

厚生労働科学研究費補助金

曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の
健康影響を評価するための研究
(23FA1002)

令和5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 稲葉 洋平

令和6（2024）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究	
稲葉洋平	

II. 分担研究報告

1. LC/MS/MS を使用した揮発性有機化合物代謝物一斉分析法の改良	
稲葉洋平, 牛山明	
2. LC/MS/MS を使用した多環芳香族炭化水素代謝物の一斉分析法の確立	
稲葉洋平, 牛山明	
3. DNA 損傷分析	
戸塚ゆ加里	
4. 3 歳児健康診査を活用した加熱式たばこによる家族の受動喫煙に関する調査票の作成 ...	
瀬瀬朋弥, 大澤絵里	
5. 喫煙者への調査体制の確立について	
松尾洋孝, 中山昌喜	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	
---------------------------	--

令和5年度厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
総括研究報告書

曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を
評価するための研究

研究代表者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

研究要旨

これまでの加熱式たばこの成分分析結果と紙巻たばこと加熱式たばこ喫煙者のバイオマーカーの先行研究を発展させ、日本人喫煙者・受動喫煙者を主たる4項目（曝露・炎症・影響・臨床）で評価し、喫煙者・受動喫煙者の健康影響評価法を開発するとともにその実態を明らかにすることである。本研究は、喫煙者は「紙巻たばこ喫煙者」、「併用者」、「加熱式たばこ喫煙者」の3群に非喫煙者を加えた計4群に対し、これまでの喫煙歴、喫煙行動、生活習慣、加熱式たばこへの意識、ニコチン依存度を調査票で調べるとともに、生体試料（尿など）に含まれる曝露・炎症・影響マーカーを分析する。また一部の対象者は健康診断の結果と連結させる。統計解析は、たばこ製品ごとの比較（紙巻と加熱式など）だけではなく、曝露マーカーの分析値を基軸とした分類による解析を行う。

受動喫煙者は、3歳児検診の場を活用し、喫煙者家族と非喫煙者家族の2つのグループから、喫煙者に上記喫煙者と同様の調査票に加えて、家庭内での喫煙場所などを尋ねる。生体試料（尿）に含まれる曝露・炎症・影響・臨床マーカーを分析し、非喫煙家族の分析値との比較を行うことを目的とした。

初年度は、尿中のたばこ煙由来の曝露マーカー分析法の改良・開発を行なった。分析対象の曝露マーカーとして、燃焼によって発生するガス成分の揮発性有機化合物代謝物類（VOC バイオマーカー）と粒子成分の多環芳香族炭化水素類の代謝物の分析法を確立した。引き続き2年度も炎症マーカー等の開発を継続する。また、加熱式たばこ喫煙者の健康影響を評価するためにDNA損傷分析の文献調査を行なった。次年度は今年度の調査をもとにDNA損傷の実験を開始し、サンプリングの条件検討を進める。

調査対象のフェールドの確保を行い、アンケート調査票の作成も行なった。1つは、本研究の対象者として、職域の健康診断受検者を計画中である。研究体制について調整を行い、倫理審査を準備中である。次に受動喫煙者の調査は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、地域特性が異なる自治体で実施する3歳児健康診査を活用し、喫煙歴、喫煙者のたばこ製品、喫煙場所、喫煙に対する認識、住環境、車の保有状況等についてWebアンケート調査を実施し、受動喫煙者のバイオマーカーの分析結果との関連性を検討する。初年度である今年度は自治体をリクルートし説明を行うことに加え本調査で使用するアンケート調査票の作成を行った。.

研究分担者	所属施設名
牛山 明	国立保健医療科学院
大澤 絵里	国立保健医療科学院
瀬瀬 朋弥	岐阜大学
戸塚 ゆ加里	日本大学
松尾 洋孝	防衛医科大学校
中山 昌喜	防衛医科大学校

研究協力者	所属施設名
中島 宏	防衛医科大学校
上山 純	名古屋大学
秋本 紗希	東京薬科大学

A. 研究背景と目的

本研究の目的は、これまでの加熱式たばこの成分分析結果と紙巻たばこと加熱式たばこ喫煙者のバイオマーカーの先行研究を発展させ、日本人喫煙者・受動喫煙者を主たる4項目（曝露・炎症・影響・臨床）で評価し、喫煙者・受動喫煙者の健康影響評価法を開発するとともにその実態を明らかにすることである。

これらの先行研究における加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者のバイオマーカー分析結果から、いくつかの課題が抽出された。

1. 疾患が認められていない喫煙者・受動喫煙者からの分析法開発・調査研究になるため、可能な限り侵襲のない生体試料をもとにバイオマーカー分析を行う必要がある。そのため尿に加えて他の非侵襲的に回収可能な生体サンプルから有効なバイオマーカー分析手法の開発を探索する。
2. 1.の成果をもとに加熱式たばこ喫煙者の曝露以外の炎症、臨床、影響（酸化ストレス、DNA付加体など）に関する評価に有効なバイオマーカーの抽出を行う必要がある。
3. 喫煙者について、加熱式たばこ製品の違いによ

る曝露量の違いがみられるのか比較検討する。

4. 加熱式たばこの受動喫煙の評価は、バイオマーカー分析に加えていくつかの環境要因「地域性（車の使用率が高い、たばこ農家が多い地域）」、「住環境（戸建、集合住宅）」、「加熱式たばこに関する認識の違い」について質問票を組み合わせる評価を行う必要がある。

5. 受動喫煙による炎症、および影響マーカーについて、尿試料から探索する。

そこで本研究では、喫煙者は「紙巻たばこ喫煙者」、「併用者」、「加熱式たばこ喫煙者」の3群に非喫煙者を加えた計4群に対し、これまでの喫煙歴、喫煙行動、生活習慣、加熱式たばこへの意識、ニコチン依存度を調査票で調べるとともに、生体試料（尿など）に含まれる曝露・炎症・影響マーカーを分析する。また一部の対象者は健康診断の結果と連結させる。統計解析は、たばこ製品ごとの比較（紙巻と加熱式など）だけではなく、曝露マーカーの分析値を基軸とした分類による解析を行う。

受動喫煙者は、3歳児検診の場を活用し、喫煙者家族と非喫煙者家族の2つのグループから、喫煙者に上記喫煙者と同様の調査票に加えて、家庭内での喫煙場所などを尋ねる。生体試料（尿）に含まれる曝露・炎症・影響・臨床マーカーを分析し、非喫煙家族の分析値との比較を行うことを目的とした。

評価の進め方

喫煙者；曝露マーカー毎に、喫煙者間では、紙巻、加熱式の曝露状況を比較するとともに、各主流煙分析の結果との相関を評価する。次に、曝露量の差と炎症マーカーレベルの相関を評価する。そして、影響・臨床マーカーのレベルと曝露マーカー、炎症マーカーのレベルとの相関を評価する。まだ、加熱式たばこのみの喫煙と各影響マーカーとの

相関についても非喫煙者のデータと比較する。
受動喫煙者；受動喫煙者においては、曝露マーカーと家庭内喫煙者が使用するたばこ製品ごとにそれらの相関を評価する。喫煙者の喫煙場所、加熱式たばこ製品に対する意識との関連性を比較する一方、受動喫煙者の炎症マーカー、影響マーカーと曝露マーカーと同居喫煙者の各マーカーとの相関を評価する。

B. 今年度の研究成果

1. LC/MS/MS を使用した揮発性有機化合物代謝物一斉分析法の改良

加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（尿）に含まれているたばこ由来の有害化学物質の代謝物と影響マーカー（酸化ストレスマーカー）の分析を行っている。今年度は、新たに揮発性有機化合物（VOC）の代謝物 17 成分の一斉分析法を改良し、標準尿試料を使用しての尿中 VOC 代謝物の分析を行なった。分析対象の VOC 代謝物は、たばこ煙のガス成分由来の 1,3-ブタジエン、アクロレイン、クロトンアルデヒド、アクリロトリル、プロピレンオキシド、キシレンの代謝物、さらに 120°C の加熱で発生するアクリルアミドの代謝物も分析対象に加えた。このアクリルアミドは、加熱式たばこ主流煙にも多く含まれており、紙巻たばこと同程度の発生量が定量された加熱式たばこ銘柄も報告されている。

分析カラムの変更を行ったところ、これまで分析が困難であった 3MHA と 4MHA、MHBMA2 と MHBMA3、MA と測定妨害成分の分離が確認された。他の測定対象物質ピーク付近に現れる測定妨害成分ピークとの分離も明確になり、精度の高い分析が達成された。さらに検量線を作成したところ、定量下限値が低減され、高感度化が達成され

た。今回改良した VOC 代謝物分析法を使用して次年度からの調査研究を進める。

2. LC/MS/MS を使用した多環芳香族炭化水素代謝物の一斉分析法の確立

本研究では、新たに多環芳香族炭化水素（PAH）の代謝物 13 成分の一斉分析法を確立することを目的とした。分析対象の PAH 代謝物は、たばこ煙の粒子成分由来のナフタレン、フルオレン、フェナンスレン、ピレン、クリセン、ベンゾ[a]アントラセンの代謝物とした。

尿中 PAH 代謝物の分析には、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）を使用し、分析カラムは C8 を採用した。移動相にギ酸とアセトニトリルを適用したところ、PAH 代謝物の分離と感度が先行研究の分離条件よりも向上した。尿試料の前処理法は液液抽出を採用した。標準尿試料で同時再現性実験を行った。1-, 2-OHNap、OHFlu 類、1-, 2-, 3-, 4-, 9-OHPhe、1-OHPyr の CV の値は、0.70-4.32、1.32-4.65、2.87-9.78、3.85-6.43、2.09-5.47、4.54-5.70、3.12-8.96、3.65-10.6 及び 3.71-7.71% であった。一方、1-, 2-, 3-, 4-OHChr 及び 3-OHB[a]A の CV の値が 12.9-40.1、8.06-36.1、11.8-16.4、14.2-47.7 及び 8.33-17.6% と、最大で 47.7% となった。これは尿中の含有濃度が低い成分ほどばらつきが大きくなっていた。加熱式たばこ喫煙者は主流煙 PAH の発生量が少ないため、曝露量も少ないと予想されるが、まだ日本人喫煙者の PAH 曝露量の報告は少ない状況である。本研究で確立した尿中 PAHs 代謝物分析法を利用して、喫煙者、受動喫煙者の曝露量調査を進める計画である。

