィルター素材についても文献調査を含め調査研究を進める必要がある。

A. 研究目的

最近、外箱表示量ニコチン 0.1 mg, タール 1 mg の紙巻たばこ製品（低タール・低ニコチンたばこ）が、我が国の紙巻たばこ製品の販売量上位 24.1%を占めるようになった (1)。この低タール・低ニコチンたばこは、国際標準化機構の定める喫煙法 (ISO 法) (2, 3) によって捕集されたたばこ主流煙中のタール・ニコチン量が 1 mg と 0.1 mg となっている。しかし、低タール・低ニコチンたばこは、たばこ吸い口部分のフィルターに通気孔が数多く設けられているため、ISO 法で主流煙を捕集するとこの通気孔から流入する空気によって主流

煙が希釈されてしまうと指摘がある (4, 5)。さらに、喫煙者は生体内により多くのニコチンを取り込もうと喫煙行動するため、代償性補償喫煙行動をすると報告もある (6, 7)。このような指摘があるたばこ製品にもかかわらず、我が国では、これらたばこ製品は、喫煙者のタール・ニコチンの曝露量が低いたばこ製品という印象を与えかねない状況が続いている。しかし、これまで我が国のたばこ製品の通気孔から空気が流入する割合（通気率）を分析された結果はわずかである。そこで本研究では、我が国で販売される低タール・低ニコチンたばこを対象としてフィルター通気率の

実態調査を行い、低タール・低ニコチンたばこ製品の機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 装置と試薬

紙巻たばこ製品の通気率の分析は、Borgwaldt社製のPV10を使用した。

2. たばこ試料

たばこ試料は、我が国で販売されている外箱表示ニコチン 0.1mg 及びタール 1mg の紙巻たばこ製品 56 銘柄とした (Table 1)。購入後のサンプルはすべてプラスチック製の袋に入れて、 -20°C 以下の冷凍庫内に保存した。

3. 試料調整

たばこ葉の恒湿化

紙巻たばこ製品は ISO3402 に準拠し、最低 48 時間～最大 10 日間、温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $60\pm 3\%$ で恒湿化を行い分析に供した (8)。

4. 紙巻たばこの通気率の分析

通気率は、恒湿化後の紙巻たばこ製品を PV10 に供して分析した (9)。なお、1 銘柄についてたばこ 10 本の分析を行った。本研究では Fig. 1 に示すフィルターの通気率 (Filter ventilation) を調査した。

C. 結果及び考察

本研究で分析を行った低タール・低ニコチンたばこ製品の銘柄の特徴は、メンソールたばこの銘柄数が 33 と半数以上であった。我が国の低タール・低ニコチンたばこ製品は、COP6 報告書 (10) で指摘された特殊なたばこ製品の特徴 (スリム/スーパースリムデザインのたばこ、フィルター通気率、ここ数年我が国で販売されているフィルター中にメンソールカプセルを封入して味や香

りを伝達する新規フィルターデザイン) が使用されていた。たばこ外箱は、これまでよりスリムな製品も多く、「爽快感」など連想させる魅惑性を高めるデザインが採用されていた。

たばこの通気率-日本たばこ産業-

日本たばこ産業製の外箱表示タール 1 mg 及びニコチン 0.1 mg の紙巻たばこ製品 23 銘柄のフィルター通気率の分析結果を Table 1 に示す。最も銘柄数が多いブランドが「メビウス」であり、次に「ピアニッシモ」であった。たばこ銘柄ごとに 10 回測定を実施したところ、通気率は $71.3\sim 90.5\%$ であった。通気率の最も低いたばこ銘柄が「キャスター フロンティア ワン ボックス」の $73.1\pm 1.9\%$ であった。最も通気率が高いのは九州で限定発売された「メビウス コントロールワン Min」の $90.5\pm 1.6\%$ であった。このたばこ製品は、ISO 法で喫煙した場合、1 回の吸煙量が 3.3 mL になる。

