

厚生労働行政推進調査事業費補助金

加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と受動喫煙による健康
影響の研究

(21FA2001)

令和3年度～令和5年度

総合研究報告書

研究代表者 稲葉 洋平

令和6（2024）年 5月

目 次

I. 総合研究報告

- 加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と受動喫煙による健康影響の
評価手法の開発
稲葉洋平

II. 総合分担研究報告

1. 加熱式たばこ主流煙分析法の確立と国際標準化及びたばこ銘柄への適用
(加熱式たばこ、電子たばこ、紙巻たばこ用加熱装置)
稲葉洋平、高橋秀人、中田光紀、牛山明、内山茂久、若井美樹、須藤江里子
2. たばこ製品から発生する有害成分と室内の汚染に関する研究
戸次加奈江
3. 加熱式たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の分析
鳥羽陽
4. 紙巻たばこの加熱式喫煙における主流煙中の水銀に関する研究
杉田和俊
5. 加熱式たばこの副流煙分析および受動喫煙環境下のシミュレーション評価
李 時桓
6. 加熱式たばこエアロゾルが生体に及ぼす影響に関する実験的検討
牛山明、中館和彦
7. 加熱式たばこの曝露試験より得られたマウスの諸臓器に対する分子病理学的解析
煙山紀子、美谷島克宏、中江大
8. 加熱式たばこの *in vivo* 遺伝毒性評価
戸塚ゆ加里

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

令和3～5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)
総合総括研究報告書

加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と受動喫煙による健康影響の研究

研究代表者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

研究要旨

健康増進法(改正)において、国は受動喫煙の防止に関する施策の策定に必要な調査研究を推進するように努めることとされている。加熱式たばこについては、紙巻たばこと比較して販売からの歴史が浅いことから、現時点の科学的知見では、加熱式たばこの受動喫煙による将来的な健康影響をまだ分かっていないことも多いため更なる科学的根拠の蓄積が必要とされている。これまでに研究班では、紙巻たばこで蓄積した成分分析の技術的知識をもとに新たな技術を開発してきており、WHO たばこ研究室ネットワークで国際標準化された分析法の開発を行ってきた(WHO TobLabNet SOP 8 and 9)。さらに、「加熱式たばこ副流煙の分析法を開発し、成分分析を一部実施」している。本研究では、これらの研究成果(分析法、実験装置)を基盤として、加熱式たばこ等の新たなたばこ製品について、①主流煙および環境たばこ煙の成分分析および評価、②動物実験を基盤として曝露マーカー、毒性試験、③副流煙の室内でのシミュレーションと実験環境下での実測などから受動喫煙による健康影響を研究、④加熱式たばこおよび新たなたばこ製品についての評価手法を検討、⑤本研究によって開発された健康影響の評価手法に従って、加熱式たばこなど新たなたばこ製品の評価を実施し、受動喫煙防止のための施策に活用することを目的としている。

3年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析を行った。分析法を確立し、新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量が上昇していることが確認された。また、加熱式たばこと紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要がある。曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。電子たばこにおいても出力、電子たばこリキッドのグリセロールの配合率によってカルボニル化合物の発生量が異なることなども解明された。加熱式たばこの受動喫煙の健康影響を評価するために、加熱式たばこ副流煙の分析を行った。この結果をもとに喫煙者のシミュレーションを行なったところ、副流煙よりも呼出煙の影響が大きいことが評価された。

加熱式たばこばく露による生体への影響を定量的に決定するためには、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要である。そのため本研究では、in vivo 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発した。そして開発したばく露装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を検討・評価を行った。加熱式たばこばく露は、一部の指標において、生体影響と考えられる変化をもたらしたが、本研究ではばく露期間の制約もあるため健康影響を検索するためには、さらに長期間のばく露・高用量のばく露などの条件による研究が必要であると考えられた。

研究分担者	所属施設名
高橋 秀人	帝京平成大学
牛山 明	国立保健医療科学院
戸次加奈江	国立保健医療科学院
煙山 紀子	東京農業大学 (2, 3 年度)
杉田和俊	麻布大学
中舘 和彦	明治薬科大学
李 時桓	名古屋大学
鳥羽 陽	長崎大学
中田 光紀	国際医療福祉大学
戸塚 ゆ加里	日本大学
中江 大	帝京平成大学 (初年度)

研究協力者	所属施設名
内山 茂久	国立保健医療科学院
小井川 奈々	千葉大学
斎藤みのり	千葉大学
美谷島 克宏	東京農業大学
中江 大	帝京平成大学
小宮 雅美	国立がん研究センター研究所
服部 研之	明治薬科大学
須藤 江里子	明治薬科大学
若井 美樹	明治薬科大学

A. 研究背景と目的

健康増進法（改正）において、国は受動喫煙の防止に関する施策の策定に必要な調査研究を推進するように努めることとされている。加熱式たばこについては、紙巻たばこと比較して販売からの歴史が浅いことから、現時点の科学的知見では、加熱式たばこの受動喫煙による将来的な健康影響をまだ分かってないことも多く、更なる科学的根拠の蓄積が必要とされている。

研究代表者が所属する国立保健医療科学院は、

紙巻たばこで蓄積した成分分析の技術的知識をもとに新たな技術を開発してきており、2014年にはWHO-CC 指定協力研究センターに認定され、さらに、WHO-TobLabNet(たばこ研究室ネットワーク)に参画し、常に新しい技術開発に関する情報交換・国際標準化された分析法の開発を行ってきた(WHO TobLabNet SOP 8 and 9)。また、「国際標準化された分析法を使用して、日本国内で販売されている加熱式たばこ製品群の成分分析を行い、学術論文においても発表」している(JUOEH. 2017; 39: 201-07, Chem. Res. Toxicol. 2018, 31, 7, 585-593, Chem. Res. Toxicol. 2020, 33, 2, 576-583)。これまでには、「加熱式たばこ副流煙の分析法を開発し、成分分析を一部実施」している(H30-R3 厚生労働行政推進調査事業費補助金)。また、AMED 研究等で、加熱式たばこ喫煙者、加熱式たばこ受動喫煙者の曝露成分の分析法の開発、実態調査を行い、加熱式たばこの家族においてニコチン代謝物、たばこ特異的な発がん性物質を確認した。さらに、動物曝露用の加熱式たばこ喫煙装置の開発を行い、その曝露量を分析し、現在は論文が公開されている。

本研究では、これらの研究成果(分析法、実験装置)を基盤として、加熱式たばこ等の新たなたばこ製品について、①主流煙および環境たばこ煙の成分分析および評価を行う。また、②動物実験を基盤として曝露マーカー、毒性試験、副流煙の室内でのシミュレーションと実験環境下での実測などから受動喫煙による健康影響を研究し、加熱式たばこおよび新たなたばこ製品についての評価手法を検討する。③本研究によって開発された健康影響の評価手法に従って、加熱式たばこなど新たなたばこ製品の評価を実施し、受動喫煙防止のための施策に活用する(総合評価)。また、新たなたばこ製品は、今後も新製品が継続的に開発、

販売されていくことが見込まれるため、最新の市場状況を反映した本研究の科学的知見の蓄積を生かしてたばこ対策の政策立案を行うことを目的としている。

①「成分分析」に関して、これまでの研究を継続し、WHO-TobLabNet 連携し、加熱式たばこの成分分析法の国際標準化を行う。加熱式たばこ製品の主流煙・副流煙分析は、毎年、市場から新たな製品や加熱装置等が投入されており、これらについて成分分析をすすめる。

②「受動喫煙の健康影響評価」に関しては、動物曝露用の加熱式たばこ喫煙装置を使用して、加熱式たばこの毒性実験を行う。亜急性曝露・中期的な曝露からの呼吸器を中心としてその他の臓器への影響を評価する。副流煙・呼出煙（主流煙の30%と報告）の分析値をもとに、加熱式たばこ喫煙室での副流煙・呼出煙の対流から加熱式たばこ専用室の条件で開口部の煙の流出量と専用室で飲食する非喫煙者の曝露量シミュレーション（曝露のリスク評価）を行う。

③上記①、②より、経年的に情報を蓄積し評価するとともに、主として最終年度に加熱式たばこの健康影響評価を行う。加熱式たばこ喫煙者に関しては、確立した喫煙法をもとに、主流煙の成分分析を実施して、リスク評価を行う。実験室において、部屋の大きさ、換気状態、喫煙本数等一定の条件下において、環境たばこ煙の捕集・分析を行い、シミュレーションの妥当性を検証する。なお、加熱式たばこ互換機、紙巻たばこを加熱式たばこの様に加熱する装置についても、必要に応じて成分分析や健康影響の評価等を行っていく。

B. 3年間の研究成果

1. 加熱式たばこ主流煙分析法の確立と国際標準化及びたばこ銘柄への適用

（加熱式たばこ、電子たばこ、紙巻たばこ用加熱装置）

本研究では3年間の研究期間で、加熱式たばこの成分分析法の確立を行い加熱式たばこ銘柄への適用を目的とした。更に、確立した分析法を電子たばこ、最近 EC サイトで販売されている「紙巻たばこ加熱装置」に着目し分析も目的とした。本研究班の分析は、我々が参加している WHO たばこ研究室ネットワーク (TobLabNet) と作成を進めてきた「WHO TobLabNet 標準作業手順書」を基盤として分析を行なっている。

3年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析法の確立を行った。新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量は加熱式たばこが販売開始された 2014 年と比較すると上昇していることが確認された。また、加熱式たばこと紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。電子たばこは、有害性が低いたばこ製品として報告されることもある。しかし、喫煙条件によってはホルムアルデヒドをはじめとするカルボニル化合物、連続使用による一酸化炭素の発生なども確認された。電子たばこ製品は、製品に対する規制もなく、出力と電子たばこリキッドの組合せによって、条件によっては喫煙者が想定していない有害化学物質の曝露量になっていた。また、紙巻たばこ加熱装置の調査では、電子たばこと同様に装置によっては、加熱式たばこ以上、紙巻たばこに匹敵する有害化学物質も確認された。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要

がある。

2. たばこ製品から発生する有害成分と室内の汚染に関する研究

近年、国内で幅広く使用される加熱式たばこは、フレーバーなどの添加物を使用した多種多様な銘柄が販売され、主流煙中の成分においても従来の紙巻たばことは異なる特徴が報告されている。これらは、加熱式たばこの副流煙や喫煙者の呼気を介して環境中へ放散され、室内汚染を引き起こす可能性も懸念されている。そこで本研究では、はじめに、これまで主流煙中からの検出が報告され有害性が指摘されているフラン類とピリジン類 1) を対象に副流煙中の濃度を調べることにした。また、たばこ煙中での有害性が懸念される他の成分として、燃焼を主な発生源とするイソシアネートやメチルイソシアネートなどのイソシアネート化合物は、刺激性や感作性が強く、アレルギー性疾患や神経系への影響を及ぼすことが報告されている。そこで本研究では、国内で販売される新型たばこを対象に、副流煙中の有害成分の含有量を明らかにすると共に、主流煙からのイソシアネートの発生量及び室内の環境調査を行うことで、たばこ製品から発生する有害成分と室内汚染の影響を調べることにした。本研究結果より、新型たばこから発生するイソシアネートは、加熱温度により発生量の変動するものの、銘柄間での組成の違いは殆ど無いことが確認された。一方で、加熱及び燃焼温度の上昇に伴い分子量の大きなイソシアネートの発生量が増加する傾向にあり、検出されたイソシアネートのうち、特に、紙巻たばこを使用する住宅では、ICA の他、MIC が比較的多く検出される傾向にあった。このような特徴は、イソシアネートの室内濃度にも影響していることが、室内環境調査の結果から明らかとされ、紙

巻たばこを使用する住宅では、ICA と MIC いずれも I/O 比が高値を示す傾向にあった。そのため、イソシアネートが受動喫煙の健康リスク因子の一つとなる可能性も示唆された。

3. 加熱式たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の分析

活性酸素種 (ROS) を生成し、酸化ストレスを引き起こす多環芳香族炭化水素キノン類 (PAHQ) を測定対象とし、加熱式たばこ 6 種及び電子たばこ 3 種の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類 (PAHQ) を同定・定量し、紙巻たばこと比較することを目的とした。各主流煙について、自動喫煙装置を用いてフィルターに捕集し、ジクロロメタンで抽出した後、PAHQ を還元・トリメチルシリル (TMS) 誘導体化してガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計 (GC-MS/MS) で測定した。加熱式たばこ及び紙巻たばこ主流煙中から最も多くて 21 種類の PAHQ を定量し、電子たばこからは 27~29 種類を定量できた。いずれのたばこにおいても 1~3 環 PAHQ が生成しやすく、検出種と組成はたばこ間で類似していた。加熱式たばこ主流煙中の PAHQ 濃度は、全ての加熱式たばこ製品で紙巻たばこの 3% 以下であり、主流煙における PAHQ の生成には、燃焼・加熱温度が深く関与していた。電子たばこでは連続使用による使用回数の増加に伴い PAHQ 濃度が上昇しており、使用方法によっては紙巻たばこと同程度、あるいはそれを超える PAHQ を吸入する可能性が示唆された。

4. 紙巻たばこの加熱式喫煙における主流煙中の水銀に関する研究

近年、加熱式たばこは若い世代を中心に使用され、JT 等の専用加熱式たばこの他に、紙巻たばこ

を加熱して喫煙するデバイスも販売されており、喫煙形態が大きく変化している。また、加熱式たばこは販売されてから 10 年程度の歴史しかないことに加え、フレーバー等の蒸気を加えたものなど多様な形態があり、人への健康影響が不明な点も多い。そこで、本研究では、たばこに含まれる水銀等の金属の挙動に関する研究の一環として、加熱式として喫煙できる喫煙デバイスで標準たばこ（3R4F Research cigarettes, University of Kentucky）を電気炉で加熱し発生する水銀の測定、及び静電捕集によるその他の重金属と水銀の同時捕集を検討した。

その結果、水銀は 100°C 以上で温度の上昇に従って発生量が増加することが分かった。また、デバイス（加熱装置）の温度制御の劣化による発生量のばらつきが示唆された。静電捕集を用いた金属と水銀の同時測定では水銀の捕集は静電捕集装置に影響されないことが分かった。また、静電捕集された金属類は通常の紙巻たばことして発生する量よりも加熱式喫煙の方が低いことが分かった。しかし、静電捕集を用いた同時捕集については、測定精度を向上させ、測定できる元素数を増やす必要がある。

5. 加熱式たばこの副流煙分析および受動喫煙環境下のシミュレーション評価

喫煙によって発生するたばこの煙は、主流煙と副流煙の両方の発がん物質として定義され、人の健康への危険性が広く認識されている。したがって、喫煙室などの屋内空間では、喫煙によって発生する汚染物質を効率的に除去するための換気設計が必要である。最近では、加熱式たばこ（紙巻き状の非燃焼加熱式たばこ）は従来の紙巻式たばこより発生する副流煙が少ないため、加熱式たばこ専用の室内喫煙エリアも設置されている。し

かし、加熱式たばこによる健康への危険性はまだ明らかになっておらず、室内環境における受動喫煙による有害性及びその健康影響については明確な検討事例が少ない。第 1 章では、喫煙時の加熱式たばこ呼吸特性と汚染物質の発生を実測により定量的に分析し、呼吸特性を適用した解析モデルを提案することで化学種物質の挙動特性を明らかにし、それらの結果をもとに第 2 章では、非定常計算用の数値解析モデルを構築し、構築した数値解析モデルを用いて受動喫煙防止のために喫煙者と受動喫煙者の離れた距離による有害物質の摂取量について定量的に検討した。第 3 章では実測によるエアバリア最適風速の検証と第 1, 2 章の結果をもとに数値モデルと飲食店舗モデルを構築し、受動喫煙防止のためのエアバリア型テーブルの提案・検討を行った。

6. 加熱式たばこエアロゾルが生体に及ぼす影響に関する実験的検討

加熱式たばこの普及による健康リスクを推定するために生物学的研究は必須である。しかしながら、加熱式たばこはこれまでの燃焼式たばこは煙の発生機序が異なるため、従来のばく露装置をそのまま使用することは困難であり、仮に使用したとしてもそこから導かれる結果には大きな不確実性が伴うことが懸念される。加熱式たばこばく露による生体への影響を定量的に決定するためには、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要であるが、in vivo 実験用の標準化された加熱式たばこエアロゾルばく露装置はない。そのため本研究では、in vivo 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発し、開発した装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチ

ンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を検討した。また、開発した装置を用いて IQOS エアロゾルをばく露したマウスの生理学的応答および組織学的影響を検討することを目的とした。我々は同装置を用いて、マウスに IQOS のエアロゾルばく露を行い、健康影響アウトカム解析を試みた。初年度は短期ばく露（1日5本で最大4日程度）のばく露をおこなって、肺胞マクロファージの泡沫化や還元型グルタチオン（GSH）が減少することを示した。また、研究の途上でばく露時の拘束ストレスの影響が懸念されたため、拘束しないばく露方法を検討した。拘束しないばく露方法を用いて最終年度までに1）血中の炎症性サイトカイン濃度への影響、2）テレメトリー法による心拍への影響、3）病理組織解析の3つの研究を最大4週間までの連続ばく露を行ったマウスで解析を実施した。

加熱式たばこばく露は、一部の指標において、生体影響と考えられる変化をもたらしたが、本研究ではばく露期間の制約もあるため健康影響を検索するためには、さらに長期間のばく露・高用量のばく露などの条件による研究が必要であると考えられた。

7. 加熱式たばこの曝露試験より得られたマウスの諸臓器に対する分子病理学的解析

本分担研究は、本研究の別の分担研究者である国立保健医療科学院の牛山らにより開発された主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する加熱式たばこ喫煙装置を使用して、加熱式たばこの毒性病理学的影響について解析した。本分担研究は、牛山らにより実施された、雄性 *gpt delta* マウスに、噴霧により曝露した動物実験から供給を受けた材料を用い、病理組織学的解析および組織中遺伝子発現解析を行った。タバコ喫煙装置は、

1ポートから4ポートへ改良され、一度に多くのマウスへの曝露が可能となった。さらに拘束条件から非拘束条件で5匹同時に曝露できるまで改良を重ねた。その結果、拘束条件下では体重減少と胸腺の萎縮が観察され、IQOS 曝露による免疫学的な影響が疑われたが、拘束ストレスの影響も示唆された。非拘束下においては、病理組織学的に胸腺では Air 群・IQOS 曝露群間で明らかな差はなく、曝露条件の改善によるものと考えられた。その他組織学的な変化は明らかでなかったものの、肺・腎臓などの遺伝子発現解析では、IQOS 曝露群において一部の炎症関連遺伝子並びに酸化ストレス関連因子発現に変動が認められた。このことから、本実験系では、IQOS 曝露による臓器障害を示唆する組織学的な変化は見られなかったものの、病態形成以前の段階において遺伝子発現への影響が見出された可能性があるものと考えられた。

8. 加熱式たばこの *in vivo* 遺伝毒性評価

gpt delta マウスおよび C57BL/6J マウスを用いて、IQOS 主流煙捕集液の反復気管内投与による肺を対象とした *in vivo* 遺伝毒性について検討した。研究代表者（稲葉）らが開発した方法で加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを PBS に捕集した液を、*gpt delta* マウスおよび C57BL/6J マウスに、1匹あたり 100 μ Lx 40回の気管内投与を行なったのち、屠殺解剖を行なった。摘出した *gpt delta* マウス肺より抽出した gDNA の *gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、Control 群と比べて紙巻きたばこ（3R4F）群、IQOS 群の変異頻度はそれぞれ 1.3 倍、2.0 倍と上昇傾向にあった。変異スペクトルの解析を行なったところ、control と比較して 3R4F および IQOS 曝露群に共通して A:T \rightarrow C:G、G:C \rightarrow T:A 変異が増加した。さ

らに、IQOS 曝露群では G:C→C:G 変異の増加も観察された。

C57BL/6J マウス肺より抽出した gDNA を用いて、気管内投与による DNA 付加体の網羅的解析を行なったところ、control 群と 3R4F 群、IQOS 群の 3 つにクラスターリングができた。IQOS のクラスターリングに寄与する付加体を見出した。さらに、研究代表者（稲葉）らが開発した加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する装置を用い、雄性 *gpt delta* マウスに対して、中期曝露（4 週間）の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性についてインビトロパッケージング法により評価した。1 度目の曝露実験は IQOS を 1 回 5 本で 1 日に 1 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 IQOS 100 本相当）。この時に使用した曝露方法は *gpt delta* マウスを夏目製作所から購入した筒状フォルダー内に固定（拘束）し、4 分岐で曝露を実施し、最終曝露から 4 日目にマウスを解剖し、肺における変異原性の解析を *gpt assay* により検出した。コントロール動物は IQOS 曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定し、曝露装置を用いて空気のみを曝露をおこなった（Air-control 群）。その結果、Air-control 群、IQOS 群に検出された変異頻度は殆ど変わらないことがわかった。2 度目の曝露実験では、IQOS の本数を前回より増やし、1 回 10 本で 1 日に 2 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 IQOS 400 本相当）。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを扇形の 5 区画に分けて曝露した。コントロール動物は IQOS 曝露と同様にマウスを 5 区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のみを曝露をおこなった（Air-control 群）。その結果、有意差はつかないものの、IQOS 曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

C. 結論

3 年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析を行った。分析法を確立し、新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量が上昇していることが確認された。また、加熱式たばこと紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要がある。曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

加熱式たばこばく露による生体への影響を定量的に決定するためには、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要である。そのため本研究では、*in vivo* 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発し、開発した装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を検討・評価を行った。

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3～5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)
総合研究報告書

加熱式たばこ主流煙分析法の確立と国際標準化及びたばこ銘柄への適用
(加熱式たばこ、電子たばこ、紙巻たばこ用加熱装置)

分担研究者	稲葉 洋平	国立保健医療科学院
分担研究者	高橋 秀人	帝京平成大学
分担研究者	中田 光紀	国際医療福祉大学
分担研究者	牛山 明	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	若井 美樹	明治薬科大学
研究協力者	須藤 江里子	明治薬科大学

研究要旨

本研究では3年間の研究期間で、加熱式たばこの成分分析法の確立を行い加熱式たばこ銘柄への適用を目的とした。更に、確立した分析法を電子たばこ、最近 EC サイトで販売されている「紙巻たばこ加熱装置」に着目し分析も目的とした。本研究班の分析は、我々が参加している WHO たばこ研究室ネットワーク (TobLabNet) と作成を進めてきた「WHO TobLabNet 標準作業手順書」を基盤として分析を行なっている。

3年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析法の確立を行った。新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量は加熱式たばこが販売開始された2014年と比較すると上昇していることが確認された。また、加熱式たばこと紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。電子たばこは、有害性が低いたばこ製品として報告されることもある。しかし、喫煙条件によってはホルムアルデヒドをはじめとするカルボニル化合物、連続使用による一酸化炭素の発生なども確認された。電子たばこ製品は、製品に対する規制もなく、出力と電子たばこリキッドの組合せによって、条件によっては喫煙者が想定していない有害化学物質の曝露量になっていた。また、紙巻たばこ加熱装置の調査では、電子たばこと同様に装置によっては、加熱式たばこ以上、紙巻たばこに匹敵する有害化学物質も確認された。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要がある。

A. 研究目的

加熱式たばこは、2014年のiQOS(現IQOS)を販売開始後、日本人喫煙者に普及したたばこ製品である。加熱式たばこから発生するたばこ煙の発生原理は、たばこ葉を加工したスティックを携帯用

の加熱装置に差し込み、燃焼に至らない加熱温度(240から350℃)で加熱する。加熱式たばこスティックと加熱装置には、各たばこ産業に違いがあり、発生する有害化学物質にも違いが出ている。加熱式たばこの主流煙から発生する有害化学物質

は発生量が紙巻たばこと比較して 90%削減されている報告がされている。本研究では 3 年間の研究期間で、加熱式たばこの成分分析法の確立を行い加熱式たばこ銘柄への適用を行なった。更に、確立した分析法を電子たばこ、最近 EC サイトで販売されている「紙巻たばこ加熱装置」に着目し分析も行なった。本研究班の分析は、我々が参加している WHO たばこ研究室ネットワーク (TobLabNet) と作成を進めてきた「WHO TobLabNet 標準作業手順書」を基盤として分析を行なっている。TobLabNet とこの 3 年間の研究期間で標準作業手順書を 5 編公開した。これらの分析法は WHO のホームページで公開されている。

加熱式たばこの受動喫煙に関する研究として副流煙の分析を行なった。

以上、日本で販売される加熱式たばこ電子たばこ、紙巻たばこ加熱装置の分析を行うことを目的とし、さらに WHO TobLabNet との国際共同研究を行うことも目的とした。

B. 3 年間の研究成果

加熱式たばこ主流煙分析法の確立

芳香族アミン類

これまでに確立した紙巻たばこの主流煙芳香族アミン類の分析法を加熱式たばこに変更し、実態を調査することを目的とした。加熱式たばこ分析法は、1 試料あたりの加熱式たばこ捕集本数を 3 から 5 本に増やすことによって定量範囲で分析が可能になった。たばこ主流煙には、国際がん研究機関のグループ 1 (ヒトに対して発がん性のある) に該当する 4-アミノビフェニル、 α -トルイジン、2-ナフチルアミン等の芳香族アミン類が含まれている。現在、国内で販売される紙巻たばこ銘柄の報告は少ない状況であった。我々は芳香族アミンの対象物質を増やし、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS) を使用した分析法を確立し、国産たばこ銘柄に適用してきた。本研究では、

加熱式たばこ 7 製品の 29 銘柄について分析を行ったところ、芳香族アミン類は加熱式たばこの加熱温度が高くなると若干高い濃度となった。定量された芳香族アミン類は 20 成分中 19 成分が検出された。特に α -トルイジンが発がん性物質であり、最も含有されている芳香族アミンであった。それ以外にも、発がん性物質 2-ナフチルアミン、4-アミノビフェニルと有害性が懸念されている 2,6-ジメチルアニリンも含有されていた。加熱式たばこの芳香族アミン類は紙巻たばこと比較すると 1/10 であるが、必ず喫煙者は複数の芳香族アミン類に曝露されることから有害化学物質の複合曝露は継続されていることが確認された。

多環芳香族炭化水素類

我々の先行研究によるとガス状の有害化学物質であるホルアルデヒド、アセトアルデヒド、アクロレインなど発生量は低減しているものの多くの成分が加熱式たばこ主流煙から検出されていた。そこで粒子状の成分についても有害化学物質量は低減しているが、有害化学物質の数はそれほど低下をしていないのではないかと考えている。そこで本研究では、燃焼由来と考えられている多環芳香族炭化水素 (PAHs) の加熱式たばこに適用した主流煙捕集法を確立し、GC/MS/MS による一斉分析を行うことを目的とした。本研究では、PAH のガス成分を固体捕集にすることで、PAH のガス成分と粒子成分の計 29 成分の同時分析が可能となり、捕集から分析までの効率化を達成した。

紙巻たばこ 11 銘柄の主流煙を分析したところ、全ての銘柄に 2 環から 6 環までの PAH 計 29 成分を定量できた。加熱式たばこ 8 製品 6 銘柄の主流煙を分析したところ、IQOS3 (銘柄;REGULAR), IQOS ILUMA (TEREA), glo Hyper+ (KENT TRUE TOBACCO), PloomS 2.0 (REGULAR), PloomX (RICH) の 4 製品では PAH23 成分, glo hyper (KENT TRUE TOBACCO) は PAH24 成分を定量した。NOS (REGULAR) 及び THERMALOU (3R4F) は、デバイスによってはそれぞれ

れ PAH29 成分、PAH27 成分を定量できたものもあった。以上の結果から、加熱式たばこの喫煙においても発がん性が認められているベンゾ[a]ピレンの曝露は生じた。基本的に、主流煙の PAH 発生量は「温度」に依存している。本研究法で定量した PAH は、加熱や燃焼によるたばこ葉からの移行によるものと、燃焼によって発生するものの 2 通りが考えられる。紙巻たばこは、燃焼により発生した PAH 及び、たばこ葉から移行した PAH が主流煙で定量された。一方、加熱式たばこは、たばこ葉に含まれる PAH が加熱により主流煙に移行した可能性もある。また、加熱式たばこは、加熱原理、加熱温度、たばこ葉によって移行率が変動するため製品によって曝露量が異なった。NOS 及び THERMALOUIC の一部のデバイスでは、PAH 濃度が高値であることから、加熱温度が高温となり、PAH が発生した可能性も考えられる。今後は、たばこ葉に含まれる PAH 量を分析する必要があると考える。

アクリルアミド

アクリルアミドは食品中に含まれているあるアミノ酸と糖類が、揚げる、焼く、焙るなどの 120°C 以上での加熱により化学反応を起こすために発生すると考えられている。国際がん研究機関による発がん性の分類では、グループ 2A ヒトに対しておそらく発がん性があるとされている。アクリルアミドの発生条件から考えると加熱式たばこ製品においても紙巻たばこと同程度発生量が確認されると予測される。現段階で、たばこ主流煙のアクリルアミドの分析結果の報告事例が少なく、加熱式たばこ製品に限定すると先行研究は僅かである。そこで、アクリルアミドの分析方法を確立し、加熱式たばこ及び紙巻たばこの主流煙アクリルアミドの分析を行い、実態を明らかにすることを目的とした。

紙巻たばこは、国産たばこ 11 銘柄、海外産たばこ 10 銘柄、標準たばこ (3R4F)、加熱式たばこ 76 銘柄の計 98 銘柄を使用した。加熱式たばこの

加熱装置は、PloomX、PloomX ADVANCED、glo hyper+、glo hyper pro、IQOS3 duo、IQOS ILUMA の 6 製品を使用し、それぞれの装置に適応する加熱式たばこスティックについてアクリルアミド分析を行った。

アクリルアミドは 120°C 以上の温度帯で発生するため、すべての測定対象たばこ製品から定量された。本研究で調査を行なった紙巻たばこ主流煙アクリルアミド量の範囲は 3309-10971 ng/cig であった。加熱式たばこは、122-5783 ng/cig であった。加熱式たばこの下限値は 122 ng/cig と紙巻たばこと比較すると低かった。しかし 5219 ng/cig と紙巻たばこに匹敵する銘柄も確認された。多くの加熱式たばこ紙巻たばこを分析することによって、加熱式たばこ製品の開発の傾向、IQOS、glo、Ploom X を販売するたばこ産業の比較が出来た。PloomX と PloomX ADVANCED、glo hyper+ と glo hyper pro を比較すると最新型の加熱式たばこの方が分析値は高い傾向も確認された。さらに加熱式たばこの比較に使用されている標準紙巻たばこの分析結果だけでは、紙巻たばこの分析値を反映されている訳ではないということも確認された。加熱式たばこ、紙巻たばこ製品群における幅広い銘柄による比較も必要である。

加熱式たばこ銘柄の実態調査

加熱式たばこは 2014 年にフィリップモリス社から「IQOS」が販売され、それ以後も新たに加熱式たばこが販売されている。本研究では 2020 から 21 年にかけて新たに日本市場に投入された加熱式たばこ IQOS ILUMA (11 銘柄)、glo hyper+ (各 8 銘柄)、Ploom X (11 銘柄)、ARK X (6 銘柄) 及び li1 HYBRID (3 銘柄) の加熱式たばこ製品の有害化学物質のタール、ニコチン、一酸化炭素とたばこ特異的ニトロソアミン類のたばこ葉と主流煙の分析を行った。

たばこ葉のニコチン量は、1.25-6.12 mg/stick であり 5 倍程度の差があった。次に、たばこ特異

的ニトロソアミン類 (TSNAs) は、72.9-355 ng/stick であった。たばこ主流煙中のニコチン量は IQOS が Ploom X の 0.34 から glo hyper+ の 2.67 mg/stick となった。今回のニコチンの分析結果を確認すると加熱式たばこ製品ごとに 1 mg/stick に近い銘柄があり、紙巻たばこと同程度の濃度を保っていた。一酸化炭素 (CO) の定量は、lil hybrid は、定量下限値以下であった。それ以外の加熱式たばこから CO はたばこ葉の加熱によっても若干は発生するものの、濃度範囲は 0.11-0.44 mg/stick であった。燃焼によって発生する成分である CO は、加熱温度から考えても発生量は低いことが分かった。4 種類の TSNA 合算量は IQOS ILUMA と Ploom X から発生する 3.22-19.6 ng/stick と glo hyper+, lil HYBRID、ARK X から発生する 50.7-125 ng/stick の 2 群に分けられた。2020 年あたりから販売されている加熱式たばこは、Ploom TECH のような間接的にたばこ葉を加熱する製品は少なくなっており 200°C 以上加熱する製品が増えてきた (Ploom TECH は 2023 年に販売終了)。Ploom についても Ploom X は 290°C で加熱すると報告されている。日本の加熱式たばこ製品の傾向は、高温加熱帯で喫煙するために主流煙ニコチン量も 1 mg/stick に近くなっていることから、加熱式たばこの使用によって禁煙は難しいのではないかと考えられる。加熱式たばこ主流煙化学物質量は低減化されたものの、有害化学物質の種類は削減されていない加熱式たばこも存在することから、加熱式たばこの使用によって有害化学物質の複合曝露が生じると考えられた。

加熱式たばこ副流煙の分析

これまでに我々は加熱式たばこ副流煙の捕集法・分析法を開発してきた。今年度は、2020 年から 2021 年にかけて新たに投入された加熱式たばこ製品について副流煙の捕集を行いニコチン、メンソール、たばこ特異的ニトロソアミン (TSNAs) の分析を行った。また、先行研究で得られた結果

と比較して、副流煙の含有量が変化しているのか。検証を行った。副流煙を捕集した抽出液について、ニコチンの分析はガスクロマトグラフ水素炎イオン化検出器 (GC/FID) で行った。TSNAs の分析は高速液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) で分析を行った。分析対象の加熱式たばこ製品は IQOS ULUMA、glo Hyper+, Ploom X とした。

分析対象のすべての製品からはニコチン、TSNAs が定量されたことから、新規加熱式たばこ製品からも副流煙が発生することが分かった。IQOS ILUMA の総ニコチン量は 0.011 mg/stick となり、先行研究で報告した IQOS3 の 0.057 よりも低い値となった。一方で glo Hyper+ と Ploom X は先行研究で行った製品よりも上昇していた。次に TSNAs に関しては、IQOS ILUMA が低減したものの、glo Hyper+, Ploom X は上昇していた。今回のように加熱式たばこ製品の新たな製品から化学物質量が上昇することがあるために、たばこ製品の継続的なモニタリングはたばこ対策を行う上で必要であると考えられる。これまでの加熱式たばこの副流煙の有害化学物質量は紙巻たばこと比較すると低い値である。我々の研究から加熱式たばこの呼出煙によって受動喫煙が生じることが確認されているため、加熱式たばこであっても非喫煙者に配慮する必要がある。

電子たばこ主流煙の成分分析

電子たばこから発生する一酸化炭素とフェノール類の分析

我々の先行研究では、これまでに低出力の電子たばこ製品の連続使用による調査結果から、70W の電子たばこでは、一酸化炭素 (CO) が紙巻たばこよりも高値で 50 回目の喫煙時は、46.9 mg/回となった。28W の電子たばこは、50 回目の喫煙時は 3.90 mg/回となった。また、フェノール類に関してもヒドロキノン、レゾルシノール、3 種類のクレゾールなども検出された。

しかし、これら有害化学物質が発生する条件はまだ解明されていない。そこで本年度は、電子たばこリキッド（配合、香料の種類）を変更することによってCOの発生条件を調査した。これまでの研究ではグリセロール（VG）の配合率が高いリキッドでは発生量が高いと考えられていた。そこで、香料なしのリキッドを調整しCO分析を行ったが、検出されることはなかった。次に複数種類のPG/VG配合比率のリキッドに香料を添加したがCOは検出されなかった。最後に、市販のリキッドを分析したところ、PG/VGが25:75条件で香料がスイーツ系と呼ばれている糖度がある製品においてCO、フェノール類が定量された。CO量（mg/回）が40W出力の電子たばこは、2日目からCOの発生が生じ、最高12.5 mg/回まで上昇した。90W出力の電子たばこも2日目からCOの発生が生じ、最高35.5 mg/回まで上昇した。これらの結果は、我々の先行研究と同様の結果となった。次にフェノール類は、カテコールの発生量が多く、90Wの電子たばこでは、130,000 ng/回となった。本研究結果から、電子たばこのCO、フェノール類発生の要因は、VGの配合比率が高く、スイーツ味のように糖度がある電子リキッドの使用が考えられた。これは、VGと糖度の影響で、電熱コイルが劣化したためにCOなどが発生したと考えている。

電子たばこ、加熱式たばこ等の新型たばこから発生する熱分解物質

加熱式たばこや電子たばこなどの新型たばこから発生する化学物質の定性・定量を行った。また、アンダーセンサンプラーを用いてこれらの主流煙を分級捕集し、粒子状成分の粒径分布を測定し人への影響を検討した。電子たばこからはE-リキッド（グリセロール、プロピレングリコール）の熱分解物である有害なプロピレンオキサイド、グリシドール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アクロレイン、グリオキサ

ール、メチルグリオキサールが生成することが明らかになった。また、これらの熱分解物質は沸点の高いグリセロールから多く発生した。発生量は電力に大きく依存しバラツキも非常に大きい。発がん性物質の合算量で最大42000 μ g/10 s発生することもある。この量は、通常の紙巻たばこ（2400~3000）の10倍以上である。加熱式たばこの場合、発がん性物質の合算量は40~250 μ g/stickで紙巻たばこの10分の1程度であるがゼロではない。また、新型たばこから発生するエアロゾルの大半（92~95%）は2 μ m以下の微小粒子であった。2 μ m以下の微小粒子は直接肺胞まで達するので健康影響が懸念される。電子たばこのエアロゾル発生量は電力だけではなくE-リキッドの組成によっても異なる。例えば、総粒子状物質はPG 100%のE-リキッドから170 mg/10 s（150 W）発生したが、これはGLY 100%のE-リキッドからの50 mg/10 s（150 W）の3.4倍である。総粒子状物質の主成分はグリセロール、プロピレングリコールであるが、これらの物質の毒性は比較的低い。2 μ m以下の微小粒子なので大量に摂取すると危険である。