3. DNA 損傷分析

インターネット検索ツールにより口腔内からの DNA 試料採取・保存用器具として、マウイディー

エヌエーテクノロジーズ社の iSWAB DNA Collection Kit が試料採取の簡便性や DNA 回収効率から見て適当であると考えた。次に、これまでに報告されている文献検索を実施した。文献検索には PubMed を用い、まずは“buccal cells”, “heated cigarette (heated tobacco products)”で検索したところ、2 件が検索された。検索ワードの“heated cigarette (heated tobacco products)”を“e-cigarettes”に変更して検索したところ、先の検索で見つかった 2 件の論文を含む、9 件に増加した。このうち、DNA 付加体を検出しているものは 2 件あり、一報はアクロレインの付加体である α -OH-Acr-dGuo (Cheng G. et al., Carcinogenesis, 2022, 43; 437-444) ともう一報は DNA 損傷から生成される Apurinic/Apyrimidinic Sites を誘導体化して検出するものであった (Guo J., et al., Chem Res Toxicol, 2021, 34; 2540-2548)。一方で、9 報のうち小核を遺伝毒性の指標としていたものが 3 報あった。また、1 報ずつであるが、脂質過酸化物質であるマロンジアルデヒドやエピゲノム変化である DNA メチル化の変化を指標としている報告もあった。これら以外では、etheno-dA が紙巻たばこの喫煙に相関する DNA 付加体であることが知られている。これらの情報を参考に、本研究では加熱式たばこ曝露の指標として適当な DNA 損傷（遺伝毒性）について検討を進める予定である。

4.3 3 歳児健康診査を活用した加熱式たばこによる家族の受動喫煙に関する調査票の作成

本研究では、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、地域特性が異なる自治体で実施する 3 歳児健康診査を活用し、喫煙歴、喫煙者のたばこ製品、喫煙場所、喫煙に対する認識、住環境、車の保有状況等について Web アンケート調査を実施し、受動喫煙者のバ

イオマーカーの分析結果との関連性を検討する。初年度である今年度は自治体をリクルートし説明を行うことに加え本調査で使用するアンケート調査票の作成を行った。

本調査でリクルートした 3 自治体は人口 8.5 万人、3.5 万人、11 万人の市であり、住環境、世帯構成、喫煙率等が異なる地域である。先行研究において、加熱式たばこの受動喫煙が生じる要因は、喫煙者が受動喫煙者の近くで喫煙することにあるとの仮説を立てた[1]。そこで、喫煙者の喫煙場所、加熱式たばこの使用による周囲に対する健康影響への認識、住環境、車の保有等の項目を含め調査票を作成した。

我が国では、改正健康増進法により受動喫煙対策が強化された。しかし、家庭での受動喫煙防止への取り組みは十分とは言えない。現在、子育て世代である 20～30 歳代の男性の加熱式たばこの使用率は 50%を超える[2]。子どもが最も長い時間を過ごす家庭での受動喫煙防止は重要な課題である。本調査では特に子どもが受動喫煙を受けやすい家庭での受動喫煙曝露の実態を把握できるように配慮した。

5. 喫煙者への調査体制の確立について

喫煙により生じる煙には、多くの有害化学物質が含まれている。しかし従来の「紙巻たばこ」に加え、近年発売され広まってきた「加熱式たばこ」について、実際に日本人喫煙者が加熱式たばこによりどの程度有害化学物質に曝露されているのかの研究はあまりなされていないのが現状である。本研究では、健康診断受検者を対象に、紙巻たばこと加熱式たばこを区別して、その有害化学物質への曝露の程度について検討を行うものである。

本研究の対象者として、職域の健康診断受検者を

計画中である。研究体制について調整を行い、倫理審査を準備中である。本研究では、尿に含まれる揮発性有機化合物代謝物（Volatile Organic Compounds: VOC 代謝物）を中心に、曝露・炎症・影響マーカーを分析する予定である。

本研究により、紙巻たばこおよび加熱式たばこを区別した、より適切な喫煙のバイオマーカーが明らかになるとともに、その健康への影響についての検討が進むことが期待できる。

C. 結論

初年度は、喫煙者の曝露マーカー分析法の改良・開発を行なった。分析対象の曝露マーカーとして、燃焼によって発生するガス成分の揮発性有機化合物代謝物類（VOC バイオマーカー）と粒子成分の多環芳香族炭化水素類の代謝物の分析法を確立した。この分析によって加熱式たばこの燃焼由来のバイオマーカーの曝露量の評価が可能となった。VOC バイオマーカーの中には 120℃と低加熱温度領域で発生するアクリルアミド代謝物の分析も可能なため、アクリルアミド代謝物と他の VOC 代謝物の比較をすることによって、喫煙者が紙巻たばこまたは加熱式たばこを使用しているのか？推測することも可能になる。2 年度は炎症マーカー分析法の開発も並行して進めていく計画である。

次に DNA 損傷体の文献調査を実施した。文献検索の結果、DNA 付加体や小核などを用いて加熱および電子たばこによる有害性を評価している論文が数報見つかった。加熱式たばこおよび電子たばこが汎用されてからまだあまり年月が経っていないこともあると考えられるが、期待よりも少ない報告数であった。先行研究の結果から、複数の報告で小核が非喫煙者と比較して加熱式たばこ使用者でその発現頻度が上昇する結果となっ

ていたことから、本研究での DNA 損傷の指標として一つの候補となると考えられる。将来的に加熱式たばこ使用者でのゲノム変異解析を実施したいと考えていることから、本研究では可能であれば DNA 付加体の検出を実施したい。しかしながら、口腔粘膜細胞から採取できる細胞や DNA の回収量も考慮しつつ、次年度以降に実施する項目を検討する予定である

調査対象のフェールドの確保を行い、アンケート調査票の作成も行なった。1 つは、本研究の対象者として、職域の健康診断受検者を計画中である。研究体制について調整を行い、倫理審査を準備中である。次に受動喫煙者の調査は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、地域特性が異なる自治体で実施する 3 歳児健康診査を活用し、喫煙歴、喫煙者のたばこ製品、喫煙場所、喫煙に対する認識、住環境、車の保有状況等について Web アンケート調査を実施し、受動喫煙者のバイオマーカーの分析結果との関連性を検討する。初年度である今年度は自治体をリクルートし説明を行うことに加え本調査で使用するアンケート調査票の作成を行った。

D. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

分担研究報告書に記載

2. 学会発表

分担研究報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

LC/MS/MSを使用した揮発性有機化合物代謝物一斉分析法の改良

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院

研究要旨

本研究では、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（尿）に含まれているたばこ由来の有害化学物質の代謝物と影響マーカー（酸化ストレスマーカー）の分析を行っている。今年度は、新たに揮発性有機化合物（VOC）の代謝物 17 成分の一斉分析法を改良し、標準尿試料を使用しての尿中 VOC 代謝物の分析を行った。

分析カラムの変更を行ったところ、これまで分析が困難であった 3MHA と 4MHA、MHBMA2 と MHBMA3、MA と測定妨害成分の分離が確認された。他の測定対象物質ピーク付近に現れる測定妨害成分ピークとの分離も明確になり、精度の高い分析が達成された。さらに検量線を作成したところ、定量下限値が低減され、高感度化が達成された。今回改良した VOC 代謝物分析法を使用して次年度からの調査研究を進める。

A. 研究目的

たばこ煙には、有害化学物質が含まれており[1]、喫煙によって発生する複数の有害化学物質の複合曝露によって生体への健康影響が報告されている。たばこの主流煙には 5,300 種類以上の化学物質が含まれていると報告されており[2]その主流煙には、IARC の発がん性リスク一覧のグループ 1 とされた「ヒトに対する発がん性が認められる」化合物が確認されている（1,3-ブタジエン、NNK、NNN、ベンゾ[a]ピレン）。グループ 1 には、厚生労働省によって室内濃度指針値が定められているホルムアルデヒドが指定され、有害化学物質のアセトアルデヒド、アクロレイン、アクリルアミド、アクリロニトリルなどの揮発性有機化合物なども含まれている[1]。室内濃度指針値の対象物質以外にも有害化学物質（グループ 2A）として、アクリルミ

ドなども報告されている。

これまでに我々は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の尿中揮発性有機化合物代謝物の分析法を確立し、日本人喫煙者、受動喫煙者の揮発性有機化合物代謝物（Volatile Organic Compounds: VOC 代謝物）の分析を行ってきた[3]。しかし、LC/MS/MS 分析時に測定対象成分と測定妨害物質の分離が困難な尿サンプルも確認されていた。そこで新たに VOC 代謝物分析法を改良し、分析時に測定対象成分の分離がより明確になる分析条件への改良を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) 尿中 VOC 代謝物の分析

揮発性有機化合物（VOC）代謝物は、Table 1 に示す 19 成分を分析対象とした。尿中 VOC 代謝物

の固相抽出には、MonoSpin®C18-CX（GLサイエンス社製）を用いた。VOC代謝物の分析は、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS；Qtrap5500, SCIEX社製）を使用した。LC条件はAlwisらの方法[5]を採用した。なお、LC/MS/MSの検量線範囲はTable 2に示した。本分析法の変更点は、分析カラムによって成分分離に効果が確認された。分析カラムはWaters社製、ACQUITY™ Premier T3（1.8 μm, 2.1x150 mm）を採用した。

C. 研究結果及び考察

(1) LC/MS/MSによるVOC代謝物の分析

本研究において分析カラムをACQUITY™ Premier T3（1.8 μm, 2.1x150 mm）へ変更した。得られたピークを標準物質と標準尿試料の各分析結果をFig.1に示す。これまで分離が困難であったXyleneの代謝物3MHAと4MHAの分離が達成された。それ以外にもVOC代謝物ピーク付近に確認されていた他成分のピークとの見分けも明確になった。また、本分析法の改良によって、分析対象物質も17成分から19成分の分析が可能となった。本研究では今後、改良したVOC代謝物分析法を使用して研究を推進する計画である。

(2) 検量線

本分析法を使用して検量線を作成したところ、過去の分析法と比較して、検量線の低濃度領域の分析が可能となった（Table 2）

(3) クロマトグラム

先行研究で確立したVOC代謝物分析法で、分離が困難であった成分について、(A) 標準溶液、(B) 尿試料のクロマトグラムをFig.1に示す。MA、3MHAと4MHA、MHBMA1,2,3について示した。その結果はこれまでピークが重なっていた3MHAと4MHAは、3MHAの濃度が高い傾向にあることが分かった。

D. 結論

本研究では、喫煙者のVOC代謝物の分析の改良を行った。分析カラムの変更を行ったところ、これまで分析が困難であった3MHAと4MHAの分離が確認された。他の測定対象物質ピーク付近に現れる測定妨害成分ピークとの分離も明確になり、精度の高い分析が達成された。今後、本研究で改良した尿中VOC分析法を活用していく計画である。

[引用文献]

- [1] IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 83: 1-1438, 2004.
- [2] Rodgman A, Perfetti TA. Alphabetical Component Index. In: The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. Rodgman A, Perfetti TA, editors. Boca Raton, FL: CRC Press, 1483-1784, 2009.
- [3] 稲葉洋平. 揮発性有機化合物代謝物の一斉分析法の確立と日本人喫煙者および受動喫煙者への適用. 令和4年度 厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）「加熱式たばこの健康影響評価のためのバイオマーカーを用いた評価手法の開発」（研究代表者：大森久光. 〈課題番号：20FA1004〉）分担研究報告書.

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1. 稲葉洋平. セッション 2 「加熱式タバコについて考える」加熱式タバコのエアロゾル成分解析からみえる長期的健康被害とは？ 第5回 禁煙推進学術ネットワーク学術会議（WEB開催）. 2023.10.1；東京. Web要旨集.