たばこの通気率-ブリティッシュアメリカン及びアメリカンスピリット-

ブリティッシュアメリカン及びアメリカンスピリット製の外箱表示タール 1 mg 及びニコチン 0.1 mg の紙巻たばこ製品 11 銘柄のフィルター通気率の分析結果を Table 2 に示す。最も銘柄数が多いブランドが「ケント」であった。たばこ銘柄ごとに 10 回測定を実施したところ、通気率は $76.9\sim 86.8\%$ であった。通気率の最も低いたばこ銘柄が「クール エース ボックス」の $76.9\pm 1.0\%$ であった。最も通気率が高いのは「ケント・エス・シリーズ・1・100・ボックス」の $86.8\pm 0.8\%$ であった。

たばこの通気率-フィリップモリス-

フィリップモリス製の外箱表示タール 1 mg 及びニコチン 0.1 mg の紙巻たばこ製品 22 銘柄の

フィルター通気率の分析結果を Table 3 に示す。最も銘柄数が多いブランドが「ラク」であり、次に「マルボロ」と「バージニア・エス」であった。たばこ銘柄ごとに 10 回測定を実施したところ、通気率は 73.3~85.9%であった。通気率の最も低いたばこ銘柄が「マルボロ・フィルタープラス・ワン・ボックス」と「マルボロ・クリア・ハイブリッド・ワン・100s・ボックス」の 73.3 ± 1.6 及び $73.3 \pm 2.7\%$ であった。最も通気率が高いのは「バージニア・エス・デュオ・メンソール・10s」の $85.9 \pm 0.9\%$ であった。

各たばこ産業の低タール・低ニコチンのたばこ吸い口部のフィルター通気率は、70%以上であった。この結果は、低タール・低ニコチンたばこのフィルター通気孔が主流煙を希釈する根拠の一因であると考えられた。一方で、最近販売開始された新規紙巻たばこのフィルターには、ISO9502 では分析が難しい構造を有する製品が販売されており、通気孔以外にもフィルター素材についても文献調査を含め調査研究を進める必要がある。今後もフィルター構造が、喫煙者や喫煙行動、さらにはマーケティングに与える影響に着目しながら、たばこ製品規制に向けた科学的根拠を得る計画である。

D. 結論

我が国で販売される低タール・低ニコチンたばこ 56 銘柄を対象としてフィルター通気率の実態調査を行ったところ、通気率は 73.1~90.5%であった。この結果から、低タール・低ニコチンたばこは、ISO 法で喫煙した場合、主流煙の 73.1~90.5%がフィルター通気孔から流入する空気希釈されることが考えられた。