電子たばこから発生するカルボニル化合物の生成メカニズム

電子たばこから発生するカルボニル化合物の生成メカニズムを検討した。電子たばこのE-リキッドは、主成分であるグリセロール（GLY）とプロピレングリコール（PG）にニコチンや香料を添加した溶液である。本研究では任意の比率のGLYとPGから構成される添加物を含まない純粋なE-リキッドを作製し、様々な電力におけるカルボニル化合物を定性・定量することで熱分解反応を考察した。電力100Wの時、PG 100%のE-リキッドから発生する粒子状物質（煙）はGLY 100%のときの3倍程度多いが、反対にカルボニル化合物の発生量は少ない。PGは沸点がGLYよ

り低く気化→凝縮→粒子化しやすいためと考えられる。PG 100%の時は、全体的に熱分解物質発生量は非常に少ないが、GLY の比率が高くなるにつれ発生量が増加した。また、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アセトン、プロパナール、アクロレイン、アセトールはガス状で多く存在したが、グリオキサール、メチルグリオキサールは粒子状でも多く存在した。ガス状のホルムアルデヒド発生量はGLY 0%の時は $31 \mu\text{g}/10\text{s}$ であるが、GLY100%の時は $350 \mu\text{g}/10\text{s}$ に達する。PG が2価アルコールであるのに対しGLY が3価であり水酸基が少ないことが原因と考えられる。一方、電力 200W ではカルボニル化合物の発生量が非常に多く、 $700 \mu\text{g}/10\text{s}$ のホルムアルデヒドが発生するケースもあった。コイル温度が 600°C を超えると、電力が増加したときにE-リキッドの蒸発平衡が崩れるため、熱分解反応が促進されることが示唆された。また、E-リキッドの粘度が熱分解物質発生量に大きな影響を及ぼすことも明らかになった。すなわち、粘度が高いとE-リキッドが発熱コイルに達する速度が遅くなり、コイルに十分なE-リキッドが供給されなくなり、いわゆる空焚き状態になり高温になることが分かった。GLY とPG の粘度はそれぞれ $1412 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 、 $56.0 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ であるのでGLY の方が約5倍高いことから、GLY の比率が高いE-リキッドは注意が必要である。

紙巻たばこ加熱装置を使用したたばこ煙中の有害化学物質の分析

現在、日本では紙巻たばこ用加熱装置が販売されており、その装置を使用し喫煙した場合に有害化学物質の曝露量が開示されていない状況である。本研究では国内で販売されている紙巻たばこ用加熱装置を購入し、紙巻たばこで吸煙した条件で発生する主流煙に含まれるタール・ニコチン・一酸化炭素・TSNAs の分析を行った。紙巻たばこ加熱装置は、装置使用法が2種類存在

している。1つは紙巻たばこを直接装置に挿入し喫煙するタイプ (Aタイプ) と紙巻たばこからたばこ葉のみを充填するタイプ (Bタイプ) に分かれている。それぞれの装置10製品について評価を行った。その結果は、ニコチン量が $1 \text{ mg}/\text{cig}$ 発生し、主流煙CO量 (mg/cig) は $0.012\text{--}5.83$ となった。さらにたばこ特異的ニトロソアミン量 (ng/cig) は $16.8\text{--}11021$ となった。本研究から同じ紙巻たばこ銘柄を各製品で分析した結果は、製品ごとに発生量が異なることが確認された。

最終年度は主流煙の多環芳香族炭化水素類 (PAHs) とアクリルアミドの分析を行った。その結果は、直接加熱する装置 (Aタイプ) 3製品の主流煙総PAHs量 (ng/cig) は、HIMASU が 37.3 ± 2.35 、YOWO が 65.7 ± 4.42 、 2228 ± 1585 であった。次に、紙巻たばこのたばこ葉のみを加熱する装置 (Bタイプ) 2製品の主流煙総PAHs量 (ng/cig) は、FENIX MINI PRO が 80.0 ± 9.74 、Fy Hit eco -S が 78.0 ± 9.90 となった。製品によっては紙巻たばこ主流煙PAHs量に近い発生量となっていた。次にアクリルアミド (ng/cig) は次にアクリルアミド量 (ng/cig) は、直接加熱する装置 (Aタイプ) 4製品の濃度範囲は、 $220\text{--}3777$ であった。紙巻たばこのたばこ葉のみを加熱する装置 (Bタイプ) 5製品のアクリルアミドは $668\text{--}4462$ であった。アクリルアミドに関しては、Bタイプの製品でもPAHsの発生量とは異なり高い含有量となった。最終年度の結果と2カ年度の結果から、紙巻たばこ用加熱装置と紙巻たばこ銘柄の組合せによって、有害化学物質の曝露量は大きく変動することに留意し使用する必要がある。

WHO TobLabNet 標準作業書の作成

WHO TobLabNet に参加し、国際共同研究を行なった。これまでもWHO TobLabNet SOP1 から10までの作成を行ってきたが、この3カ年でWHO

TobLabNet SOP11 から 15 の作成を行った。

その内容は、WHO TobLabNet SOP11 が電子たばこリキッド中のニコチン、グリセロール、プロピレングリコールの分析法、WHO TobLabNet SOP12 から 14 は無煙たばこの水分、pH、ニコチン分析法、WHO TobLabNet SOP が加熱式たばこ葉に含まれるニコチン、グリセロール、プロピレングリコール分析法となっている。

C. 結論

3年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析を行った。分析法を確立し、新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量が上昇していることが確認された。また、加熱式たばこ紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。さらにイソシアネート、多環芳香族炭化水素キノロン類、水銀の分析を行った。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要がある。

D. 研究発表

1. 論文発表

Sawa M, Ushiyama A, Inaba Y, Uchiyama S, Hattori K, Ogasawara Y, Ishii K. A Newly Developed Aerosol Exposure Apparatus for Heated Tobacco Products for In Vivo Experiments Can Deliver Both Particles and Gas Phase With High Recovery and Depicts the Time-Dependent Variation in Nicotine Metabolites in Mouse Urine. *Nicotine Tob Res.* 2021 Nov 5;23(12):2145-2152.

2. 学会発表

1. 稲葉洋平, 郡司夏美, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. 2 種類の前処理を組み合わせたたばこ主

流煙の芳香族アミン分析 第 29 回環境化学討論会. 2021.6.2-3. ハイブリッド開催 同要旨集 p254-255.

2. 稲葉洋平, 松本知大, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. 加熱式たばこ IQOS と互換機から発生する有害化学物質量の比較 フォーラム 2021 衛生薬学・環境トキシコロジー 2021.9.10-11. オンライン開催. 同講演要旨集 p279.

3. 稲葉洋平, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. 加熱式たばこ副流煙(エアロゾル)のニコチンとたばこ 特異的ニトロソアミンの分析. 第 80 回日本公衆衛生学会総会. 2021.11.21-23 ; ハイブリット開催 (東京). 同講演抄録集. p.370

4. 清水萌花, 内山茂久, 稲葉洋平, 櫻田尚樹, 牛山明, 小倉裕直. 電子タバコから発生する熱分解物質の発生量に及ぼす加熱温度の影響. 2021 年室内環境学会学術大会. ハイブリッド開催(京都) 2021.12.2-3. 講演要旨集

5. 稲葉洋平, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. 加熱式たばこ主流煙のタール・ニコチン・一酸化炭素・たばこ特異的ニトロソアミンの分析. 2021 年室内環境学会学術大会 ; 2021.12.2-4 ; 京都. 同講演集. p.314-315

6. 稲葉洋平, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. 紙巻たばこ専用加熱装置から発生する主流煙の有害化学物質の分析. 第 31 回日本禁煙推進医師歯科医師連盟学術総会 (静岡) 2022.2.26-27. プログラム要旨集 p61.

7. 澤麻理恵, 石川智, 牛山明, 服部研之. IQOS エアロゾルばく露は肺組織及び肺胞マクロファージに酸化ストレスを発生させる. 第 92 回日本衛生学会学術総会 (兵庫) 2022.3.21-23. 同予稿集 S205.

8. 澤麻理恵, 牛山明, 稲葉洋平, 中舘和彦, 服部研之. 加熱式たばこエアロゾルを短期間ばく露した際のマウス肺の組織学的評価. 日本薬学会第142年会(名古屋) 2022.3.25-28. Web 予稿集.

9. 稲葉 洋平, 内山 茂久, 戸次 加奈江, 牛山 明. 電子たばこの連続喫煙による一酸化炭素, フェノール類の発生. 日本薬学会第142年会(名古屋) 2022.3.25-28. オンライン要旨集

10. 稲葉洋平, 若井美樹, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. たばこ主流煙の多環芳香族炭化水素類の捕集および分析法の確立と国内販売銘柄への適用. 第82回分析化学討論会(茨城, 水戸) 2022. 5. 14-15. 同 pdf 要旨集 P2137.

11. 稲葉洋平, 内山茂久, 戸次加奈江, 杉田和俊, 鳥羽 陽, 牛山明. 加熱式たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素類の捕集及び分析法の確立. 第30回環境化学討論会(富山) 2022.6.14-16. 同 pdf 要旨集 p540-541.

12. 杉田和俊, 小林 寛, 稲葉洋平. 加熱式タバコの水銀含有量. 第30回環境化学討論会(富山) 2022.6.14-16. 同 pdf 要旨集 p557-558.

13. 齋藤みのり, 清水萌花, 内山茂久, 樺田尚樹, 稲葉洋平, 牛山明, 小倉裕直. 加熱式タバコ主流煙の化学物質発生量に及ぼす加熱温度の影響. 第30回環境化学討論会(富山) 2022.6.14-16. 同 pdf 要旨集 p464-465.

14. 稲葉洋平, 須藤江里子, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 紙巻たばこ用加熱装置から発生する主流煙に含まれる有害化学物質. フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2022.8.30-31. (熊

本) .同講演抄録集. p.295.

15. 稲葉洋平, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. 2020年から販売された加熱式たばこの成分分析と初期型加熱式たばこことの比較. 第81回日本公衆衛生学会総会. 2022.10.7-9. (甲府) 同講演抄録集. p322.

16. 稲葉 洋平, 戸次 加奈江, 内山 茂久, 牛山 明. 電子たばこの連続使用によって発生する主流エアロゾルの一酸化炭素, フェノール類の分析. 第59回全国衛生化学技術協議会年会. 2022.10.31-11.1. (川崎). 同協議会講演集. p.214-215.

17. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 加熱式たばこ副流煙の捕集・分析法の確立 2022年室内環境学会学術大会. 2022.12.1-2. (東京) 同講演要旨集. P142-143.

18. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 「シンポジウム 2 「加熱式タバコの最新のエビデンス」」加熱式タバコ, 電子タバコの成分分析 第32回日本禁煙推進医師歯科医師連盟学術総会. 2023.2.26. (北九州) 同抄録集. P40.

19. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 新型の加熱式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93回日本衛生学会学術総会. 2023.3.2-4. (東京) 同講演集 S213.

20. 稲葉洋平, 須藤江里子, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 紙巻たばこ主流煙に含まれるアクリルアミド分析法の確立と国内販売銘柄の実態調査 日本薬学会第143年会. 2023.3.25-28 (札幌) 同要旨集.

21. 吉岡響, 吉田さくら, 安孫子ユミ, 戸次加奈江, 稲葉洋平, 鳥羽陽. 加熱式たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の定量とたばこスティックの比較 日本薬学会第 143 年会. 2023.3.25-28 (札幌) 同要旨集.
22. 広田航太郎, 山口大雅, 小宮雅美, 稲葉洋平, 加藤孝一, 戸塚ゆ加里. 加熱式タバコの遺伝毒性評価 日本薬学会第 143 年会. 2023.3.25-28 (札幌) 同要旨集.
23. 佐藤光平, 澤麻里恵, 小池伸, 中舘和彦, 服部研之, 稲葉洋平, 牛明, 小笠原裕樹. 加熱式たばこの主流煙暴露によるマウス肺におけるストレス応答の解析 日本薬学会第 143 年会. 2023.3.25-28 (札幌) 同要旨集.
24. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 内山茂久, 杉田和俊, 鳥羽陽, 牛山明. 電子たばこから発生する主流煙の多環芳香族炭化水素の分析. 環境化学物質 3 学会合同大会. 2023. 5. 29. -6. 2. ; 徳島. 同要旨集. P393-394.
25. 小井川奈々, 内山茂久, 齋藤みのり, 小倉裕直, 樺田尚樹, 稲葉洋平, 牛山明. Determination of Carbonyl compounds Generated from E-cigarettes . 日本分析化学会第 72 年会. 2023.9.13-15 ; 熊本. 同講演要旨集 3A1-001.
26. 稲葉洋平. セッション 2 「加熱式たばこについて考える」加熱式たばこ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.
27. 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.
28. 稲葉洋平, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明. 加熱式たばこ主流煙に含まれる芳香族アミン類の分析. 第 60 回全国衛生化学技術協議会年会. 2023.11.9-10 ; 福島. 同講演集 p182-183.
29. 小井川奈々, 内山茂久, 齋藤みのり, 小倉裕直, 稲葉洋平, 牛山明. 電子たばこから発生するカルボニル化合物の生成メカニズム. 2023 年室内環境学会学術大会. 2023.11.30-12.1 ; 沖縄. 同講演要旨集 p166-167.
30. 稲葉洋平, 飯島健太郎, 楠瀬翔一, 戸次加奈江, 内山茂久, 牛山明. 加熱式たばこ IQOS ILUMA と ILUMA 互換機から発生する有害化学物質の分析と比較. 2023 年室内環境学会学術大会. 2023.11.30-12.1 ; 沖縄. 同講演要旨集 p168-169.
31. 稲葉洋平. JSMO2024 禁煙推進セッション 加熱式たばこ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.
32. 稲葉洋平, 磯部秀太, 飯島健太郎, 戸次加奈江, 鳥羽陽, 内山茂久, 牛山明. 加熱式たばこ互換機の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素の分析. 日本薬学会第 144 年会 ; 2024.3.28-31 ; 横浜. 同要旨集. .
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 禁煙支援をはじめの前に 1. たばこ製品について知る p28-41. 2023. 南山堂

E. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

(<https://www.who.int/publications/i/item/9789240079304>)

F.その他

WHO TobLabNet SOP（公開済）

1. Tobacco Laboratory Network (TobLabNet). WHO TobLabNet SOP 11 - Standard operating procedure for determination of nicotine, glycerol and propylene glycol in e-liquids. World Health Organization. 2022. ISBN: 978-92-4-002274-4

(<https://www.who.int/publications/i/item/9789240022744>)

2. Tobacco Laboratory Network (TobLabNet). WHO TobLabNet SOP 12 – Standard operating procedure for determination of nicotine content in smokeless tobacco products. World Health Organization. 2022. ISBN: 9789240044661

(<https://www.who.int/publications/i/item/9789240044661>)

3. Tobacco Laboratory Network (TobLabNet). WHO TobLabNet SOP 13 - Standard operating procedure for determination of moisture content in smokeless tobacco products. World Health Organization. ISBN: 9789240044685

(<https://www.who.int/publications/i/item/9789240044685>)

4. Tobacco Laboratory Network (TobLabNet). WHO TobLabNet SOP14 - Standard operating procedure for determination of the pH of smokeless tobacco products. World Health Organization. ISBN: 9789240044708

(<https://www.who.int/publications/i/item/9789240044708>)

5. Tobacco Laboratory Network (TobLabNet). Standard operating procedure for determination of nicotine, glycerol and propylene glycol content in the tobacco of heated tobacco products: WHO TobLabNet Official Method SOP15. World Health Organization. ISBN: 978-92-4-007930-4

令和5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)
令和3年度～令和5年度 総合研究報告書

たばこ製品から発生する有害成分と室内の汚染に関する研究

研究分担者 戸次 加奈江 国立保健医療科学院

研究要旨

近年、国内で幅広く使用される加熱式たばこは、フレーバーなどの添加物を使用した多種多様な銘柄が販売され、主流煙中の成分においても従来の紙巻たばことは異なる特徴が報告されている。これらは、加熱式たばこの副流煙や喫煙者の呼気を介して環境中へ放散され、室内汚染を引き起こす可能性も懸念されている。そこで本研究では、はじめに、これまで主流煙中からの検出が報告され有害性が指摘されているフラン類とピリジン類¹⁾を対象に副流煙中の濃度を調べることにした。また、たばこ煙中での有害性が懸念される他の成分として、燃焼を主な発生源とするイソシアネートやメチルイソシアネートなどのイソシアネート化合物は、刺激性や感作性が強く、アレルギー性疾患や神経系への影響を及ぼすことが報告されている。そこで本研究では、国内で販売される新型たばこを対象に、副流煙中の有害成分の含有量を明らかにすると共に、主流煙からのイソシアネートの発生量及び室内の環境調査を行うことで、たばこ製品から発生する有害成分と室内汚染の影響を調べることにした。本研究結果より、新型たばこから発生するイソシアネートは、加熱温度により発生量が増加するものの、銘柄間での組成の違いは殆ど無いことが確認された。一方で、加熱及び燃焼温度の上昇に伴い分子量の大きなイソシアネートの発生量が増加する傾向にあり、検出されたイソシアネートのうち、特に、紙巻たばこを使用する住宅では、ICA の他、MIC が比較的多く検出される傾向にあった。このような特徴は、イソシアネートの室内濃度にも影響していることが、室内環境調査の結果から明らかとされ、紙巻たばこを使用する住宅では、ICA と MIC いずれも I/O 比が高値を示す傾向にあった。そのため、イソシアネートが受動喫煙の健康リスク因子の一つとなる可能性も示唆された。

A 目的

近年、国内で幅広く使用される加熱式たばこは、フレーバーなどの添加物を使用した多種多様な銘柄が販売され、主流煙中の成分においても従来の紙巻たばことは異なる特徴が報告されている。これらは、加熱式たばこの副流煙や喫煙者の呼気を介して環境中へ放散され、室内汚染を引き起こす可能性も懸念されている。そこで本研究では、はじめに、これまで主流煙中からの検出が報告され有害性が指摘されているフラン類とピリジン類¹⁾を対象に副流煙中の濃度を調べることにした。また、たばこ煙中での有害性が懸念される

他の成分として、窒素元素を含むイソシアネートやメチルイソシアネートなどのイソシアネートは、刺激性や感作性が強く、アレルギー性疾患や神経系への影響を及ぼすことが報告されており、主な発生源としては、自動車などの燃料燃焼や廃棄物燃焼²⁾、喫煙などが主な発生源として知られている。そこで本研究では、国内で販売される新型たばこを対象に、副流煙中の有害成分の含有量を明らかにすると共に、主流煙からのイソシアネートの発生量及び室内の環境調査を行うことで、たばこ製品から発生する有害成分と室内汚染の影響を調べることにした。

B 方法

B.1 副流煙中の有害成分の分析

B.1.1 個体捕集カートリッジの作製

Tenax GR (GL サイエンス社製) 20 mg をポリエチレン製カートリッジ (Rezorian tube, 1 mL) に充填し、予め酢酸エチル、メタノール各 10 ml を通液し洗浄した後、窒素ガス 2L を通気し乾燥させ、捕集まで冷暗所にて保管した。

B.1.2 副流煙の捕集及び分析

副流煙の捕集は、稲葉らによる令和 2 年度厚労科研報告書³⁾における手法を用いて行った。具体的には、自動喫煙装置 (Borgwaldt Technik GmbH 製, LM4E) で加熱式たばこを吸引し、その際、デバイスやスティックの先端部分から発生する煙を専用の捕集管を用い、流速 1 L/min で吸引しながら捕集した。捕集には、フィッシュテール、CFP、Tenax GR カートリッジ、インピンジャーを設置し、フィッシュテールと CFP からは主に粒子状成分を、Tenax GR カートリッジとインピンジャーでガス成分を捕集した。捕集後は、Tenax GR カートリッジ及び CFP を有機溶媒で抽出し、フィッシュテール及びインピンジャーで採取した試料はそのまま分析に供した。捕集管等の接続に使用した捕集チューブも有機溶媒で洗い流し分析に使用した。また本研究では、多くの夾雑成分を含むたばこ主流煙を対象に微量成分も含めた 21 成分の分析を行うため、高感度高選択性の高い GC-MS/MS の MRM モードにより分析した⁴⁾。

B.2 加熱式たばこの主流煙に含まれるイソシアネートの分析

B.2.1 分析対象物質

本研究では、たばこ煙や環境中での検出頻度が高いイソシアネート 5 種を分析の対象とした。イソシアン酸 (ICA), メチルイソシアネート (MIC),

エチルイソシアネート (EIC), プロピルイソシアネート (PIC), フェニルイソシアネート (PHI)。

B.2.2 分析に使用したたばこ製品

本実験で使用した加熱式たばこは、glo Hyper+ (British American Tobacco), ploom X (日本たばこ産業株式会社), IQOS3 duo (Philip Morris), IQOS3 ILUMA (Philip Morris), NOS (IQOS3 duo 互換機), HITASTE (IQOS3 ILUMA 互換機) 及び標準の紙巻たばこ (3R4F) である。

B.2.3 たばこ主流煙の捕集及び分析

誘導体化剤ジブチルアミン (DBA) を保持させた陽イオン交換樹脂 (SCX) (Bond Elut, Agilent) に DBA-HCl を含浸させた石英繊維フィルター (CFP) を組み合わせたものを個体捕集材とし、自動喫煙装置に接続して、タバコ主流煙の捕集を行った。捕集する際、各種専用のたばこは、フィルターの通気孔を塞ぎ、Health Canada Intensive (HCI) 法⁵⁾に準拠して行った。また、デバイスごとの捕集条件を Table 1 に示す。

主流煙を固体捕集材に捕集した後、アセトニトリルで抽出し、イソシアネート DBA 誘導体を LC-MS/MS で分析した。得られた試料中のイソシアネート DBA 誘導体は、Bekki ら³⁾が報告する LC-MS/MS の分析条件に従い、選択反応モニタリングモード (SRM) により分析した。

Table 1 たばこ製品の捕集条件

	製品	吸煙時間 (s)	吸煙間隔 (s)	吸煙量 (mL)	吸煙回数 (n)
(A)	glo Hyper+	2	16	55	12
(B)	ploom X	2	27	55	12
(C)	IQOS3 duo	2	30	55	12
(D)	IQOS3 ILUMA	2	16	55	12
(E)	NOS	2	16	55	12
(F)	HITASTE	2	16	55	12
(G)	3R4F (cigarette)	2	28	55	8

B.3 室内空気の捕集及び分析

ガラス繊維フィルターに誘導体化試薬 (ジブチル

アミン) を含浸した拡散サンプラー⁶⁾を屋内・屋外に7日間設置しサンプリングをした後、メタノール：硫酸：トルエン (=3 : 3 : 4) で液液抽出し濃縮したものを試料とし、イソシアネート誘導体をLC-MS/MSで分析した。

C 結果及び考察

C.1 副流煙中の有害成分の分析

フィッシュテール、CFP、Tenax GRカートリッジ、インピンジャーによりglo hyperの各銘柄の専用スティックから発生する副流煙を捕集し、GC-MS/MSで各成分を分析した結果をTable 1に示す。対象としたフラン類及びピリジン類、メンソールなどの殆どがカートリッジで比較的多く捕集され、ガス状のものが多く含まれていることが確認された。一方で、ニコチンは、フィルターで検出された他、フィッシュテールからも吸着したものが検出され、稲葉らの報告³⁾と同様に主に粒子状で存在することが確認された。また、検出された成分は、銘柄によって傾向がことなっていたことから、フレーバーに由来しているものと予想された。検出された成分の中でも、フラン類に該当するフルフラールについては、吸入により接取することで、頭痛、めまい、吐き気などの中毒症状を示す可能性が指摘されており、ACGIH (アメリカ合衆国産業衛生専門官会議) では“動物実験で発がん性が認められた物質”としてA3に分類されている⁷⁾。2-フランメタノール及びピリジンについては、IARCにより“発がん性を示す可能性のあるもの”としてGroup 2Bに分類されている。さらに、3/4-EPは、ニコチン由来のガス状成分として、従来より、受動喫煙や三次喫煙に関する空気中のマーカー成分としても着目されている。こうした成分により、呼出煙や副流煙などによる室内汚染の影響や、受動喫煙による非喫煙者への曝露を引き起こす可能性が考えられた。

C.2 加熱式たばこ主流煙中のイソシアネート

対象としたイソシアネート5種のうち、加熱式たばこの主流煙からは、全ての成分が検出され、特にICA (50~1800 ng/stick) 及びMIC (3.5~720 ng/stick) の発生量が多い傾向にあった (Fig. 1)。製品ごとの発生量の違いは、使用した製品の加熱温度の違いが主に影響しているものと考えられ、専用スティックの違い等による影響はさほど大きく見られなかった。また、各製品の主流煙から検出された成分の組成は、いずれもほぼ同様の傾向が見られたが、加熱及び燃焼温度が高いものほど、分子量の大きいイソシアネートの発生量が増える傾向にあった。また、これら各成分の発生量は、紙巻たばこに比べて大きく低減されていたものの、NOS (IQOS 互換機) や HITASTE (IQOS ILUMA 互換機) では殆ど同程度の発生量であった。

以上の様に、各種たばこ製品から発生するイソシアネートの量は異なるものの、習慣的な喫煙によって継続的に曝露される可能性があることから、イソシアネートが健康リスクの要因の一つとなる可能性が考えられた。

C.3 一般住宅における空気中イソシアネート濃度

2022年12月~2023年12月の1年間、関東に位置する4件の住宅で、拡散サンプラー⁴⁾毎月1回イソシアネートを測定し、を算出し、比較したところ (Fig. 2)、いずれの住宅からもICAとMICの室内外の濃度比 (I/O比) が1を超えるサンプルが検出された。これらは、室内の何らかの発生源が寄与しているものと考えられ、特に住宅Cでは、ICAとMICのI/O比が極端に高値となった。この要因として、住宅Cでは、喫煙者が室内で紙巻たばこを吸う習慣があったことから、喫煙が主に影響しているものと考えられた。

D 結論

本研究結果より、加熱式たばこの副流煙からもガスまたは粒子の形態でフラン類及びピリジン類等に関する成分が検出され、呼出煙や副流煙などによる室内への影響や、受動喫煙による非喫煙者への曝露を引き起こす可能性が考えられた。

また、新型たばこから発生するイソシアネートに関する調査結果からは、加熱温度によりイソシアネートの発生量が変動するものの、銘柄間での組成の違いは殆ど無いことが確認された。一方で、加熱及び燃焼温度の上昇に伴い分子量の大きなイソシアネートの発生量が増加する傾向にあり、このような特徴は、イソシアネートの室内濃度にも影響していることが、環境調査の結果から明らかとなった。そのため、環境中のイソシアネートが受動喫煙の健康リスク因子として寄与している可能性が示唆された。

E 引用文献

1. Bekki K. et al., Environ Health Prev Med 2021, 26: 89.
2. Leanderson, P. Indoor air 2019, 29. 291-298
3. 稲葉洋平, 戸次加奈江, 牛山明, 内山茂久. 令和2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「加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と受動喫煙による健康影響の評価手法の開発」加熱式たばこの副流煙の捕集・分析法に関する検討. 分担研究報告書
4. Bekki K. et al., Anal. Bioanal. Chemistry 412, 2020.
5. Health Canada, Official method T-115, 1999.
6. 戸次加奈江, 空気中の含窒素有機化合物に関するモニタリング手法の開発. 日本分析化学

会第72年会, 講演要旨

7. フルフルール : GHS 分類結果 . <https://www.nite.go.jp/chem/ghs/06-imcg-0914.html>.

F 研究発表

(国内学会)

1. 戸次加奈江, 稲葉洋平, 内山茂久, 牛山明. たばこ製品から発生するイソシアネートの発生量と組成比較. 日本薬学会第143年会 ; 2023. 3.26-28 ; 札幌. 同講演集.
2. 戸次加奈江, 稲葉洋平, 内山茂久, 牛山明. 新型たばこから発生するイソシアネートの分析. 第60回全国衛生化学技術協議会年会 ; 2023. 11.9-10 ; 福島. 同講演集
3. 戸次加奈江, 稲葉洋平, 楠瀬翔一, 内山茂久, 牛山明. たばこ製品に起因するイソシアネートと室内の汚染に関する研究. 日本薬学会第144年会 ; 2024. 3.28-31 ; 横浜. 同講演集 (論文)
1. Bekki K, Uchiyama S, Inaba Y, Ushiyama A. Analysis of furans and pyridines from new generation heated tobacco product in Japan. Environ Health Prev Med 2021, 26: 89.

G 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Concentrations of chemical compounds detected in the sidestream smoke of HTPs using Tenax GR cartridge, CFP, fishtale and impinger ($\mu\text{g}/\text{stick}$) (n=3). n.d. means not determined.

$\mu\text{g}/\text{stick}$	Fresco Menthol					True Tobacco				
	cartridge	filter	fishtale	impinger	total	cartridge	filter	fishtale	impinger	total
Furans										
Furfural	6.2 ± 1.1	0.015 ± 0.0064	0.015 ± 0.012	0.018 ± 0.015	6.3 ± 1.1	5.2 ± 0.28	n.d.	0.013 ± 0.0024	n.d.	5.3 ± 0.28
Furfuryl Alcohol	10 ± 2.0	n.d.	n.d.	0.013 ± 0.012	10 ± 2.0	8.4 ± 0.38	n.d.	0.019 ± 0.021	n.d.	8.5 ± 0.38
2(5H)-furanone	0.19 ± 0.036	n.d.	n.d.	n.d.	0.19 ± 0.036	0.13 ± 0.0088	n.d.	n.d.	n.d.	0.14 ± 0.0083
5-methylfurfural	2.1 ± 0.47	0.066 ± 0.021	n.d.	n.d.	2.2 ± 0.48	1.8 ± 0.11	0.067 ± 0.024	n.d.	n.d.	1.9 ± 0.086
Pyridines										
Pyridine	0.72 ± 0.21	n.d.	n.d.	n.d.	0.73 ± 0.21	0.44 ± 0.042	n.d.	n.d.	n.d.	0.45 ± 0.043
2,6-Dimethylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.010 ± 0.0053	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,5-Dimethylpyrazine	0.063 ± 0.017	n.d.	n.d.	n.d.	0.077 ± 0.015	0.029 ± 0.011	n.d.	n.d.	n.d.	0.042 ± 0.014
2-Ethenylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.010 ± 0.0053	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Ethylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Ethenylpyridine	0.44 ± 0.069	0.10 ± 0.043	0.037 ± 0.016	n.d.	0.59 ± 0.10	0.37 ± 0.026	0.080 ± 0.016	0.054 ± 0.012	n.d.	0.51 ± 0.030
3-Ethenylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.018 ± 0.0028	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.012 ± 0.0012
2,3,5-Trimethylpyrazine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.019 ± 0.0071	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.016 ± 0.0046
Additives										
Benzyl Alcohol	0.95 ± 0.22	0.33 ± 0.052	0.010 ± 0.0069	n.d.	1.3 ± 0.27	0.038 ± 0.028	0.035 ± 0.021	n.d.	0.025 ± 0.0072	0.10 ± 0.033
Linalol	0.010 ± 0.00087	n.d.	n.d.	n.d.	0.021 ± 0.010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.012 ± 0.0053
Menthol	130 ± 19	13 ± 2.8	0.031 ± 0.014	0.65 ± 0.58	150 ± 21	3.3 ± 1.2	0.61 ± 0.034	0.014 ± 0.018	1.3 ± 0.29	5.3 ± 1.5
4-Ethyl guaiacol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	0.017 ± 0.011	0.033 ± 0.021	n.d.	0.012 ± 0.0081	n.d.	0.013 ± 0.0031	0.041 ± 0.0064
Others										
Nicotine (mg/stick)	0.48 ± 0.079	56 ± 12	3.0 ± 0.065	n.d.	60 ± 12	0.19 ± 0.29	35 ± 3.2	2.9 ± 0.45	n.d.	39 ± 3.7
Freeze Menthol										
	cartridge	filter	fishtale	impinger	total	Fluorescent Citrus				
						cartridge	filter	fishtale	impinger	total
Furans										
Furfural	4.3 ± 0.67	n.d.	0.018 ± 0.011	n.d.	4.3 ± 0.67	6.1 ± 1.5	0.021 ± 0.0051	0.035 ± 0.0072	0.012 ± 0.00085	6.1 ± 1.5
Furfuryl Alcohol	8.0 ± 1.0	n.d.	n.d.	n.d.	8.0 ± 1.0	11 ± 3.0	0.035 ± 0.038	0.014 ± 0.0028	0.010 ± 0.0029	11 ± 3.0
2(5H)-furanone	0.15 ± 0.021	n.d.	n.d.	n.d.	0.15 ± 0.022	0.18 ± 0.053	n.d.	n.d.	n.d.	0.18 ± 0.053
5-methylfurfural	1.5 ± 0.22	0.045 ± 0.0067	n.d.	n.d.	1.6 ± 0.21	2.3 ± 0.66	0.053 ± 0.0089	n.d.	n.d.	2.4 ± 0.67
Pyridines										
Pyridine	0.42 ± 0.059	n.d.	n.d.	n.d.	0.42 ± 0.056	0.67 ± 0.20	n.d.	n.d.	n.d.	0.67 ± 0.20
2,6-Dimethylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.010 ± 0.0025	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.015 ± 0.0046
2,5-Dimethylpyrazine	0.049 ± 0.012	n.d.	n.d.	n.d.	0.071 ± 0.011	0.034 ± 0.021	n.d.	n.d.	n.d.	0.050 ± 0.024
2-Ethenylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Ethylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Ethenylpyridine	0.39 ± 0.064	0.075 ± 0.0051	0.044 ± 0.020	n.d.	0.51 ± 0.049	0.40 ± 0.076	0.079 ± 0.0091	0.052 ± 0.016	n.d.	0.54 ± 0.079
3-Ethenylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.014 ± 0.0057	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.014 ± 0.0054
2,3,5-Trimethylpyrazine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.017 ± 0.0028	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.011 ± 0.0025
Additives										
Benzyl Alcohol	n.d.	0.019 ± 0.016	0.020 ± 0.015	n.d.	0.054 ± 0.030	0.014 ± 0.019	0.034 ± 0.0051	0.017 ± 0.018	0.023 ± 0.0054	0.090 ± 0.029
Linalol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.014 ± 0.0018	0.041 ± 0.045	n.d.	n.d.	n.d.	0.054 ± 0.054
Menthol	100 ± 20	9.7 ± 0.61	0.051 ± 0.016	0.42 ± 0.22	110 ± 20	100 ± 19	7.2 ± 0.42	0.071 ± 0.073	1.2 ± 0.13	110 ± 19
4-Ethyl guaiacol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.026 ± 0.0049	0.013 ± 0.014	n.d.	n.d.	n.d.	0.034 ± 0.016
Others										
Nicotine (mg/stick)	0.25 ± 0.043	27 ± 2.9	2.5 ± 0.38	n.d.	30 ± 3.3	1.7 ± 0.33	40 ± 9.2	2.3 ± 0.32	n.d.	44 ± 9.8
Tropical Swirl										
	cartridge	filter	fishtale	impinger	total	True Berry Boost				
						cartridge	filter	fishtale	impinger	total
Furans										
Furfural	4.3 ± 0.62	0.014 ± 0.011	n.d.	0.010 ± 0.0028	4.4 ± 0.62	4.1 ± 0.70	n.d.	n.d.	n.d.	4.1 ± 0.70
Furfuryl Alcohol	9.2 ± 1.0	0.010 ± 0.0038	0.011 ± 0.015	n.d.	9.3 ± 1.0	8.0 ± 0.69	n.d.	n.d.	0.013 ± 0.0046	8.0 ± 0.69
2(5H)-furanone	0.14 ± 0.014	n.d.	n.d.	n.d.	0.14 ± 0.015	0.14 ± 0.017	n.d.	n.d.	n.d.	0.14 ± 0.017
5-methylfurfural	1.7 ± 0.18	0.054 ± 0.014	n.d.	n.d.	1.7 ± 0.18	1.2 ± 0.23	0.049 ± 0.020	n.d.	n.d.	1.3 ± 0.25
Pyridines										
Pyridine	0.44 ± 0.073	n.d.	n.d.	n.d.	0.44 ± 0.073	0.44 ± 0.044	n.d.	n.d.	n.d.	0.45 ± 0.040
2,6-Dimethylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.010 ± 0.0013
2,5-Dimethylpyrazine	0.023 ± 0.0071	n.d.	n.d.	n.d.	0.037 ± 0.011	0.053 ± 0.010	n.d.	n.d.	n.d.	0.059 ± 0.014
2-Ethenylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Ethylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Ethenylpyridine	0.36 ± 0.040	0.096 ± 0.0040	0.062 ± 0.011	n.d.	0.52 ± 0.038	0.37 ± 0.026	0.10 ± 0.0079	0.052 ± 0.0074	n.d.	0.52 ± 0.027
3-Ethenylpyridine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.011 ± 0.0092	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.018 ± 0.0041
2,3,5-Trimethylpyrazine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.013 ± 0.0071	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.010 ± 0.0035
Additives										
Benzyl Alcohol	0.041 ± 0.011	0.071 ± 0.014	0.026 ± 0.012	n.d.	0.14 ± 0.034	0.18 ± 0.055	0.064 ± 0.0095	0.012 ± 0.0064	0.023 ± 0.016	0.28 ± 0.053
Linalol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.017 ± 0.0043	0.015 ± 0.0036	n.d.	n.d.	n.d.	0.028 ± 0.0042
Menthol	74 ± 3.1	6.9 ± 1.4	0.034 ± 0.0078	0.94 ± 0.47	81 ± 3.4	86 ± 7.7	8.9 ± 0.66	0.048 ± 0.044	1.1 ± 0.44	97 ± 7.6
4-Ethyl guaiacol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.021 ± 0.016	n.d.	0.014 ± 0.022	n.d.	n.d.	0.031 ± 0.025
Others										
Nicotine (mg/stick)	1.2 ± 0.38	35 ± 4.5	2.1 ± 0.72	0.010 ± 0.0072	39 ± 4.9	n.d.	18 ± 5.5	1.7 ± 0.39	0.011 ± 0.0034	20 ± 5.9

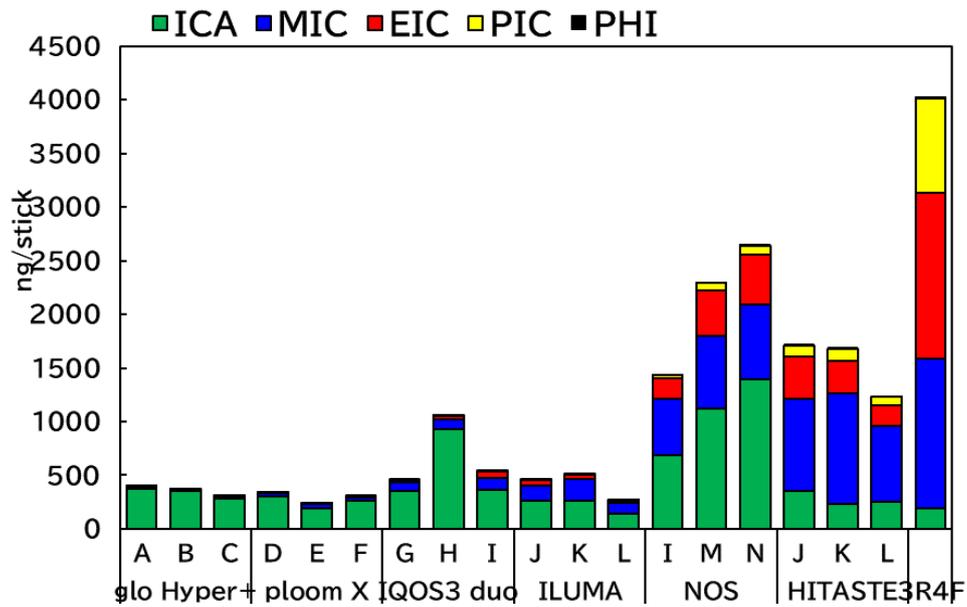


Fig. 1-A 加熱式タバコ主流煙中のイソシアネート濃度.