2. 稲葉洋平、戸次加奈江、内山茂久、牛山明. 電子たばこ主流エアロゾルに含まれる有害化学物質の分析. 第 82 回日本公衆衛生学会総会. 2023.10.31-11.2 ; つくば. 同抄録集 p405.

3. 稲葉洋平. JSMO2024 禁煙推進セッション 加熱式タバコのエアロゾル成分解析. 第 21 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (JSMO2024). 2024.2.22-2.24 ; 名古屋. Web 講演集.

4. 稲葉洋平、内山茂久、大森久光、緒方裕光、牛山明. 喫煙者の尿中揮発性有機化合物の代謝物とニコチン代謝物との関連性. 日本分析化学会第 72 年会. 2023.9.13-15 ; 熊本. 同講演要旨集 2P-027.

5. 稲葉洋平、大和浩、大森久光、中田光紀、緒方裕光、牛山明. 加熱式たばこ喫煙者の尿中揮発性有機化合物の代謝物分析. 第 94 回日本衛生学会学術総会. 2024.3.7-3.9 ; 同講演集 S267.

2. 書籍

日本禁煙学会編. はじめよう! 薬剤師のための禁煙支援ガイド 稲葉洋平. 第 2 章 禁煙支援をはじめる前に 1. タバコ製品について知る p28-41. 2023. 南山堂

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1 分析対象の揮発性有機化合物代謝物と曝露化合物

曝露	代謝物	正式名称
Acrolein	3-HPMA	N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl)cysteine,Dicyclohexylammonium
Acrolein	CEMA	N-Acetyl-S-(2-carboxyethyl)-L-cysteine Bis(dicyclohexylamine) Salt
Crotonaldehyde	CMEMA	N-Acetyl-S-(3-carboxy-2-propyl)-L-cysteine disodium Salt
Crotonaldehyde	HPMMA	N-Acetyl-S-(3-hydroxypropyl-1-methyl)-L-cysteine
Acrylamide	AAMA	N-Acetyl-S-(cabamoylethyl)-L-cysteine
N,N-Dimethylformamide	AMCC	N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)-L-cysteine
Styrene	MA	DL-Mandelic acid
Acrylonitrile	CYMA	N-Acetyl-S-(2-cyanoethyl)-L-cysteine Ammonium Salt
Propylene oxide	2-HPMA	N-Acetyl-S-(2-hydroxypropyl)cysteine Dicyclohexylammonium
1,3-Butadiene	DHBMA	N-Acetyl-S-(3,4-dihydroxybutyl)-L-cysteine (Mixture of Diastereomers)
1,3-Butadiene	MHBMA 1	N-Acetyl-S-(1-hydroxymethyl-2-propen-1-yl)-L-cysteine
1,3-Butadiene	MHBMA 2	N-Acetyl-S-(2-hydroxy-3-buten-1-yl)-L-cysteine (Mixture)
1,3-Butadiene	MHBMA3	N-Acetyl-S-(2-hydroxy-2-buten-1-yl)-L-cysteine
Ethylbenzen,Styrene	PGA	Phenylglyoxylic Acid (Benzoylfomic Acid)
Xylene	2MHA	2-Methylhippuric acid
Xylene	3MHA	3-Methylhippuric acid
Xylene	4MHA	4-Methylhippuric acid
Benzene	PMA	S-Phenylmercapturic Acid
Toluene	SBMA	N-Acetyl-S-benzyl-L-cysteine

Table 2 揮発性有機化合物代謝物の内部標準物質と検量線範囲

曝露成分	代謝物	内部標準	検量線濃度範囲 (ng/mL)	
			過去	本分析法
Acrolein	3-HPMA	3HPMA-d3	1-200	0.5-200
Acrolein	CEMA	CEMA-d3	1-200	0.5-200
Crotonaldehyde	CMEMA	CMEMA-d3	1-200	1-200
Crotonaldehyde	HPMMA	HPMMA-d3	1-200	0.5-200
Acrylamide	AAMA	AAMA-d3	1-200	0.5-200
N,N-Dimethylformamide	AMCC	AMCC-d3	1-200	0.5-200
Styrene	MA	MA-d5	1-500	5-500
Acrylonitrile	CYMA	CYMA-d3	0.05-100	0.01-100
Propylene oxide	2-HPMA	2HPMA-d3	1-200	0.1-200
1,3-Butadiene	DHBMA	DHBMA-d7	1-200	0.05-200
1,3-Butadiene	MHBMA 1	MHBMA-d6	0.1-100	0.1-100
1,3-Butadiene	MHBMA 2	MHBMA-d6	0.1-100	0.1-100
1,3-Butadiene	MHBMA3	MHBMA3-d3	0.1-100	0.1-100
Ethylbenzen,Styrene	PGA	PGA-d5	0.2-100	0.1-100
Xylene	2MHA	2MHA-d7	1-100	0.5-100
Xylene	3MHA	3MHA-d7	1-100	0.5-100
Xylene	4MHA	4MHA-d7	1-100	0.5-100
Benzene	PMA	PMA-d5	0.01-100	0.01-100
Toluene	SBMA	SBMA-d3	0.01-200	0.01-200

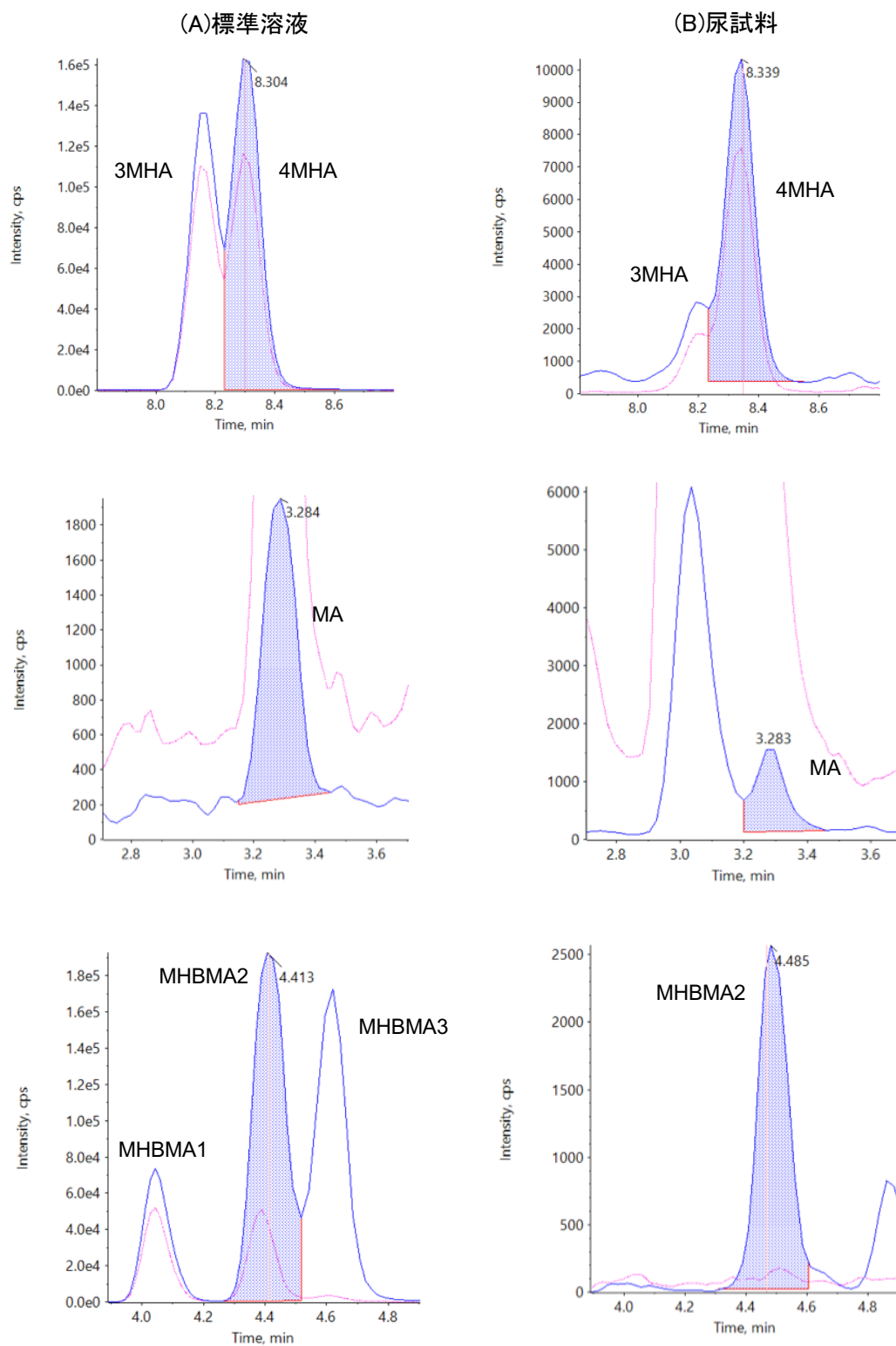


Fig. 1 揮発性有機化合物代謝物のクロマトグラム
(A)標準物質、(B)尿試料

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

LC/MS/MSを使用した多環芳香族炭化水素代謝物の一斉分析法の確立

研究分担者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院
研究分担者 牛山 明 国立保健医療科学院
研究協力者 秋本 紗希 東京薬科大学

研究要旨

本研究では、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（尿）に含まれているたばこ由来の有害化学物質の代謝物と影響マーカー（酸化ストレスマーカー）の分析を行っている。今年度は、新たに多環芳香族炭化水素（PAH）の代謝物13成分の一斉分析法を確立することを目的とした。分析対象のPAH代謝物は、たばこ煙の粒子成分由来のナフタレン、フルオレン、フェナンスレン、ピレン、クリセン、ベンゾ[a]アントラセンの代謝物とした。

尿中PAH代謝物の分析には、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）を使用し、分析カラムはC8を採用した。移動相にギ酸とアセトニトリルを適用したところ、PAH代謝物の分離と感度が先行研究の分離条件よりも向上した。尿試料の前処理法は液液抽出を採用した。標準尿試料で同時再現性実験を行った。1-、2-OHNap、OHFlu類、1-、2-、3-、4-、9-OHPhe、1-OHPyrのCVの値は、0.70-4.32、1.32-4.65、2.87-9.78、3.85-6.43、2.09-5.47、4.54-5.70、3.12-8.96、3.65-10.6及び3.71-7.71%であった。一方、1-、2-、3-、4-OHChr及び3-OHB[a]AのCVの値が12.9-40.1、8.06-36.1、11.8-16.4、14.2-47.7及び8.33-17.6%と、最大で47.7%となった。これは尿中の含有濃度が低い成分ほどばらつきが大きくなっていた。加熱式たばこ喫煙者は主流煙PAHの発生量が少ないため、曝露量も少ないと予想されるが、まだ日本人喫煙者のPAH曝露量の報告は少ない状況である。本研究で確立した尿中PAHs代謝物分析法を利用して、喫煙者、受動喫煙者の曝露量調査を進める計画である。