E 研究発表

委託業務成果報告（総括）に一括記載した。

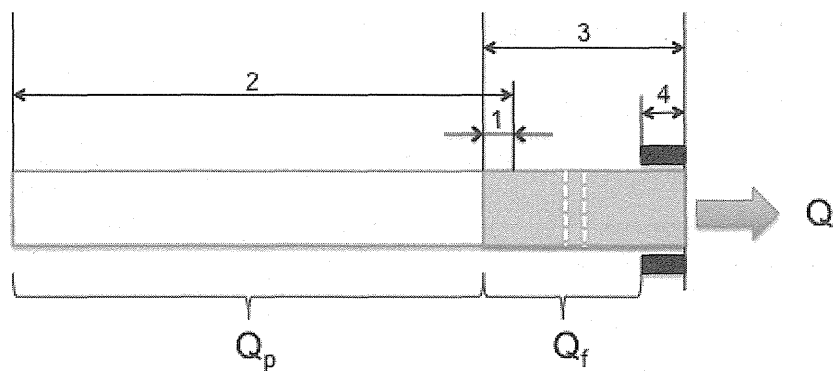
F 知的財産権の出願・登録状況
なし

G 参考文献

- (6) 日本たばこ協会. 平成 25 (2013) 年 ター ル ・ ニ コ チ ン 含 有 量 (http://www.tioj.or.jp/data/pdf/140418_02.pdf) 2015 年 3 月 9 日 接 続
- (7) ISO Standard 3308. International Organization for Standardization. Routine analytical cigarette smoking machine-definitions and standard conditions, fourth ed. 2000.
- (8) 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.
- (9) Kozlowski L, O' Conner R. Cigarette filter ventilation is a defective design because of misleading taste, bigger puffs, and blocked vents. *Tob Control* 2002;11:i40-50.
- (10) Harris B. The intractable cigarette 'filter problem' . *Tob Control* 2011 ;20 (Suppl 1) :i10-i16.
- (11) Matsumoto M, Inaba Y, Yamaguchi I, Endo O, Hammond D, Uchiyama S, Suzuki G. Smoking topography and biomarkers of exposure among Japanese smokers: associations with cigarette emissions obtained using machine smoking protocols. *Environ Health Prev Med.* 2013; 18:95-103.
- (12) Ueda K, Kawachi I, Nakamura M, Nogami H, Shirokawa N, Masui S, Okayama A, Oshima A. Cigarette nicotine yields and nicotine intake among Japanese male workers. *Tob Control.* 2002;11:55-60.

- (13) ISO 3402. Tobacco and tobacco products -- Atmosphere for conditioning and testing. 1999.
- (14) ISO 9512. Cigarettes -Determination of ventilation -definitions and measurement principles. 2002.
- (15) FCTC/COP/6/13. Progress on further

development of the partial guidelines for implementation of Articles 9 and 10 of the WHO FCTC. 2014
(http://apps.who.int/gb/fctc/PDF/cop6/FCTC_COP6_13-en.pdf) 2015年3月9日接続.



Total Air flow, $Q=17.5 \text{ mL/s}$

Degree of filter ventilation, $V_f = Q_f/Q \times 100\%$

Degree of paper ventilation, $V_p = Q_p/Q \times 100\%$

Degree of total ventilation, $V = V_f + V_p = (Q_f + Q_p)/Q \times 100\%$

1. Overlap
2. Cigarette paper
3. Tipping paper
4. Standard depth of encapsulation (ISO3308)

Fig. 1 フィルター通気率の概要

Table 1 たばこフィルター通気率の分析結果（日本たばこ産業銘柄）

Brands	No.	Brand name	Ventilation (%)		
			Mean	±	SD
Mevius	1	メビウス ワン	77.5	±	1.8
	2	メビウス ワン ボックス	78.3	±	2.1
	3	メビウス ワン 100s ボックス	75.1	±	1.5
	4	メビウス プレミアム メンソール 1	81.5	±	0.8
	5	メビウス インパクト ワン 100s ボックス	76.8	±	2.4
	6	メビウス プレミアム メンソール ワン100s	81.4	±	1.2
	7	メビウス モード スタイルプラス ワン	86.6	±	0.8
	8	メビウス モード ワン 100s ボックス	79.3	±	1.6
	9	メビウス プレミアム メンソール オプション ワン 100s	82.4	±	0.4
	10	メビウス プレミアム・メンソール オプション イエロー	84.3	±	0.7
	11	メビウス コントロールワン Max	79.2	±	4.6
		メビウス コントロールワン Min	90.5	±	1.6
CABIN	12	キャビン ワン テイスティ 100s ボックス	78.4	±	1.2
CASTER	13	キャスター ワン ボックス	80.4	±	1.5
	14	キャスター ワン 100s ボックス	74.2	±	1.9
	15	キャスター フロンティア ワン ボックス	73.1	±	1.9
Seven Stars	16	セブンスター 1	77.9	±	2.5
Winston	17	ウィンストン XS イナズマ ワン 100sボックス	80.2	±	1.7
	18	ウィンストン XS イナズマメンソール ワンボックス	77.1	±	1.1
Pianissimo	19	ピアノッシモ アリア メンソール	82.2	±	1.0
	20	ピアノッシモ ベティル メンソール ワン	76.8	±	1.0
	21	ピアノッシモ プレシア メンソール	86.2	±	0.9
	22	ピアノッシモ フラン メンソール ワン	77.5	±	0.9
	23	ピアノッシモ アイシーン クリスタ	79.7	±	1.2