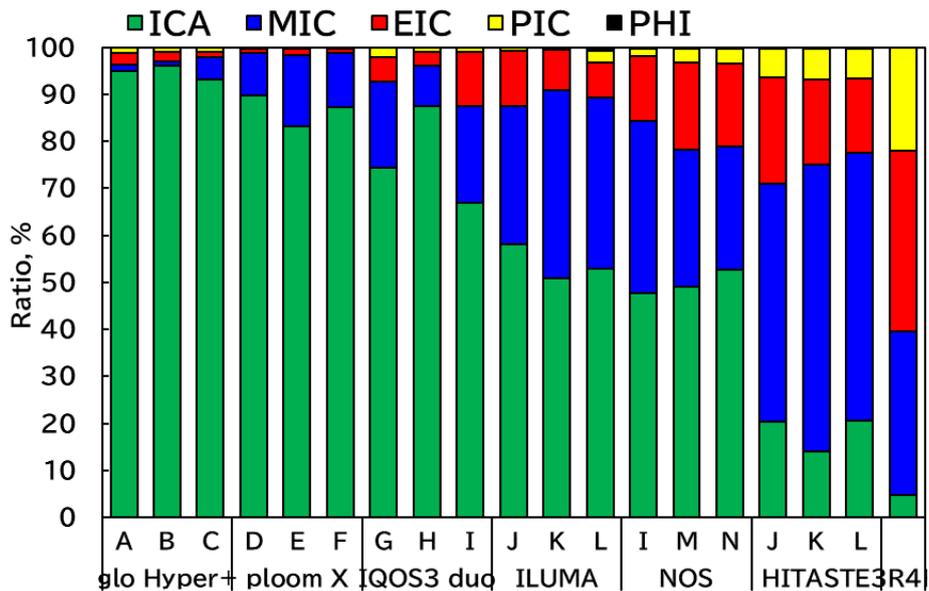


Fig. 1-B 加熱式タバコ主流煙中のイソシアネートの組成. (たばこ専用ステック銘柄 A: true menthol, B: true berry boost, C: brilliant berry, D: menthol purple, E: menthol yellow, F: menthol green, G: regular, H: menthol, I: purple menthol, J: regular (TEREA), K: menthol (TEREA), L: tropical (TEREA), M: yellow menthol, N: tropical menthol, 3R4F: 標準たばこ (紙巻たばこ))

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)
(総合) 分担研究報告書

加熱式たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の分析

分担研究者 鳥羽 陽 長崎大学

研究要旨

活性酸素種 (ROS) を生成し、酸化ストレスを引き起こす多環芳香族炭化水素キノン類 (PAHQ) を測定対象とし、加熱式たばこ 6 種及び電子たばこ 3 種の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類 (PAHQ) を同定・定量し、紙巻たばこと比較することを目的とした。各主流煙について、自動喫煙装置を用いてフィルターに捕集し、ジクロロメタンで抽出した後、PAHQ を還元・トリメチルシリル (TMS) 誘導体化してガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計 (GC-MS/MS) で測定した。加熱式たばこ及び紙巻たばこ主流煙中から最も多くて 21 種類の PAHQ を定量し、電子たばこからは 27~29 種類を定量できた。いずれのたばこにおいても 1~3 環 PAHQ が生成しやすく、検出種と組成はたばこ間で類似していた。加熱式たばこ主流煙中の PAHQ 濃度は、全ての加熱式たばこ製品で紙巻たばこの 3%以下であり、主流煙における PAHQ の生成には、燃焼・加熱温度が深く関与していた。電子たばこでは連続使用による使用回数の増加に伴い PAHQ 濃度が上昇しており、使用方法によっては紙巻たばこと同程度、あるいはそれを超える PAHQ を吸入する可能性が示唆された。

A. 研究目的

たばこ煙には約 5,300 種類の化学物質が含まれており、そのうち有害物質は約 250 種類以上、多環芳香族炭化水素 (PAH) をはじめとする発がん性物質は約 70 種類以上存在している。近年、その中でも PAH の酸化誘導体である PAH キノン類 (PAHQ) が注目を集めている。PAHQ は、生体内でレドックスサイクルを介して触媒的に酸化還元反応を起こし、活性酸素種 (ROS) を過剰産生し、酸化ストレスを誘発することから、呼吸器疾患や循環器疾患との関連が指摘されている。また、呼吸を介して曝露された PAHQ は、ヒトの生体内で代謝されて尿中に代謝物が排泄されていることが明らかになっている。従って、喫煙に関連した PAHQ 曝露によって誘発される酸化ストレスによる健康影響の検証は重要であり、たばこ煙中の PAHQ 濃度を知ることは、喫煙による健康影響の

解明に必要である。近年、日本国内では加熱式たばこや電子たばこが急速に普及している。これは、加熱式たばこ煙に含まれる有害物質の量が 90% 以上減少したという報告や電子たばこに使用するリキッドの主成分が食品添加物として使用されるプロピレングリコールや植物性グリセリンであることから健康リスクが低い可能性があると考えられるためである。しかしながら、報告された有害物質は限られた物質のみであり、その他の有害物質に関する報告は未だ少ない。そこで本研究では、新型たばこ煙に含まれる未知の有害物質の解明を目的として、日本国内で販売されている加熱式たばこや世界で流通している電子たばこの主流煙に含まれる PAHQ の定量を行った。

B. 研究方法

1. 使用たばこ銘柄

たばこ試料

国内で販売されている加熱式たばこである IQOS3 (R: REGULAR, F: TROPICAL MENTHOL), IQOS ILUMA (R: TEREA REGULAR, F: TEREA PURPLE MENTHOL), glo (R: KENT bright tobacco, F: neo BOOST BERRY), glo hyper+ (R: KENT TRUE TOBACCO, F: KENT TRUE BERRY), PloomS (R: MEVIUS REGULAR, F: CAMEL APPLE FLAVOR), PloomX (R: MEVIUS RICH, F: CAMEL MUSCAT GREEN) の主流煙を測定対象とした (R: レギュラータイプ, F: フレーバータイプ)。

電子たばこは, LOST VAPE THELEMA QUEST 200W KIT, Vaptio X-Hubble, INNOKIN Coolfire ULTRA の 3 種類を測定対象とし, 主流煙を発生させるリキッドは CUSTERD MONSTER VANILLA (MONSTER VAPE LABS)を全ての電子たばこで使用した。また, 紙巻たばこの標準たばこである 3R4F 及び CM8 の主流煙を比較対象とした。

2. たばこ主流煙の化学物質の分析

たばこ主流煙の捕集

たばこ主流煙の捕集は, 自動喫煙装置 (LX20, Borgwaldt KC GmbH) を用いて加熱式たばこ及び紙巻たばこについては HCl 法, すなわち Health Canada Intense protocol T-115 (1, 2) に準拠して行い, 一服につき 2 秒間で 55 mL 吸引, 30 秒毎に一服させた。電子たばこについては, CORESTA Recommended Method No. 81 法 (CRM81) の捕集方法に準拠して捕集した。CRM81 法による捕集では, 吸煙量 80 mL, 吸煙間隔 30 秒, 吸煙時間 3 秒とした。たばこ主流煙中の総粒子状物質 (total particle matter ; TPM) は Cambridge filter pad (CFP, ϕ 44 mm, Borgwaldt KC GmbH) 上に捕集し, 加熱式たばこでは 1 枚につき, スティック 3 本分の主流煙を捕集し, 1 試料とした。電子たばこの捕集はフィルター 1 枚につき 10 puff 分捕集し, 計 50 枚分を連続捕集した。捕集の間にはコイルの交換やデバイス内の洗浄等のメンテナンスは行わ

なかった。

PAHQ の分析

前処理法

各フィルター試料について, それぞれジクロロメタンによる超音波抽出を行なった。抽出液に DMSO を添加した後で減圧濃縮し, 超音波抽出した後, ろ過してから溶媒を留去した。トルエンに再溶解してから 5%HCl を含む飽和 NaCl 溶液で液-液抽出して精製した。誘導体化は, 亜鉛とジチオスレイトールの存在下で TMS 化試薬 [BSA+TMCS+TMSI (3:2:3)] を加えて 80°C, 30 分間で行った。誘導体化後, ヘキサンと水を加えて抽出して得られたヘキサン相を乾固してヘキサン 200 μ L に再溶解して検液とした (3)。

測定対象成分

環数が 1 つのベンゾキノロン (BQ) 類を含む 39 種の PAHQ を測定対象とした。具体的には, 1,4-benzoquinone (BQ), 2-methyl-1,4-benzoquinone (MBQ), dimethylbenzoquinone (DMBQ) 2 種, tetramethylbenzoquinone (TMBQ), 2-tert-butyl-1,4-benzoquinone (2-tb-BQ), 2,5-di-tert-butyl-1,4-benzoquinone (2,5-Dtb-BQ), naphthoquinone (NQ) 2 種, 2-methyl-1,4-naphthoquinone (MNQ), acenaphthoquinone (AceNQ), phenanthrenequinone (PQ) 3 種, anthraquinone (AQ) 2 種, 2-methyl-9,10-anthraquinone (2-MAQ), 2,3-dimethyl-9,10-anthraquinone (2,3-DMAQ), aceanthraquinone (AceAQ), fluoranthene-2,3-quinone (Frt-2,3-Q), chrysenequinone (CQ) 3 種, benzo[c]phenanthrene quinone (BcP-Q) 2 種, 7,12-benzanthraquinone (7,12-BAQ), 5,12-naphthacenequinone (5,12-NapQ), pyrenequinone (PyrQ) 3 種, Dibenzo[a,h]anthracene-5,6-quinone (DBahA-5,6-Q), benzo[a]pyrenequinone (BaP-Q) 7 種, benzo[e]pyrene-4,5-quinone (BeP-4,5-Q), Dibenzo[a,j]anthracene-7,14-quinone (DBajA-7,14-Q) の計 39 種を対象とした (3)。

GC/MS/MS 条件

Thermo Fisher Scientific 社製 GC-MS/MS (TSQ Quantum GC) システムを用いた。カラムは DB-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm, J&W) を使用し、50-310°C (25°C/min, 7 分間維持) の昇温プログラムで分析した。その他の GC 条件は、注入口温度 250°C, スプリットレスモード, 注入量 1 μL とした。MS 条件は、EI モード, イオン源温度 300°C, インターフェース温度 280°C とし、イオン化電圧は 70 eV とした。検出は、[M]⁺イオンをプリカーサーイオンとして最も強度の高いプロダクトイオン 2 種を用いた選択反応モニタリング (SRM) モードで測定した (3)。

C. 結果及び考察

1. PAHQ の定量性の確認

加熱式たばこ及び電子たばこ主流煙中 PAHQ の定量が可能であるかを確認するため、加熱式たばこでは IQOS を用い、電子たばこでは THELEMA QUEST を用い、主流煙試料の TPM 抽出物に既知量の標準物質を添加して真度や精度を評価するバリデーション試験を行った。加熱式たばこ及び電子たばこの主流煙から検出されたすべての PAHQ の定量性を確認した結果、日内および日間変動について 100±25% の真度が得られ、RSD 値も 25% 以下と良好な精度を得ることができた。以上より今回測定した電子たばこの主流煙に含まれる PAHQ の定量値が信頼性のあるデータであることを確認できた。

2. 加熱式たばこ主流煙中 PAHQ の定量と比較

加熱式たばこ主流煙中から最も多くて 21 種類の PAHQ を同定し、加熱式たばこ主流煙中の総濃度は、約 1.0~93 ng/puff であった (図 1)。一方、紙巻たばこ主流煙中の PAHQ 総濃度は 3,900~7,300 ng/puff であり、加熱式たばこに比べて著しく高濃度であった。加熱式たばこのデバイス間では、IQOS3 > IQOS ILUMA > glo Hyper⁺ > Ploom X > glo > Ploom S の順番で PAHQ の総濃度が高く、

この傾向はレギュラータイプとフレーバータイプで同じであった。また、スティックタイプ (フレーバーの有無) について比較すると、IQOS ILUMA と glo において、異なるスティックタイプで約 2 倍の濃度差があったが、その他のデバイスでは、濃度差はほとんど観察されなかった。この結果から、PAHQ の生成にスティックタイプの違い (フレーバーの有無) は大きく影響しないと考えられた。

各加熱式たばこの主流煙から共通して主に 1~3 環の環数の少ない PAHQ が検出され、BQ 類が組成の 98% 以上を占め、残りは 2, 3 環の PAHQ が占めていた。また、濃度は低い 4 環の PAHQ も一部検出された。一方で、5 環以上の環数を有する PAHQ は検出されなかった。加熱式と紙巻の違いや加熱式デバイスやスティックタイプの違いにかかわらず、全てのたばこで検出種や組成はほとんど同様の傾向を示した。BQ 類以外では特に 3 環の 9,10-anthraquinone (9,10-AQ) とそのメチル化体 (MAQ, DMAQ) が高濃度で検出された。9,10-AQ の親化合物であるアントラセンは、9 位と 10 位のフロンティア電子密度が高く、他の位置よりも酸化されやすいと考えられる。定量できた PAHQ の中には活性酸素種を生成する代表的な PAHQ である 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) や 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) も含まれていた (4)。

紙巻たばこに対する加熱式たばこ煙中 PAHQ の割合について、紙巻たばこの PAHQ 濃度を 100% として算出したところ、すべての加熱式たばこにおいて PAHQ 濃度は紙巻たばこに対して 3% 以下となった。また、紙巻たばこと加熱式たばこにおいて、燃焼・加熱温度と PAHQ 濃度との間に相関が観察された。これらのことから、たばこの燃焼・加熱温度の上昇に伴って PAHQ 濃度が増加することが分かった。

3. 電子たばこ主流煙中 PAHQ の濃度と組成

THELEMA QUEST と X-Hubble の主流煙から 29

種類の PAHQ が検出され、Coolfire ULTRA の主流煙からは THELEAM QUEST と X-Hubble から検出された BeP-4,5-Q と DB[a,h]A-5,6-Q を除く 27 種類が検出されたことから、電子たばこ製品間での検出種はおおよそ共通であることが分かった。これは、3 種類の電子たばこにおいて同じリキッドを使用したことが関係すると考えられる。また、使用回数に伴う検出種の変動について、使用回数の少ない時は主に 1~3 環の PAHQ が検出された一方で、使用回数が増加するにつれて 4, 5 環の PAHQ も検出されるようになった。

検出された各 PAHQ 濃度を合計した PAHQ 総濃度は、THELEMA QUEST で 6.7 (1 回目) ~419 (32 回目) ng/puff, X-Hubble で 8.3 (8 回目) ~299 (49 回目) ng/puff, Coolfire ULTRA で 13.9 (3 回目) ~164 (34 回目) ng/puff の範囲であった。図 2 に使用回数 1 回分 (10 puff) における PAHQ 総濃度の変動を示す。測定した全ての電子たばこにおいて、使用回数の増加に伴い PAHQ 総濃度が増加する傾向があり、使用回数と PAHQ 総濃度との間に $r > 0.5$ の相関が観察された。

総 PAHQ 濃度を 100% とした時の各 PAHQ 組成について、電子たばこ製品の違いや使用回数の増加に関わらず、全ての電子たばこ製品・使用回数において BQ 類 (BQ, MBQ, DMBQ, TMBQ) が組成の 80% 以上を占め、BQ 類以外では残りの割合を 1,2-NQ や 9,10-AQ など 2~3 環の PAHQ が占めていたことから、電子たばこの主流煙では 1~3 環の少環 PAHQ が生成しやすいことが示唆された。また、3 種類全ての電子たばこにおいて 1,2-NQ や 2,5-DMBQ など使用回数の増加に伴い組成割合が急激に増加する PAHQ が存在し、さらに 4~5 環 PAHQ の組成割合も増加した。特に、急激に組成割合が増加した 1,2-NQ は ROS 産生能の高い PAHQ であることが知られている (4)。以上より、使用回数により PAHQ 組成が変動し、健康リスクが高くなる可能性が示唆された。

測定を行った全ての電子たばこにおいて、使用回数 1 回目から PAHQ が検出された。電子たばこ

のコイルにはコットンが備え付けられており、保持したリキッドをコイルへと効率的に供給し、エアロゾル生成を促進する役割を持つ。一方で、コットンは熱安定性が低く、劣化しやすいという欠点があり、これはコットンの化学的組成において 99% 以上がセルロースであるためである (5)。セルロースは 180°C という低温での熱分解によって固体炭化残留物である「チャー」を形成 (6) し、350°C 以上になるとチャーからベンゼンやトルエン、ナフタレン、アントラセンなどの PAH が生成したと報告されている (7, 8)。従って、PAH は 300°C 以上でセルロースの熱分解により生成すると考えられる。本研究では電子たばこの温度測定を行っていないが、Uchiyama らはリキッドを気化させる部分であるアトマイザー温度を測定し、70 W の電力値で最高温度が約 250°C 以上に到達したと報告している (9)。今回使用した電子たばこの電圧値は 90 W と 150 W であることから最高温度は 250°C 以上に達すると予想され、これは熱分解によりセルロースから PAH が生成する温度に近い。以上のことから、コットン中のセルロースの熱分解が今回測定した電子たばこにおける PAH の発生源の一つであると考えられ、生成した PAH が加熱時に酸化されたことにより PAHQ が電子たばこエアロゾル中に放出されたと推察される。

4. 電子たばこの連続使用による影響

今回の測定では電子たばこのメンテナンスを行わないことを前提に 10 puff/回を 50 回連続使用する条件のもと 3 種類の電子たばこの捕集を行った。使用する製品、吸煙回数、洗浄頻度などといった喫煙パラメーターは電子たばこ使用者によって異なるため、今回の結果が必ずしも電子たばこ使用者への PAHQ 曝露実態に当てはまるとは言えない。しかし、Tillery らは 2018~2020 年における 60 名の電子たばこ使用者の使用実態を調査し、電子たばこ使用者は一日当たり 80 puff 分を吸入しており、コイル交換は約 2 週間に 1 回であったことを報告している (10)。コイル交換を行わずに

2週間毎日 80 puff 分を電子たばこで吸入すると仮定した場合、2週間で 1120 puff を吸入することになり、本研究で連続使用の目安として設定した 500 puff を大きく超えている。さらに、近年では紙巻たばこに近い吸い応えを求める使用者も多く、低い抵抗値と高い電力値により爆発的な水蒸気量を生成する「爆煙型」を使用する人も増加している。以上のことから、実際の電子たばこの使用においても、コイルの劣化等によって PAHQ 生成量の増加が起こっていると考えられ、製品によってはエアロゾル中の PAHQ 濃度が今回の結果に匹敵する可能性がある。また、本研究で測定した 3 種類の電子たばこにおける、使用回数ごとの累計濃度を図 3 に示す。本研究における研究用標準紙巻たばこ (3R4F) の測定値と比較した場合、3 種類全ての電子たばこにおいて、連続使用 50 回となる前に PAHQ の累計濃度が 3R4F 一本分の主流煙中 PAHQ 濃度を大きく超えていた。電子たばこは紙巻たばこと比較して有害物質量が減少するとされているが、吸煙回数や使用頻度などといった使用方法によっては紙巻たばこと同程度、あるいはそれを超える PAHQ を吸入する可能性が示唆された。

D. 結論

加熱式たばこ及び紙巻たばこ主流煙中の PAHQ を分析したところ、最も多くて 21 種類の PAHQ を検出することに成功した。PAHQ の組成にスティックタイプの違い（フレーバーの有無）は影響せず、1~3 環 PAHQ が生成しやすいことが示唆された。加熱式たばこ主流煙中の PAHQ 濃度は、全ての加熱式たばこ製品で紙巻たばこの 3%以下であった。加熱式たばこ製品は紙巻たばこよりも PAHQ を生成しにくいと考えられ、PAHQ 総濃度と燃焼・加熱温度との間に相関が観察されたことから、PAHQ の生成には、燃焼・加熱温度が深く関与していることが示唆された。

測定した 3 種類すべて電子たばこの主流煙に含まれる PAHQ の同定と定量に成功し、最大で 29

種類の PAHQ が検出された。PAHQ の組成は BQ 類が大部分を占め、残りは 2~3 環 PAHQ であったが、電子たばこの使用回数の増加に伴い 4~5 環 PAHQ も検出された。検出種と組成は電子たばこ間で共通であったことから、製品の違いは検出種や組成に影響しないと考えられる。測定した全ての電子たばこにおいて、電子たばこの使用回数と PAHQ 総濃度との間に相関性が観察され、使用回数の増加に伴い PAHQ 濃度が上昇することが示唆された。電子たばこを連続使用することでコイルやその付近に発生・付着した残留物や焦げが、今回の PAHQ 生成量の増加を引き起こしたと考えられる。

本研究は新型たばこ製品から発生する PAHQ に注目し、フレーバーの有無や連続使用による生成量への影響を明らかにした初めての研究であり、新型たばこの使用によって PAHQ に曝露する可能性を強く示唆している。本研究で得られた成果は新型たばこの健康影響の解明に貢献するものと期待される。

E. 参考文献

- (1) Health Canada Test Method T-115. Determination of the tar, water, nicotine and carbon monoxide in mainstream tobacco smoke. 1999.
- (2) WHO. Standard operating procedure for intense smoking of cigarettes: WHO Tobacco Laboratory Network (TobLabNet) official method (Standard operating procedure 01). Geneva, World Health Organization, 2012.
- (3) Toriba A., Homma C., Kita M., Uzaki W., Boongla Y., Orakij W., Tang N., Kameda T., Hayakawa K., Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbon quinones by gas chromatography-tandem mass spectrometry, following a one-pot reductive trimethylsilyl derivatization, J. Chromatogr. A, 1459, 89-100 (2016).

- (4) Motoyama Y., Bekki K., Chung S.W., Tang N., Kameda T., Toriba A., Taguchi K., Hayakawa K., Oxidative stress more strongly induced by ortho- than para-quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons in A549 Cells, *J. Health Sci.*, 55(5), 845-850 (2009).
- (5) Cunningham A., McAdam K., Thissen J., Digard H., The Evolving E-cigarette: Comparative Chemical Analyses of E-cigarette Vapor and Cigarette Smoke, *Frontiers in Toxicology*, 2, 586674 (2020).
- (6) Yang C.Q., Freeman J.M., Thermal degradation of cotton cellulose studied by fourier transform infrared-photoacoustic spectroscopy., *Advances in Chemistry*, 236, 693-708 (1993).
- (7) Hajaligol M., Waymack B., and Kellogg D., Low temperature formation of aromatic hydrocarbon from pyrolysis of cellulosic materials, *Fuel*, 80, 1799-1807 (2001).
- (8) McGrath T., Chan W.G., Hajaligol M., Low temperature mechanisms for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of cellulose, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 66, 51-70 (2003).
- (9) Uchiyama S., Noguchi M., Sato A., Ishitsuka M., Inaba Y., Kunugita N., Determination of Thermal Decomposition Products Generated from E-Cigarettes, *Chemical Research in Toxicology*, 33 (2), 576-583 (2020).
- (10) Tillery A., Aherrera A., Chen R., Lin J.J.Y., Tehrani M., Moustafa D., Mihalic J., Acien A.N., Rule A.M., Characterization of e-cigarette users according to device type, use behaviors, and self-reported health outcomes: Findings from the EMIT study, *Tobacco Induced Diseases*, 21, 159 (2023).

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

吉岡響, 吉田さくら, 戸次加奈江, 稲葉洋平, 鳥羽陽. 加熱式たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の分析 環境化学物質 3 学会合同大会. 2022.6.14-16. ハイブリッド開催。

吉岡響, 吉田さくら, 安孫子ユミ, 戸次加奈江, 稲葉洋平, 鳥羽陽, 加熱式たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の定量とたばこスティックの比較 日本薬学会 第 143 年会. 2023.3.25-28. ハイブリッド開催。

吉岡響, 吉田さくら, 安孫子ユミ, 戸次加奈江, 稲葉洋平, 鳥羽陽. 電子たばこ主流煙中に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の分析 フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2023.9.12-13 (広島) 同要旨集。

鳥羽陽, 吉岡響, 吉田さくら, 安孫子ユミ, 戸次加奈江, 稲葉洋平, 電子たばこ製品の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素キノン類の定量 日本薬学会 第 144 年会. 2024.3.28-31 (横浜) 同要旨集。

稲葉洋平, 磯部秀太, 飯島健太郎, 戸次加奈江, 鳥羽陽, 内山茂久, 牛山明, 加熱式たばこ互換機の主流煙に含まれる多環芳香族炭化水素の分析 日本薬学会 第 144 年会. 2024.3.28-31 (横浜) 同要旨集。

3. その他

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

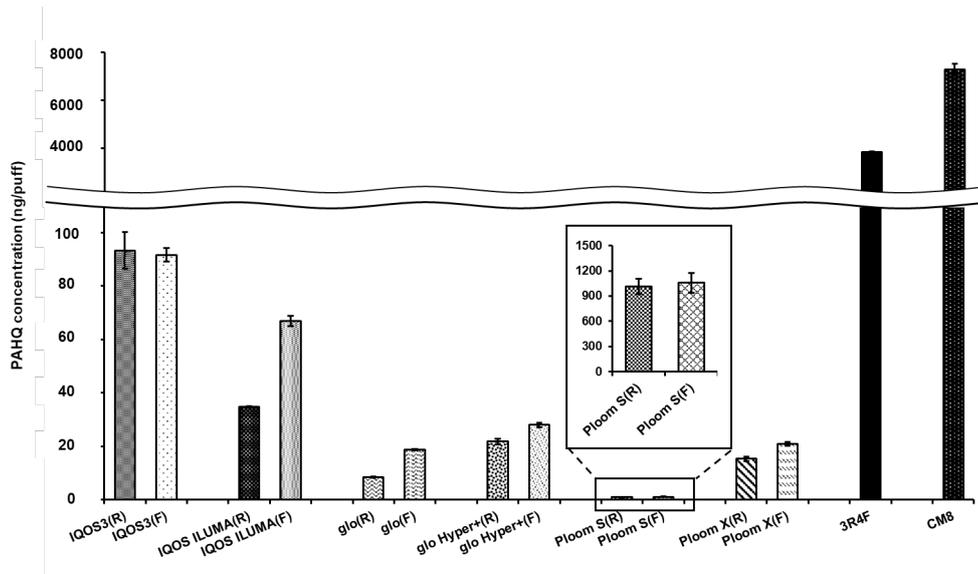


図1 加熱たばこ主流煙中の総 PAHQ 濃度

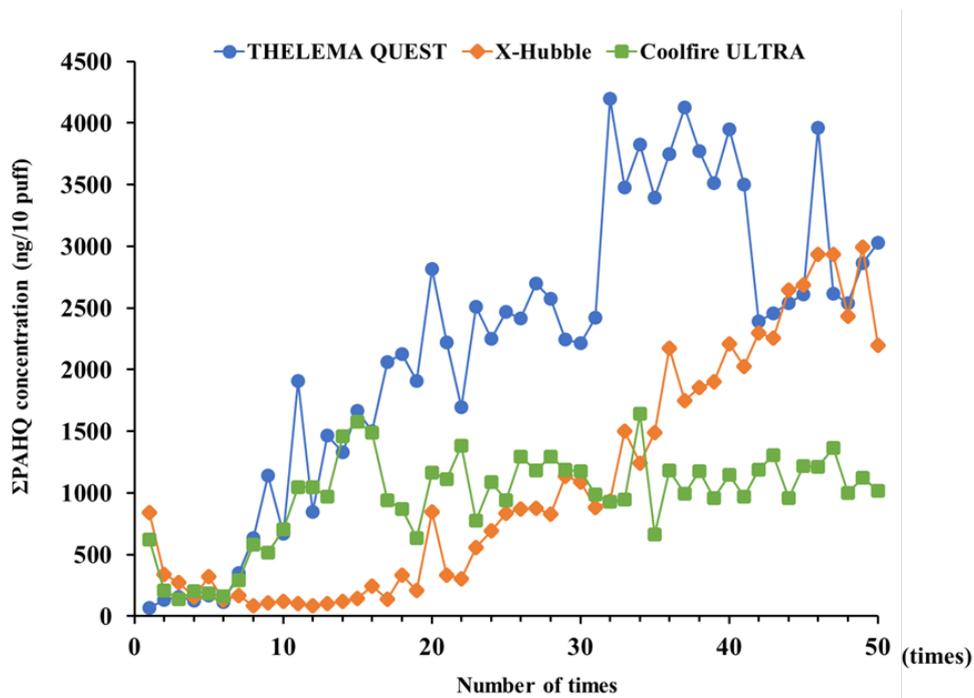


図2 電子たばこの連続使用による主流煙中総 PAHQ 濃度の変化

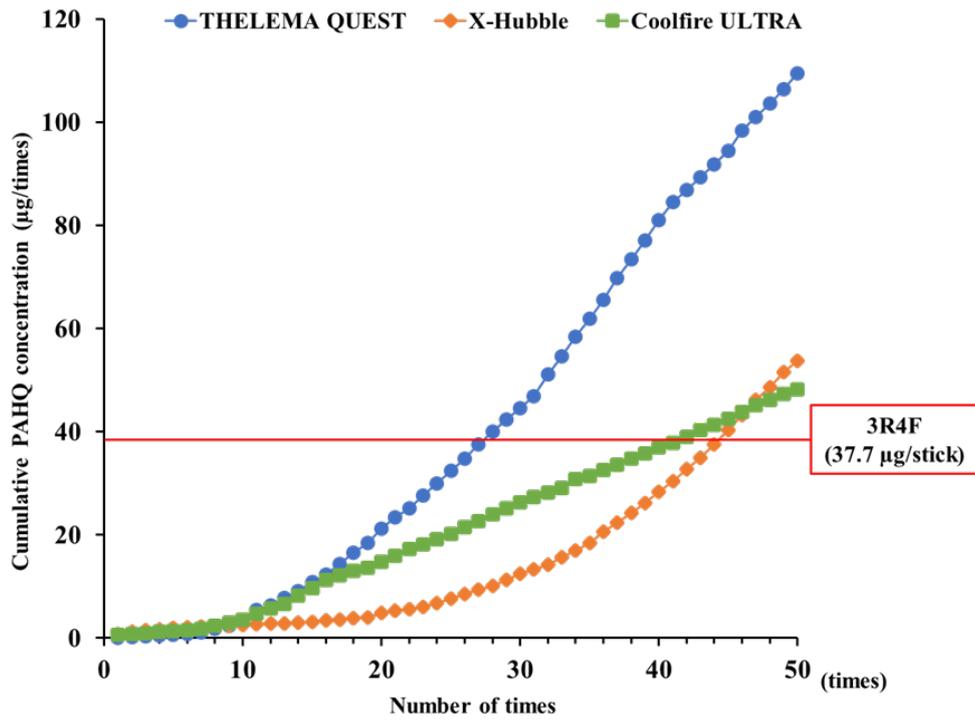


図 3 電子たばこの連続使用による使用回数ごとの PAHQ 累計濃

令和 5 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)
総合研究報告書 (2021-2023)

紙巻たばこの加熱式喫煙における主流煙中の水銀に関する研究

研究代表者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院
分担研究者 杉田 和俊 麻布大学獣医学部

研究要旨

近年、加熱式たばこは若い世代を中心に使用され、JT 等の専用加熱式たばこの他に、紙巻たばこを加熱して喫煙するデバイスも販売されており、喫煙形態が大きく変化している。また、加熱式たばこは販売されてから 10 年程度の歴史しかないことに加え、フレーバー等の蒸気を加えたものなど多様な形態があり、人への健康影響が不明な点も多い。そこで、本研究では、たばこに含まれる水銀等の金属の挙動に関する研究の一環として、加熱式として喫煙できる喫煙デバイスで標準たばこ(3R4F Research cigarettes, University of Kentucky)を電気炉で加熱し発生する水銀の測定、及び静電捕集によるその他の重金属と水銀の同時捕集を検討した。

その結果、水銀は 100°C 以上で温度の上昇に従って発生量が増加することが分かった。また、デバイス(加熱装置)の温度制御の劣化による発生量のばらつきが示唆された。静電捕集を用いた金属と水銀の同時測定では水銀の捕集は静電捕集装置に影響されないことが分かった。また、静電捕集された金属類は通常の紙巻たばことして発生する量よりも加熱式喫煙の方が低いことが分かった。しかし、静電捕集を用いた同時捕集については、測定精度を向上させ、測定できる元素数を増やす必要がある。

A. 研究目的

健康増進法が 2020 年 4 月に改定され、受動喫煙対策が強化された結果として、たばこ葉を燃焼させない加熱式たばこが 20~30 歳台の若年層を中心に広がっている。加熱式たばこは、2013 年以降に日本国内での販売が開始され、約 10 年以上が経過し、すでに喫煙者において 20% を超えるシェアを占めている。直接たばこ葉を加熱するタイプや加熱した液体をたばこ葉に通過させるなど、いくつかの喫煙方式がある。近年では、紙巻たばこを加熱式として喫煙できるデバイスも販売されており、喫煙方法がさらに多様化している。他方、水銀は、日本では水俣病に代表される有機水銀汚染、世界では金鉱山や金属製錬などに伴う無機水銀汚染などが

報告されており、世界各国では未だに代表的な環境汚染物質となっている。たばこ葉には様々な重金属が含まれていることが報告されており、主流煙中でも同様の金属類が検出され、人への暴露影響が懸念されている。

そこで、本研究ではたばこ葉及び主流煙に含まれる水銀を測定し、たばこやデバイス(加熱装置)の比較を行うと共に移行率を求めた。最終年度では、水銀の捕集とその他の金属の同時捕集について検討した。

B. 研究方法

1. 使用たばこと試験機 (デバイス)

市販のたばこについて国内で販売されてい

る日本たばこ株式会社とフィリップモリスジャパンの加熱式たばこのうちそれぞれ 14 銘柄と 16 銘柄、及び標準たばこ（3R4F）を用いた。試用した加熱デバイスは 7 種類とした。7 種類のうち 6 種類で温度調節が可能であり、4 種類がたばこを挿入する挿入方式、3 種類がたばこ葉を充填する充填方式であった。

2. 主流煙中水銀の捕集及び測定

主流煙中の水銀は、水銀マニュアル（環境省）に若干変更を加え、0.6%過マンガン酸カリウム（試薬特級 富士フィルム 和光純薬株式会社）水溶液と硫酸水溶液（有害金属測定用 富士フィルム和光純薬工業株式会社）

（1+15）を等量今後したもの吸収液とした。この吸収液 15ml をインピンジャー1 本に入れ、HCl モード Health Canada Intense TC-115) による機械式喫煙モードにより発生したたばこ 5 本分の主流煙を捕集した。捕集後、ホットプレート上で過マンガン酸カリウム溶（吸収液と同じもの）を加えながら、過マンガン酸カリウムの紫色が消えなくなるまで加熱分解した。水銀測定の直前に 10%ヒドロキシルアミン塩酸塩（試薬特級 和光純薬工業）溶液を添加し、過マンガン酸カリウム溶液の紫色を脱色し、20mL に定容し、全量を水銀測定試料とした。

たばこ葉中の水銀は水銀マニュアル(環境省)に若干変更を加え、肉厚のメスフラスコ（50mL）に試料約 0.5g を計り取り、水 1mL、硝酸（電子工業用 含有率 61% 関東化学株式会社）- 過塩素酸（有害金属測定用特級試薬 60% ナカライテスク株式会社）を等量混合したもの 4mL 及び硫酸（有害金属測定用 富士フィルム和光純薬工業株式会社）5mL を加え、ホットプレート上で1時間の加熱分解を行った。冷却後、水を加え 50mL に定容し、水銀測定用試料とした。