A. 研究目的

たばこ煙には、ニコチン、ベンゾ[a]ピレン等の多環芳香族炭化水素（polycyclic aromatic hydrocarbons、PAHs）、芳香族アミン、たばこ特異的ニトロソアミン（tobacco-specific nitrosamine、TSNA）、などの有害化学物質が含まれる[1-3]。PAHsは石油、木材、たばこ等の有機物の不完全燃焼により生成され[4]、大気中を

浮遊する粒子状物質から検出される難分解性有機汚染物質である[5,6]。ヒトは、喫煙、可塑剤、顔料、殺虫剤等の製造や加工、食事、大気汚染等を通じてPAHsに曝露する[7,8]。PAHsは体内に取り込まれた後に、代謝を受け一水酸化多環芳香族炭化水素(OH-PAHs)となり、呼吸系、生殖系、神経系に影響を与えたり発がんリスクを高めたりする[6]。国際がん研究機関（IARC）

の発がん性リスク一覧には、PAHs をグループ 1 とされた「ヒトに対する発がん性が認められる」や「ヒトに対して発がん性がある可能性がある」としてグループ 2B 以上に分類している。

加熱式たばこは、加工されたたばこ葉を携帯型の装置で加熱することによって発生する煙（エアロゾル）を吸引するたばこ製品である。このたばこ製品は、燃焼を伴わないために紙巻たばこから発生する有害化学物質の発生を抑制する。2014 年に販売開始された IQOS をはじめとする加熱式たばこの主流煙（エアロゾル）は、燃焼由来の有害化学物質が 90% 近く削減されている。我々の研究においても加熱式たばこ主流煙の PAHs 量は紙巻たばこと比較すると低値であることは確認している。しかし、加熱式たばこ喫煙者の PAHs 曝露量を正確に分析した調査例は少なく、実際の曝露実態は不明である。

そこで本研究ではヒトの PAHs 曝露量を把握するために、非喫煙者、紙巻たばこ喫煙者、加熱式たばこ喫煙者の尿に含まれる PAHs 代謝物の分析法の確立を目的とした。

B. 研究方法

(1) 測定対象成分

本研究の測定対象成分は、1-OHNap、2-OHNap、9-OHPhe、1-OHPyr は、Sigma Aldrich から購入した。1-OHNap-*d*7、2-OHNap-*d*7、3-OHFlu、3-OHFlu-*d*9、2-OHFlu、2-OHFlu-*d*9、1-OHPhe、1-OHPhe-*d*9、2-OHPhe、2-OHPhe-*d*9、3-OHPhe、3-OHPhe-*d*9、4-OHPhe、9-OHPhe-*d*8、1-OHPyr-*d*9、1-OHChr、2-OHChr、3-OHChr、3-OHChr-*d*11、4-OHChr、3-OHB[a]A、3-OHB[a]A-*d*11 は、Toronto Research Chemicals Inc. から購入した。9-OHFlu は、Cambridge Isotope Laboratories, Inc. から購入し、試薬の調整を行った。なお、測定成分のリストは Table 1 に示す。

(2) 試薬調整

各測定対象物質(1-, 2-OHNap、2-, 3-OHFlu、1-, 2-, 3-, 4-, 9-OHPhe、1-OHPyr、1-, 2-, 3-, 4-OHChr、3-OHB[a]A)をそれぞれ 1000 ng/mL になるようにメタノールに溶解した。内標準物質 (I.S.) は 1-, 2-OHNap-*d*7、2-, 3-OHFlu-*d*9、1-, 2-, 3-OHPhe-*d*9、9-OHPhe-*d*8、1-OHPyr-*d*9、3-OHChr-*d*11、3-OHB[a]A-*d*11 をそれぞれ 1000 ng/mL になるようにメタノールに溶解した。

調整溶液を各分析に希釈して使用した。

(3) 尿試料の前処理

標準尿試料を流水で解凍し、遠心分離 (3000rpm 10 分間) を行った。IWAKI 遠沈管 15 mL、解凍した尿試料を 2 mL、100 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) を 2 mL、β-グルクロニダーゼ酵素調製液 (尿サンプルの β-グルクロニダーゼ酵素活性が 20,000U になるように調製) を 1 mL 加え、37°C で 24 時間酵素処理を行った。

酵素処理後、5% ギ酸を 1 mL、混合 I.S. (10 ng/mL) を 0.1 mL 添加し、急速冷凍 (-20°C、10 分間) を行った。冷凍後、1 から 3 の手順で液-液抽出を行った。

1. ヘキサンを 6 mL 添加し、振とう (160rpm 30 分間) 後、遠心分離を 3000rpm で 10 分間行った。ヘキサン層を回収した。

2. ヘキサン層を回収後の尿試料に、再びヘキサンを 6 mL 添加し、1. と同様の処理を行い、ヘキサン層を回収した。

3. 再度ヘキサン層を取り出した尿試料に、ジクロロメタン : ヘキサン (1 : 9, v/v) を 6 mL 添加し、振とう抽出を 160 rpm で 30 分間行った。その後、5 分間、氷中で静置した。その後、遠心分離を 3000 rpm で 10 分間行い、ジクロロメタン : ヘキサン層を回収した。

液-液抽出により回収した有機層を、窒素留去 (水温 35°C) により乾固させた後、0.5 mL の MeOH に再溶解した。前処理済の試料が 0.05-0.1 mL になるまで再度窒素留去を行い、残量と同量の MilliQ

水を加えた。得られた前処理済試料は LC/MS/MS に供した。

(4) LC/MS/MS の分析条件

LC/MS/MS 装置は、Triple Quad 5500+システム-QTRAP Ready (SCIEX 社製) を用いた。分析カラムは、CORTECS UPLC C8 カラム (100 mm×2.1 mm、1.6 μ m、Waters) を用いた。LC へのサンプル注入量は 5 μ L、カラムオープン温度は 30°C とした。移動相は 0.1%酢酸および 0.1%酢酸 ACN を用いた。

C. 研究結果及び考察

(1) 分析カラムの検討

本研究における測定対象物は、異性体を含む 15 種類の PAHs 代謝物とした。C18 カラムではこれらの異性体の選択的分離が確認されなかった。その理由として、C18 カラムは PAH との結合力が強く、移動相によるグラジエント分離、複数の C18 カラム (製造会社による比較) などの比較・検討を行ったが効果は確認されなかった。そこで、C18 と比較して PAHs 代謝物との結合力が弱い C8 カラム (Waters 社製、Phenomenex 社製) を選択し、調査を行ったところ、Waters 社製の C8 カラムによって異性体の分離が確認された。本研究の PAHs 代謝物の異性体の分離には、C8 カラムが適していた。

(2) 移動相の検討

U.S. CDC が公表している PAHs 代謝物の分析法 [9] は、移動相として 0.1 mM フッ化アンモニウム水溶液および 0.1% フッ化アンモニウム MeOH 溶液を採用していた。また、その他の論文 [10] では移動相として 2 mM 酢酸アンモニウム水溶液、MeOH を採用していた。以上参考文献を参考に MeOH 採用したところ、本研究環境下においては MeOH を用いた移動相では OGPhe 類及び OHChr 類の異性体の分離が困難であった。そこで新たに ACN を

用いた移動相 0.1%酢酸、0.1%酢酸 ACN を採用したところ、OH-PAHs 成分の良好な分離が確認された。OH-PAHs の分析に用いる移動相の pH は、MeOH を用いた中性条件と比較して ACN を用いた酸性条件の方が適していた。

(3) LC/MS/MS の測定結果及び検量線

15 種類の native のクロマトグラムを Fig.1 に示す。2-、3-OHFlu 以外の 13 成分は、分離が可能であった。検量線には内標準法を適応し、それぞれの native に対して Table 2 のように I.S. を対応させた。各成分における検量線の検出限界値 (LOD、Limit of detection)、定量下限値 (LOQ、Limit of quantification)、定量範囲、直線性 (r^2) を Table 3 に示す。検量線の直線性は定量範囲において、全ての分析対象物が $r^2=0.99$ 以上となり、良好な直線性が得られた。

(4) 同時再現性実験

喫煙者標準尿を 3 種類用いて、同時再現性実験を行った ($n=5$)。サンプルから得られた各成分の平均値 (Mean)、標準誤差 (SD、Standard deviation)、を Table 4 に示す。1-、2-OHNap、OHFlu 類、1-、2-、3-、4-、9-OHPhe、1-OHPyr の CV の値は、0.70-4.32、1.32-4.65、2.87-9.78、3.85-6.43、2.09-5.47、4.54-5.70、3.12-8.96、3.65-10.6 及び 3.71-7.71% であった。一方、1-、2-、3-、4-OHChr 及び 3-OHB[a]A の CV の値が 12.9-40.1、8.06-36.1、11.8-16.4、14.2-47.7 及び 8.33-17.6% と、最大で 47.7% であった。

D. 結論

本研究では、喫煙者及、受動喫煙者および非喫煙者の PAHs 代謝物の分析法を確立した。加熱式たばこ喫煙者は PAH の発生量が少ないため、曝露量も少ないと予想されるが、まだ日本人喫煙者の PAH 曝露量の報告は少ない状況である。今回は、標準尿試料を使用して同時再現性を確認した。今

後は本分析法を使用して加熱式たばこ喫煙者と紙巻たばこ喫煙者の曝露量の比較などを進めていく計画である。

[引用文献]

- [1] IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 83: 1–1438, 2004.
- [2] Rodgman A, Perfetti TA. Alphabetical Component Index. In: The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. Rodgman A, Perfetti TA, editors. Boca Raton, FL: CRC Press, 1483–1784, 2009.
- [3] 厚生労働省. :「喫煙と健康 喫煙の健康影響に関する検討会報告書」概要. 2016
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000172686.pdf> (accessed 2024-04-08)
- [4] Gaudreau É, Bérubé R, Bienvenu JF, Fleury N. Stability issues in the determination of 19 urinary (free and conjugated) monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons. Anal Bioanal Chem. 2016;408:4021-33. doi: 10.1007/s00216-016-9491-2.
- [5] 本薬学会 環境衛生部会：環境・衛生薬学トピックス「我々の健康を脅かす大気汚染物質－多環芳香族炭化水素（PAH）類の発生と動態－」. 2011
http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kanei/topics/topics19.html (accessed 2024-04-08)
- [6] Hua L, Guo S, Wang Y, Sun H, Zhao H. Simultaneous determination of multiple isomeric hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2021;1184:122983. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122983.

[7] 小池 英子, 多環芳香族炭化水素と誘導体の毒性機序解明へのアプローチ, エアロゾル研究, 2013, 28 巻, 1 号, p. 34-41.

[8] Wang Y, Meng L, Pittman EN, Etheredge A, Hubbard K, Trinidad DA, Kato K, Ye X, Calafat AM. Quantification of urinary mono-hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2017 ;409:931-937. doi: 10.1007/s00216-016-9933-x.

[9] CDC. Laboratory Procedure Manual: Monohydroxy-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (OH-PAHs).2012.
https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2011-2012/labmethods/pahs_g_met.pdf (accessed 2024-04-08)

[10] 平井 哲也, 木下 啓明, 岡村 秀雄, 矢野 吉治, 中野 武, 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による海技者尿中の多環芳香族炭化水素代謝物の定量と曝露評価. 分析化学. 2012;61:925–930.

F. 研究発表

1. 稲葉洋平. セッション 2 「加熱式タバコについて考える」加熱式タバコのエアロゾル成分解析からみえる長期的健康被害とは？ 第 5 回 禁煙推進学術ネットワーク学術会議（WEB 開催）. 2023.10.1；東京. Web 要旨集.
2. 稲葉洋平、戸次加奈江、内山茂久、牛山明. 電子たばこ主流エアロゾルに含まれる有害化学物質の分析. 第 82 回日本公衆衛生学会総会. 2023.10.31-11.2；つくば. 同抄録集 p405.
3. 稲葉洋平. JSMO2024 禁煙推進セッション 加熱式タバコのエアロゾル成分解析. 第 21 回日本

臨床腫瘍学会学術集会 (JSMO2024). 2024.2.22-2.24 ; 名古屋. Web 講演集.

4. 稲葉洋平、内山茂久、大森久光、緒方裕光、牛山明. 喫煙者の尿中揮発性有機化合物の代謝物とニコチン代謝物との関連性. 日本分析化学会第72年会. 2023.9.13-15 ; 熊本. 同講演要旨集 2P-027.

5. 稲葉洋平, 大和浩, 大森久光, 中田光紀, 緒方裕光, 牛山明. 加熱式たばこ喫煙者の尿中揮発性有機化合物の代謝物分析. 第94回日本衛生学会学術総会. 2024.3.7-3.9 ; 同講演集 S267.

2. 書籍

日本禁煙学会編. はじめよう!薬剤師のための禁煙支援ガイド 稲葉洋平. 第2章 禁煙支援をはじめる前に 1.タバコ製品について知る p28-41.2023.南山堂

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1 分析対象の多環芳香族炭化水素代謝物

(A) 標準物質		(B) 内標準物質	
略称	名称	略称	名称
1-OHNap	1-Naphthol	1-OHNap-d7	1-Naphthol-d7
2-OHNap	2-Naphthol	2-OHNap-d7	2-Naphthol-d7
2-OHFlu	2-Hydroxyfluorene	2-OHFlu-d9	2-Hydroxyfluorene-d9
3-OHFlu	3-Hydroxyfluorene	3-OHFlu-d10	3-Hydroxyfluorene-d10
1-OHPhe	1-Phenanthrol	1-OHPhe-d9	1-Phenanthrol-d9
2-OHPhe	2-Phenanthrol	2-OHPhe-d9	2-Phenanthrol-d9
3-OHPhe	3-Phenanthrol	3-OHPhe-d9	3-Phenanthrol-d9
4-OHPhe	4-Phenanthrol	9-OHPhe-d8	9-Phenanthrol-d8
9-OHPhe	9-Phenanthrol	1-OHPyr-d9	1-Hydroxypyrene-d9
1-OHPyr	1-Hydroxypyrene	3-OHChr-d11	3-Hydroxychrysene-d11
1-OHChr	1-Hydroxychrysene	3-OHB[a]A-d11	3-Hydroxybenz[a]anthracene-d11
2-OHChr	2-Hydroxychrysene		
3-OHChr	3-Hydroxychrysene		
4-OHChr	4-Hydroxychrysene		
3-OHB[a]A	3-Hydroxybenz[a]anthracene		

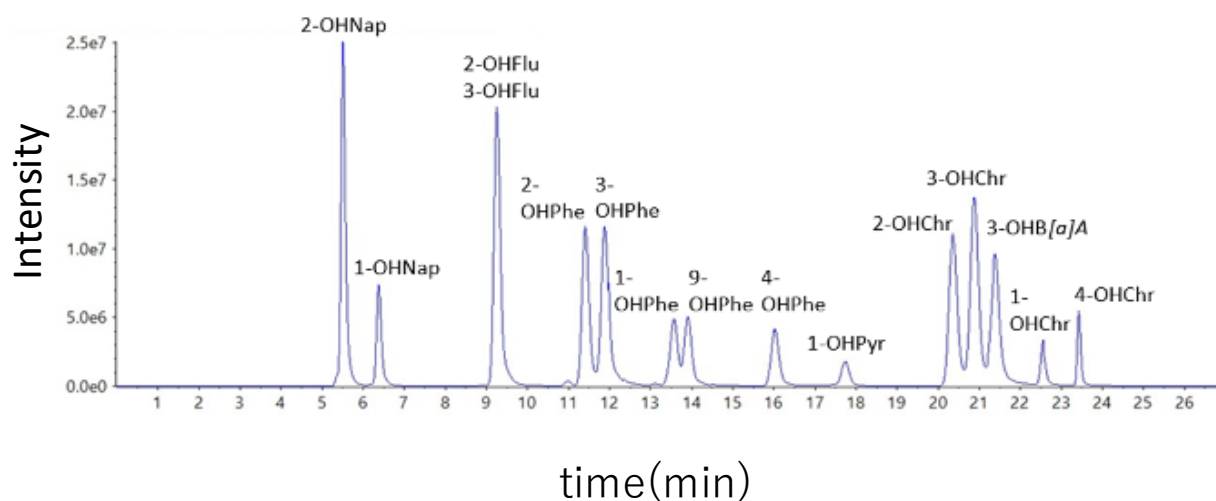


Fig.1 多環芳香族炭化水素代謝物のクロマトグラム

Table 2 分析時の化学物質対応表

標準物質	内部標準
1-OHNap	1-OHNap- <i>d</i> 7
2-OHNap	2-OHNap- <i>d</i> 7
2-OHFlu	2-OHFlu- <i>d</i> 9
3-OHFlu	3-OHFlu- <i>d</i> 10
1-OHPhe	1-OHPhe- <i>d</i> 9
2-OHPhe	2-OHPhe- <i>d</i> 9
3-OHPhe	3-OHPhe- <i>d</i> 9
4-OHPhe	9-OHPhe- <i>d</i> 9
9-OHPhe	
1-OHPyr	1-OHPyr- <i>d</i> 9
1-OHChr	
2-OHChr	3-OHChr- <i>d</i> 11
3-OHChr	
4-OHChr	
3-OHB[a]A	3-OHB[a]A- <i>d</i> 11

Table 3 PAHs 代謝物検量線

Compounds		濃度			直線性 (r^2)	検量線
正式名	略称	LOD	LOQ	定量範囲		
1-Naphthol	1-OHNap	0.005	1	1-250	0.9998	$y=3.11820e-4x + 0.00230$
2-Naphthol	2-OHNap	0.005	1	1-250	0.9994	$y=1.19817e-4x + 0.01555$
2-Hydroxyfluorene	2-OHFlu	0.01	0.1	0.1-50	0.9995	$y=1.17886e-4x + 0.00316$
+ 3-Hydroxyfluorene	+ 3-OHFlu	0.005	0.1	0.1-50	0.9973	$y=9.72191e-4x + 0.02032$
1-Phenanthrol	1-OHPhe	0.005	0.01	0.01-10	0.9988	$y=5.41952e-5x + 4.49434e-4$
2-Phenanthrol	2-OHPhe	0.005	0.01	0.01-10	0.9989	$y=2.22166e-4x + 0.00131$
3-Phenanthrol	3-OHPhe	0.005	0.01	0.01-10	0.9975	$y=7.43372e-5x + 3.72844e-4$
4-Phenanthrol	4-OHPhe	0.005	0.01	0.01-10	0.9974	$y=3.09786e-5x + 1.50686e-4$
9-Phenanthrol	9-OHPhe	0.005	0.01	0.01-10	0.9992	$y=2.4715e-5x + 1.54725e-4$
1-Hydroxypyrene	1-OHPyr	0.005	0.01	0.01-10	0.9909	$y=1.83816e-4x + -0.01062$
1-Hydroxychrysene	1-OHChr	0.005	0.02	0.02-10	0.9988	$y=2.40233e-5x + 3.20309e-4$
2-Hydroxychrysene	2-OHChr	0.005	0.01	0.01-10	0.9982	$y=1.09461e-4x + 0.00125$
3-Hydroxychrysene	3-OHChr	0.005	0.01	0.01-10	0.9997	$y=1.33099e-4x + 0.00173$
4-Hydroxychrysene	4-OHChr	0.005	0.02	0.02-10	0.9983	$y=3.79316e-5x + 3.62578e-4$
3-Hydroxy benz[a]anthracene	3-OHB[a]A	0.005	0.01	0.01-10	0.9989	$y=1.47537e-4x + 9.13085e-4$

Table 4 標準尿を使用した同時再現性実験

n=5

Compounds		Conc. (ng/mL)								
		Urine 1			Urine 2			Urine 3		
		Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)
1-OHNap		10.8 ± 0.08		0.70	18.6 ± 0.73		3.91	27.0 ± 1.17		4.32
2-OHNap		27.4 ± 0.36		1.32	58.4 ± 2.67		4.57	42.2 ± 1.96		4.65
2-OHFlu	181.0/152.9	3.04 ± 0.10		3.24	2.72 ± 0.09		3.43	3.23 ± 0.09		2.87
+ 3-OHFlu	181.0/180.2	3.22 ± 0.31		9.78	2.66 ± 0.25		9.28	2.74 ± 0.25		9.28
1-OHPhe		0.79 ± 0.05		6.43	0.87 ± 0.03		3.85	0.96 ± 0.05		5.08
2-OHPhe		1.07 ± 0.02		2.09	0.61 ± 0.02		4.05	0.55 ± 0.03		5.47
3-OHPhe		0.71 ± 0.04		5.70	0.64 ± 0.03		4.54	0.59 ± 0.03		5.29
4-OHPhe		0.12 ± 0.004		3.12	0.13 ± 0.01		8.96	0.24 ± 0.01		3.15
9-OHPhe		0.12 ± 0.004		3.65	0.33 ± 0.02		7.29	0.26 ± 0.03		10.6
1-OHPyr		0.54 ± 0.02		3.71	0.51 ± 0.03		6.09	0.60 ± 0.05		7.71
1-OHChr		0.029 ± 0.0118		40.1	0.012 ± 0.0029		24.4	0.014 ± 0.0018		12.9
2-OHChr		0.007 ± 0.0027		36.1	0.005 ± 0.0004		8.63	0.006 ± 0.0004		8.06
3-OHChr		0.004 ± 0.0006		16.3	0.003 ± 0.0004		16.4	0.003 ± 0.0003		11.8
4-OHChr		0.011 ± 0.0054		47.7	0.005 ± 0.0010		22.1	0.003 ± 0.0004		14.2
3-OHB[a]A		0.008 ± 0.0014		17.6	0.008 ± 0.0006		8.33	0.006 ± 0.0005		8.89