水銀測定は、水銀測定用試料 20mL をガラス製測定容器に入れ、硫酸（富士フィルム和光純薬株式会社、有害金属測定用）（1+1） 1mL 及び 10%塩化すず（塩化すず(II)二水和物、富士フィルム和光純薬株式会社、有害金属測定用）水溶液 1mL を添加し、発生した水銀蒸気を空気中でセルに導き吸光度を測定した。水銀の吸光度測定は Mercury Analyzer HG400（平沼産業株式会社）を用いた。水銀の定量には水銀標準試薬（Hg 100, 富士フィルム和光純薬株式会社）を適宜希釈して用いた。

3. 主流煙中重金属及び水銀の同時捕集及び測定

たばこ主流煙中重金属及び水銀の捕集は自動喫煙装置（LX20, BORGWALD KC 製）に静電捕集装置（High Voltage Generator HV1, BORGWALD KC 製）を設置し、その後に硫酸酸性過マンガン酸カリウム吸収液の入ったインピンジャー2 本を取り付けて行った。喫煙法は、ヒトの喫煙行動に類似したカナダ保健省が推奨する HCl 法（吸引量 55mL/回）とした。HCl 法では、フィルター部分の通気孔をテープで完全に塞いで捕集を行った。金属類の捕集には自動喫煙装置に接続した静電捕集装置を用い約 17.5 kV の電圧を維持しガラス管の表面にタールや粒子を捕集した。さらに、静電捕集装置の後に硫酸酸性過マンガン酸カリウム水溶液を吸収液としたインピンジャー2 本で水銀を捕集した。試料はガラス管 1 本あたりたばこ主流煙 5 本分を捕集し 1 試料とし、3 回の測定を実施した。

たばこ主流煙の金属類の分析は、捕集後のガラス管をメタノール（LC/MS 用、和光純薬工業）でバイアルに洗い込み、窒素気流下でメタノールを除去した。これを少量の硝酸（関東化学）でテフロン製の分解容器に洗い込みマイクロウェーブで分解し、ICP-MS 測定

用試料とした。ICP-MS 測定では混合標準液を 0.1, 1, 10, 100, 1000 ng/mL の濃度に酸濃度を試料溶液と合わせた硝酸水溶液で希釈し、検量線を作成し定量した。

C. 研究成果

1. 加熱式たばこのたばこ葉及び主流煙に含まれる水銀含有量

加熱式たばこは、加熱温度がデバイスにより異なっているのが大きな特徴である。JT では 40°C および 295°C, PM では 350°C と加熱温度が公開されていないデバイスがあった。測定結果は、たばこ葉中の水銀含有量は 1 本当たり平均 3.4ng, 主流煙では 1 本当たり平均 0.71ng であり、移行率は平均で 22% となった。JT では低温加熱のデバイスがあり、この主流煙中水銀含有量は 1 本当たり平均 0.13ng と他の約 1/5 程度で有意な差が認められた。PM のたばこ葉中の水銀含有量は平均で 3.8ng, 主流煙中水銀含有量では、1 本当たり平均 1.8ng と JT の主流煙中水銀含有量の約 2 倍であった。

両者の比較を Fig.1 に示す。たばこ葉中水銀含有量、主流煙中水銀含有量および移行率で有意差を確認したところ、たばこ葉中水銀含有量では有意差は認められないものの、主流煙中水銀含有量および移行率において有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

水銀のたばこ葉から主流煙への移行について JT では加熱温度が 40°C, 200°C 及び 240°C 以上であり、加熱温度間で移行値率に差が認められ、加熱温度が高いほど移行率が高い傾向が認められた。PM では葉から主流煙への移行率は銘柄に関係なく 40% 程度であった。以上の結果から、葉から主流煙への移行については温度が要因となっていることが示唆された。

2. 紙巻たばこの加熱式喫煙による主流煙中の水銀含有量

標準たばこ (3R4F) の水銀含有量は平均で 15.4 ± 0.84 ng/g, 1 本あたりの水銀含有量は 11.4 ± 0.62 ng であった。この標準たばこを用いて各喫煙デバイスで加熱し、HCl による喫煙方法で得られた主流煙中の水銀含有量を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。喫煙デバイスのうち温度調節ができるもの 6 種類については、加熱温度の設定は最低温度と最高温度に設定し、試料採取時に加熱部の温度を測定した。加熱デバイスによっては温度計が挿入できないものもあり、その場合は試料採取とは別に加熱温度を測定した。Table 1 に温度設定と実測温度を記載した。また、試料 A, B, C, D は紙巻たばこを加熱デバイスにそのまま挿入する方式 (挿入方式) であり、試料 E, F, G はたばこ葉 0.2 g を加熱デバイス内に充填する方式 (充填方式) であった。

まず、たばこ 1 本あたりの主流煙中水銀量の全平均は 2.6 ± 1.4 ng, 最低が 0.7ng, 最高 5.3ng で、低温と高温の比率 (L/H) を条件間で比較したところ、予想に反し低温条件下で主流煙中水銀が多く含まれていた。しかし、試験時の加熱温度は低温時も高温時も 40°C 以上の大きな差は認められなかった。40°C を超える差は充填方式 2 種類認められ、その 2 種類では高温加熱で主流煙中水銀濃度は高いことが認められた。

そこで、温度条件による主流煙への移行を検証するため、一定流量で吸引し、発生した水銀量を測定した結果を Fig. 3 に示す。その結果、50~100°C では 2.2 ± 0.26 ng/g とほぼ一定の水銀が発生し、100°C 以上で温度が上昇するに従って、水銀の発生量の上昇が認められ、250°C では 23ng/g でほぼ頭打ち状態に達した。

3. 水銀と金属類の同時捕集に関する検討

水銀とその他の重金属の同時捕集を検討した。水銀のインピンジャー捕集の前に重金属の捕集として静電捕集法を行った。メタノールで回収したタール状の試料を揮発乾固させ、硝酸

を用いて分解容器に洗い込み、マイクロウェーブ分解した。分解後、定容し、ICP-MSで測定した。測定対象化合物は変動等が少なかった、Be, Cr, Mn, As 及び Cd の 5 元素とした。その結果を Table 3 に示す。まず、同時測定における主流煙中の水銀濃度は、2.7ng/cig 及び 4.6ng/cig で、昨年度の水銀のみ捕集した場合 (2.2 ng/cig 及び 3.0 ng/cig) と同程度であり、同時捕集による静電捕集による影響は認められなかった。

ICP-MS による主流煙中金属分析では、先行研究で報告されていた 3R4F の紙巻たばことしての主流煙中濃度を比べた。その結果を Table 2 に示す。その結果、Cr で 1/5, Mn 及び As では同等以下、Cd では 1/3 程度と加熱式喫煙で得られた主流煙で低い含有量であった。

D. 考察

本研究結果から、加熱式たばこのたばこ葉には 1 本当たり平均 3.3ng(0.6~6.8ng)の水銀が含まれており、紙巻たばこ(平均 13.6ng/cig)の約 1/4 であった。加熱式たばこのたばこ葉重量は約 0.25g であり、紙巻たばこ (たばこ葉重量約 0.6g) の約 40%になっていることが要因の 1 つであると考えられる。また、低温加熱式 (40°C) では移行率が 3%, 高温加熱式 (200~350°C) に比べると 1/10 以下でありデバイスの加熱温度が主流煙中の水銀濃度に大きく影響することが示唆された。

また、紙巻たばこの加熱式喫煙による主流煙中に含まれる水銀含有量は低温度条件で低いことが予想されたものの、低温度で高くなる事例も多く認められた。温度設定による温度差は小さく、40°C以上の差が認められた 2 つの条件下では低温よりも高温で高く、主流煙中の濃度差が認められた。そこで、温度と主流煙中の水銀量を検証した結果、100°C以上で温度の上昇に伴い比例的に水銀の発生量が増加した。このことから、水銀の発生については温度に比例し

て大きくなることが分かった。

次に、紙巻たばこを用いた加熱式喫煙の静電捕集による金属の捕集の検討では、水銀を捕集するインピンジャーの前段に静電捕集を配置することで、水銀とその他の金属の同時捕集することを目的とした。水銀捕集に対して静電捕集の影響はほとんど認められなかった。また、測定できた 5 元素の結果では、加熱式喫煙による場合では紙巻たばことして捕集された量と比較すると元素による違いが認められ、Cr では 1/5, Mn 及び As では同等以下、Cd では 1/3 程度と加熱式喫煙で得られた主流煙で低い含有量であった。

E. 結論

市販の加熱式たばこの葉に含まれる水銀は 1 本あたり 3~4 ng で、たばこ葉量の違いに起因するものであった。主流煙中の水銀含有量は 1 本あたり 1~2ng であり、デバイスによる加熱温度に比例して主流煙中の水銀含有量が高くなる傾向が示唆された。紙巻たばこの加熱式喫煙では、喫煙温度の制御が悪く、設定した燃焼温度では差は認められなかった。しかし、たばこ葉の加熱試験により 100°Cまでは一定の発生量で 100°Cを超えると温度に比例し発生量することから、温度が高いほど主流煙中の水銀含有量は高くなることが分かった。また、静電捕集は水銀捕集にはほとんど影響しないことが分かった。静電捕集による同時捕集では測定できた 5 元素では元素により燃焼式と同等か低い含有量であった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Kazutoshi SUGITA, Hiroshi SATO, Sample Introduction Method in Gas Chromatography (Review), Anal. Sci. Vol.37. pp159-165, 2021.

Kazutoshi SUGITA, Junpei YAMAMOTO, Kimika KANESHIMA, Chika KITAOKA-SAITO, Masashi SEKIMOTO, Osamu ENDO, Yukihiro TAKAGI, Yuko KATO-YOSHINAGA, Acrylamide in dog food, Fundam. Toxicol. Sci. pp49-52, 2021.

Keisuke Sugimoto, Kazutoshi Sugita, Kensuke Orito and Yoko Fujii, S Repeated-Dose Pharmacodynamics of Pimobendan in Healthy Cats, Animals, 12, 981. <https://doi.org/10.3390/ani12080981>, 2022.

Kei Kazama, Kazutoshi Sugita, and Ken Onda, Trace element concentrations in blood samples from dairy cows with uterine torsion and their neonatal calves. Veterinary World, 16(12): 2533–2537, 2023.

2. 学会発表

杉田和俊, 久保美千代, 中野佳彦, 福田健 犬被毛中水銀の汚染源の推定, 日本毒性学会 生体金属部会主催 メタルバイオサイエンス研究会 2021, 2021.

杉田和俊, 小林寛, 稲葉洋平, P-82 加熱式たばこの水銀含有量. 第 30 回 環境化学討論会, 2022.

杉田和俊, 稲葉洋平, P-112 土紙巻たばこの加熱式喫煙における水銀の主流煙への移行率. 第 31 回 環境化学討論会, 2023.

竹本好, 杉田和俊, 遠藤治, P150 土壌の塩素処理における変異原性物質の推定. 第 31 回 環境化学討論会, 2023.

林原茜, 杉田和俊, P-137 イヌにおける歯石沈着の程度と口腔ガス中 VSC 濃度の関係. 第 31 回 環境化学討論会, 2023.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特にな

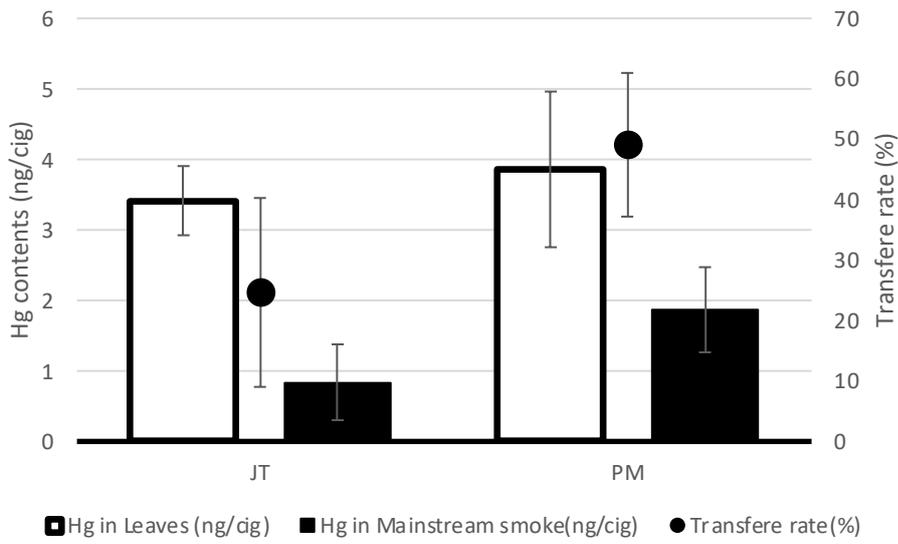


Fig.1 Comparison of mercury content and transfer rates of tobacco leaves and mainstream smoke in two companies

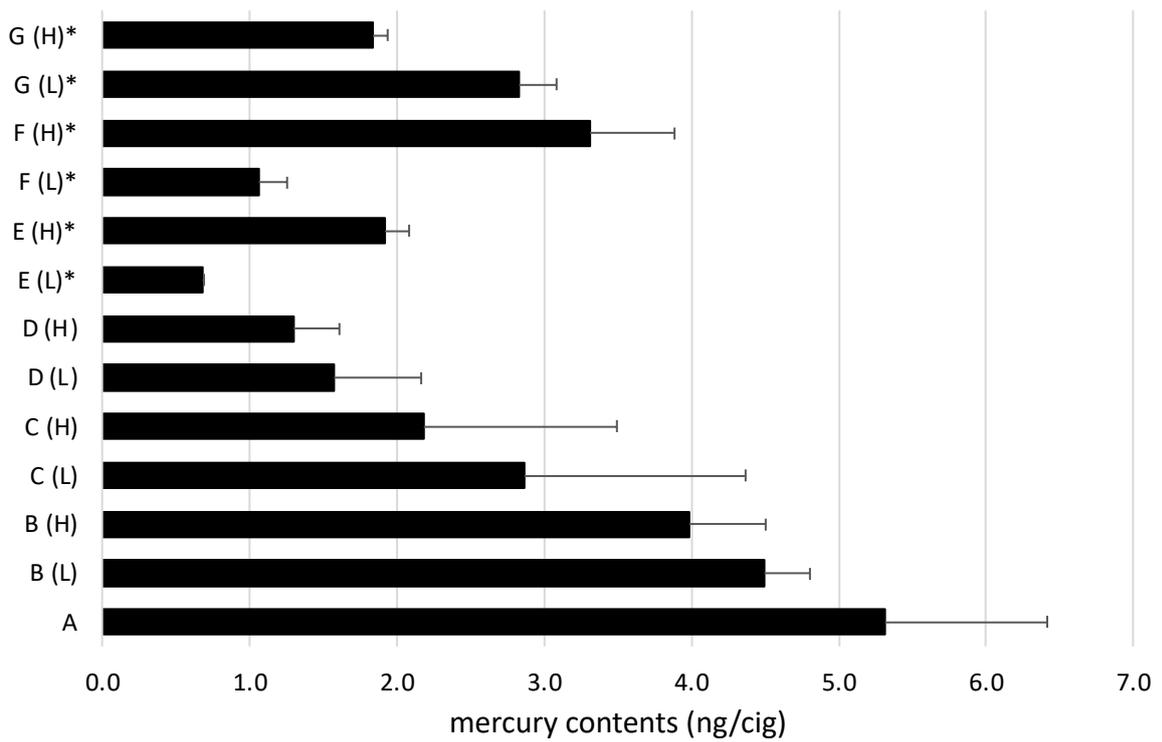


Fig. 2 mercury contents in mainstream smoke

Table 1 Mercury concentration in cigarette mainstream smoke

specimen	Filling type	Temp. setting	Measured temp.(°C)	Hg concentration (ng/cig)	SD (ng/cig)	RSD (%)	transfer rate (%)	Conc. Ratio L/H
A	1 peace	–	142	5.3	1.1	20.6	46.5	–
B	1 peace	L	233	4.5	0.3	6.8	39.4	1.13
		H	264	4.0	0.5	13.1	34.9	
C	1 peace	L	310	2.9	1.5	52.7	25.0	1.31
		H	317	2.2	1.3	59.9	19.1	
D	1 peace	L	199	1.6	0.6	38.2	13.7	1.21
		H	220	1.3	0.3	23.9	11.4	
E	0.2g	L	169	0.7	0.0	0.9	21.9	0.34
		H	218	1.9	0.2	8.7	62.0	
F	0.2g	L (160°C)	146	1.1	0.2	17.9	34.3	0.22
		H (240°C)	223	3.3	0.6	17.1	107.3	
G	0.2g	L (199°C)	190	2.8	0.3	9.0	91.6	1.47
		H (216°C)	203	1.8	0.1	5.5	59.4	

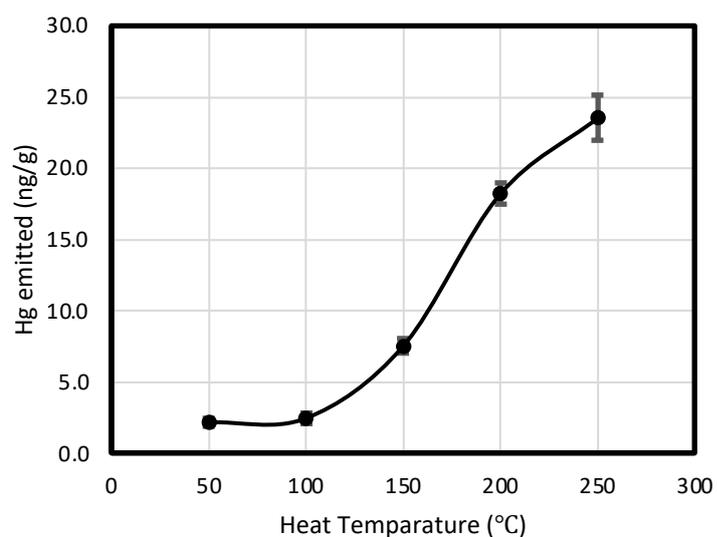


Fig. 3 The relationship between mercury emission and heated temperature

Table 2 Heavy metals concentration in the mainstream smoke from heated tobacco smoking with standard cigarette (3R4F)

	Mainstream (ng/cig) 3R4F	Tobacco leaf (ng/cig) 3R4F*	Ratio (Mainstream/Tobacco Leaf)	Mainstream (ng/cig) 3R4F**
Be	< 0.5	10 ± 2	-	<0.01
Cr	2.0 ± 1.2	1,110 ± 10	0.0018	11.4 ± 2.52
Mn	3.1 ± 1.3	127,000 ± 9,280	0.000024	4.51 ± 2.11
As	4.0 ± 0.6	220 ± 30	0.018	6.94 ± 0.46
Cd	31.7 ± 5.7	820 ± 40	0.039	103 ± 3.50
Hg	2.2~4.6	11.4 ± 0.62	11.4 ± 0.62	2.2~4.6

* : Inaba et al. 2023

** : 紙巻たばことして主流煙中含有量, Inaba et al. 2023

令和3-5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

加熱式たばこの副流煙分析および受動喫煙環境下のシミュレーション評価 (令和3-5年度総括)

分担研究者 李 時桓 名古屋大学

研究要旨

喫煙によって発生するタバコの煙は、主流煙と副流煙の両方の発がん物質として定義され、人の健康への危険性が広く認識されている。したがって、喫煙室などの屋内空間では、喫煙によって発生する汚染物質を効率的に除去するための換気設計が必要である。最近では、加熱式タバコ（紙巻き状の非燃焼加熱式タバコ）は従来の紙巻式タバコより発生する副流煙が少ないため、加熱式タバコ専用の室内喫煙エリアも設置されている。しかし、加熱式タバコによる健康への危険性はまだ明らかになっておらず、室内環境における受動喫煙による有害性及びその健康影響については明確な検討事例が少ない。第1章では、喫煙時の加熱式タバコ呼吸特性と汚染物質の発生を実測により定量的に分析し、呼吸特性を適用した解析モデルを提案することで化学種物質の挙動特性を明らかにし、それらの結果をもとに第2章では、非定常計算用の数値解析モデルを構築し、構築した数値解析モデルを用いて受動喫煙防止のために喫煙者と受動喫煙者の離れた距離による有害物質の摂取量について定量的に検討した。第3章では実測によるエアバリア最適風速の検証と第1, 2章の結果をもとに数値モデルと飲食店舗モデルを構築し、受動喫煙防止のためのエアバリア型テーブルの提案・検討を行った。

はじめに

喫煙によって発生するタバコの煙は、主流煙と副流煙の両方の発がん物質として定義¹⁾され、人の健康への危険性が広く認識されている。したがって、喫煙室などの屋内空間では、喫煙によって発生する汚染物質を効率的に除去するための換気設計が必要である。最近では、加熱式タバコ（紙巻き状の非燃焼加熱式タバコ）は従来の紙巻式タバコより発生する副流煙が少ないため、加熱式タバコ専用の室内喫煙エリアも設置されている。しかし、加熱式タバコによる健康への危険性はまだ明らかになっておらず、室内環境における受動喫煙による有害性及びその健康影響については明確な検討事例が少ない。

第1章（令和3年度）では、喫煙時の加熱式タバコ呼吸特性と汚染物質の発生を実測により定量的に分析し、呼吸特性を適用した解析モデルを提案する

ことで化学種物質の挙動特性を明らかにすることを目的とする。第2章（令和4年度）では、非定常計算用の数値解析モデルを構築し、構築した数値解析モデルを用い、受動喫煙防止のために喫煙者と受動喫煙者の離れた距離による有害物質の摂取量についての定量的な検討を行う。第3章（令和5年度）では、実測と数値解析モデルをもとに飲食店舗（加熱式たばこ専用室）で飲食する非喫煙者の受動喫煙曝露評価を行う。また、受動喫煙防止のためのエアバリア型テーブルの提案し、その効果を明らかにする。

第1章 加熱式タバコの喫煙による呼吸特性と化学種物質の挙動特性（令和3年度）

1.1 研究目的

第1章（令和3年度）では、喫煙時の加熱式タ

バコ呼吸特性と汚染物質の発生を実測により定量的に分析し、呼吸特性を適用した解析モデルを提案することで化学種物質の挙動特性を明らかにすることを目的とする。

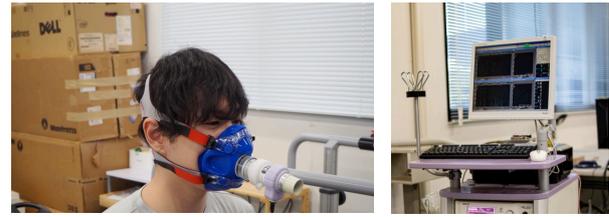
1.2 研究方法

(1) 実測による喫煙時の呼吸特性

本研究（第1章）では、喫煙時の呼吸特性を検討するために、呼吸流量の測定を行う。同時に、汚染源を二酸化炭素（CO₂）として呼気 CO₂ 濃度を測定する。**Figure 1** に実測風景を示す。実測機器としては流量と CO₂ 濃度が同時測定可能なエアロモニター（ミナト医科学, AE-310E）を使用する。被験者実測では**Figure 2(a)**に示す呼吸手順（非喫煙5回、喫煙1回）を1サイクルとし、加熱式タバコの喫煙による呼吸特性について複数回測定する。なお、喫煙時は**Figure 2(b)**に示すように呼吸方法を統一している。また、副流煙については、タバコ本体から発生する CO₂ 濃度を測定する。

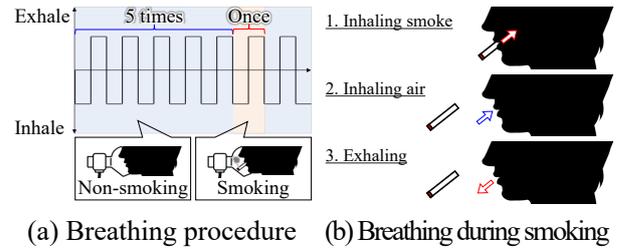
(2) 数値解析による化学種物質の挙動特性

喫煙時の化学種物質発生状況および挙動特性を検討するため、数値解析モデルを作成する。**Figure 3** に解析モデルの概要を示す。解析領域は1.80(x)×1.00(y)×1.00(z) m とし、人体は上半身のみ解析対象とする。**Table 1** に解析条件を示す。呼吸特性は実測と同様に非喫煙時の呼吸5回と喫煙中の呼吸1回を1サイクルとし、呼吸は鼻で喫煙は口で行う。また、加熱式タバコ1スティックあたりの喫煙時間は約6分間であり、喫煙は10サイクル行うと設定する。汚染物質は化学種物質としてCO₂とNicotine（ニコチン）の2種類を対象とし、人体モデルの口と鼻、タバコ先端部を汚染物質の発生源とする。副流煙の発生源は0.01(x)×0.01(y)×0.01(z) m³としてモデル化し、空間内環境のCO₂濃度は1,000 ppm、ニコチンは0 ppbとする。実測で得られた呼吸流量とCO₂濃度、ニコチン濃度を境界条件として与えるが、呼吸から発生するニコチン量は主流煙の30%²⁾とする。数値解析は喫煙1サイクルを非定常計算で行い、発生するCO₂、ニコチン濃度および空気中での挙動特性を確認する。



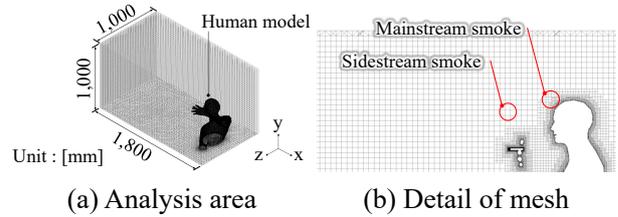
(a) Transducer (b) Aero monitor

Fig. 1 Status of measurement



(a) Breathing procedure (b) Breathing during smoking

Fig. 2 Breathing Method



(a) Analysis area (b) Detail of mesh

Fig. 3 Overview of analytical model

Table 1. Analysis conditions

Items	Contents	
Scheme	SIMPLE	
Turbulence model	Standard k-ε model	
Meshes	Approximately 1,300,000	
Calculation time	60 s (1 cycle)	
CO ₂ emission [ppm] (Mainstream smoke)	Non-smoking	40,000
	Heated tobacco	42,000
CO ₂ emission [ppm] (Sidestream smoke)	1,100	
Nicotine emission [mg/stick] (Mainstream smoke)	1.640	
Nicotine emission [mg/stick] (sidestream smoke)	0.056	
Temperature [°C]	Exhalation	32
	Indoor air	24
	Heated tobacco	47

1.3 結果及び考察

(1) 喫煙時の呼吸特性

Figure 4 に非喫煙時と喫煙時における測定した呼吸特性を示す。呼吸特性と CO₂ 濃度は数回の呼吸を行い、アンサンブル平均化 (ensemble average) した。喫煙時の一呼吸当たりの空気流量は約 2,000 ml となり、非喫煙時の約 600 ml と比べ、約 3.3 倍増加した。

Figure 5 に喫煙 1 サイクル (呼吸 5 回+喫煙 1 回) における呼吸流量, Figure 6 に呼吸 CO₂ 濃度を示す。非喫煙時の最大呼気 CO₂ 濃度は約 40,000 ppm, 喫煙時の最大呼気 CO₂ 濃度は約 42,000 ppm と計測され、喫煙時と非喫煙時における呼気の CO₂ 濃度の差は小さかった。一方、実測された空間内温度は約 24.0 °C (T 型熱電対による測定値) であり、喫煙時の呼吸温度は約 32.0 °C (T 型熱電対による測定値), 加熱式タバコの表面温度は約 47.0 °C (赤外線カメラによる測定値) であった。

(2) 喫煙による化学種物質の挙動特性

Figure 7, Figure 8 に CO₂ とニコチンの解析結果を示す。喫煙による汚染物質発生量および空気中における挙動が再現され、CO₂ は非喫煙, 喫煙時において常に発生し、室内に拡散された。加熱式タバコの場合、副流煙から発生する CO₂ 濃度が約 1,100 ppm として非常に少なく、副流煙から発生する CO₂ は呼吸と比べ室内への影響が小さい結果となった。一方、ニコチンは喫煙時のみ口から発生し、ニコチンの副流煙は CO₂ に比べて大きく室内へ影響を与える結果となった。また、発生した汚染物質は加熱式タバコと人体表面温度により発生する上昇気流に沿って上昇した。

1.4 結論 (第 1 章)

本研究 (第 1 章) では、喫煙時の呼吸特性と化学種物質の挙動特性を定量化することを目的とし、実測と数値解析を行った。実測により得られた呼吸流量と汚染物質を基に数値解析モデルを作成し、喫煙時の化学種物質挙動特性を明らかにした。

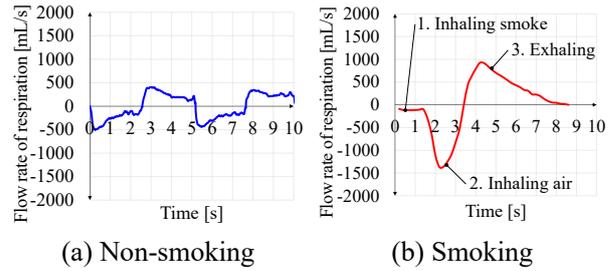


Fig. 4 Respiratory characteristics

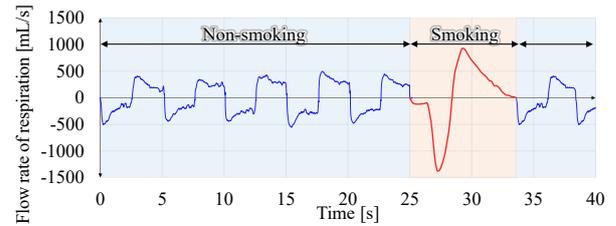


Fig. 5 Fluctuations in flow rate of respiration

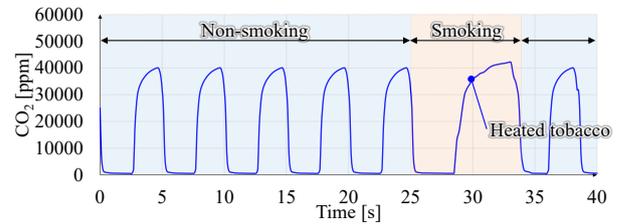


Fig. 6 CO₂ concentration with the tobacco

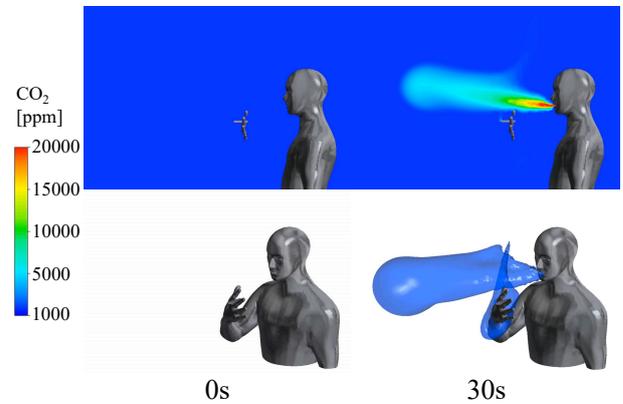


Fig. 7 Analysis results (CO₂)

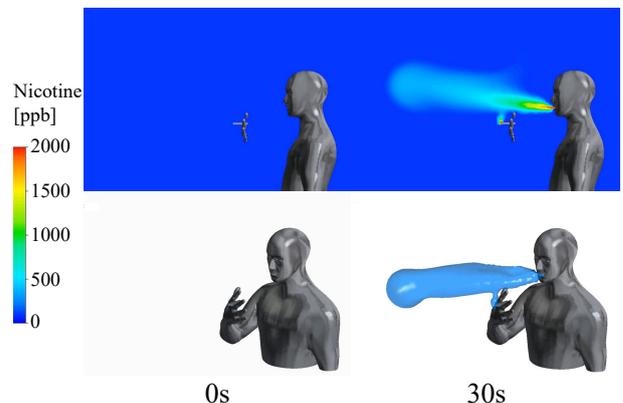


Fig. 8 Analysis results (Nicotine)

第2章 数値解析による受動喫煙者の有害物質摂取量の評価（令和4年度）

2.1 研究目的

第2章（令和4年度）では、非定常計算用の数値解析モデルを構築し、構築した数値解析モデルを用い、受動喫煙防止のために喫煙者と受動喫煙者の離れた距離による有害物質の摂取量についての定量的な検討を行う。

2.2 研究方法

(1) 数値解析モデルの構築

喫煙際には一般の呼吸と違う喫煙プロセスを持ち、その喫煙プロセスを **Figure 9** に示す。喫煙プロセスは3段階に構成され、① タバコから煙を吸い上げるプロセス (inhaling smoke)、② タバコを口から外して周囲の空気を吸うプロセス (inhaling air)、③ 煙を吐き出すプロセス (Exhaling) で構成される。この喫煙プロセスでの呼吸流量の時系列変化は前年度の研究で測定しており、その結果を呼吸5回と喫煙1回を1セットとして **Figure 10** に示す。主流煙からのCO₂濃度は **Figure 11** に、副流煙から発生するCO₂濃度は **Figure 12** にそれぞれ示す。また、ニコチンについては主流煙から 1.640 mg/stick、副流煙から 0.056 mg/stick であり、数値解析モデルの構築 (**Figure 13** 参照) に活用する。

(2) 数値解析による受動喫煙の影響

実測値をもとに作成した数値解析モデルを用い、喫煙者と受動喫煙者の離れた距離による有害物質の摂取量を検討するための数値解析モデルを作成する。**Figure 14** に数値解析モデルの概要を示す。解析領域は3.00(x)×1.50(y)×2.00(z)mとし、人体は上半身のみ解析対象とする。呼吸特性は実測状況と同様に非喫煙時の呼吸5回と喫煙中の呼吸1回を1サイクルとし、呼吸は鼻で喫煙は口で行う。また、加熱式タバコ1スティックあたりの喫煙時間は約6分間であり、喫煙は10サイクル行うと設定する。汚染物質は化学種物質としてCO₂とニコチンの2種

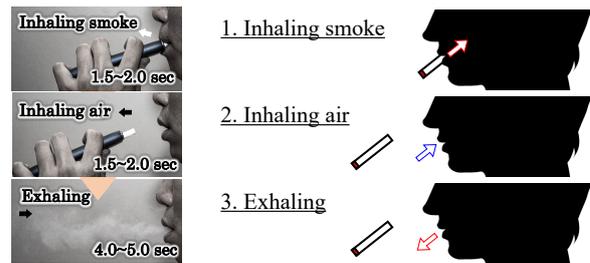


Fig. 9 Breathing characteristics on smoking

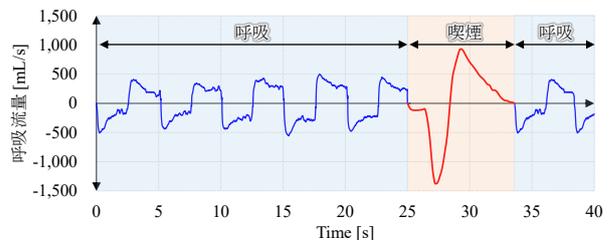


Fig. 10 Fluctuations of flow rate in mainstream

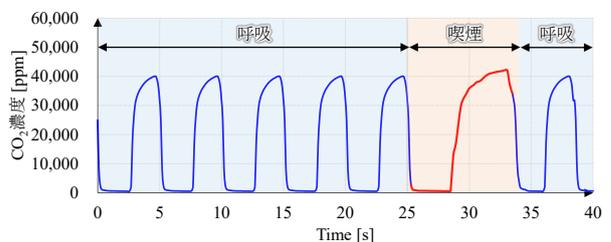


Fig. 11 Fluctuations of CO₂ in mainstream

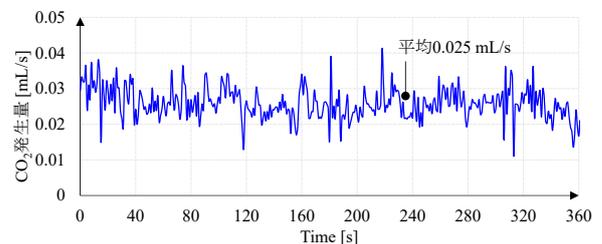


Fig. 12 Fluctuations of CO₂ in sidestream

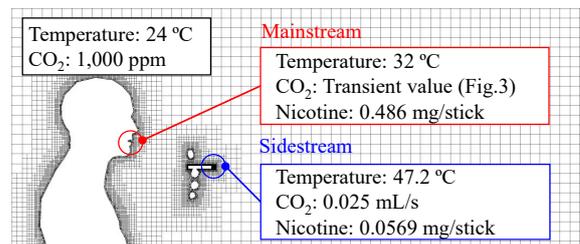


Fig. 13 Numerical model & boundary condition

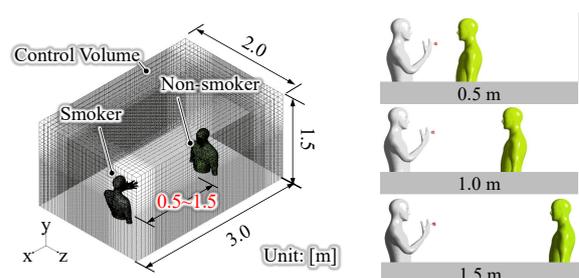


Fig. 14 Overview of evaluation model

類を対象とし、人体モデルの口と鼻、タバコ先端部を汚染物質の発生源とする。副流煙の発生源は $0.01(x) \times 0.01(y) \times 0.01(z)$ m としてモデル化し、空間内環境の CO₂ 濃度は建築基準法で定められている室内環境許容値である 1,000 ppm とし、ニコチンは 0 ppb とする。実測で得られた呼吸流量と CO₂ 濃度、ニコチン濃度を境界条件として与えるが、呼吸から発生するニコチン量は主流煙の 30%²⁾ とする。数値解析は喫煙 1 サイクル (約 360 s (6 分)) を非定常

計算で行い、喫煙者と受動喫煙者間の距離 (0.5 m, 1.0 m, 1.5 m 間隔) による受動喫煙の影響を CO₂ とニコチンの摂取量により定量的に確認する。

2.3 結果及び考察

Figure 15 に数値解析の結果を示す。呼吸時には鼻から CO₂ が出ており、タバコの先端からの副流煙によるニコチンが出ており、温度差による上昇気流が生じる。喫煙する時には喫煙者の口から CO₂

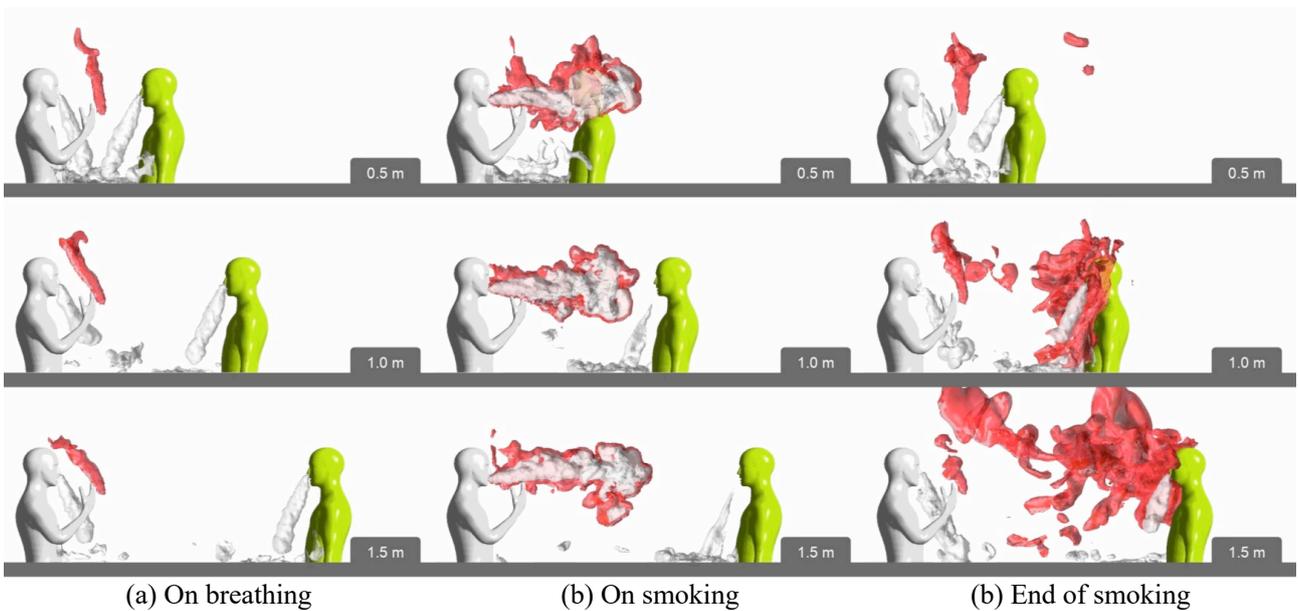


Fig. 15 Analysis results (CO₂: white color, Nicotine: red color)

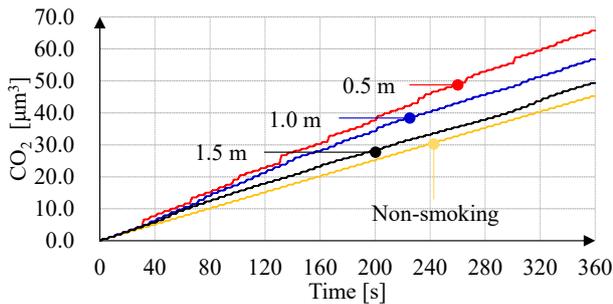


Fig. 16 Cumulative passive smoking (CO₂)

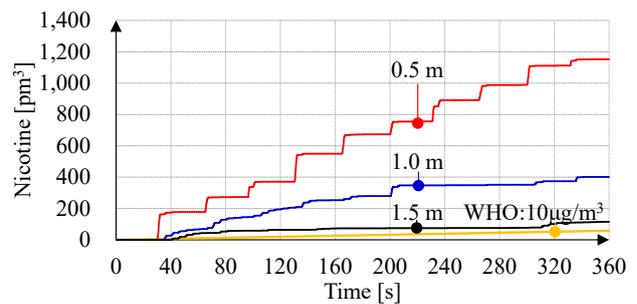


Fig. 17 Cumulative passive smoking (Nicotine)

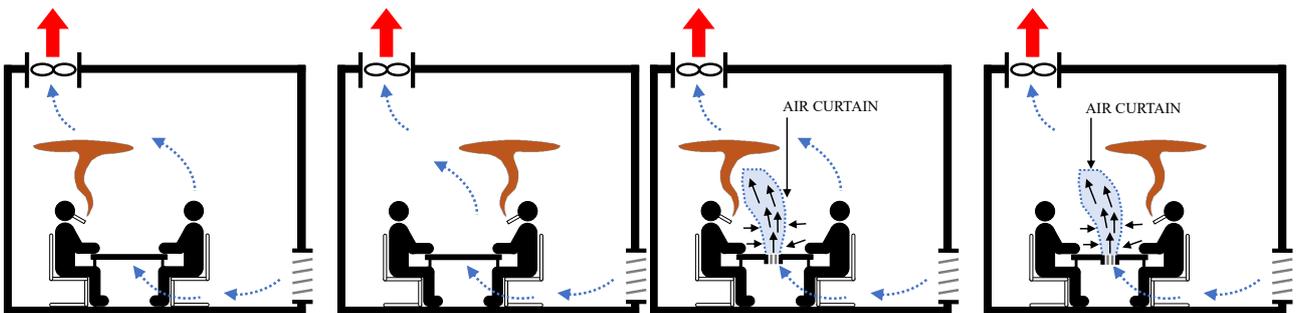


Fig. 18 Future work

とニコチンが両方とも出ており、受動喫煙者まで移流する。喫煙が終了後の一時的には上昇気流に従って流れる有害物質の移動が観測される。

Figure 16 と Figure 17 に喫煙者とある程度離れている受動喫煙者が摂取する CO₂ 濃度とニコチン濃度の累積値を示す。CO₂、ニコチンとも距離が近くなると受動喫煙者の摂取量が増加した。また、WHO ガイドラインによるニコチン 10 μg/m³ と受動喫煙者の呼吸による CO₂ を基準とすると、離れた距離 0.5 m において、加熱式タバコの受動喫煙による影響は、CO₂ が約 145.2% の増加 (45.24 μm³ → 65.70 μm³)、ニコチンが約 1,995% の増加 (57.75 pm³ → 1,152.34 pm³) する結果が見られた。

2.4 結論 (第 2 章)

本研究 (第 2 章) では、加熱式タバコの喫煙状況における非定常計算用の数値解析モデルを構築した。また、構築した数値解析モデルを用い、受動喫煙防止のために喫煙者と受動喫煙者の離

れた距離による有害物質の摂取量を明らかにした。次年度には、本年度に構築した解析モデルをもとに、加熱式タバコ専用の室内喫煙エリア (レストラン、喫茶店など) における受動喫煙の影響を換気方式の違い、エアカーテンの有無などによって検討する予定 (Figure 18 参照) である。

第 3 章 受動喫煙防止のためのエアバリア型テーブルの開発と効果検証 (令和 5 年度)

3.1 研究目的

第 3 章 (令和 5 年度) では、実測と数値解析モデルをもとに飲食店舗 (加熱式たばこ専用室) で飲食する非喫煙者の受動喫煙曝露評価を行う。また、受動喫煙防止のためのエアバリア型テーブル (Figure 19 参照) を提案し、その効果を検討する。

3.2 実態調査

加熱式タバコ喫煙可能店において 10 分間の PM



Fig. 19 エアバリアテーブル

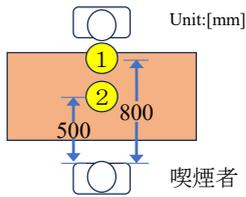


Fig. 20 測定位置

Table 2. 実態調査結果

	PM2.5 濃度 [μg/m ³]	
	1 本	2 本
測定位置①	131.0 μg/m ³	476.8 μg/m ³
測定位置②	526.9 μg/m ³	811.4 μg/m ³

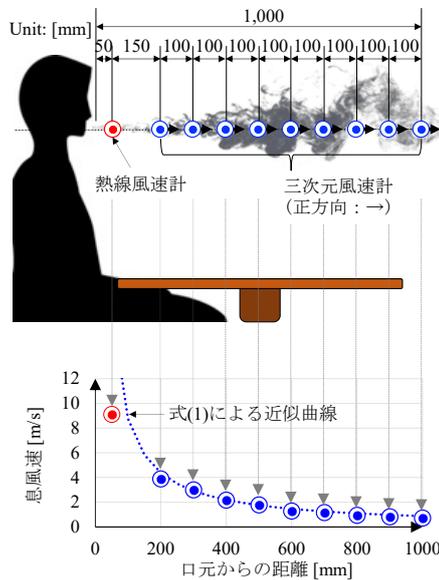


Fig. 22 吹き出し息風速の測定位置と測定結果

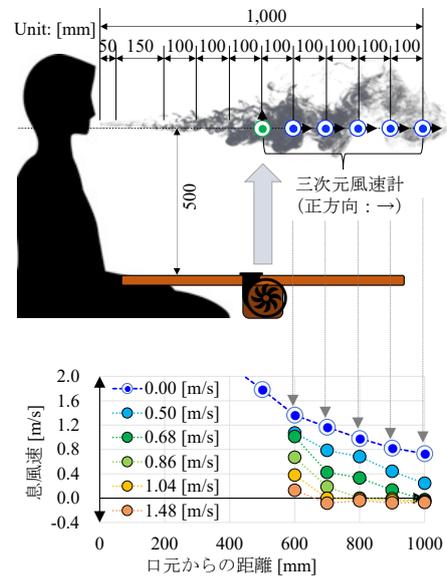


Fig. 23 エアバリア通過後の測定位置と測定結果



(a) PM2.5 粉塵計 (b) 加熱式タバコ



Fig. 24 吹き出し息実測使用機器



Fig. 25 実測風量

2.5 粉塵濃度の実測を行う。喫煙者の口から受動喫煙者の口までの距離を 1,000 mm と仮定し、実測位置を **Figure 20**, 使用機材を **Figure 21** に示す。実測位置①, ②においてそれぞれ加熱式タバコを 1 本と 2 本喫煙する場合の実測を行う。実測結果を **Table 2** に示す。PM2.5 環境基準値では一年平均値が $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下、一日平均値が $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下であることから、受動喫煙者周囲の空気は一時的に環境基準値を大幅に超える結果となった。

3.3 実測によるエアバリア最適風速の検証

(1) 実測方法

エアバリア形成時と非形成時の喫煙を模した吹き出し風速の距離による減衰の実測を三次元風速計 (SONIC CORPORATION WA-340) と熱線風速計 (多点式アネモマスター, HIOKI 1590) を用いて行う。吹き出し風速の測定位置を **Figure 22**, エアバリアを通過後の吹き出し風速の測定位置を **Figure 23**, 使用機材を **Figure 24**, 実測風景を **Figure 25** に示す。エアバリア形成時の吹き出しの実測において、エアバリア風速は約 0.2–1.6 m/s 間を約 0.1 m/s 間隔で変化させる。噴流特性の方程式を式(1)に示す。ここで、 U [m/s]は吹き出し口から x mm 離れた地点の吹き出し風速、 K [-]は吹き出し口定数とし、 D_0 [m]は吹き出し口の直径 12 mm と仮定する。実測では、吹き出し速度 U_0 を実測し、吹き出し口定数 K を求める。

$$U = \frac{K}{x/D_0} U_0 \quad (1)$$

(2) 実測結果

Figure 22 に吹き出し風速の測定結果, **Figure 23** にエアバリア風速ごとのエアバリア通過後の吹き出し風速の測定結果を示す。吹き出し息の測定は各測定位置で 20 回の吹き出しを行い、それらのデータをアンサンブル平均化 (ensemble average) した。実測結果で吹き出し息の初期速度は $U_0=9.119 \text{ m/s}$ となり、式(1)による近似式では $K=8$ であった。口元からの距離 1,000 mm においてエアバリアを通過後の吹き出し息の風速 (U_x) が 0 m/s 以下となる最小エアバリア風速 (U_y) は 0.68 m/s であった。

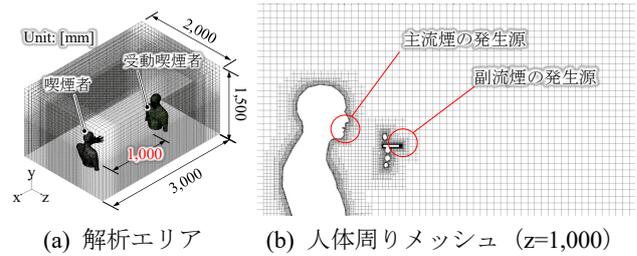


Fig. 26 解析モデル

Table 3. 解析条件

項目	内容	
乱流モデル	LES	
メッシュ	約 130 万個	
呼気 CO ₂ 濃度	呼吸	40,000 ppm
	喫煙	42,000 ppm
ニコチン	呼吸	0 mg/本
	加熱式タバコ	0.482 mg/本
温度	呼気	32 °C
	室内空気	24 °C

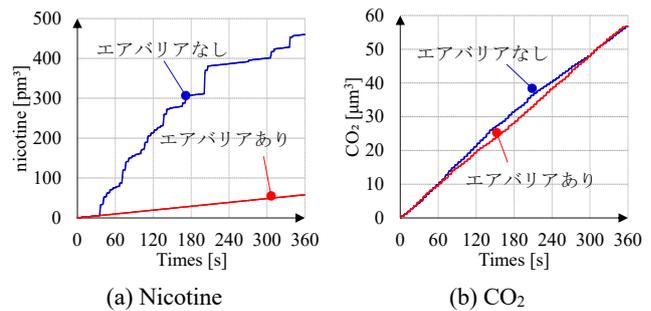


Fig. 27 受動喫煙者が摂取する濃度累積値

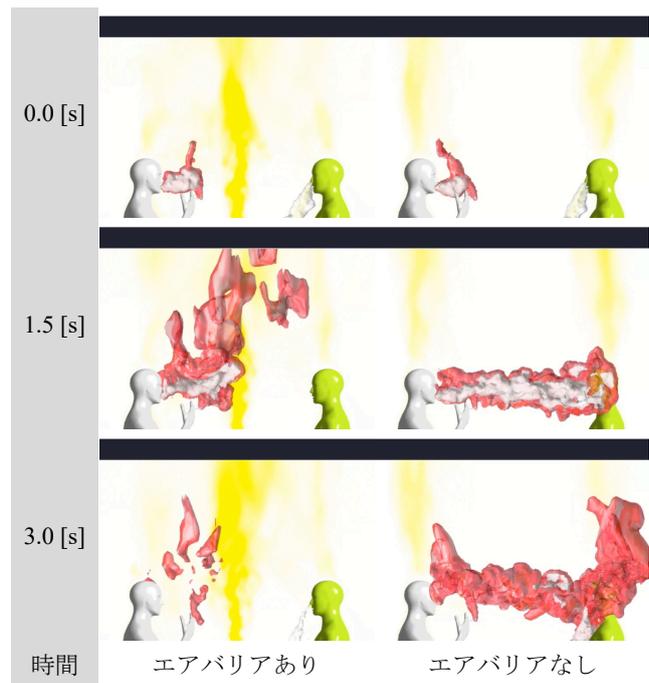


Fig. 28 主流煙の時系列変化

3.4. エアバリア有無による受動喫煙量の検証

(1) 解析条件

エアバリアテーブルによるエアバリア形成時における受動喫煙者の有害物質の摂取量を検討するため、CFD 解析モデルを作成する。Figure 26 に解析モデルの概要を示す。喫煙者と受動喫煙者の中央 (xz 面上) に幅 (x 方向) 40 mm, 長さ (z 方向) 1,000 mm の吹き出し口を設定し、y 方向へ速度 1.0 m/s で吹き出すことにより y=500 mm で 0.68 m/s のエアバリアを形成するものとする。第 1 章の非喫煙時および喫煙時の呼吸特性をもとに解析で用いる呼吸特性は Figure 10 を用いる。呼吸特性は呼吸 5 回と喫煙 1 回を 1 サイクルとし、呼吸は鼻で喫煙は口で行う。加熱式タバコ 1 本当たりの喫煙時間を約 6 分とし、喫煙を 10 サイクル行うと設定する。解析条件を Table 3 に示す。汚染物質は化学物質として CO₂ とニコチンの 2 種類を対象とし、人体モデルの口と鼻、たばこの先端部を汚染物質の発生源とする。副流煙の発生源は 10(x)×10(y)×10(z) mm としてモデル化し、室内環境の CO₂ 濃度は建築基準法で定められている室内環境許容値である 1,000 ppm とし、ニコチンは 0 ppb とする。換気は天井換気とする。呼吸から発生するニコチン量は主流煙の 30%²⁾ とする。数値解析は喫煙 10 サイクルを非定常計算で行い、エアバリアの有無による受動喫煙の影響を CO₂ とニコチンの摂取量により確認する。

(2) 解析結果

Figure 27 に受動喫煙者が摂取するニコチン濃度と CO₂ 濃度の累積値、Figure 28 に主流煙の時系列変化 (赤流体がニコチン、白流体が CO₂, 黄色が気流速度) を示す。受動喫煙者が摂取するニコチン濃度の累積値はエアバリアが形成されていない場合に 459.7 pm³, エアバリアが形成されている場合に 57.8 pm³ となり、87.4%の減少が見られた。受動喫煙者が摂取する CO₂ 濃度の累計値はエアバリアが形成されていない場合に 56.8 μm³, エアバリアが形成されている場合に 56.6 μm³ となり、増減はほとんど見られなかった。

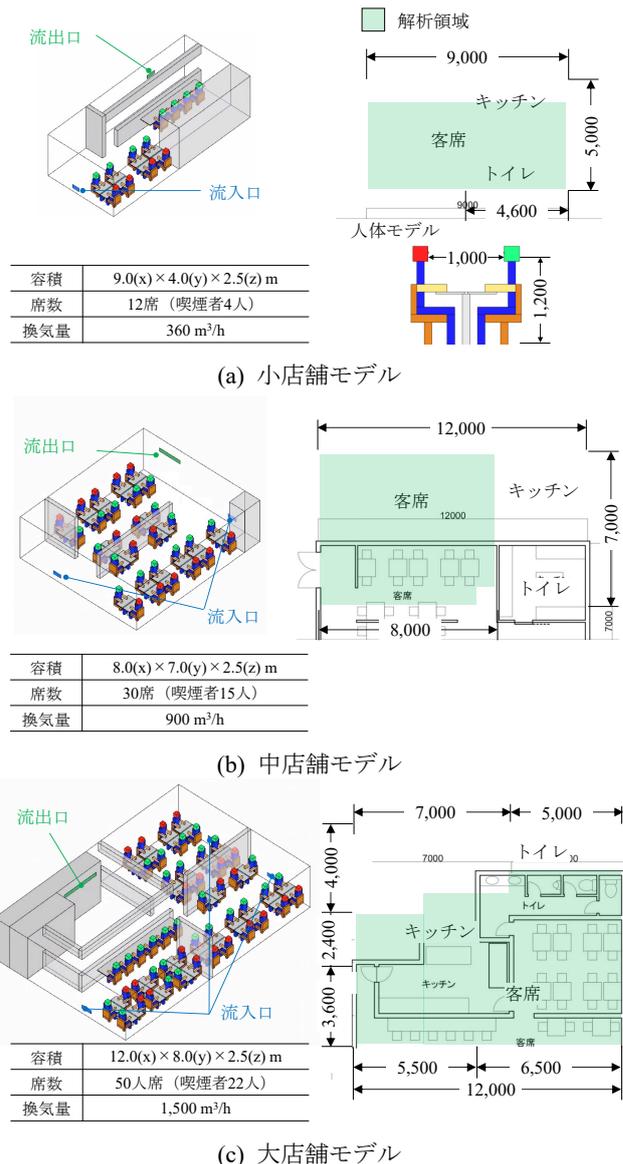


Fig. 29 飲食店舗モデル概要

Table 4. 解析条件

項目	内容	
乱流モデル	高レイノルズ数 k-ε モデル	
時間項	非定常計算	
計算時間	360 s (6 分)	
対象店舗	小店舗	9.0(x)×4.0(y)×2.5(z) m
	中店舗	8.0(x)×7.0(y)×2.5(z) m
	大店舗	12.0(x)×8.0(y)×2.5(z) m
メッシュ	小店舗	約 100 万個
	中店舗	約 200 万個
	大店舗	約 300 万個
呼気 CO ₂ 濃度	呼吸	40,000 ppm
	喫煙	42,000 ppm
ニコチン	呼吸	0 mg/本
	加熱式タバコ	0.482 mg/本
温度	呼気	32 °C
	室内空気	24 °C
人体発熱量	40 W	
換気量	30 m ³ /(h・人)	
外気 CO ₂ , Nicotine	400 m, 0 ppm	

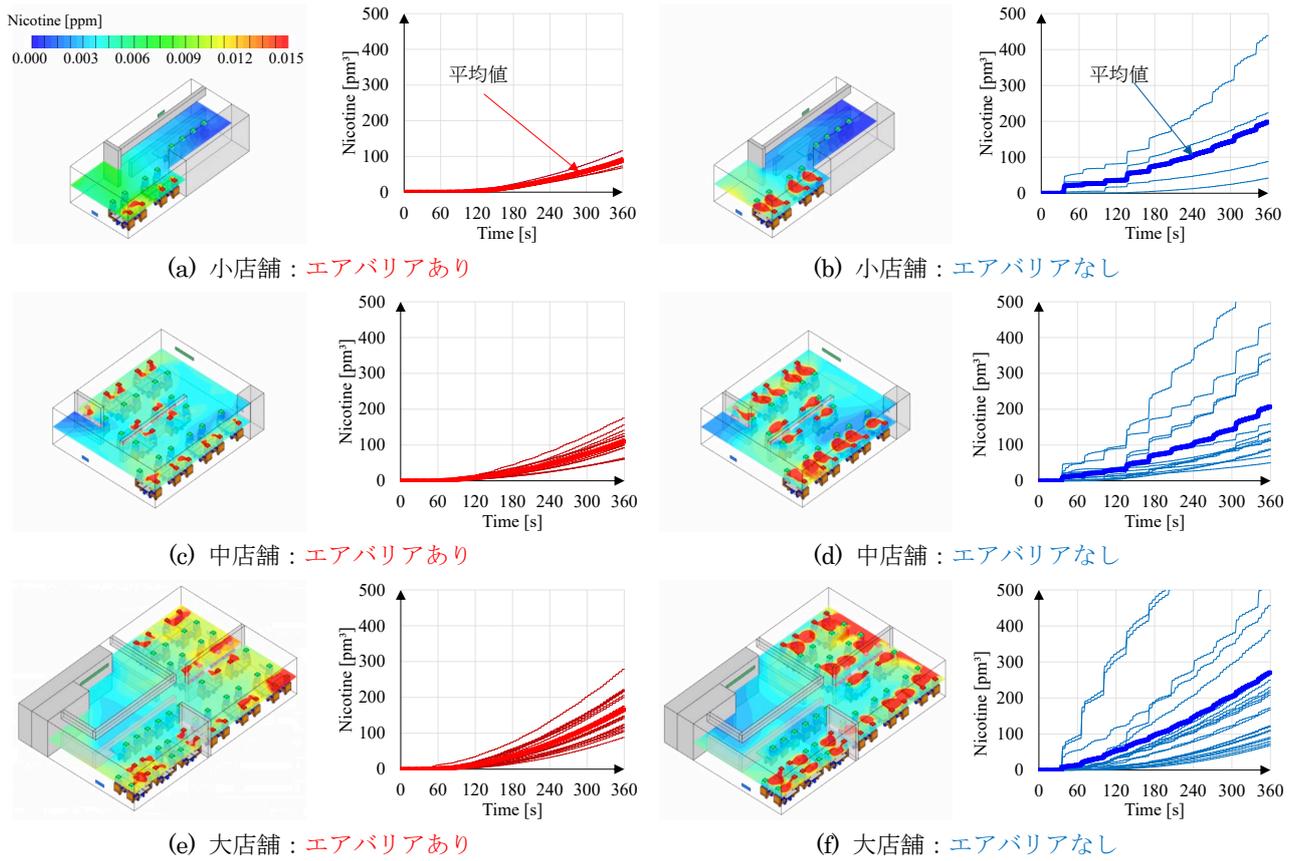


Fig. 30 ニコチン濃度分布 ($z=1.2$ m, 5 分 40 秒時点)・受動喫煙者が摂取する濃度累積値

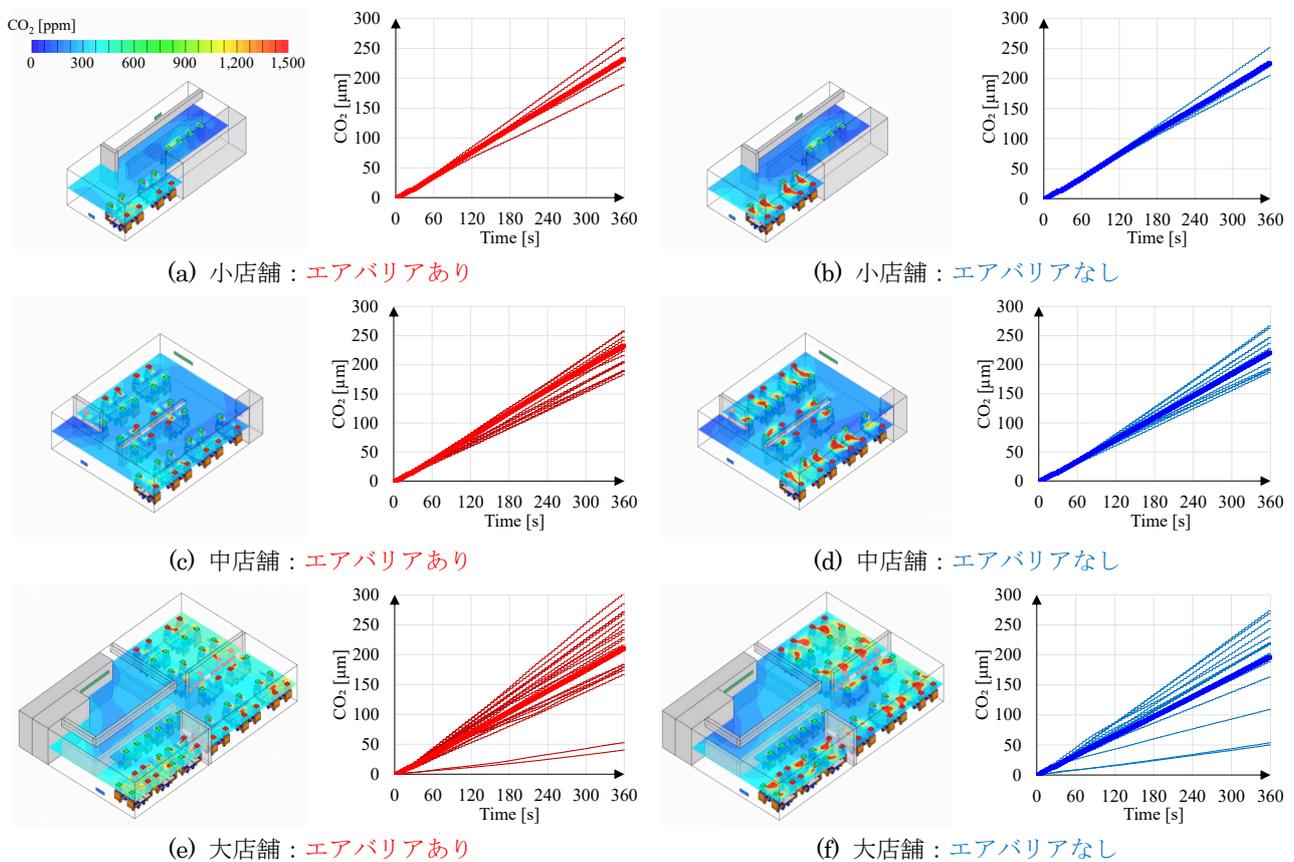


Fig. 31 CO₂濃度分布 ($z=1.2$ m, 5 分 40 秒時点)・受動喫煙者が摂取する濃度累積値

3.5 店舗モデルにおける受動喫煙量の検証

(1) 解析条件

飲食店舗（加熱式タバコ専用レストラン）でエアバリア型テーブルを使用した際の受動喫煙者の有害物質の摂取量を検討するために小・中・大規模の飲食店舗モデルを作成³⁾する。**Figure 29**に飲食店舗モデル概要、**Table 4**に解析条件を示す。本研究では、Rhinceros 8.1⁴⁾ (Robert McNeel & Associates (TLM, Inc.)) を用いて CAD モデルを作成し、FlowDesigner 2024⁵⁾ (株式会社アドバンスドナレッジ研究所) を用いて数値解析を行う。小店舗モデルは 12 席，中店舗モデルは 30 席，大店舗モデルは 50 席とし，喫煙席は壁に沿うように配置し，非喫煙者は小店舗モデルに 4 人，中店舗モデルに 15 人，大店舗モデルに 22 人とする（緑が非喫煙者，赤が喫煙者）。エアバリアと呼吸条件はエアバリア有無による受動喫煙量の検証の数値解析モデルと同様にする。汚染物質は化学物質として CO₂ とニコチンの 2 種類を対象とし，人体モデルの口と鼻を汚染物質の発生源とする。換気条件は席数 × 30 m³/h とし，換気の空気は客席からキッチンへ流れるとし，外気の二酸化炭素濃度は気象庁の「大気中二酸化炭素濃度の経年変化」より 400 ppm とする。外気の流入口は小・中・大店舗モデルにそれぞれ 1 つ，2 つ，3 つとし，流出口はキッチンに 1 つとする。数値解析は喫煙 10 サイクル（6 分間）を非定常計算で行い，エアバリアの有無による受動喫煙の影響を CO₂ とニコチンの摂取量により確認する。

(2) 解析結果

Figure 30 にニコチン濃度分布・受動喫煙者が摂取する濃度累積値，**Figure 31** に CO₂ 濃度分布・濃度累積値を示す。濃度分布図は z=1.2 m，10 回目の喫煙時の 5 分 40 秒を切り出した。受動喫煙者が摂取するニコチンの平均濃度累積値はエアバリア形成時では非形成時と比べ，小店舗では 197.9 pm³ から 88.3 pm³ への 55.4% の減少，中店舗では 206.6 pm³ から 109.8 pm³ への 46.9% の減少，大店舗では 270.2 pm³ から 166.0 pm³ への 38.6% の減少

が見られ，小・中・大店舗全体で角席の減少率が高い傾向にあった。エアバリアの有無による CO₂ の平均濃度累積値は増減がほとんど見られず，席による減少率に傾向は見られなかった。

3.6 考察

3.4 章におけるエアバリア有無における受動喫煙量の検討では受動喫煙者が摂取するニコチン濃度累積値がエアバリア非形成時に比べて形成時には 87.4% の減少が見られた。一方，3.5 章における飲食店舗モデルを用いた受動喫煙量の検証においては小店舗では 55.4%，中店舗では 46.9%，大店舗では 38.6% の減少が見られた。このような解析結果の違いは，エアバリア有無における受動喫煙量の検討では乱流モデルとして高精度の LES (Large Eddy Simulation) 解析を使用した半面，飲食店舗モデルにおける受動喫煙量の検討では乱流モデルとして時間平均モデル (RANS: Reynolds-averaged Navier-Stokes Simulation) を使用したことが計算の誤差が生じる原因であると考えられる。今後，飲食店舗モデルにおいても高精度の LES を使用した数値計算を行い，より精密な検討が必要である。また，換気条件として天井換気と厨房換気の違いも数値誤差が生じる原因の一つであると考えられる。

3.7 結論（第 3 章）

本研究（第 3 章）では，エアバリア型テーブルの有効性を示し，飲食店舗モデルへの導入を目的とし，実測と数値解析を行った。実測によって得られたエアバリア最適風速を基に数値解析モデルを作成し，エアバリア型テーブルの有効性を示した。

A. 参考文献

- (1) World health organization international agency for research on cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol.83, Tobacco smoke and involuntary smoking, 2004.

- (2) Frank Kelley St. Charles, John McAughey, Christopher J. Shepperd : Methodologies for the quantitative estimation of toxicant dose to cigarette smokers using physical, chemical and bioanalytical data, *Inhalation Toxicology*, 25(7), p. 383-397, 2013, <https://doi.org/10.3109/08958378.2013.794177>.
- (3) 飲食店の開業改装サポート : <https://nomura-fp.com>. (2024年2月12日参照)
- (4) Rhinoceros 3D: <https://www.rhino3d.com>.
- (5) FlowDesigner 2024: <https://akl.co.jp>.

B. 研究発表

- (1) 岡村晃, 李時桓, 黄載雄, 近藤志樹 : 喫煙による呼吸特性, その数値解析, 室内環境学会学術論文集, B-06, p.146-147, 2021.12. (本報告書第1章の内容)
- (2) Jaeung Hwang, Sihwan Lee: Respiratory characteristics during smoking and its numerical analysis, *Indoor Air* 2022, ID 1513, p.1-4, 2022.06. (本報告書第2章の内容)
- (3) 黄載雄, 李時桓 : 加熱式タバコの喫煙による呼吸特性と化学種物質の挙動特性, 日本建築学会大会学術講演梗概集, 環境工学, 40733, p.1591-1592, 2022.09. (本報告書第2章の内容)
- (4) 黄載雄, 李時桓 : 加熱式タバコの距離による受動喫煙の影響, 室内環境学会学術論文集, A-21, p.230-231, 2022.12. (本報告書第2章の内容)
- (5) 平山由晏, 李時桓 : 受動喫煙防止のためのエアバリア型テーブルの開発, 日本建築学会大会学術講演梗概集, 環境工学, 2024.08. (発表予定, 本報告書第3章の内容)
- (6) 平山由晏, 李時桓 : 加熱式タバコ専用飲食店舗におけるエアバリア型テーブルの効果, 空気調和・衛生工学会学術講演会講演論文集, 2024.09. (発表予定, 本報告書第3章の内容)

C. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

D. Supplemental Data

本研究で行われた実測結果及び数値解析結果(動画など)は下記のリンクで確認可能である。

<https://lee-lab.net/smoking/smoking.html>.