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

DNA 損傷分析

分担研究者 戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部・環境衛生学・教授

研究要旨：インターネット検索ツールにより口腔内からの DNA 試料採取・保存用器具として、マウイディーエヌエーテクノロジーズ社の iSWAB DNA Collection Kit が試料採取の簡便性や DNA 回収効率から見て適当であると考えた。次に、これまでに報告されている文献検索を実施した。文献検索には PubMed を用い、まずは“buccal cells”, “heated cigarette (heated tobacco products)”で検索したところ、2 件が検索された。検索ワードの“heated cigarette (heated tobacco products)”を“e-cigarettes”に変更して検索したところ、先の検索で見つかった 2 件の論文を含む、9 件に増加した。このうち、DNA 付加体を検出しているものは 2 件あり、一報はアクロレインの付加体である γ -OH-Acr-dGuo (Cheng G. et al., Carcinogenesis, 2022, 43; 437-444) ともう一報は DNA 損傷から生成される Apurinic/Apyrimidinic Sites を誘導体化して検出するものであった (Guo J., et al., Chem Res Toxicol, 2021, 34; 2540-2548)。一方で、9 報のうち小核を遺伝毒性の指標としていたものが 3 報あった。また、1 報ずつであるが、脂質過酸化物質であるマロンジアルデヒドやエピゲノム変化である DNA メチル化の変化を指標としている報告もあった。これら以外では、etheno-dA が紙巻たばこの喫煙に相関する DNA 付加体であることが知られている。これらの情報を参考に、本研究では加熱式たばこ曝露の指標として適当な DNA 損傷 (遺伝毒性) について検討を進める予定である。

A. 研究目的

これまで、紙巻たばこについては受動喫煙による健康影響が明らかになっているが、加熱式たばこについては主流煙にニコチンや発がん性物質が含まれていることは明らかであるものの、現時点では受動喫煙による長期的な健康影響を予測することは難しい状況である。このような状況を踏まえ、健康増進法の改正において、加熱式たばこによる受動喫煙がヒトの健康に影響を及ぼす調査研究を一層推進し、可能な限り早期に結論を得るよう附帯決議がなされた。

そのため、疾患が認められていない喫煙者・受動喫煙者からの分析法開発・調査研究に利用可能な侵襲のない生体試料をもとに有効なバイオマーカー分析手法の開発を探索する必要がある。また、加熱式たばこ喫煙者の曝露以外の炎症、臨床、影響 (酸化ストレス、DNA 付加体など) に関する評価に有効なバイオマーカーの抽出を行う必要がある。そこで本研究では、これまでの研究結

果を参考に、口腔内細胞を用いた加熱式たばこ曝露マーカーとなる DNA 損傷の解析手法について検討する。

B. 研究方法

本研究では、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料 (口腔内細胞) に含まれているたばこ由来の有害化学物質由来 DNA 付加体分析法の開発を行っている。初年度は口腔粘膜からのサンプル採取や解析手法について文献調査を実施し、分析法開発の基礎的な資料とした。

はじめに、インターネット検索ツールにより口腔内からの DNA 試料採取・保存用器具の検索を行い、本研究に適した物品の選定を行なった。次に、曝露の指標として適当な DNA 付加体の選択のため、PubMed を用いこれまでに報告されている文献検索を実施した。欧米では加熱式たばこよりも電子たばこの方が普及していることより、電子たばこもキーワードに加えて検索した。

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 研究結果

インターネット検索ツールにより口腔内からの DNA 試料採取・保存用器具として、マウイディーエヌエーテクノロジー社の iSWAB DNA Collection Kit が試料採取の簡便性や DNA 回収効率から見て適当であると考えた。



このキットを用いると、口腔サンプルが室温で月単位での保存が可能であり、操作も簡便である。また、このキットを用いてヒト口腔細胞から DNA を抽出した場合には 15~30 μg 回収できるとの情報があり、数回の DNA 付加体の検出に使用できる量である。

次に、加熱式たばこや電子たばこの曝露マーカーとしてこれまでに報告されている文献検索を実施した。文献検索には PubMed を用い、まずは“buccal cells”, “heated cigarette (heated tobacco products)”で検索したところ、2 件が検索された。検索ワードの“heated cigarette (heated tobacco products)”を“e-cigarettes”に変更して検索したところ、先の検索で見つかった 2 件の論文を含む、9 件に増加した。このうち、DNA 付加体を検出しているものは 2 件あり、一報はアクロレインの付加体である $\gamma\text{-OH-Acr-dGuo}$ (Cheng G. et al., Carcinogenesis, 2022, 43; 437-444)ともう一報は DNA 損傷から生成される Apurinic/Apyrimidinic Sites を誘導体化して検出するものであった (Guo J., et al., Chem Res Toxicol, 2021, 34; 2540-2548)。

図 1 アクロレインの付加体である $\gamma\text{-OH-Acr-dGuo}$

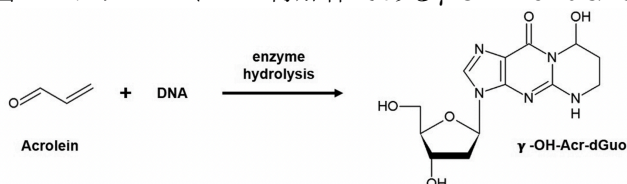
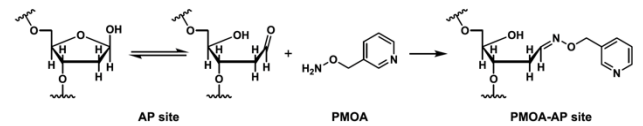
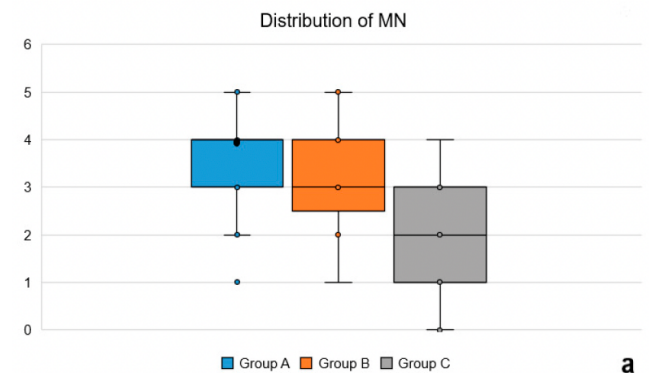


図 2 DNA 損傷から生成される Apurinic/Apyrimidinic Sites の誘導体化



一方で、9 報のうち小核を遺伝毒性の指標としていたものが 3 報あった。Tadin A. et al., (Journal of Xenobiotics, 2024)では小核を有する口腔粘膜細胞数が非喫煙者では 1.22 ± 1.00 ($M \pm SD$)であるのに対して、紙巻たばこでは 1.95 ± 1.46 ($M \pm SD$)、電子たばこでは 1.85 ± 0.58 ($M \pm SD$, $p=0.028$)と上昇したのに対して、加熱式たばこでは 1.40 ± 1.17 ($M \pm SD$)であった。同論文では小核以外にも核異形などを観察しており、そのうち、非喫煙者と比較して加熱式たばこで有意に異なっていたものは、nuclear bud、binucleated cells、karyorrhexis、karyolysis、condensed chromatin、pyknosis であった。Maria Pop A., et al., (Int. J. Environ. Res. Public Health, 2021)では被験者を紙巻たばこ電子たばこの両方を吸っているグループ (Group A)、電子たばこを吸っているグループ (Group B)、非喫煙者 (Group C) の 3 つのグループに分け、口腔内細胞の小核について解析している。その結果、Group A および B では C と比較して小核の発現が高いことが示された (図 3)。

図 3 喫煙者および非喫煙者における小核出現



Menicagli R. et al., (International Journal of Preventive Medicine, 2020)の論文でも同様に電子たばこ使用者では小核の発現が有意に高くなっていることが示されていた。また、1 報ずつであるが、脂質過酸化物質であるマロジアルデヒドやエピゲノム変化である DNA メチル化の変化を指標としている報告もあった。これら以外では、etheno-dA が紙巻たばこの喫煙に相関する DNA 付加体であることが知られている。これらの情報を参考に、本研究では加熱式たばこ曝露の指標として適当な DNA 損傷 (遺伝毒性) の評価方法について検討を進める予定である。

D. 考察

文献検索の結果、DNA 付加体や小核などを用いて加熱および電子たばこによる有害性を評価している論文が数報見つかった。加熱式たばこおよび電子たばこが汎用されてからまだあまり年月が経っていないこともあると考えられるが、期待よりも少ない報告数であった。先行研究の結果から、複数の報告で小核が非喫煙者と比較して加熱式たばこ使用者でその発現頻度が上昇する結果となっていたことから、本研究での DNA 損傷の指標として一つの候補となると考えられる。将来的に加熱式たばこ使用者でのゲノム変異解析を実施したいと考えていることから、本研究では可能であれば DNA 付加体の検出を実施したい。しかしながら、口腔粘膜細胞から採取できる細胞や DNA の回収量も考慮しつつ、次年度以降に実施する項目を検討する予定である。

E. 結論

インターネット検索ツールにより口腔内からの DNA 試料採取・保存用器具として、マウイディーエヌエーテクノロジー社の iSWAB DNA Collection Kit が試料採取の簡便性や DNA 回収効率から見て適当であると考えた。次に、これまでに報告されている文献検索を実施した。文献検索には PubMed を用い、まずは“buccal cells”, “heated cigarette (heated tobacco products)”で検索したところ、2 件が検索された。検索ワードの“heated cigarette (heated tobacco products)”を“e-cigarettes”に変更して検索したところ、先の検索で見つかった 2 件の論文を含む、9 件に増加した。このうち、DNA 付加体を検出しているものは 2 件あり、一報はアクロレインの付加体である g-OH-Acr-dGuo (Cheng G. et al., Carcinogenesis, 2022, 43; 437-444)ともう一報は DNA 損傷から生成される Apurinic/Apyrimidinic Sites を誘導体化して検出するものであった (Guo J., et al., Chem Res Toxicol, 2021, 34; 2540-2548)。一方で、9 報のうち小核を遺伝毒性の指標としていたものが 3 報あった。また、1 報ずつであるが、脂質過酸化物質であるマロンジアルデヒドやエピゲノム変化である DNA メチル化の変化を指標としている報告もあった。これら以外では、etheno-dA が紙巻たばこの喫煙に相関する DNA 付加体であることが知られている。これらの情報を参考に、本研究では加熱式たばこ曝露の指標として適当な DNA 損傷（遺伝毒性）について検討を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A,

Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, **Totsuka Y**, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. Biomolecules. 14:36, 2024.

2. 学会発表

1. **戸塚ゆかり** 生体を模倣した in vitro 遺伝毒性評価法 日本薬学会 144 年会 (2024 年 3 月、横浜)
2. **戸塚ゆかり** ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析、日本酸化ストレス学会 (2023 年 12 月、川崎)
3. **Totsuka Y**. Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023 年 11 月、東京)
4. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆかり**. 加熱式たばこの遺伝毒性評価、第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
5. 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、**戸塚ゆかり**. アドバンストナノマテリアルの in vitro 遺伝毒性評価、第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
6. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, **Yukari Totsuka**, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロロミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明、第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
7. 白鳥修平、小宮雅美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、Jiri Zavadil、渡部浩平、**戸塚ゆかり**. 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバードラクト探索、第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
8. 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、**戸塚ゆかり**. アルコール発がんにおけるドライバードラクトの探索と変異誘発メカニズムの解明、第 52 回環境変異原学会 (2023 年 11 月、福岡)
9. **Yukari Totsuka**, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023 年 9 月、横浜)
10. **Totsuka Y**. Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023 年 9 月、シカゴ・米国)
11. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆかり**. 加熱式たばこの遺伝毒性評価、がん予防学術大会 2023 (2023 年 9 月、金沢)
- 12.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録
該当なし。

3. その他
該当なし。

資料 研究成果に関する図表

図1 *gpt* 遺伝子における変異頻度

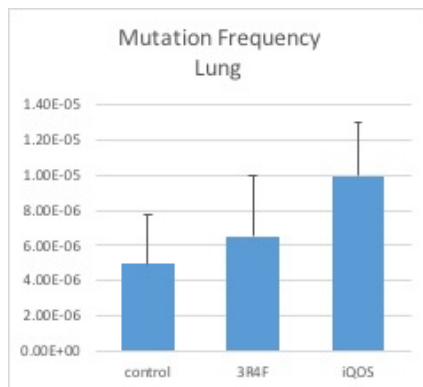


図2 *gpt* 遺伝子における変異のスペクトル解析

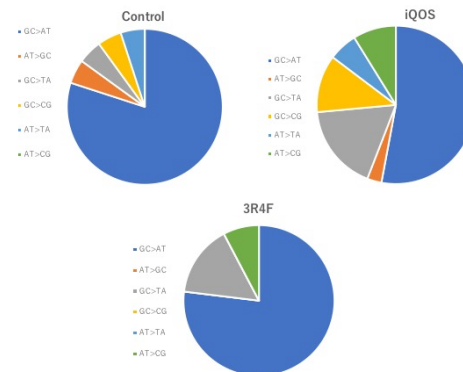


図3 DNA 付加体網羅的解析

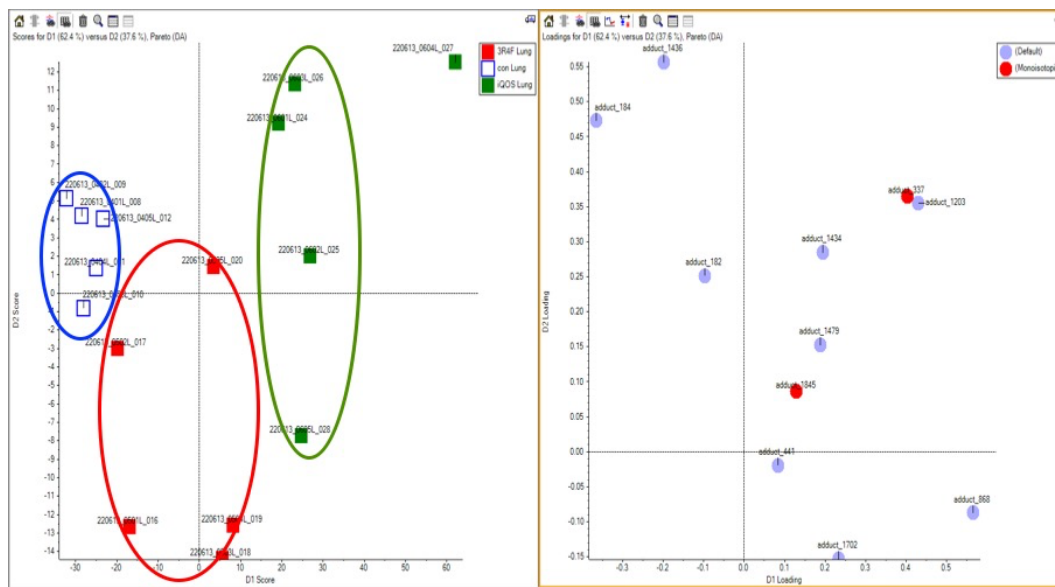


図4 主成分解析における iQOS 曝露群の特徴的なアダクト

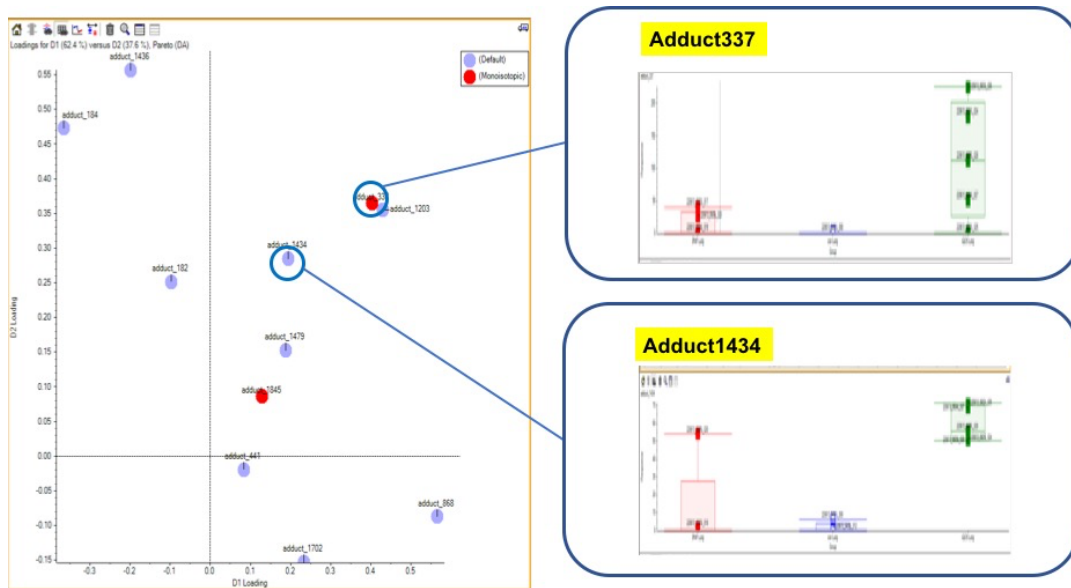
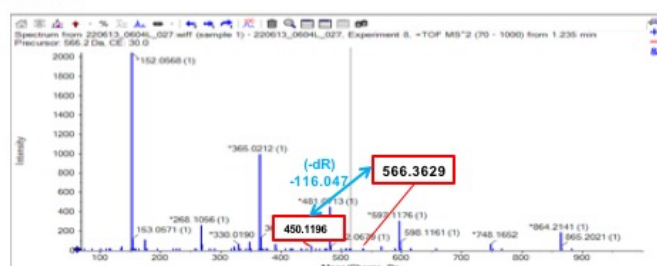
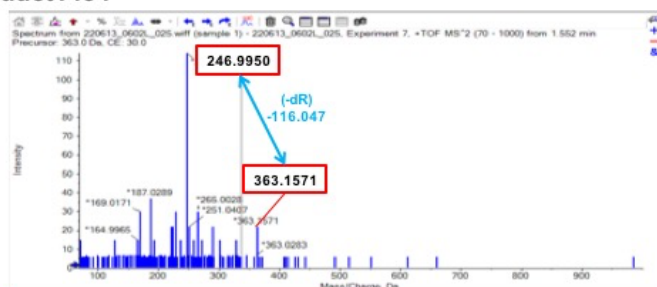


図5 付加体337および1434のフラグメンテーション解析

Adduct337



Adduct1434



令和 5 年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

3歳児健康診査を活用した加熱式たばこによる家族の受動喫煙に関する調査票の作成

研究分担者 額額朋弥 岐阜大学医学部看護学科
大澤絵里 国立保健医療科学院 公衆衛生政策研究部

研究要旨

本研究では、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、地域特性が異なる自治体で実施する 3 歳児健康診査を活用し、喫煙歴、喫煙者のたばこ製品、喫煙場所、喫煙に対する認識、住環境、車の保有状況等について Web アンケート調査を実施し、受動喫煙者のバイオマーカーの分析結果との関連性を検討する。初年度である今年度は自治体をリクルートし説明を行うことに加え本調査で使用するアンケート調査票の作成を行った。

本調査でリクルートした 3 自治体は人口 8.5 万人、3.5 万人、11 万人の市であり、住環境、世帯構成、喫煙率等が異なる地域である。先行研究において、加熱式たばこの受動喫煙が生じる要因は、喫煙者が受動喫煙者の近くで喫煙することにあるとの仮説を立てた[1]。そこで、喫煙者の喫煙場所、加熱式たばこの使用による周囲に対する健康影響への認識、住環境、車の保有等の項目を含め調査票を作成した。

我が国では、改正健康増進法により受動喫煙対策が強化された。しかし、家庭での受動喫煙防止への取り組みは十分とは言えない。現在、子育て世代である 20～30 歳代の男性の加熱式たばこの使用率は 50%を超える[2]。子どもが最も長い時間を過ごす家庭での受動喫煙防止は重要な課題である。本調査では特に子どもが受動喫煙を受けやすい家庭での受動喫煙曝露の実態を把握できるよう配慮した。

A. 研究目的

本研究は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、3 歳児健康診査を活用し健康診査対象児とその家族を対象にアンケート調査を実施する。今年度は加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価するための調査票の作成を行う。

B. 研究方法

今年度の研究として 3 歳児健康診査対象児の家族に実施する父母別々の調査票を 2 種類作成した。

喫煙者は喫煙状況から「紙巻きたばこ使用者」、「加熱式たばこ使用者」、「紙巻きたばこと加熱式たばこ併用者」、「非喫煙者」の 4 群に分類し、基

本属性、喫煙状況・喫煙行動、加熱式たばこに関する認識、加熱式たばこ使用者の加熱式たばこを使用する理由、喫煙者のたばこ製品と受動喫煙の状況を比較し検討する。最終的にアンケート調査とバイオマーカー分析結果を組み合わせた健康影響評価を行う。

C. 研究結果及び考察

各調査対象者用に作成した 2 種類の調査票は、資料 1-1：3 歳児健康診査対象児の母親用
資料 1-2：3 歳児健康診査対象児の父親用として添付した。

調査項目は以下のとおりである。

- (1) 基本属性：年齢・子どもの数、最終学歴、家族構成、自家用車の保有の有無、住環境。

特に住環境については、持ち家か賃貸・社宅などの違いは喫煙場所や喫煙行動に影響するのではないかと考えた。

なお、父母に共通する子どもの数、家族構成、住環境については母親のみの調査項目とした。

(2) 身体状況：身長、体重、BMI

(3) 生活習慣：

①食生活：主食、主菜、副菜の揃う頻度、揚げ物の頻度。たばこの曝露マーカーは、揚げ物の摂取によって変動することから調査項目に入れた。

②運動：1日30分以上の運動の頻度

③睡眠：1日の平均睡眠時間

(4) 喫煙状況・喫煙行動：喫煙歴、現在の喫煙状況、①喫煙者：喫煙本数、使用銘柄、喫煙開始年齢、喫煙場所、禁煙意思、ニコチン依存度
②過去喫煙者：使用銘柄、喫煙本数、禁煙した時期、禁煙理由

(5) 加熱式たばこに関する認識：「日本における社会と新型タバコに関するインターネット調査研究プロジェクト（以下、「JASTIS研究」[3]」で使用された項目を採用した。

(6) 加熱式たばこ使用者：加熱式たばこを使用した理由。理由の内容についてはJASTIS研究で使用された10項目を採用した。

(7) 受動喫煙者：ここ1ヶ月間の受動喫煙の機会の有無と場所、頻度、家庭での喫煙ルール、自家用車内での喫煙状況、職場での喫煙ルール

(8) 子育てについて：①ゆったりした気持ちで子育てが行えているか、②子どもに対し育てにくさを感じるか、③子育てに困ったときに相談したり協力をお願いできる相手の有無の3項目とした。

(9) 子どもの健康状況について：気管支喘息の有無。先行研究において、子どもの喘息の罹患には受動喫煙が関連していることが報告されており、調査項目に採用した[4]。

本調査は、人口構成、家族構成、住環境等の地域特性が異なる3自治体で調査を行う。地域

特性は喫煙状況や喫煙行動に影響を及ぼすことが考えられ地域の特性を考慮した調査票を作成することができたと考える。

回答者が設問の内容を正しく把握し解答できるように検討を重ね調査票を作成することができた。

[引用文献]

[1] 稲葉洋平 他. 新規加熱式たばこの副流煙分析. 令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業） 分担研究報告書.