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)
総合研究報告書

加熱式たばこエアロゾルが生体に及ぼす影響に関する実験的検討

分担研究者 牛山 明 国立保健医療科学院
分担研究者 中舘 和彦 明治薬科大学
研究協力者 服部 研之 明治薬科大学

研究要旨

加熱式たばこの普及による健康リスクを推定するために生物学的研究は必須である。しかしながら、加熱式たばこはこれまでの燃焼式たばこは煙の発生機序が異なるため、従来のばく露装置をそのまま使用することは困難であり、仮に使用したとしてもそこから導かれる結果には大きな不確実性が伴うことが懸念される。加熱式たばこばく露による生体への影響を定量的に決定するためには、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要であるが、*in vivo* 実験用の標準化された加熱式たばこエアロゾルばく露装置はない。そのため本研究では、*in vivo* 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発し、開発した装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を検討した。また、開発した装置を用いて IQOS エアロゾルをばく露したマウスの生理学的応答および組織学的影響を検討することを目的とした。我々は同装置を用いて、マウスに IQOS のエアロゾルばく露を行い、健康影響アウトカムの解析を試みた。初年度は短期ばく露（1日5本で最大4日程度）のばく露をおこなって、肺胞マクロファージの泡沫化や還元型グルタチオン（GSH）が減少することを示した。また、研究の途上でばく露時の拘束ストレスの影響が懸念されたため、拘束しないばく露方法を検討した。拘束しないばく露方法を用いて最終年度までに1）血中の炎症性サイトカイン濃度への影響、2）テレメトリー法による心拍への影響、3）病理組織解析の3つの研究を最大4週間までの連続ばく露を行ったマウスで解析を実施した。

加熱式たばこばく露は、一部の指標において、生体影響と考えられる変化をもたらしたが、本研究ではばく露期間の制約もあるため健康影響を検索するためには、さらに長期間のばく露・高用量のばく露などの条件による研究が必要であると考えられた。

A. 研究目的

加熱式たばこの普及による健康リスクを推定するために生物学的研究は必須である。しかしながら、加熱式たばこはこれまでの燃焼式たばこは煙の発生機序が異なるため、従来のばく露装置をそのまま使用することは困難である。仮に使用したとしても、経路の途中でエアロゾルが結露し

結露水にニコチンが溶け込むため、正しいばく露は得られない。そのためそこから導かれる結果には大きな不確実性が伴う。したがって加熱式たばこばく露による生体への影響を定量的に決定しリスク評価をするためには、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要であるが、*in vivo* 実験用の標準化された加

加熱式たばこエアロゾルばく露装置はない。そのため本研究では、in vivo 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発し、開発した装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を検討した。また、開発した装置を用いて IQOS エアロゾルをばく露したマウスの生理学的応答および組織学的影響を検討した。

また、同装置を用いてマウスにエアロゾルばく露をした際の 1) 血中の炎症性サイトカイン濃度への影響、2) テレメトリー法による心拍への影響、3) 病理組織解析を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 加熱式たばこばく露装置および捕集するエアロゾルの分析

1. 1 動物用加熱式たばこ露装置

本研究では当研究室で開発した加熱式たばこばく露装置を使用した (図 1 および図 2)。本装置では、様々な喫煙プロトコルを設定できるが、本研究では、Health Canada Intensive (HCI) プロトコルを用いた。使用する加熱式たばことして、デバイスには IQOS3 Duo、IQOS ヒートスティックは Marlboro レギュラーをすべての研究を通じて使用した。

1. 2 加熱式たばこエアロゾルの捕集

加熱式たばこばく露装置および化学分析用捕集装置 (LM4E、Borgwaldt) を用いて、IQOS ヒートスティック 3 本分のエアロゾルを Cambridge filter 1 枚に捕集した。捕集は喫煙者の喫煙行動を想定した国際的な喫煙法である HCI 法に従い、吸煙量 55 mL、吸煙時間 2 秒間、吸煙間隔 30 秒間、および通気孔を 100%閉鎖して行った。LM4E は動物用ばく露装置を用いて捕集した化学物質量と比較し、その装置の有用性を検証するために用いた。

加熱式たばこエアロゾルの化学分析

加熱式たばこエアロゾルのニコチン、水分、タールおよび一酸化炭素の定量は WHO TobLabNet が定めた標準作業手順書に基づき行った。

2. マウスを用いたばく露と生物学的ばく露量の検討

2. 1 マウスへのばく露方法

ばく露方法は、当初の実験において C57BL/6N マウスを保定用チューブに入れ、鼻部ばく露用マスクにマウスの鼻がかかるように置いた。この際には保定による拘束ストレスが予想されたため、1 回のばく露では、連続で 60 分を超えないようにした。研究後半では、ばく露の際に筒状のホルダーにいれた際の拘束ストレスを回避するため、動物を保定しない (自由度の高い) ばく露用のホルダーでばく露を行った (図 3)。これまでと異なるばく露法であるが、尿のニコチン代謝物の分析に基づけば高いばく露条件が達成されていることが示された。

2. 2 尿中ニコチン代謝物の定量

IQOS ヒートスティックエアロゾルばく露から 1、2、4、6 時間後に採尿し、尿中ニコチン代謝物の定量をするときまで -80°C で保存した。サンプル中のニコチン代謝物を LC-MS/MS (Xevo TQ-S、Waters Co) を用い定量した。また、尿中のクレアチニン濃度を定量し、尿中ニコチン代謝物濃度をクレアチニン濃度で補正した。

3. 生理・生化学的解析

3. 1 体表面皮膚温度測定

マウス体表面皮膚温度を IR カメラ (InfReC G100EX、日本アビオニクス株式会社) で測定するため、ばく露実験前日にマウスの背中の中毛を小動物用電気バリカン (トリマー MODEL 2100、大東電機工業株式会社) で毛刈りし、残った毛をクリームで除毛した。IQOS ヒートスティック 1 本分のエアロゾルばく露前、ばく露直後、5、10、15、30、

60、120 分後に除毛したマウス背中中の IR イメージを 1 測定時間あたり 3 枚取得し、3 枚の IR イメージから平均値を算出し体表面皮膚温度とした。

3. 2 気管支肺胞洗浄および肺胞マクロファージの回収

加熱式たばこエアロゾルばく露後、気管切開して、サーフロー外筒を挿入し、PBS1 mL を充填したシリンジを接続し、肺内に PBS を注入した。PBS を注入後、シリンジの押し子をゆっくり引き、注入した液を回収した。これを 2 回繰り返して、回収した液を気管支肺胞洗浄液とした。気管支肺胞洗浄液は 4°C、100×g で 10 分間遠心分離し、上清と細胞画分（肺胞マクロファージ）に分けた。

3. 3 肺胞マクロファージ内 GSH 濃度の定量

本研究では、肺胞マクロファージ内のグルタチオン（GSH）濃度を調べる目的で蛍光指示試薬 QuicGSH3.0（五稜化薬）を使用した。QuickGSH3.0 はグルタチオン存在下で発色する 572 nm とグルタチオン非存在下で発色する 650 nm の 2 波長の蛍光強度比より細胞内グルタチオン濃度を求める手法である。基本的に販売会社の提供するプロトコールに従い実験を行った。

マウス 1 匹につき 50 細胞以上を解析し、求めた GSH 濃度の平均を各マウスの肺胞マクロファージ内 GSH 濃度とした。

3. 4 肺組織内 GSH および GSSG 濃度の定量

肺胞洗浄液を回収した後の肺組織について、GSH および GSSG を GSSG/GSH Quantification Kit（同仁化学研究所）を用いて定量した。

製品プロトコールに従い、気管支肺胞洗浄後のマウス肺組織 100 mg に 5%SSA 溶液を 0.5 mL 加えてホモジナイズし、4°C、8,000×g で 10 分間遠心分離した。上清を SSA 溶液の濃度が 0.5%となるように希釈し、所定の方法で反応をさせた。吸光度測定により求めた GSSG 濃度と総グルタチオン濃度

を用いて、次式から GSH 濃度を算出した。

$$\text{GSH 濃度} = \text{総グルタチオン濃度} - (\text{GSSG 濃度}) \times 2$$

3. 5 酸化ストレスマーカーの解析

凍結保存した臓器から ISOGEN2 を用いて、常法に従って total RNA を抽出し、Invitrogen 社の SuperScript IV VIL0 Master Mix を用いて cDNA を合成した後、表 1 に示すプライマーセットと TOYOBO の THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて RT-PCR による遺伝子発現の解析を行った。

5. 2 血中サイトカイン濃度の網羅的解析

加熱式たばこばく露の血液をマウスの頰静脈から一定量採血し、血漿を回収した。なお、採血のタイミングは、一連のばく露を開始する前、ばく露を 2 週間行った直後、ばく露を 4 週間行った直後の計 3 回であり、ばく露は 1 日 10 本（スティック）のばく露をおこなった群（以下、10S 群とする。）と 1 日 20 本のばく露をおこなった群（20S 群）、ばく露を行わずホルダーに入れ、空気をばく露した群（Air 群）、何も行わない群（Control 群）とした。

3. 6 サイトカインの定量

血しょう中のサイトカインの定量は Biolegend 社の LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel（13-plex）with Filter Plate キットおよび BECKMAN COULTER 社のフローサイトメーター CytoFLEX を使用し、メーカーマニュアルに従って分析を行った。

検出限界値以上の濃度と判定されたサイトカインについて統計解析ソフト SPSS を使用し、各群の統計解析をおこなった。統計処理は各群が等分散であると仮定して一元配置分散分析（one-way ANOVA）を行い、 $p < 0.05$ の項目について post hoc 解析を実施した。

3. 6 マウス心電図の取得及び解析（短期ばく

露)

実験の48時間前までに、マウス(C57BL/6N)に対して外科的に埋め込み型マウス心電図送信器(ソフトロン)を装着した。実験直前にマウスを円筒型マウスホルダー(KN-325-C, 夏目製作所)に入れて保定をした。ホルダーを心電図受信ボードの上に置き、送信機からのアナログ信号をPowerLab4/26(AD Instruments)を介してA/D変換を行いPCに取り込んだ。取り込んだデジタルデータは、LabChartProソフトウェアおよび内臓のECG解析モジュール(AD Instrument)で処理および解析を行った。なお、マウスの心拍数は平時で600~700拍/分(10~12拍/秒)データの取得レートは1kHzとした。

3. 7 マウス心電図の取得及び解析(長期ばく露)

あらかじめ、加熱式たばこばく露装置で、1日20本のばく露を3週間行い、エアロゾルばく露に馴化したマウス(C57BL/6N)を用意した。毎日のばく露を実施しつつ、心電図を取得する実験の48時間前までに、外科的に埋め込み型マウス心電図送信器(ソフトロン)を装着した。対照としては、加熱式たばこエアロゾルに全くさらされていないマウスを用意した。実験直前に図3で示したホルダーにマウスを1匹だけ入れ、ホルダーを心電図受信ボードの上に置きばく露を行った。心電図の取得および解析は3.6と同様である。

4. 病理組織解析

4. 1 光学顕微鏡を用いた病理組織解析

IQOSばく露マウスとコントロールマウスの肺を4%パラフォルムアルデヒド溶液にて浸漬固定した。緩衝液で洗浄後、アルコール系列で脱水、レモゾール液置換後、パラフィン包埋した。パラフィン包埋した肺組織は5 μ m厚に薄切し、ヘマトキシリン-エオシン(HE)液を用いて染色した。HE染色切片は、光学顕微鏡(LM)で撮影し、病理

組織解析を行なった。病理組織像観察については、i; 肺胞上皮組織(I型とII型)の変化解析、ii; 肺胞マクロファージの数と形態変化解析、iii; 肺胞中隔内の厚さ、血管内皮細胞の病理検査、iv; 肺胞腔への血球等の浸潤等について検討した。

4. 3 電子顕微鏡を用いた微細病理組織解析

光学顕微鏡を用いた病理組織解析で使用したIQOSばく露マウス(1日4本1日ばく露群、1日4本2日ばく露群)とコントロールマウスの肺の一部を4%アルデヒド、2%グルタルアルデヒド溶液で固定し、その後、オスミウム酸で再固定した。緩衝液で洗浄後、アルコール系列で脱水、プロピレンオキサイド液置換後、エポキシ樹脂包埋した。包埋した肺組織は70nm厚に薄切し、電子染色液を用いて染色した。透過型電子顕微鏡(TEM)にて検鏡、撮影し、微細構造変化を解析した。

4. 5 免疫組織化学法による病理組織解析

上記病理組織解析で作製したパラフィン包埋後のIQOSばく露マウスとコントロールマウスの肺5 μ m厚に薄切し、レモゾール、アルコール系列、蒸留水に置換した。10mMクエン酸ナトリウム(pH 6.0)で95度60分間、抗原賦活化した。Block Aceにてブロッキング処理を行ったのち、下記の抗体で蛍光抗体法にて検討した。

Anti-Endothelial-cell antibody, Anti-Collagen1 antibody, Anti-CD45 antibody, Anti-CD31 antibody, Anti-F4/80 antibody, Anti-TNF-alpha antibody, Anti-MIP1alpha antibody

1次抗体は4℃で一晩反応し、洗浄後、各2次抗体で発色した。蛍光染色切片は、蛍光顕微鏡で撮影し、病理組織解析を行なった。

5. 倫理的配慮

動物実験は、国立保健医療科学院動物実験委員会の承認を得て実施された。

C. 結果及び考察

1. ばく露装置と拘束ホルダーによるマウスへのばく露

本研究では我々が独自に開発したばく露装置を用いて実験を行った(図1、図2)。ばく露装置を用いて収集した物質を分析したところ、エアロゾルの化学分析結果において粒子状およびガス状物質ともに化学分析用の捕集装置(LM4E)の捕集結果と比較してほぼ同量であった(図4)。この結果から、動物用ばく露装置は加熱式たばこエアロゾルを大きく損失することなくマウスにばく露することができるといえる。また、カスタムメイドの鼻部ばく露用マスクを加熱式たばこエアロゾル放出ポートの先端に接続することで、マウス鼻部を直接エアロゾルでばく露することができ、以下の実験では本ばく露装置を使用することとした。

2. ばく露によるニコチン代謝物の挙動と生理・生化学応答

尿中のニコチンおよびニコチン代謝物量の変化
ばく露装置による IQOS エアロゾルばく露がマウスへ化学物質の損失なく実施できていることを検証するために、ばく露後の各時点でのマウス尿中のニコチン代謝物(コチニンおよび3-ヒドロキシコチニン)をLC-MS/MSで定量した。コチニンはばく露1時間後に高値(6.82 µg/mg)となり、2時間後にはおおよそ半量(3.32 µg/mg)となった。一方で、コチニンの代謝物の一つである3-ヒドロキシコチニンはばく露2時間後に高値(32.9 µg/mg)となった(図5)。(すべてクレアチニン補正值)

また、呼吸器から吸収されたニコチンの血管収縮作用による体表面皮膚温度の変化を経時的に測定した(図6)。エアロゾルばく露前は37.6°C±0.8°Cあった体表面皮膚温度がばく露直後から徐々に低下し、30分後に最低値(33.5°C±0.5°C)

となった。さらに、ばく露120分後には元の温度に戻り、マウスの活動もばく露前の状態に戻った。一方で、エアロゾルばく露中は保定用チューブで拘束しているため、拘束ストレスが体温に影響を与える可能性があった。そのため、ばく露装置を用いて室内空気をばく露した Sham 群の体表面温度と比較したところ、IQOS ばく露群はばく露直後から60分後まで有意な体温の低下を示した。また、Sham 群の結果より、体温の低下は拘束ストレスによるものではないことが確認された。

肺に吸い込まれた加熱式たばこエアロゾルによる酸化ストレスの影響について検討するため、酸化ストレスの指標として知られているグルタチオンに着目し、IQOS エアロゾルをばく露したマウスの肺胞マクロファージの細胞内還元型グルタチオン(GSH)濃度を定量した。Control 群と比較し、IQOS エアロゾルばく露によって肺胞マクロファージの細胞内GSH濃度は有意に減少した(図7)。また、IQOS エアロゾルばく露群においても5s1d群(5本/日を1日ばく露)と比べ5s2d群(5本/日を2日ばく露)では有意に減少し、群間の量的反応関係が認められた。

IQOS エアロゾルばく露による肺胞マクロファージにおける酸化ストレスの増大が認められたため、続いて肺組織への影響を検討した。各群のマウス肺組織中の総グルタチオン濃度、GSH濃度および酸化型グルタチオン(GSSG)濃度を定量したところ、肺組織中の総グルタチオン濃度はIQOS エアロゾルばく露によって有意差はなかったものの増加傾向であった(図8)。

3. 酸化ストレスマーカーの発現解析

加熱式タバコのエアロゾルへのばく露影響を検討するため、肺および肝臓における酸化ストレスマーカーとして以下の7種の遺伝子発現量をRT-PCR法を用いて測定した。測定対象はメタロチオネイン: Mt1, Mt2、ヘムオキシゲナーゼ1: Hmox1、チオレドキシシン: Txn1, Txn2、ペルオキシレドキシ

ン：Prdx1、NAD(P)Hキノンデヒドロゲナーゼ1：Nqo1である。また、ハウスキーピング遺伝子として、YwhazとRpl13Aを測定し、それぞれで補正した結果が同様であることを確認した。

IQOSのエアロゾルに直接ばく露される臓器として、肺の酸化ストレスマーカーの発現量をRT-PCR法を用いて測定した。ケージで飼育したコントロール群の発現量を1とし、各遺伝子のシャムばく露群とIQOSばく露群の相対的な発現量を図9に示した。Mt1とMt2のみがコントロール群に対して2倍以上の発現誘導が観察された。しかし、この影響はシャムばく露群にも同等の影響が認められており、拘束ストレスによる影響の可能性が高いと考えられる。また、Mt1とMt2以外の酸化ストレスマーカーでは、発現の誘導が観察されていない。Mt1とMt2はコルチゾールによる発現誘導を受けることが報告されており、肺における発現誘導はIQOSエアロゾルによる酸化ストレスではなく、拘束ストレスによってコルチゾールの分泌量が増えたことを示唆する結果である。

次に、肝臓における酸化ストレスマーカーの遺伝子発現量を測定した。肺と同様に、ケージで飼育したコントロール群の発現量を1とし、各遺伝子のシャムばく露群とIQOSばく露群の相対的な発現量を図10に示した。肝臓では、シャムばく露群とIQOSばく露群においてコントロール群と比較してMt1とMt2の発現量が100倍以上に誘導されていた。それ以外の酸化ストレスマーカーでは、Hmox1で2倍以上の誘導が認められたが、IQOSばく露群だけではなく、シャムばく露群により強い誘導が認められた。さらに、TrxやPrdxおよびNqo1では、誘導が観察されなかった。これらの結果は、肺と同様に肝臓においても拘束ストレスにより、Mt1とMt2がコルチゾール依存的に誘導されたことを示唆する結果である。

IQOSエアロゾルに直接ばく露する肺と化学物質の代謝を担う肝臓において酸化ストレスマーカーの遺伝子発現量を測定した。その結果、Mt1と

Mt2の誘導が認められたが、シャム群とIQOS群における誘導が同等であったことと、Nqo1やPrdxおよびTrxなどの酸化ストレスマーカーの誘導が観察されなかった。これらの結果は、酸化ストレスを介した発現誘導ではなく、コルチゾール依存的な拘束ストレスによる影響であることを示唆している。今後、IQOSエアロゾルのばく露影響を評価するためには、非拘束下のばく露方法を検討することが必要であると考えている。

4. 5 血中サイトカインへの影響

検出限界値より高い濃度が示された炎症性サイトカインはIL-1 α 、IL-1 β 、IL-10の3つであったため、この3つに注目して解析を進めた。IL-1 α は加熱式たばこばく露によって、血漿中の濃度が増加する傾向がみられた。しかし数値のばらつきが大きくANOVA解析を行った結果は2週間ばく露、4週間ばく露の血漿ともに有意差は認められなかった。

IL-1 β では加熱式たばこばく露の有無による違いは見られなかったが、IL-10では加熱式たばこばく露によって血漿中が濃度の抑制される傾向が見られた。ANOVA分析において2週間ばく露の血漿では有意差は認められなかったが、4週間ばく露の血漿では20S群とAir群において有意(p=0.031)が認められた(図11)。

5. エアロゾルばく露中のマウス心電図への影響

本研究では、マウスの循環器への急性影響を明らかにするため、埋め込み型マウス心電図送信器をC57BL/6Nマウスに装着し、テレメトリー法によりマウスの覚醒下の心電図を取得した。IQOSエアロゾルはHCI法によりばく露をおこなった。加熱式たばこばく露装置にたばこを挿さずに装置を稼働した場合、すなわち空気のみをばく露を行った場合は、心電図に大きな変化を認めないが、IQOSをセットしばく露を行うとパフの直後に心拍に変化が観察された(図13)。心電図からRR間

隔を1拍毎に算出し、プロットをおこなった。この結果から、IQOSエアロゾルのばく露により心拍に変動が見られることがわかる。また図12に示すように、IQOSを連続してばく露しても同様の変化が見られた。しかしながらばく露して数分以内にはRR間隔はベースラインに回復する現象もみられ、RR間隔の変化は可逆的なものであった。なおデータは示さないが、茶葉から作られたニコチンを含まないスティックのエアロゾルばく露でも類似の可逆的な現象が確認された。

これまでは、マウスにとって拘束条件かつ初めてのたばこばく露による実験であったが、次に長期間のばく露をおこないエアロゾルばく露に馴化したマウスでの検討をおこなった。またばく露の際には、非拘束型ホルダーを用い、非拘束状態においても同様な現象が起こるのか否かについて検討をした。

マウスに1日あたり加熱式たばこ20本のエアロゾルを3週間以上にわたりばく露をし、馴化した後に、心電図を記録しながらエアロゾルばく露の影響を調べたところ、エアロゾルのパフ直後に期外収縮が見られ、馴化によってその現象が消失することはなかった(図13)。しかしながら、この影響は一過性のものであり可逆的であった。

加熱式たばこや電子たばこエアロゾルに含まれるニコチンには、その薬理的な作用で心血管系にさまざまな影響を引き起こすことが知られている。ニコチンは内皮機能不全、アドレナリン作動性ニューロンからのノルエピネフリン放出、および副腎エピネフリン放出を誘発し、全身循環および冠循環の血管収縮を引き起こす可能性がある。ニコチンによる持続的な交感神経活性化も心筋リモデリングに寄与する可能性があり、心室細動、リモデリング、線維症の発症を促進することが動物実験で示されており、本研究で見られた影響もニコチンによるものの可能性が考えられる。しかしながら、一般的にニコチンの作用であれば交感神経系が刺激され、心臓の興奮性が高め

られる作用で心拍数が上がるためRR感覚は短くなるはずである。しかしながら今回はRR感覚の延長が見られた。また今回でのデータでは、加熱式たばこの2秒のパフのあとの28秒のインターバルの間、さらには1本のスティックをばく露したあとのインターバルの間に変化がベースラインに戻る現象が見られている。この間、体内のニコチンレベルは大きな変動はないと考えられるため、ニコチン以外の有害性を持つ成分による影響の可能性もある。図14に示した通り、馴化したマウスを用いても同様の現象が起こることは、長期間のばく露でも心臓は同様の応答をし続ける可能性を示しており、心臓の肥大化や線維化を通じて心不全などの疾病につながる原因になるかもしれない、更なる長期間ばく露でどのような反応が起こるのかの検証が必要である。一方で、人とマウスで心臓の解剖学的構造や、ニコチンに対する感受性の違いも指摘されていることにも注意が必要である。

6. 光学顕微鏡 (LM) による病理組織解析

肺の病理組織解析において、i; 肺胞上皮組織 (I型とII型) の変化解析、ii; 肺胞マクロファージの数と形態変化解析、iii; 肺胞中隔内の厚さ、血管内皮細胞の病理検査、iv; 肺胞腔への血球等の浸潤等について、光学顕微鏡下で解析を行った。

コントロールマウスの肺組織の病理組織検査によって、加熱式タバコの主流煙をばく露していない肺組織は、どの検査項目によっても正常構造を示し、IQOSばく露マウスについても同様の検討を行った。今回の検討した肺組織を網羅的に解析した結果、ほぼ全ての領域において正常肺組織構造を示していた(図14)。しかし1個体の肺組織の1箇所においては、炎症様構造変化を呈していた(図14)。これらの一連の一般病理組織学的検査の結果から、今回のIQOSばく露では、ほぼ全ての肺構造へ有意な異常構造変化を誘発していない

ものと示唆されるが、ごく一部の肺組織において炎症様構造が今回初めて確認されたことは、その病理組織学的変化が稀な変化であるのか、普遍的な変化であるのかを今後詳細に検討する必要があると考察される。

7. 電子顕微鏡 (SEM) による病理組織解析

本研究では、SEM を用いて網羅的に肺組織を観察し、肺胞マクロファージの密度と形態解析をおこなった。その結果であるが、まず図 15 に肺胞像をしめす。さらに定量結果を図 16 左に示すように、コントロールと比較し IQOS ばく露では、肺胞マクロファージ細胞の数が増えていることが示された。さらに、観察された肺胞マクロファージの細胞内を観察すると、IQOS ばく露の肺内の肺胞マクロファージ細胞では、有意に異物除去を行なっている過程、すなわち消化している像が多数認められた。この過程像を持つ細胞を計測した結果を図 16 右に示すが、有意に IQOS ばく露群が多いことが示された。

IQOS のエアロゾル成分には紙巻きタバコに比べ、有害化学物質は一定程度低減しているため、どのような作用機序で肺胞マクロファージが、どのような物質を分解しているのかについては、今後詳細な検討を要すると考えている。

これらの結果から、IQOS ばく露群の肺胞マクロファージでは、なんらかの異物を処理していると考えられる。この異物を確かめるために、IT-800SHL に搭載した元素マッピング解析を行った。

図 17 にその結果の一例を示すが、空胞内の素性では、IQOS ばく露群で C (炭素) が多い傾向が示されている。ガラス板 (SiO₂) 上に組織を採取し、アルミニウム (Al) の台を使用し、OsO₄ をコーティングしているため、それらの元素が多量に検出されているが、それらを除くと有意な違いは C (炭素) のようである。肺胞マクロファージがカーボンを含んだ炭化物、もしくは有機物を異物とみなし、処理を行なっている可能性が考えられる。

この異物処理が正常範囲内、すなわち生体内の処理能力内であれば、身体にとって不都合は生じないと考えられるが、この処理過程が能力以上となった場合には、泡沫化し、肺の組織に炎症など様々な影響をもたらす可能性が示唆される。

このような微小変異が個体差ではなく普遍的な変化であるか本格的な解析を行うことが今後必要であると考えられる。さらに、このようなマイクロの肺の構造変化と肺の炎症との関連を明らかにすることが可能であると考察される。

8. 免疫組織化学法による病理組織解析

病理組織学的解析から細胞の集積が認められた領域において、マクロファージの集積や肺の線維化の有無を免疫組織学的解析により検討した。解析部位は炎症様構造を用いた。

まず、血管内皮のマーカー染色 (図 18 の左: Endthelial-cell) では、有意な差異は認められなかった。線維化の有無を検討するため collagen マーカー染色をおこなった (図 18 の右: collagen)。この結果でも有意な差は認められず、IQOS ばく露群では肺の線維化が起こっていないものと示唆された。

次に、各細胞における発現マーカーを用いて検討した。CD45 陽性白血球数 (図 19: CD45) は、両群に有意な差が認められなかった。同様に CD31 陽性血管内皮/血小板 (図 19: CD31) においても有意な差が認められなかった。マクロファージを認識する F4/80 でも有意な差が認められなかった (図 19: F4/80)。同様にマクロファージから分泌される TNF alpha においても有意な差は認められなかった (図 19: TNF alpha)。

マクロファージの集積等が確認されなかったが、マクロファージの機能の亢進の有無を検討するため、マクロファージから分泌され好中球等を誘引する MIP1alpha について検討した (図 20: MIP1alpha)。その結果、IQOS ばく露群の肺で炎症様構造部位ではほぼ全てのマクロファージが

MIP1alpha 陽性であった。

この結果から、今回異常が認められた部位においては、マクロファージの集積などは認められなかったが、その部位に分布するマクロファージは活性化し、他の細胞を誘引する可能性が示唆された。しかし、これらのマクロファージの活性化を示す結果は肺全体では認められず、極めて微細な変化であることも事実である。IQOS ばく露では、今回の病理組織学的検討から肺全体での炎症という結果を導くことは難しいが、微小変異が個体差ではなく普遍的な変化であるか本格的な解析を行うことで、肺の構造変化と肺の炎症との関連を明らかにすることが可能であり、必要であると考察される。

D. 結論

本研究では、加熱式たばこ専用の動物用ばく露装置を用いて動物実験を実施した。本装置を用いてマウスに IQOS 主流煙をばく露したところ、必ずしも健康影響とは言えないが、生体影響としての変化が様々な指標で得ることができた。

特に、肺胞マクロファージへの影響や心拍への影響については、長期的影響が懸念されることから今後更にばく露期間を増やして検討する必要があると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Sawa M, Ushiyama A, Inaba Y, Uchiyama S, Hattori K, Ogasawara Y, Ishii K. A Newly Developed Aerosol Exposure Apparatus for Heated Tobacco Products for In Vivo Experiments Can Deliver Both Particles and Gas Phase With High Recovery and Depicts the Time-Dependent Variation in Nicotine Metabolites in Mouse Urine. *Nicotine Tob Res.* 2021 Nov 5;23(12):2145-2152. doi: 10.1093/ntr/ntab123. PMID: 34111284.

Sawa M, Ushiyama A, Inaba Y, Hattori K. Increased

oxidative stress and effects on inflammatory cytokine secretion by heated tobacco products aerosol exposure to mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Jun 25;610:43-48. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.04.042. Epub 2022 Apr 11. PMID: 35462100.

Koike S, Sato K, Sawa M, Inaba Y, Hattori K, Nakadate K, Ushiyama A, Ogasawara Y. Exposure to Heated Tobacco Products Aerosol Causes Acute Stress Responses in the Lung of Mouse. *Antioxidants (Basel).* 2022 Nov 25;11(12):2329.

2. 学会発表

澤麻理恵, 牛山明, 稲葉洋平, 中舘和彦, 服部研之. 加熱式たばこエアロゾルを短期間ばく露した際のマウス肺の組織学的評価. 日本薬学会第142年会(名古屋) 2022.3.25-28. Web 予稿集.

澤麻理恵, 石川智, 牛山明, 服部研之. IQOS エアロゾルばく露は肺組織及び肺胞マクロファージに酸化ストレスを発生させる. 第92回日本衛生学会学術総会(兵庫) 2022.3.21-23. 同予稿集 S205.

澤麻理恵, 牛山明, 稲葉洋平, 服部研之. 加熱式たばこの生体影響を検索するための動物用ばく露装置の開発とその有用性に関する研究. 第69回日本実験動物学会総会(仙台) 2022.5.18-20.

牛山明, 澤麻理恵, 茂木貴博, 稲葉洋平, 服部研之. 加熱式たばこエアロゾルばく露が血中サイトカイン濃度へ及ぼす影響. フォーラム 2022: 衛生薬学・環境トキシコロジー(熊本) 2022.8.30-31. 抄録集 p.226

牛山明, 稲葉洋平, 内山茂久. 加熱式たばこエアロゾルばく露による健康ハザード探索のための

動物実験システムの構築 第 81 回日本公衆衛生学会総会. 2022.10.7-9. (甲府) 同講演抄録集. p442."

牛山明, 茂木博貴, 澤麻理恵, 稲葉洋平. 加熱式たばこエアロゾルばく露による血中サイトカインの変動とその要因の検討, 第 93 回日本衛生学会学術総会. 2023.3.2-4. (東京). 同講演集 S217.

進藤佐和子, 高橋知里, 西川史織, 二瓶まどか, 塚田航大, 中舘和彦, 稲葉洋平, 牛山明, 服部研之. 加熱式たばこエアロゾルのマウスへのばく露手法の検討. フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー ; 2023.9.12-13 ; 広島. 同講演要旨

集 Page 181.

牛山明, 稲葉洋平. 加熱式たばこエアロゾルばく露時にマウスの ECG に生じる一過性の影響について. 第 94 回日本衛生学会学術総会; 2024.3.7-3.9; 鹿児島. 日本衛生学雑誌第 79 巻 (Suppl.) S267.

3.その他

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

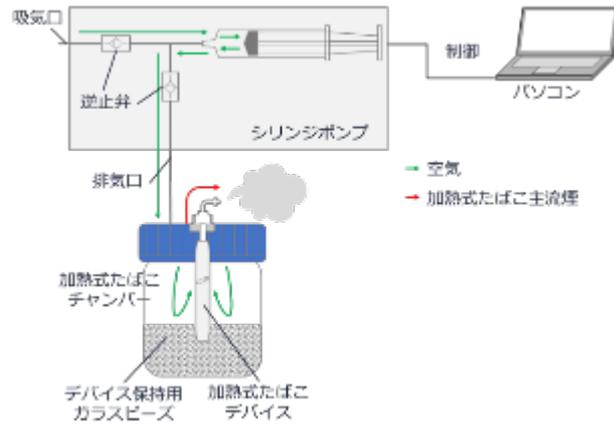


図1 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置 (概念図)

ばく露装置全体の概念図を示す。加熱式たばこデバイスはたばこスティックを入れた状態で密閉されたチャンバー内に固定する。ばく露装置はコンピューターで様々な喫煙法で制御可能であり、本研究では国際規格に則り、一定の空気量 (55 mL) を一定の間隔 (30 秒ごと) でスティック 1 本あたり 12 回排気する(HCI 法)。送気された空気はデバイスを通じてスティックの吸い口からエアロゾルとして排出される。

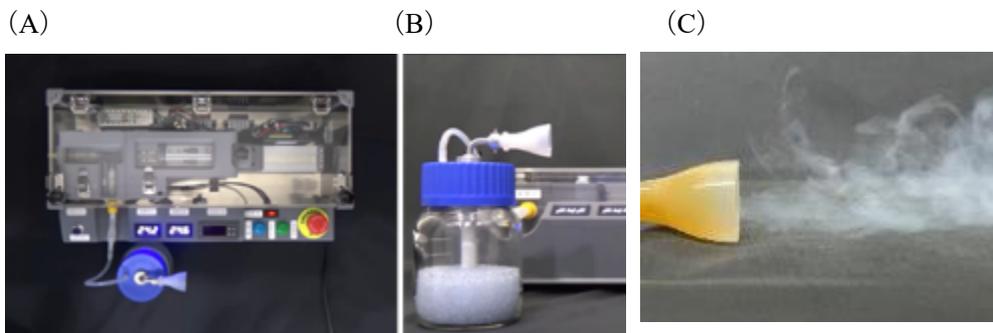


図2 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置

(A) 2 型ばく露装置の全体写真を示す。(B)IQOS デバイスおよびスティックをセットした状態の加熱式たばこチャンバーを示す。(C) エアロゾルが放出された瞬間を示す。エアロゾルの放出ポートにつけたマスクにマウスの鼻部を配置しばく露を行う。

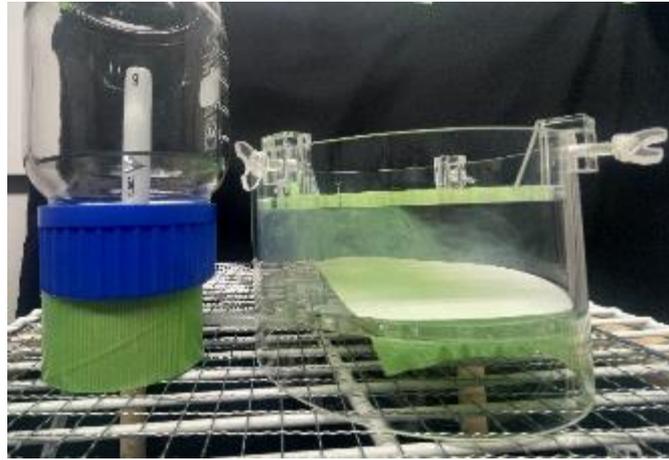


図3 動物用ばく露装置に接続する非拘束ホルダー

(A) ホルダー全体を示す。このホルダーは外径 150mm で、内部を通気性のよい仕切りで 4 等分ないし 5 等分に仕切りそれぞれの小部屋の行き来を阻害し、マウスのファイティングを防止した。(B)ホルダーにマウス模型を入れた状態。(C) ばく露装置からエアロゾルをホルダーに導入している様子。この写真では仕切りとマウスを入れていないが、実際のばく露では仕切りで区切りばく露を行う。

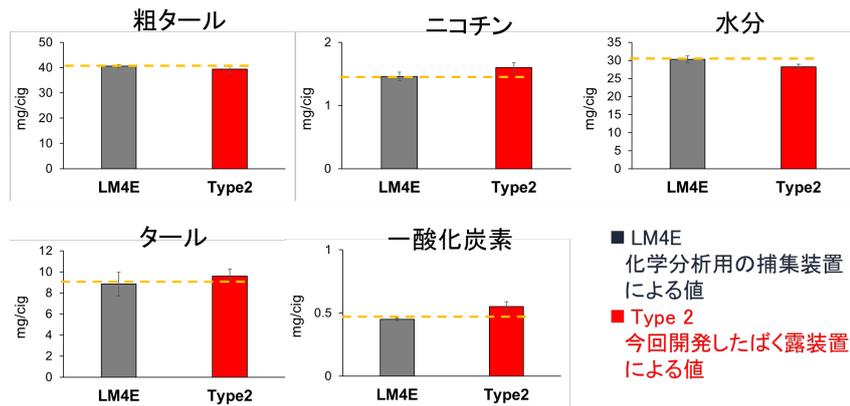


図 4 各種装置を用いた IQOS エアロゾルの化学分析結果

化学分析用捕集装置である LM4E を用いた IQOS エアロゾルの分析結果と比較した。IQOS 5 本分のエアロゾルを Cambridge filter に捕集し、捕集前後のフィルター重量差から粗タールを求めた。フィルターから抽出したサンプルから GC-TCD を用いて水分を、GC-FID を用いてニコチンを定量した。求めた粗タール量から水分量及びニコチン量を引いてタール量を求めた。また、捕集時にサンプリングバッグに集めたガス状物質から汎用赤外ガス分析計を用いて一酸化炭素を定量した。

Mean \pm SD (n = 5).

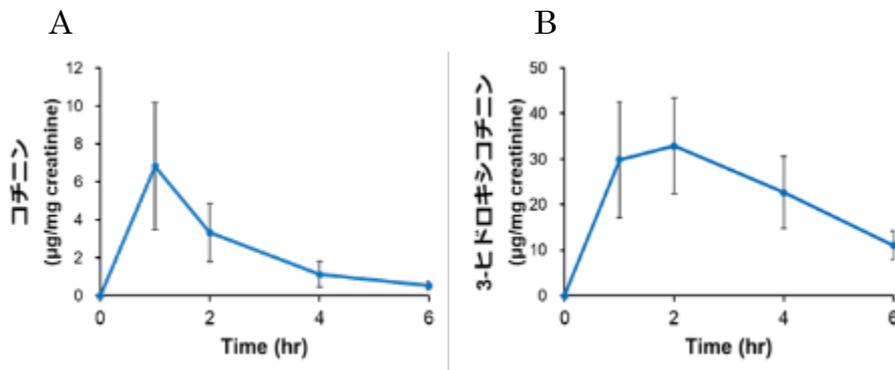


図 5 IQOS エアロゾルばく露後のマウスの尿から検出されるニコチン代謝物量の変化

マウスに IQOS 1 本分のエアロゾルをばく露し、ばく露前、ばく露後 1、2、4、6 時間後に採尿した尿のニコチンの主要代謝物である(A)コチニンと(B)3-ヒドロキシコチニンを定量した。尿は前処理後、LC-MS/MS で定量し、別途定量した尿中のクレアチニン濃度で補正した。

Mean \pm SD (n = 7).

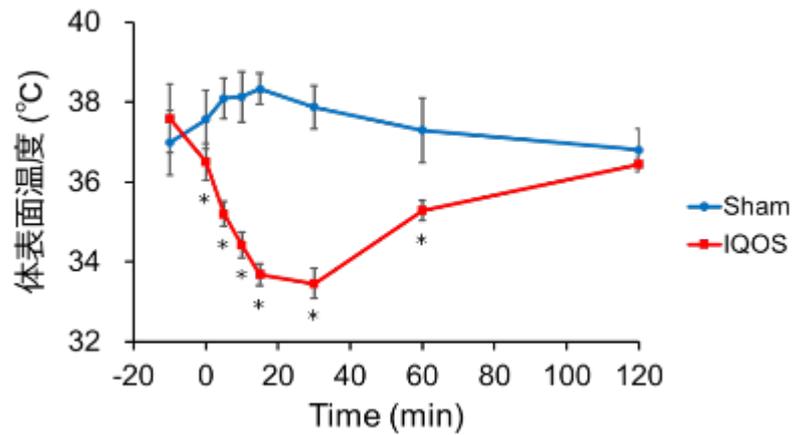


図 6 IQOS エアロゾルばく露後のマウス体表面皮膚温度の経時変化
 マウスに IQOS 1 本分のエアロゾルをばく露し、ばく露前、ばく露直後、5、10、15、30、60、120 分後の体表面皮膚温度を近赤外線サーモカメラで測定した。各測定時間で得られたサーモカメラ像をもとに算出した体表面皮膚温度の経時変化を示した。

Mean \pm SD (Sham, n = 5; IQOS, n = 7), * p <0.05, Student's t-test

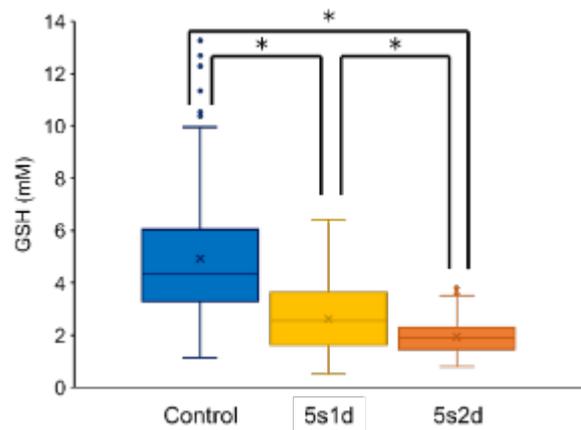


図 7 IQOS エアロゾルばく露後のマウス肺胞マクロファージの細胞内還元型グルタチオン濃度

各群で最終ばく露の 24 時間後に気管支肺胞洗浄液を回収し、その中に含まれる肺胞マクロファージを用いて細胞内還元型グルタチオン(GSH)濃度の定量を行った。

Welch's ANOVA test, post-hoc 解析は Dunnett T3 法

n = 3, * p <0.05.