[2] 厚生労働省：国民健康・栄養調査（令和元年）.2019<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000687163.pdf>.

[3] Odani Satomi, Tabuchi Takahiro Environmental Health and Preventive Medicine 29 (0), 11-11, 2024.

[4] Burke H, Leonardi-Bee J, Hashim A, et al. Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze; systematic review and meta-analysis. Pediatrics 2012;129:735-44.

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

喫煙者への調査体制の確立について

研究分担者 松尾洋孝・中山昌喜 防衛医科大学校

研究要旨

喫煙により生じる煙には、多くの有害化学物質が含まれている。しかし従来の「紙巻たばこ」に加え、近年発売され広まってきた「加熱式たばこ」について、実際に日本人喫煙者が加熱式たばこによりどの程度有害化学物質に曝露されているのかの研究はあまりなされていないのが現状である。本研究では、健康診断受検者を対象に、紙巻たばこと加熱式たばこを区別して、その有害化学物質への曝露の程度について検討を行うものである。

本研究の対象者として、職域の健康診断受検者を計画中である。研究体制について調整を行い、倫理審査を準備中である。本研究では、尿中に含まれる揮発性有機化合物代謝物 (Volatile Organic Compounds: VOC 代謝物) を中心に、曝露・炎症・影響マーカーを分析する予定である。

本研究により、紙巻たばこおよび加熱式たばこを区別した、より適切な喫煙のバイオマーカーが明らかになるとともに、その健康への影響についての検討が進むことが期待できる。

A. 研究目的

喫煙により生じる煙には、多くの有害化学物質が含まれている[1]。従来の「紙巻たばこ」に加え、近年発売され広まってきた「加熱式たばこ」は、加工されたたばこ葉を加熱することによって得られる煙 (エアロゾル) を吸引するたばこ製品である。燃焼させないことから、紙巻たばこに比較して臭いや有害化学物質の発生は少ないとされており、日本でも若年者を中心とした喫煙が認められる。しかし、実際に日本人喫煙者が加熱式たばこによりどの程度有害化学物質に曝露されているのかの研究はあまりなされていないのが現状である。

これまで分担研究者は、健康診断受検者を対象に、健康管理指標となるような物質やデータについての探索を行ってきた。

本研究では、健康診断受検者を対象に、紙巻

たばこと加熱式たばこを区別して、その有害化学物質への曝露の程度について検討を行うものである。

B. 研究方法

(1) 対象者

本研究の対象者は、職域の健康診断受検者である日本人集団である。すでに所属組織における倫理申請は承認済みである。

(2) 尿検体の収集および尿中代謝物の分析

対象者から尿検体を収取する体制はすでに確立済みである。

また、尿中に含まれる揮発性有機化合物代謝物 (Volatile Organic Compounds: VOC 代謝物) を含む尿中代謝物を中心に、曝露・炎症・影響マーカーを分析する予定であり、主な対象となる

VOC 代謝物は、図 1 に示した通りである。これらはいずれも小規模な集団におけるマーカーとしての検討はなされているものの、中規模以上の集団では検討はなされていない。

(3) 臨床情報の収集

臨床情報データ収集項目の検討のために、当該職域の職員に最適化できるよう喫煙関連情報を含めた臨床情報データを収集中である(表)。この検討を基に、紙巻たばこおよび加熱式たばこの喫煙状況について、対象者から適切な臨床情報を収集し、健康診断の結果との関連解析を行う。

C. 研究結果及び考察

職域の健康診断時における喫煙者の集団からの尿検体の供与体制について、また臨床情報について、検討および調整を行った。

これとは別に、尿試料に含まれるマーカー物質の一日排泄量の推定に関する成果を現在取りまとめ中であり、本年度、あるいは次年度中における論文報告ができるよう調整中である。この推定方法が確立できれば、多数の尿検体における疫学研究の一助となることが期待できる。

D. 結論

本研究は、紙巻たばこおよび加熱式たばこを区別して、尿中代謝物及び健康診断などの臨床情報を持つ日本人集団での解析を予定している。本研究により、紙巻たばこおよび加熱式たばこを区別した、より適切な喫煙のバイオマーカーが明らかになるとともに、その健康への影響についての検討が進むことが期待できる。

[引用文献]

[1] IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking.

IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 83: 1-1438, 2004.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

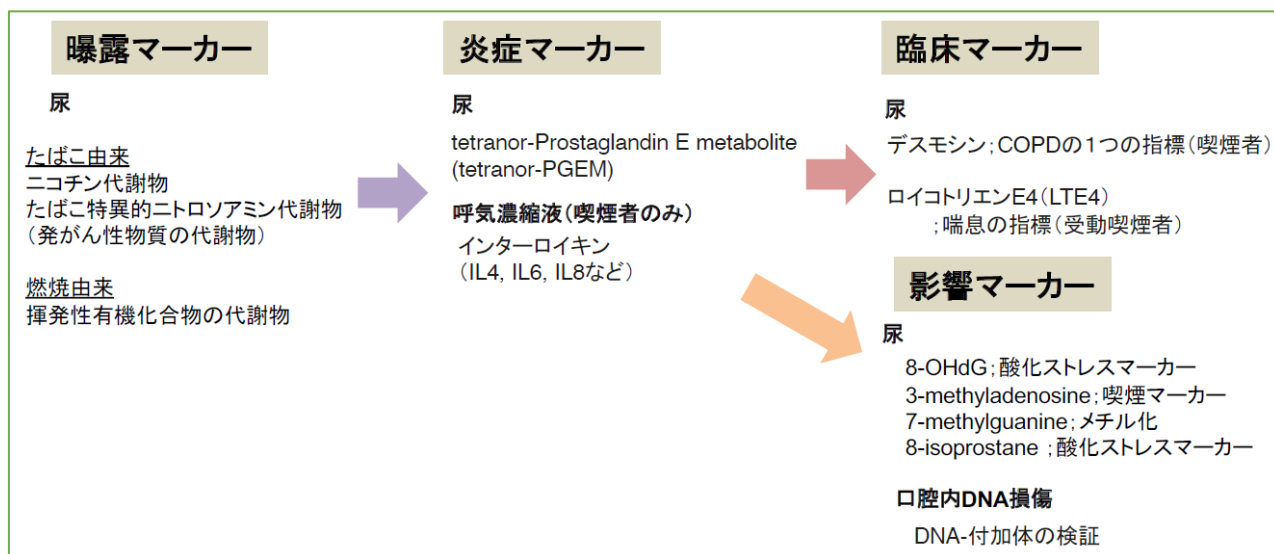


図 本研究における分析対象である揮発性有機化合物代謝物等

表 健康診断受検者を対象に収集する臨床情報の例

- Q. 1 紙巻きタバコを吸っていますか？
 - Q. 2 紙巻きタバコの現在（もしくは禁煙前）の1日の平均使用量はどのくらいですか？
 - Q. 3 紙巻きタバコのこれまでの延べ使用期間（中断期間を除く）はどのくらいですか？
 - Q. 4 加熱式タバコ（アイコス、プルーム・テック、グローなど）を吸っていますか？
 - Q. 5 加熱式タバコの現在（もしくは禁煙前）の1日の平均使用量はどのくらいですか？
 - Q. 6 加熱式タバコのこれまでの延べ使用期間（中断期間を除く）はどのくらいですか？
 - Q. 7 紙巻きタバコを禁煙することにどれくらい関心がありますか？
 - Q. 8 加熱式タバコを禁煙することにどれくらい関心がありますか？
-

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出 版地	出版年	ページ
稲葉洋平	タバコ製品について知る	日本禁煙学会	はじめよう!薬剤師のための禁煙支援ガイド	南山堂	日本	2023	28-41

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, Totsuka Y, Wanibuchi H.	Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis	Biomolecules	14	36	2024

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立保健医療科学院
所属研究機関長 職 名 院長
氏 名 曾根 智史

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業
2. 研究課題名 曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 生活環境研究部・上席主任研究官
(氏名・フリガナ) 稲葉 洋平・イナバ ヨウヘイ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長） 殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立保健医療科学院
所属研究機関長 職 名 院長
氏 名 曾根 智史

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業
2. 研究課題名 曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究
3. 研究者名 （所属部署・職名） 生活環境研究部・部長
（氏名・フリガナ） 牛山 明・ウシヤマ アキラ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長） 殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立保健医療科学院
所属研究機関長 職 名 院長
氏 名 曾根 智史

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業
2. 研究課題名 曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究
3. 研究者名 （所属部署・職名） 公衆衛生政策研究部・上席主任研究官
（氏名・フリガナ） 大澤 絵里・オオサワ エリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東海国立大学機構

所属研究機関長 職 名 機構長

氏 名 松尾 清一

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業
2. 研究課題名 曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 岐阜大学医学部・教授
(氏名・フリガナ) 瀬戸 朋弥・コウケツ トモミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

代表機関での倫理審査申請の準備中のため

- (※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
- (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

- (留意事項)
- ・該当する□にチェックを入れること。
- ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 日本大学薬学部
所属研究機関長 職 名 学部長
氏 名 榎葉 繁紀

次の職員の（令和）5 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業
2. 研究課題名 曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 日本大学薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 戸塚ゆ加里・トツカユカリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	日本大学薬学部動物実験委員会	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 防衛医科大学校
所属研究機関長 職 名 学校長
氏 名 福島 功二

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業
2. 研究課題名 曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 分子生体制御学講座 教授
(氏名・フリガナ) 松尾 洋孝 (マツオ ヒロタカ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	防衛医科大学校	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	防衛医科大学校	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 防衛医科大学校
所属研究機関長 職 名 学校長
氏 名 福島 功二

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業
2. 研究課題名 曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価するための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 分子生体制御学講座 准教授
(氏名・フリガナ) 中山 昌喜 (ナカヤマ アキヨシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	防衛医科大学校	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	防衛医科大学校	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。