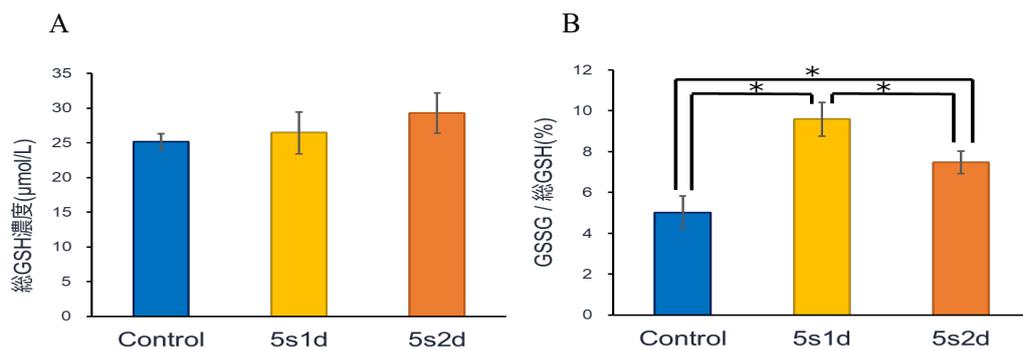


図8 IQOSエアロゾルばく露後のマウス肺組織中の(A)総グルタチオン濃度および(B)酸化型グルタチオン濃度の割合

各群の最終ばく露の24時間後の肺組織をホモジネートし、総グルタチオン濃度および酸化型グルタチオン濃度を定量した。

Welch's ANOVA test、post-hoc 解析は Dunnett T3 法

Mean ± SD (n = 3), *p<0.05.

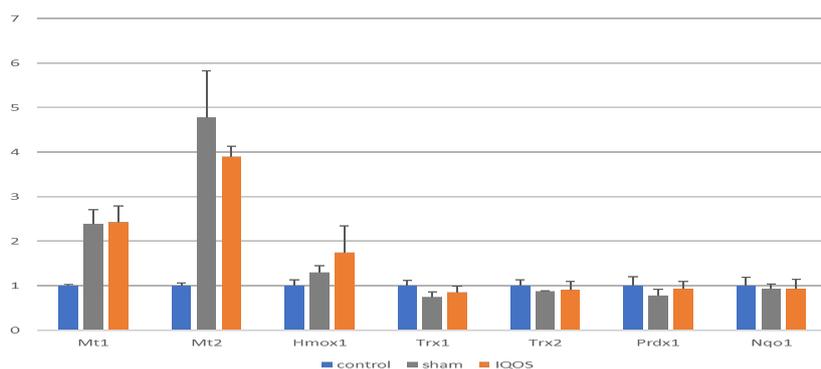


図9 肺における酸化ストレスマーカー遺伝子の相対発現量

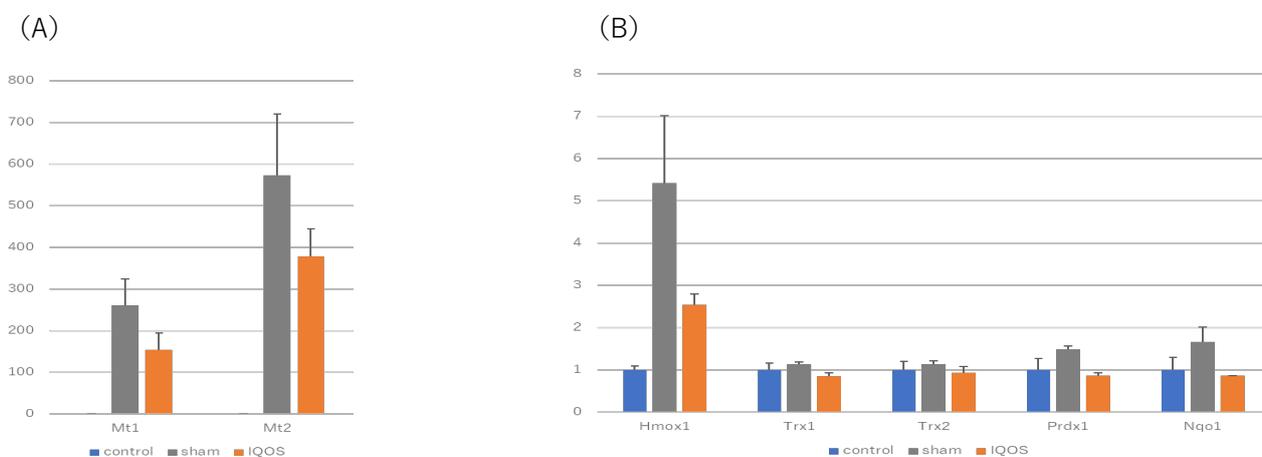


図10 肝臓における酸化ストレスマーカー遺伝子の相対発現量

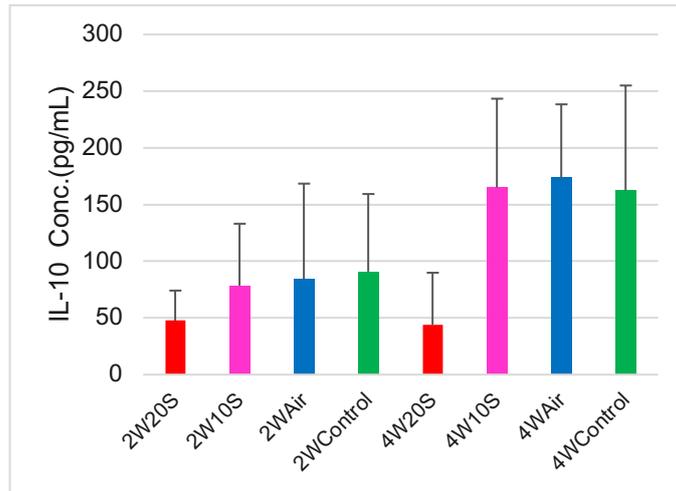


図 1 1 血漿中の IL-10 濃度

横軸の表記はそれぞれ、2W20S (20 本/日を 2 週間) , 2W10S (20 本/日を 2 週間) , 2WAir (空気ばく露を 2 週間) , 4W20S (20 本/日を 4 週間) , 4W10S (10 本/日を 4 週間) , 4WAir(空気ばく露を 4 週間) , 4WControl (ケージコントロール) を示す。データは Mean±SD (N=5 each) で示す。

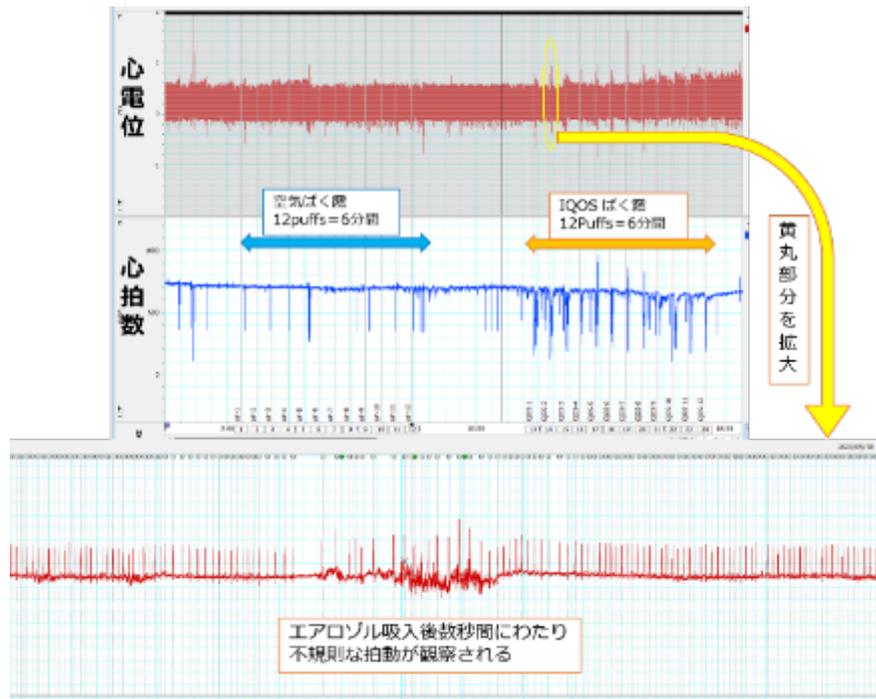
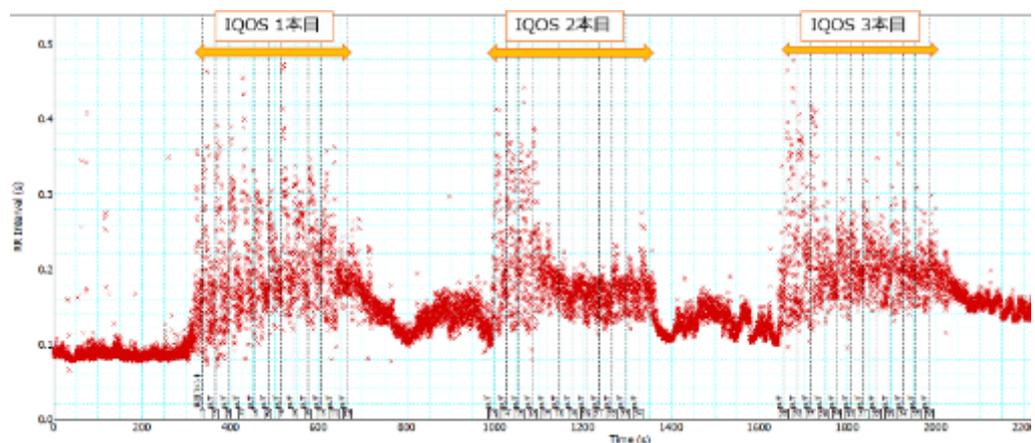
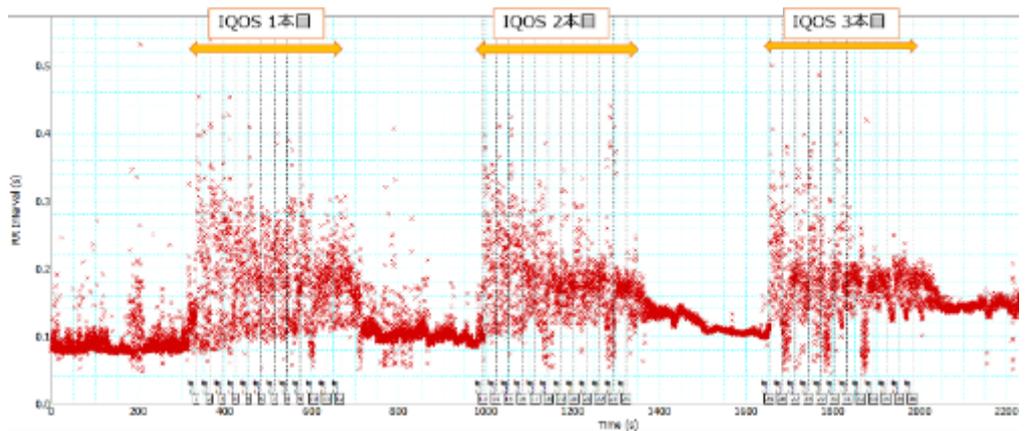


図 1 2 IQOS ばく露中の心電図

上図は埋め込み型マウス心電図送信器を装着したマウスで、連続的に心電図を記録した一例である。上図の左側で加熱式たばこばく露装置にたばこを挿さずに装置を稼働した場合、すなわち空気のみをばく露を行った場合を示す。また図の右側では、IQOS をセットしばく露を行った場合を示す。心電図の収集と同時に、心電図の RR 間隔から自動的に心拍数が算出されグラフ化されている。心拍数のグラフを見ると IQOS をばく露すると、パフ毎に心電図が乱れる傾向が見られた。そこで、IQOS の 2 パフ目（黄丸部分）の心電図を拡大したものが下図となる。エアロゾル吸入後、数秒間にわたり不規則な拍動が見られている。

3週間のばく露を行い、馴化したマウス



馴化を行っていないマウス

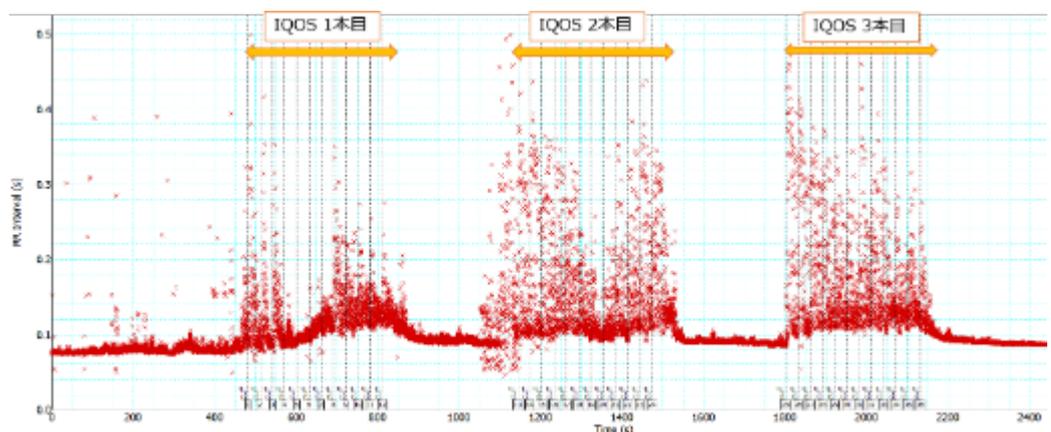


図 1 3 IQOS を連続で 3 本ばく露した際の RR 間隔の変化

IQOS を一定のインターバルをおいて連続で 3 本ばく露した際に記録された心電図をもとに 1 拍ごとの RR 間隔をプロットした。IQOS のばく露中はパフ毎に変動が見られたが、ばく露が終わるとベースラインに戻り、次のばく露が始まると、再度 RR 間隔の乱れが見られた。図中の黄色の矢印は IQOS1 本分のばく露時間（6 分間）を示す。上 2 つは馴化を行ったマウスの例（異なる 2 匹）、下は馴化を行っていないマウスの例を示す。

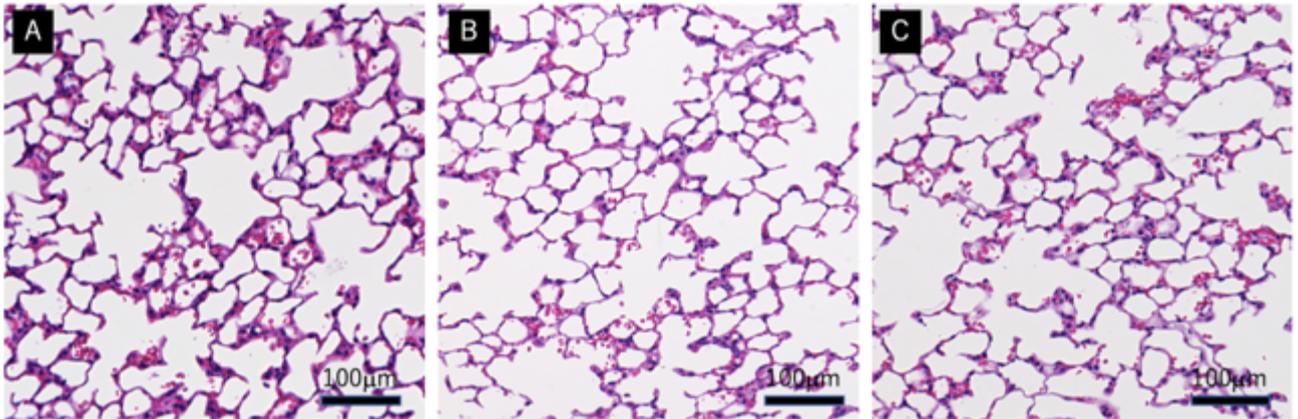


図 1 4 光学顕微鏡による病理組織解析

コントロールマウス肺の HE 染色像 (図 13A)、IQOS ばく露マウス (1 日 4 本 1 日間) 肺の HE 染色像 (図 13B)、IQOS ばく露マウス (1 日 4 本 2 日間) 肺の HE 染色像 (図 13C)。

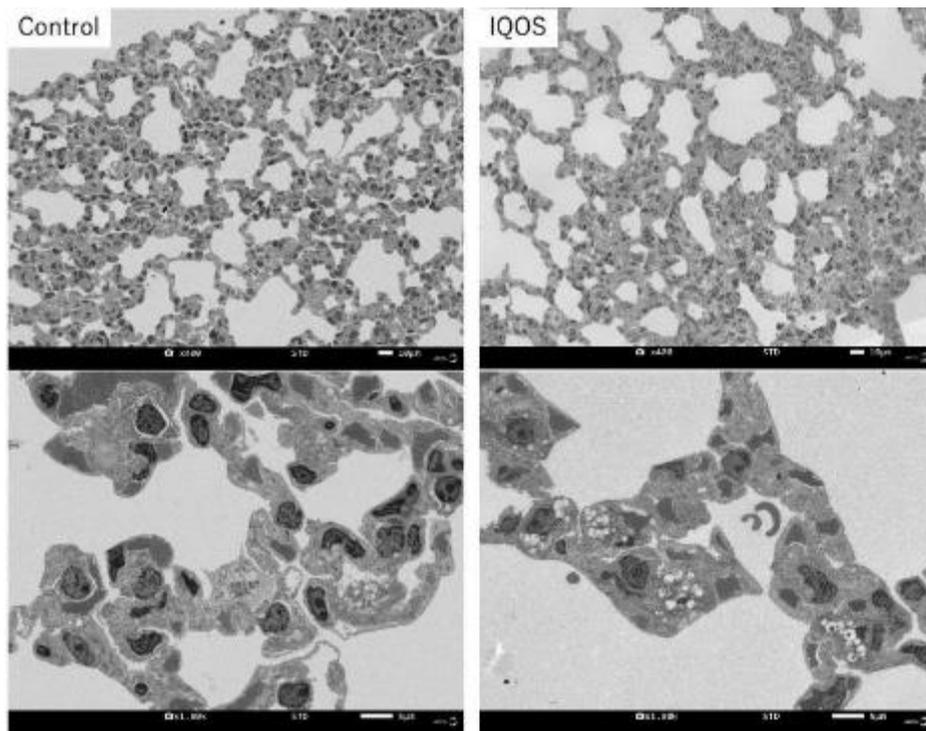


図 1 5 加熱式エアロゾルばく露後の電子顕微鏡像

コントロールの肺では、肺胞上皮細胞においても異常構造は認められない。加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウスの肺では、コントロールの肺同様に正常構造であるが、肺胞マクロファージの細胞が多く観察された。また肺胞マクロファージ内には空胞が多数認められた。

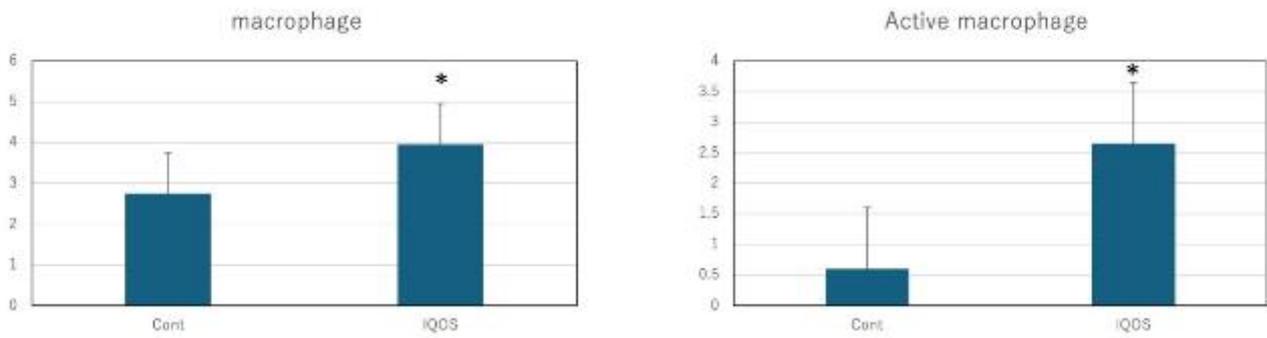


図 1 6 電子顕微鏡の画像解析の結果

左はマクロファージの出現数を示し、コントロール肺と比較し、加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウスの肺では肺泡マクロファージが増加していた。右は肺泡マクロファージ内に空胞が認められた細胞数を示す。コントロールマウスでは非常に少ない細胞数であるが、加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウス肺では肺泡マクロファージ細胞内に多数の空胞が観察される細胞が増加していた。

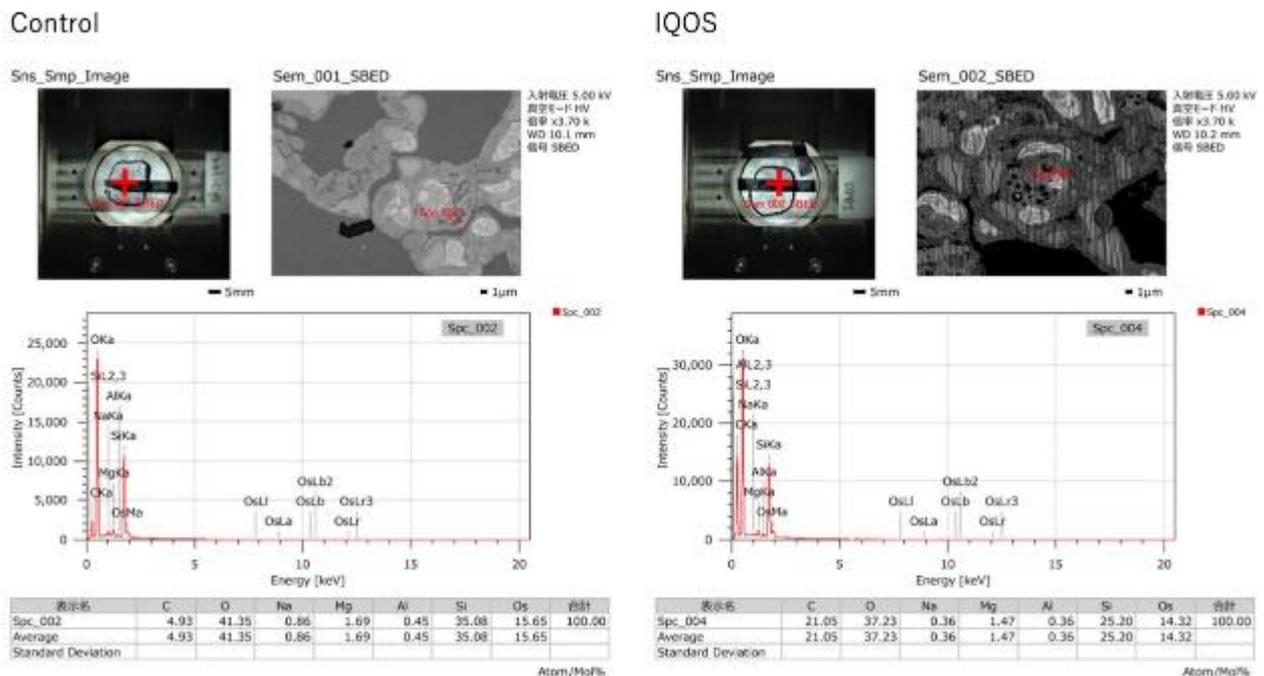


図 1 7 肺泡マクロファージ内に観察された空胞内の元素分析結果

コントロールと比較し、IQOS ばく露マウス肺のマクロファージでは、炭素が有意に増加していることが明らかになった。炭素を含む構成物を処理しているものと示唆される。

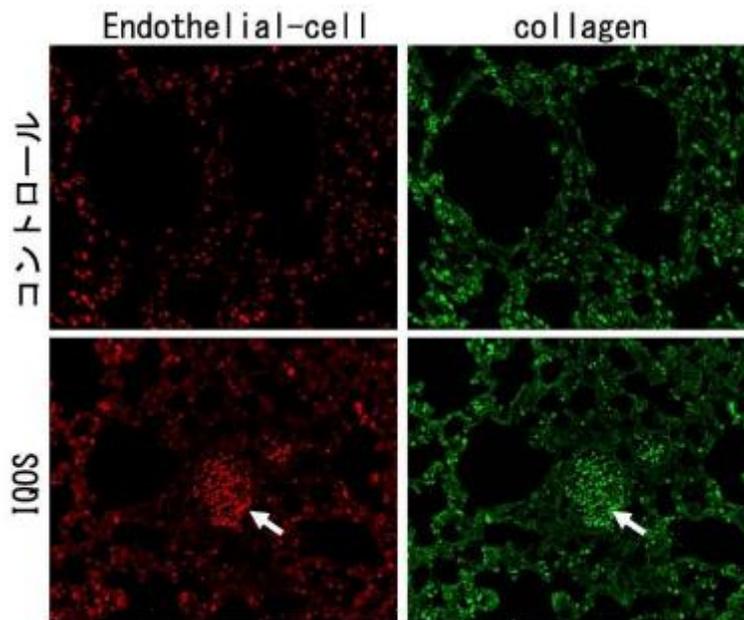


図 1 8 各抗体を用いた免疫組織化学法による像。

コントロール肺では、血管内皮細胞マーカー（赤）、コラーゲン染色（緑）とも異常構造は認められない。IQOS ばく露マウス肺の集積部位でも異常所見は観察されなかった。矢印は血管内であり、肺組織の所見を反映していない。

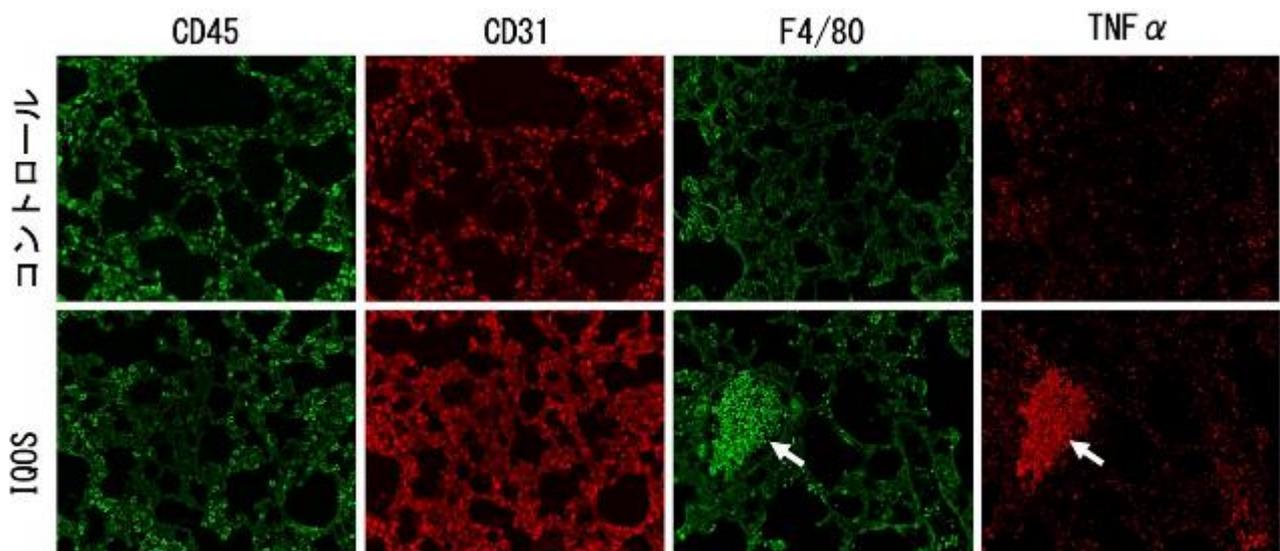
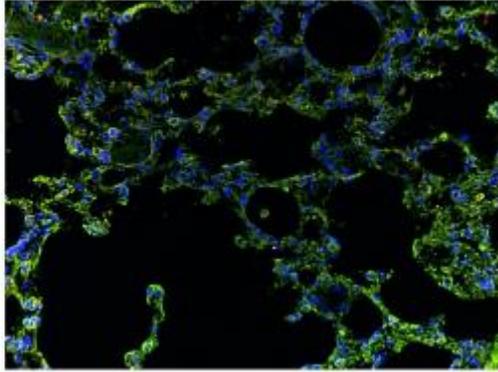


図 1 9 各抗体を用いた免疫組織化学法による像

コントロール肺ではマクロファージ細胞の異常集積や高発現は認められない。IQOS ばく露マウス肺における炎症様構造部位では、マクロファージ細胞の若干の発現上昇と集積が認められるが有意な変化ではなかった。矢印は血管内であり、肺組織の所見を反映していない。

F4/80 (緑)、MIP1 α (赤)

コントロール



IQOS

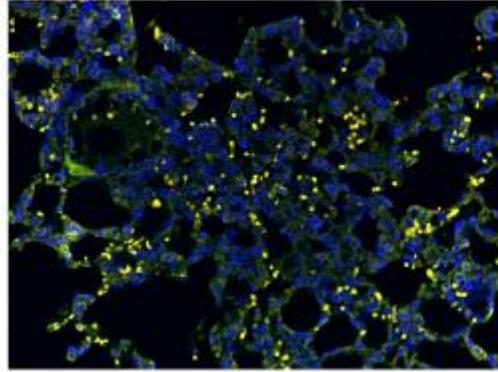


図20 免疫組織化学法による像

コントロール肺ではマクロファージからの分泌は認められない。IQOS ばく露マウス肺の炎症様構造を呈した部位では、マクロファージからのサイトカインが確認された (黄色)。

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)
令和3年～5年度 総合分担研究報告書

加熱式たばこの曝露試験より得られたマウスの諸臓器に対する分子病理学的解析

分担研究者 煙山 紀子 東京農業大学
研究協力者 美谷島 克宏 東京農業大学
研究協力者 中江 大 帝京平成大学

研究要旨

本分担研究は、本研究の別の分担研究者である国立保健医療科学院の牛山らにより開発された主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する加熱式たばこ喫煙装置を使用して、加熱式たばこの毒性病理学的影響について解析した。本分担研究は、牛山らにより実施された、雄性 **gpt delta** マウスに、噴霧により曝露した動物実験から供給を受けた材料を用い、病理組織学的解析および組織中遺伝子発現解析を行った。タバコ喫煙装置は、1ポートから4ポートへ改良され、一度に多くのマウスへの曝露が可能となった。さらに拘束条件から非拘束条件で5匹同時に曝露できるまで改良を重ねた。その結果、拘束条件下では体重減少と胸腺の萎縮が観察され、IQOS 曝露による免疫学的な影響が疑われたが、拘束ストレスの影響も示唆された。非拘束下においては、病理組織学的に胸腺では Air 群・IQOS 曝露群間で明らかな差はなく、曝露条件の改善によるものと考えられた。その他組織学的な変化は明らかでなかったものの、肺・腎臓などの遺伝子発現解析では、IQOS 曝露群において一部の炎症関連遺伝子並びに酸化ストレス関連因子発現に変動が認められた。このことから、本実験系では、IQOS 曝露による臓器障害を示唆する組織学的な変化は見られなかったものの、病態形成以前の段階において遺伝子発現への影響が見出された可能性があるものと考えられた。

A. 研究目的

近年普及しつつある加熱式たばこの安全性については、知見が限られている。健康増進法

(改正案)において、国は受動喫煙の防止に関する施策の策定に必要な調査研究を推進するように努めることとされているが、加熱式たばこの受動喫煙による健康影響については、さらなる科学的根拠の蓄積が必要とされている。

本分担研究は、国立保健医療科学院において開発された主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する加熱式たばこ喫煙装置を使用して、加熱式たばこの毒性病理学的影響について解析することを目的に行った。

B. 研究方法

1. 動物実験

本研究では、雄性 **gpt delta** マウスを用いた。群設

定は、令和3年度は雄性 **gpt delta** マウス（入荷時8週齢）を用い、対照群6匹、IQOS エアロゾル曝露群を4匹とし、1日あたり1時間で5本分の曝露を午前・午後に分け2回行った。同曝露を5日間行い、合計50本相当のエアロゾルを曝露した。対照群は通常飼育を行った。令和4年度は、**gpt delta** マウス（入荷時8週齢）IQOS 曝露群7匹、Air 曝露群8匹、ケージコントロール（対照）群4匹とした。4週間に亘って1日あたり5本分を午前と午後で1時間ずつ拘束し4ポートシステムより噴霧により曝露した。ケージ対照群は通常の飼育を行った。令和5年度は、4ポートシステムをさらに改良し、マウスを非拘束で5匹同時に曝露できるチャンバーを開発した。このシステムを用いて、4ポートシステムで実施した倍量の加熱式タバコ主流煙エアロゾルの曝露を行った。雄性 **gpt delta** マウス（入荷時5週齢）に、4週間に亘って1日あたり20本分を午前と午後で1時間ずつ非

拘束の噴霧により曝露した(令和5年度1回目)。さらに、同条件に加えて1日あたり10本分を曝露した群を設定し、再度実験を行った(令和5年度2回目)。

本曝露は、本研究の分担者である国立保健医療科学院・牛山らにより実施された。

2. 解析

当分担としては、解剖以後に採取された諸臓器を用いてBALFサイトカインアッセイ、病理組織学的解析、遺伝子発現解析を実施した。

C. 結果及び考察

1. 令和3年度

令和3年度では、5日目のエアロゾル曝露中に1匹が死亡し、曝露が完了したIQOSエアロゾル曝露群は3匹となった。曝露群においては、体重減少(図1)及び胸腺重量の減少(図2)が見られた。

病理学的解析において、曝露群では、胸腺の萎縮が観察された。病理組織学的観察においても、胸腺の萎縮が認められた。脾臓では曝露群の1例において髄外造血の亢進が認められた。その他、腎臓・肝臓・心臓・肺及び白色脂肪・褐色脂肪において対照群と曝露群間に明らかな差は見られなかった。

炎症性サイトカインレベルの測定については、BALF中、血清中、いずれもばらつきが大きく、群間に明確な差が見られなかった。

2. 令和4年度

令和4年度では、ケージ対照群では、曝露期間中に体重増加が見られたが、Air群とIQOS曝露群では、体重増加は認められなかった(図3)。解剖時の臓器重量測定において、肝臓、腎臓及び脾臓では、群間に明らかな差は見られなかったが、胸腺では、Air群とIQOS曝露群において相対重量がケージ対照群より低値であった(図4)。病理組

織学的解析では、Air群とIQOS曝露群共に、ごく軽度の胸腺の萎縮が観察された。しかし、Air群とIQOS曝露群間に明らかな差は見られなかった。また、肝臓、腎臓及び脾臓ではケージ対照群とAir群・IQOS曝露群間に明らかな差は見られなかった。

遺伝子発現解析では、肺・肝臓・腎臓・心臓において、ケージ対照群及びAir群と比較し、IQOS曝露群では、炎症関連および酸化ストレス関連遺伝子の発現において、一部上昇あるいは低下傾向にあったものの、明らかな変化はみられなかった(図5)。

3. 令和5年度

令和5年度では、1回目の実験では、曝露期間中における体重増加は、ケージ対照群に対して、Air群とIQOS曝露群では、体重増加の抑制が認められた(図6)。一方で、Air群とIQOS群に有意な差は見られなかった。相対臓器重量は、胸腺をはじめ各群間において有意な差はみられなかった(図7)。病理組織学的にIQOS曝露による胸腺、肝臓、心臓および腎臓等諸臓器への明らかな影響を見出すには至らなかった。しかしながら、肺組織及び腎臓中の遺伝子発現解析では、IQOS曝露群において一部の炎症関連遺伝子並びに酸化ストレス関連因子発現に変動が認められた(図8)。2回目の実験においても、曝露期間中における体重増加は、ケージ対照群に対してAir群とIQOS曝露群では同様に体重増加の抑制が認められた。相対臓器重量は、Air群に比してIQOS20本群で、腎臓重量が有意に増加し、一方で、白色脂肪重量は有意に低下した。その他の臓器重量に変化はみられなかった。現在、遺伝子発現解析ならびに組織学的解析を行い、本実験の結果を精査している。

4. 考察

加熱式タバコの主流煙曝露装置の開発により、マウスへの主流煙エアロゾル曝露に対する毒性病理学的解析を実施した。拘束下における曝露で

は、胸腺の萎縮が Air 群においても認められ、拘束ストレスの影響が示唆された。その後、非拘束下での曝露装置へと改良されたことで、ケージコントロール群に比して Air 群と IQOS 群において体重増加の抑制はみられたものの、胸腺重量への影響は消失し、拘束ストレスが緩和されたことが示唆された。Air 群に比して IQOS 群で肝臓・心臓・腎臓・脾臓・胸腺では明らかな組織学的変化はみられなかったが、肺・腎臓組織中の遺伝子発現解析では、IQOS 曝露群において一部の炎症関連遺伝子並びに酸化ストレス関連因子発現に変動が認められた。このことから、本実験系では、IQOS 曝露による臓器障害を示唆する組織学的な変化は見られなかったものの、病態形成以前の段階において遺伝子発現への影響が見出された可能性もあるものと考えられた。

D. 結論

本分担研究は、マウスにおける IQOS エアロゾル曝露による加熱式たばこの毒性病理学的影响について解析した。本実験において、曝露装置の改

善を図った結果、IQOS 曝露において免疫系組織の影響を見出すには至らなかったものの、組織中の遺伝子発現解析では一部の炎症および酸化ストレス関連遺伝子の上昇を認めた。よって、本分担研究における IQOS 曝露は、病態形成以前の段階において肺および他組織遺伝子発現へ影響を与える可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし
3. その他
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1：令和3年度 IQOS エアロゾル曝露期間中の体重推移

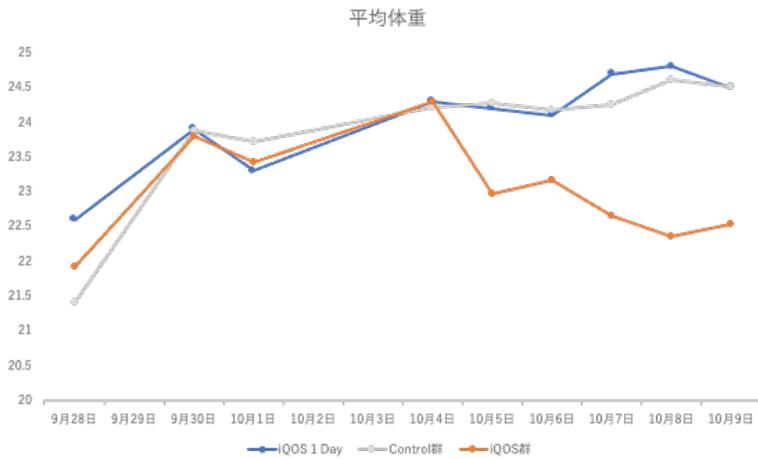


図2：令和3年度 解剖時の胸腺重量

胸腺・平均重量

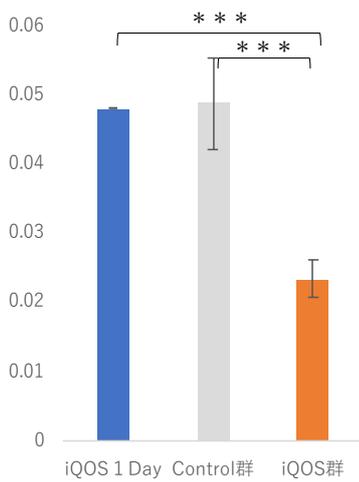


図3：令和4年度 IQOS エアロゾル曝露期間中の体重推移

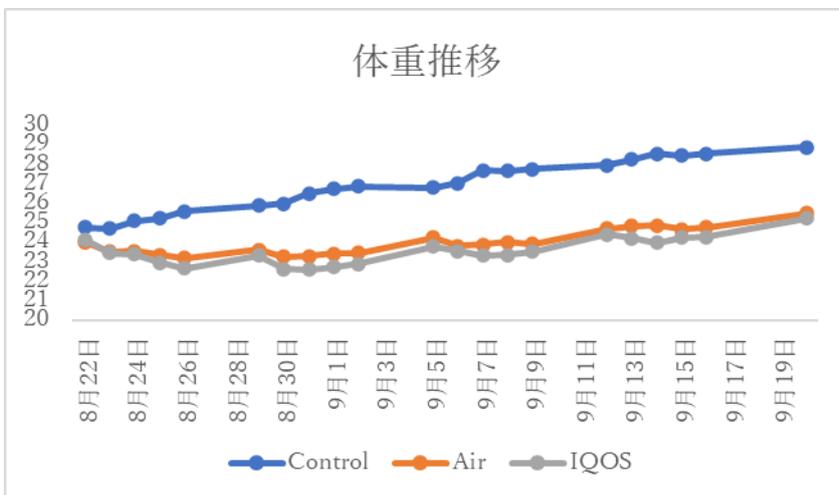


図4：令和4年度 解剖時の胸腺相対重量

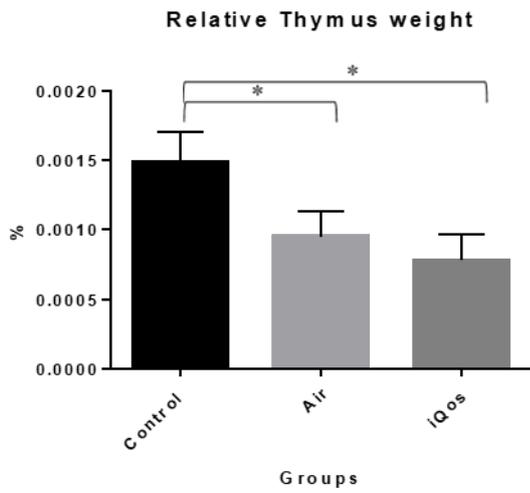


図5：令和4年度 肺における炎症関連遺伝子発現

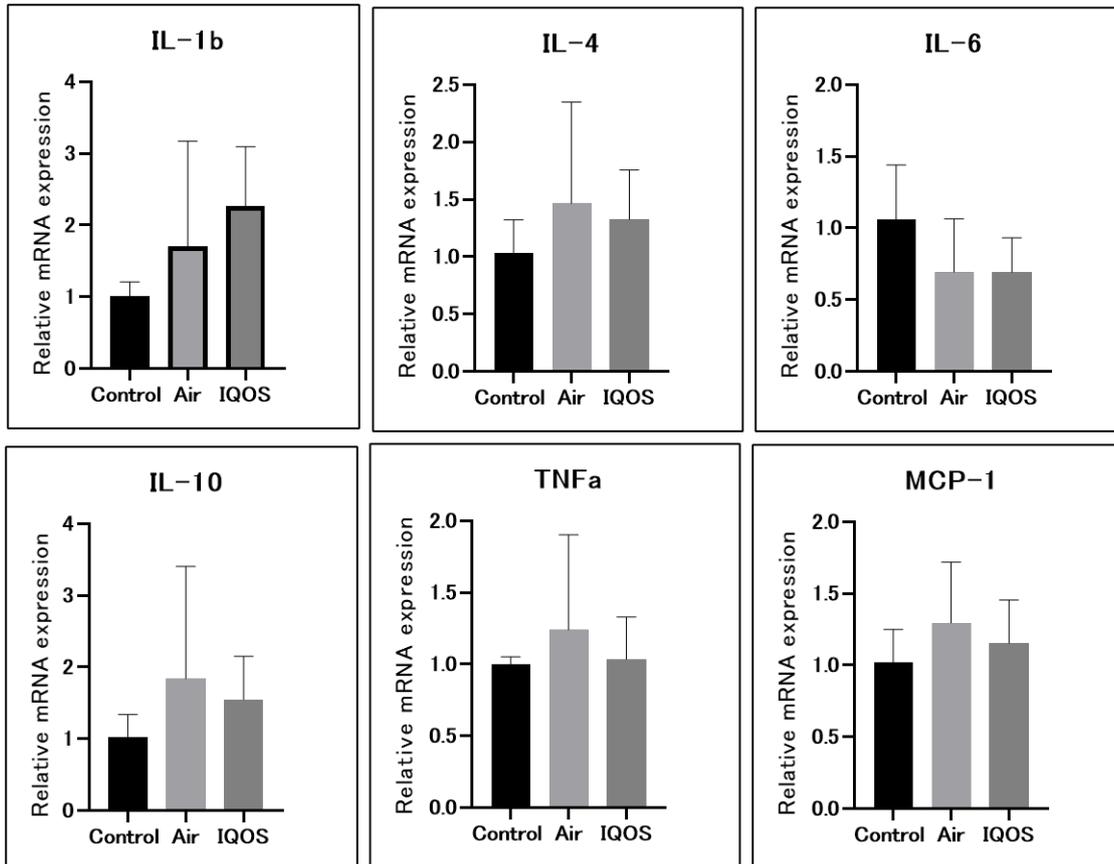
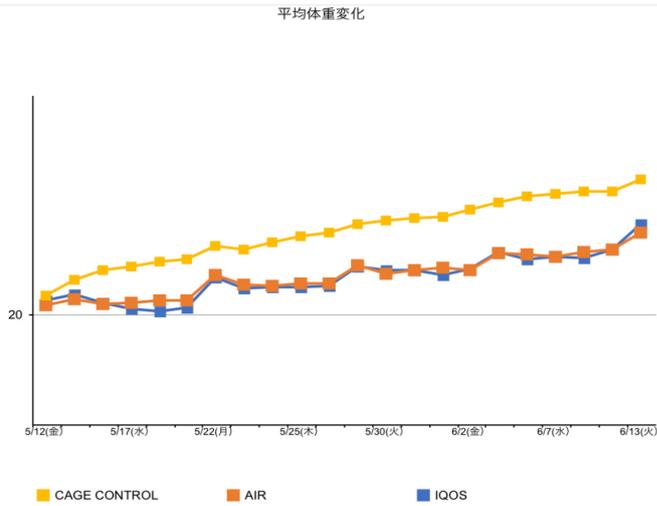


図 6 : 令和 5 年度 IQOS エアロゾル曝露期間中の体重推移
令和 5 年度 1 回目



令和 5 年度 2 回目

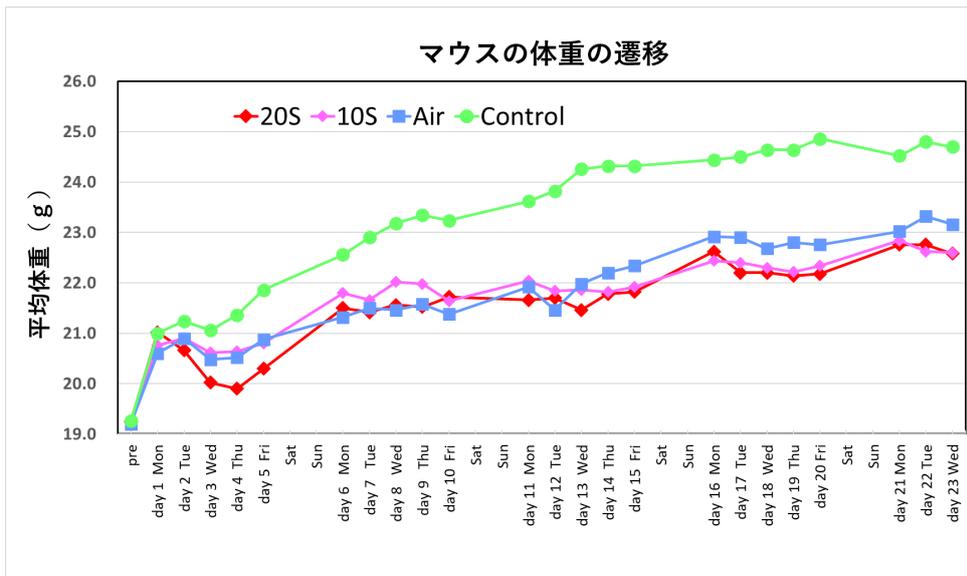


図 7 : 令和 5 年度 1 回目 解剖時の胸腺相対重量

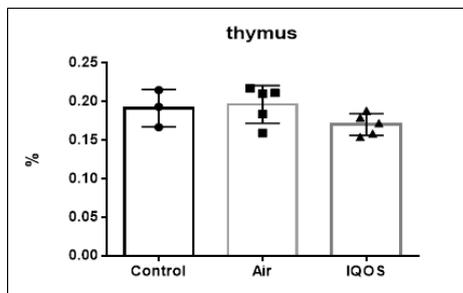
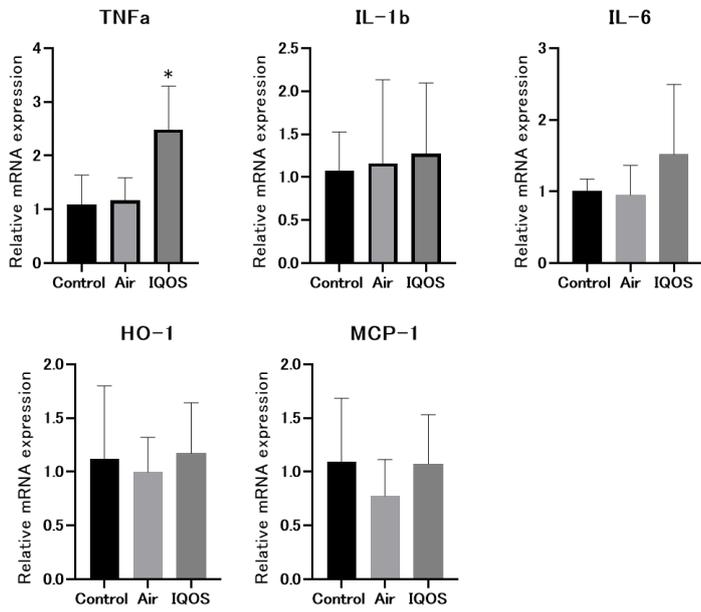
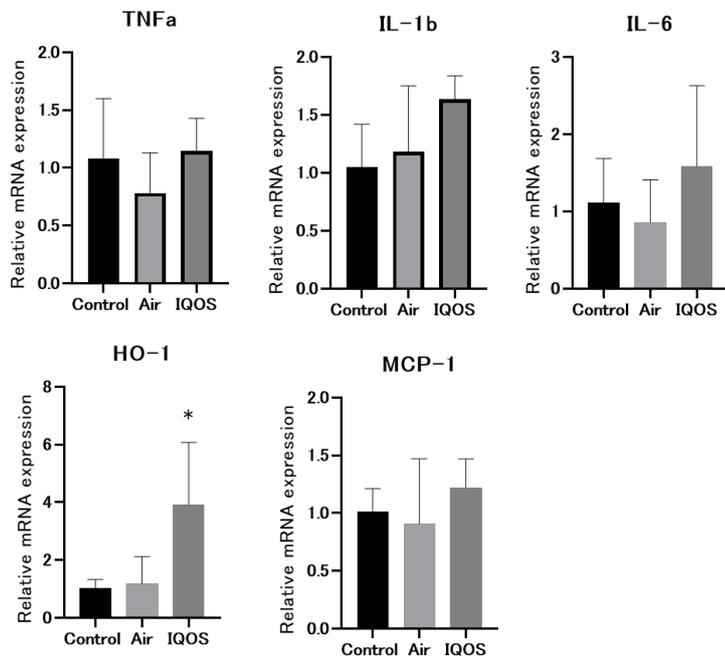


図 8 : 肺および腎臓遺伝子発現解析
肺



* = VS Air 群

腎臓



* = VS Air 群

令和3～5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)
総合研究報告書

加熱式たばこの *in vivo* 遺伝毒性評価

研究代表者 戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部・環境衛生学・教授

研究要旨： *gpt delta* マウスおよび C57BL/6J マウスを用いて、iQOS 主流煙捕集液の反復気管内投与による肺を対象とした *in vivo* 遺伝毒性について検討した。研究代表者(稲葉)らが開発した方法で加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを PBS に捕集した液を、*gpt delta* マウスおよび C57BL/6J マウスに、1匹あたり 100 μ Lx 40 回の気管内投与を行なったのち、屠殺解剖を行なった。抽出した *gpt delta* マウス肺より抽出した gDNA の *gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、Control 群と比べて紙巻きたばこ(3R4F)群、iQOS 群 の変異頻度はそれぞれ 1.3 倍、2.0 倍と上昇傾向にあった。変異スペクトルの解析を行なったところ、control と比較して 3R4F および iQOS 曝露群に共通して A:T→C:G、G:C→T:A 変異が増加した。さらに、iQOS 曝露群では G:C→C:G 変異の増加も観察された。C57BL/6J マウス肺より抽出した gDNA を用いて、気管内投与による DNA 付加体の網羅的解析を行なったところ、control 群と 3R4F 群、iQOS 群の 3 つにクラスタリングができた。iQOS のクラスタリングに寄与する付加体を見出した。さらに、研究代表者(稲葉)らが開発した加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する装置を用い、雄性 *gpt delta* マウスに対して、中期曝露(4週間)の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性についてインビトロパッケージング法により評価した。1 度目の曝露実験は iQOS を 1 回 5 本で 1 日に 1 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した(累計 iQOS 100 本相当)。この時に使用した曝露方法は *gpt delta* マウスを夏目製作所から購入した筒状フォルダー内に固定(拘束)し、4 分岐で曝露を実施し、最終曝露から 4 日目にマウスを解剖し、肺における変異原性の解析を *gpt assay* により検出した。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定し、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった(Air-control 群)。その結果、Air-control 群、iQOS 群に検出された変異頻度は殆ど変わらないことがわかった。2 度目の曝露実験では、iQOS の本数を前回より増やし、1 回 10 本で 1 日に 2 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した(累計 iQOS 400 本相当)。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを扇形の 5 区画に分けて曝露した。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを 5 区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった(Air-control 群)。その結果、有意差はつかないものの、iQOS 曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

研究協力者:

小宮雅美 日本大学薬学部・環境衛生学

A. 研究目的

健康増進法(改正案)において、国は受動喫煙の防止に関する施策の策定に必要な調査研究を推進するように努めることとされている。加熱式たばこについては、紙巻たばこと比較して販売からの歴史が浅いこと

から、現時点の科学的知見では、加熱式たばこの受動喫煙による将来的な健康影響をまだ分かっていないことも多く、更なる科学的根拠の蓄積が必要とされている。研究代表者が所属する国立保健医療科学院は、紙巻たばこで蓄積した成分分析の技術的知識(ノウハウ)をもとに新たな技術を開発してきており、2014年にはWHO-CC指定協力研究センターに認定され、さらに、WHO-TobLabNet(たばこ研究室ネットワーク)

に参画し、常に新しい技術開発に関する情報交換・国際標準化された分析法の開発を行ってきた（WHO TobLabNet SOP 8 and 9）。また、動物曝露用の加熱式たばこ喫煙装置の開発、特許出願（特願 2020-1753517）を行い、その曝露量を分析し、現在は論文投稿中である。

一方、申請者は令和1年～2年度の厚生労働省生活習慣病・難治性疾患等総合研究事業において、マウス気管内投与モデルを用い、加熱式たばこの一般・遺伝毒性評価の検討を行ってきた。（加熱式たばこによる健康危機発生を回避するための非臨床安全性評価に関する基礎的研究（19FA1501））本研究では、これまでの研究成果を基盤として、加熱式たばこ等の新たなたばこ製品について、動物実験により曝露マーカー、毒性試験について調べ、加熱式たばこおよび新たなたばこ製品についての毒性評価およびその手法を検討する。

B. 研究方法

I. 気管内投与実験

研究代表者（稲葉）らが開発した方法で加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを PBS に捕集した液を、*gpt delta* マウスおよび C57BL/6J マウスに 1 匹あたり 100 μ Lx 40 回の反復気管内投与を行なったのち、屠殺解剖を行なった。摘出した肺より gDNA を抽出し、常法に則って、*gpt mutation assay* および DNA 付加体の網羅的解析を行なった。

II. 吸入曝露実験

研究代表者（稲葉）らが開発した加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する装置（図 1）を用い、雄性 *gpt delta* マウスに対して、中期曝露（4 週間）の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性についてインビトロパッケージング法により評価した。

【Experiment 1】

1 度目の曝露実験は iQOS を 1 回 5 本で 1 日に 1 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 iQOS 100 本相当）。この時に使用した曝露方法は *gpt delta* マウスを夏目製作所から購入した筒状フォルダー内に固定（拘束）し、4 分岐で曝露を実施した（図 2）。

最終曝露から 4 日目にマウスを解剖し、摘出した肺より gDNA を抽出し、常法に則って、*gpt mutation assay* を実施した。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定し、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（Air-control 群）。

【Experiment 2】

2 度目の曝露実験では、iQOS の本数を前回より増やし、1 回 10 本で 1 日に 2 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 iQOS 400 本相当）。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを扇形の 5 区画に分けて曝露した（図 3）。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを 5 区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（Air-control 群）。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験にあたっては、国立保健医療科学院における動物実験に関する指針に則って実施し、3R の原則に則り、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

I. 気管内投与実験

gpt 遺伝子を指標とした変異原性試験

標的遺伝子である *gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果を図 4 に示す。control 及び 3R4F 群、iQOS 群に観察された変異頻度はそれぞれ $4.95 \times 10^{(-6)} \pm 2.80 \times 10^{(-6)}$ 、 $6.50 \times 10^{(-6)} \pm 3.48 \times 10^{(-6)}$ 、 $9.96 \times 10^{(-6)} \pm 3.01 \times 10^{(-6)}$ となり、曝露により変異頻度が上昇した。変異スペクトルの解析を行なったところ、control と比較して 3R4F および iQOS 曝露群に共通して A:T→C:G、G:C→T:A 変異が増加した。さらに、iQOS 曝露群では G:C→C:G 変異の増加も観察された。（図 5）

DNA 付加体網羅的解析（アダクトーム解析）

C57BL/6J マウス肺より抽出した gDNA を用いて、気管内投与による DNA 付加体の網羅的解析を行なったところ、control 群と 3R4F 群、iQOS 群の 3 つにクラスタリングができた（図 6）。iQOS のクラスタリ

ングに寄与する付加体として、Adduct 337 [m/z 566.3029→450.1196]とAdduct 1434 [m/z 363.1571→246.9960]を見出した(図7、8)。

II. 吸入曝露実験

【Experiment 1】

iQOS及び空気を曝露した後に摘出した肺から抽出したgDNAを用い、*gpt*遺伝子における変異頻度を解析した結果、変異頻度はAir-control群では平均 5.25×10^{-6} 、iQOS群では平均 3.73×10^{-6} と両グループ間で殆ど変わらないことがわかった。

【Experiment 2】

Experiment 1と同様に肺における変異頻度を*gpt*遺伝子を指標に解析した。その結果を表1及び図9に示す。

その結果、iQOS曝露群の平均変異頻度はAir control群の約2倍となり、有意差はつかないものの、iQOS曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

*gpt*遺伝子に変異を持つクローンのダイレクトPCRによる変異スペクトル解析を実施した結果を表2及び図10に示す。

本研究でのAir controlの解析数が少ないので、historical data (Totsuka Y. et al., Particle and Fibre Toxicology, 2009, 6:23)と比較して図10に示した。iQOS曝露群で得られたクローン数も少なく、はっきりとしたことは言えないが、コントロールと比較し、挿入変異が増えている傾向が観察された。

現在、同組織由来DNAを用いて、全ゲノム解析による体細胞変異の網羅的解析を実施してい

る。この結果と合わせて、iQOS特異的な変異スペクトルの同定を実施する予定である。

D. 考察

気管内投与実験においては、iQOS群および3R4F群ともにcontrol群と比較して*gpt*遺伝子における変異頻度が上昇したが、iQOS群の方が3R4F群よりも1.5倍ほど高くなった。これは、3R4Fでは主流煙中の変異を誘発する化学物質が脂溶性のものが多く、PBSに溶解せず捕集できなかったためと考えられた。このことより、主流煙PBS捕集液による検討のみではiQOS主流煙の生体への影響を明らかにするには不十分であり、主流煙を実際に吸入曝露させる実験と併せて評価する必要があると考えられる。

一方、吸入曝露実験においては、Experiment 1ではiQOS及びAir control群で変異頻度に差は見られなかったが、Experiment 2では有意差はつかないもののiQOS曝露群でAir control群の約2倍の変異頻度が観察されることがわかった。また、その変異スペクトル解析結果もcontrol群(historical data)とは異なるパターンを示しており、iQOS曝露により遺伝毒性に何らかの影響を及ぼしていることが推測された。Experiment 1と2では、使用しているiQOSの総量が異なり、Experiment 2の方が4倍多くなっていることから、Experiment 1では観察されなかった変異頻度の上昇が観察できたのではないかと考える。

変異スペクトルの解析から、iQOS曝露群ではコントロールと比較し、挿入変異が増えている傾向が観察された。紙巻タバコではPAHなどの影響によりG:C→T:Aが顕著に増加することが知られているが、本研究結果においては、G:C→T:A変異はコントロールとほぼ同程度であったことから、iQOS特有の変異原物質が存在することが示唆される。現在、同組織由来

DNA を用いて、全ゲノム解析による体細胞変異の網羅的解析を実施している。この結果と合わせて、iQOS に特異的な変異原誘発メカニズムの解明やリスク評価のバイオマーカーなどの同定について検討する予定である。

E. 結論

gpt delta マウスを用いて、iQOS 主流煙 PBS 捕集液の気管内投与による肺を対象とした *in vivo* 遺伝毒性について検討した。*gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、Control 群と比べて紙巻きたばこ(3R4F)群、iQOS 群 の変異頻度はそれぞれ 1.3 倍、2.0 倍と上昇傾向にあった。3R4F 群と比べて iQOS 群の変異頻度のほうが高値であったのは、3R4F 主流煙中の変異原物質の多くが脂溶性であり、PBS で捕集できなかつた為と考えられた。このことより、主流煙 PBS 捕集液による検討のみでは iQOS 主流煙の生体への影響を明らかにするには不十分であり、主流煙を実際に吸入曝露させる実験と併せて評価する必要があると考えられる。

DNA アダクトーム解析において見出したクラスタリングに寄与する DNA 付加体を同定し、変異スペクトルのデータと併せて評価することにより、iQOS 主流煙の変異毒性の詳細な検討を行っていく予定である。

一方、研究代表者（稲葉）らが開発した加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する装置を用い、雄性 *gpt delta* マウスに対して、中期曝露（4 週間）の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性についてインビトロパッケージング法により評価した。Experiment 1 では iQOS を 1 回 5 本で 1 日に 1 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 iQOS 100 本相当）。この時の曝露方法は *gpt delta* マウスを筒状フォルダー内に固定（拘束）し、4 分岐で曝露を実施した。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定

し、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（Air-control 群）。その結果、Air-control 群、iQOS 群に検出された変異頻度は殆ど変わらなかった。Experiment 2 では、iQOS の本数を前回より増やし、1 回 10 本で 1 日に 2 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 iQOS 400 本相当）。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを扇形の 5 区画に分けて曝露した。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを 5 区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のみでの曝露とした（Air-control 群）。その結果、有意差はつかないものの、iQOS 曝露群で変異頻度がコントロールの約 2 倍に増加する傾向が観察された。さらに、変異スペクトルの解析から、iQOS 曝露群ではコントロールと比較し、挿入変異が増えている傾向が観察された。紙巻タバコでは PAH などの影響により G:C→T:A が顕著に増加することが知られているが、本研究結果においては、G:C→T:A 変異はコントロールとほぼ同程度であったことから、iQOS 特有の変異原物質が存在することが示唆される。現在、同組織由来 DNA を用いて、全ゲノム解析による体細胞変異の網羅的解析を実施している。この結果と合わせて、iQOS に特異的な変異原誘発メカニズムの解明やリスク評価のバイオマーカーなどの同定について検討する予定である。

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. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S,

- Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2022) Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2022 Sep 19;35(9):1625-1630.
3. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. (2022) Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer. *In Vivo.* Mar-Apr;36(2): 628-634.
 4. Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y., (2021) Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids, *Front Genet.* Nov 18;12: 768781.
 5. Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. (2021) Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo.* 35(4):2107-2114.
 6. Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2021) o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 34(3):912-919.
 7. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.
2. 学会発表
 1. 戸塚ゆ加里 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. 戸塚ゆ加里. 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、石ケ守里加子、稲葉洋平、戸塚ゆ加里. 加熱式タバコの遺伝毒性評価、第52回環境変異原学会 (2023年11月、福岡)
 5. 石ケ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、戸塚ゆ加里. 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・ジクロラ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、戸塚ゆ加里. 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、戸塚ゆ加里. 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、**戸塚ゆ加里**. 加熱式タバコの遺伝毒性評価、がん予防学術大会2023 (2023年9月、金沢)
 12. Yukari Totsuka Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate a association between environmental factors and human cancer development 12th AACR-JCA Joint Conference (2022年12月、マウイ・ハワイ、米国)
 13. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、永井桃子、加藤護、松田知成 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第35回 発癌病理研究会 (2022年11月、新潟)
 14. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木 周五、魏民、鰐淵 英機、戸塚 ゆ加里 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析 第51回 環境変異原学会 (2022年11月、広島)
 15. 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜 DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価 第51回 環境変異原学会 (2022年11月、広島)
 16. 戸塚ゆ加里、集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第1回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022年11月、東京)
 17. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護 Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development 第81回癌学会 (2022年9月、横浜)
 18. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里 Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues 第81回癌学会 (2022年9月、横浜)
 19. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木 周五、魏民、鰐淵 英機、戸塚 ゆ加里 Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer 第81回癌学会 (2022年9月、横浜)
 20. Yukari Totsuka New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer 13th ICEM (2022年8月オタワ・カナダ)
 21. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines 13th ICEM (2022年8月オタワ・カナダ)
 22. 小宮 雅美、鈴木 周五、魏民、鰐淵 英機、戸塚 ゆ加里 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析 第29回日本がん予防学術大会 (2022年 7月 京都)
 23. 小林 琢磨、豊田 武士、吉岡 泰淳、岸本 真治、松下 幸平、赤根 弘敏、小川 久美子、渡辺 賢二、高村 岳樹、戸塚 ゆ加里、若林 敬二、三好 規之 細胞毒性を有するo-Toluidineとo-Anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する 第29回日本がん予防学術大会 (2022年 7月 京都)
 24. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望 第49回日本毒性学会 (2022年6月札幌)
 25. 戸塚ゆ加里 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第81回分析化学討論会 (2021年5月 Web開催)
 26. 戸塚ゆ加里 DNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第144回日本薬理学会関東支部会 (2021年6月 Web開催)
 27. 戸塚ゆ加里 Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development 第80回癌学会 (2021年10月、横浜)
 28. 戸塚ゆ加里 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価 第50回 環境変異原学会 (2021年11月、横須賀)
 29. 戸塚ゆ加里 ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する 第95回 日本薬理学会 (2022年3月、福岡)
 30. 戸塚ゆ加里 ナノマテリアルに特化した新規in vitro生体模倣評価系の開発 日本薬学会 第142年会 (2022年3月、Web開催)
- G. 知的財産権の取得状況
1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

資料 研究成果に関する図表

図1 曝露装置

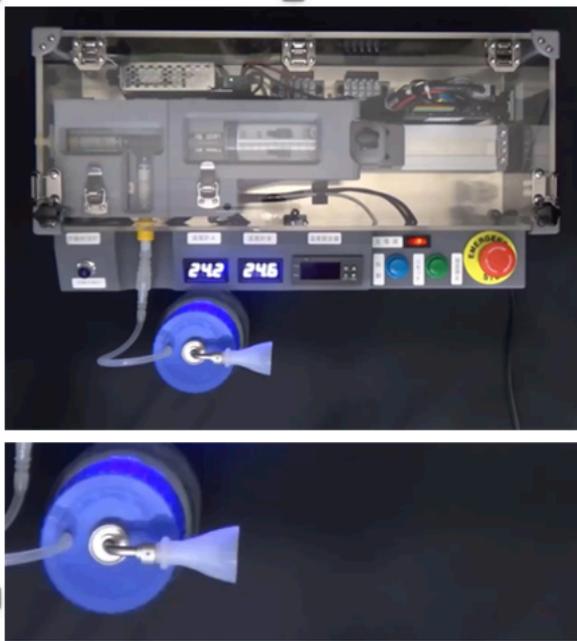


図2 使用した保定機



図3 大きな筒状のフォルダーを用いた無拘束曝露装置



図4 *gpt* 遺伝子における変異頻度

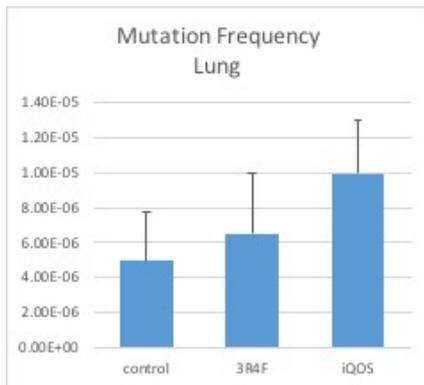


図5 *gpt* 遺伝子における変異のスペクトル解析

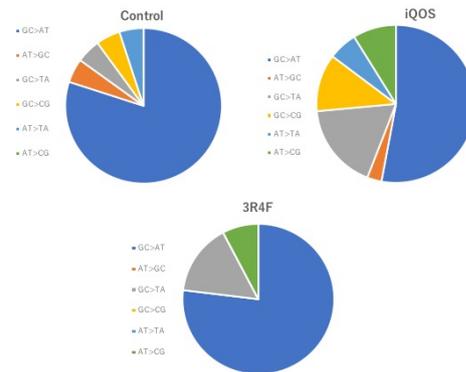


図6 DNA 付加体網羅的解析

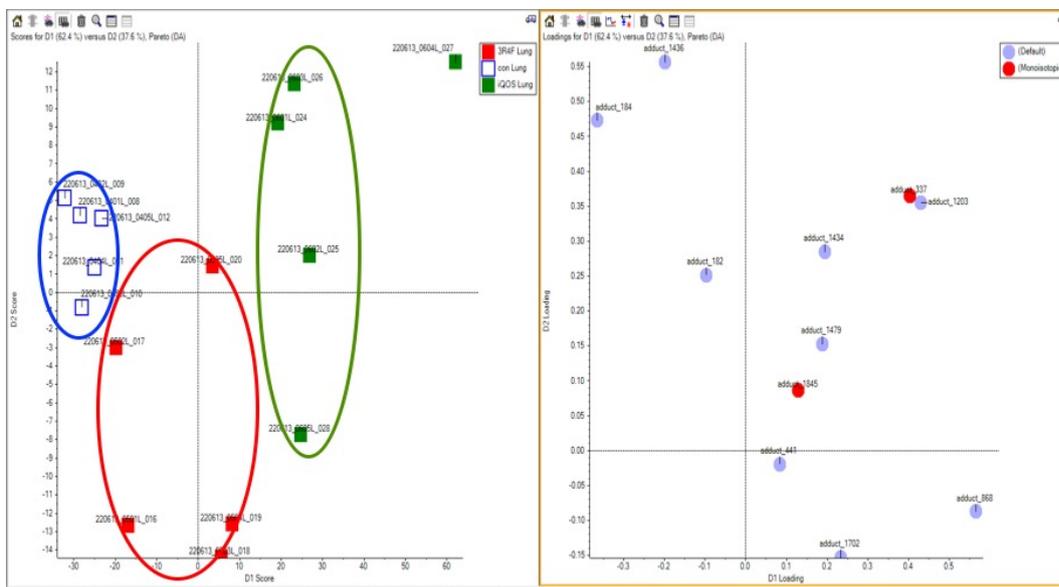


図7 主成分解析における iQOS 曝露群の特徴的なアダクト

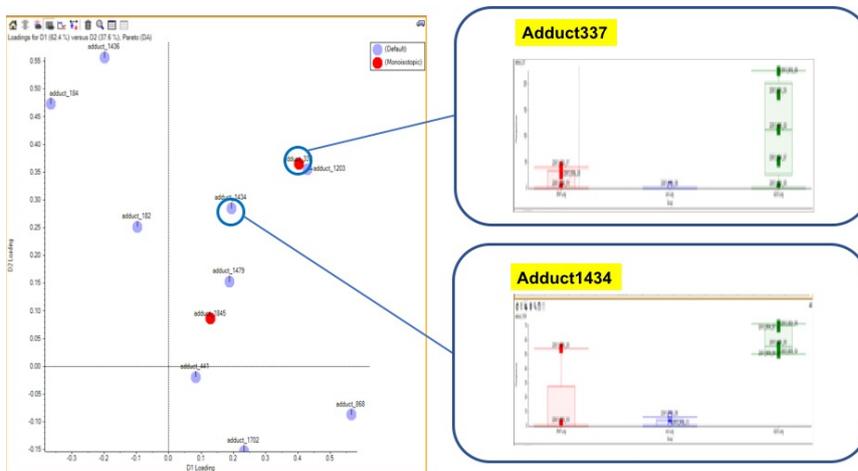
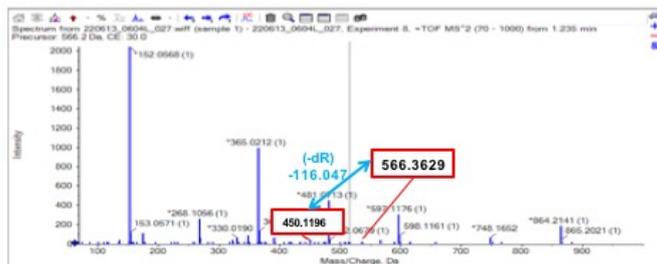


図8 付加体337および1434のフラグメンテーション解析

Adduct337



Adduct1434

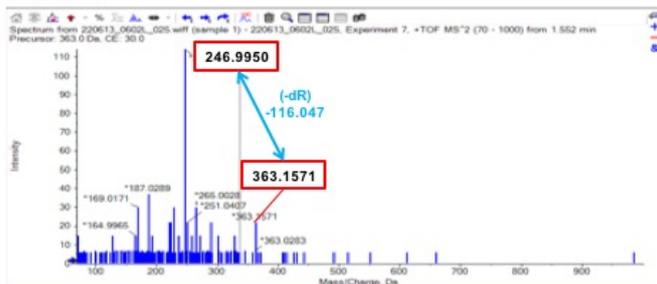


表1 *gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験結果

Treatment	Mouse ID	Number of colonies		MF (x10 ⁻⁵)	Average MF (x10 ⁻⁵)
		Mutant	Total		
Air control	2	3	285,000	1.05	-
	3	2	447,000	0.45	-
	4	1	147,000	0.68	-
	5	0	727,500	0.00	-
	Total	6	1,606,500	-	0.54 ± 0.44
iQOS	1	4	228,000	1.75	-
	2	3	220,500	1.36	-
	3	3	189,000	1.58	-
	4	4	516,000	0.78	-
	5	1	358,500	0.28	-
	Total	15	2,452,500	-	1.15 ± 0.61

図9 *gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験結果

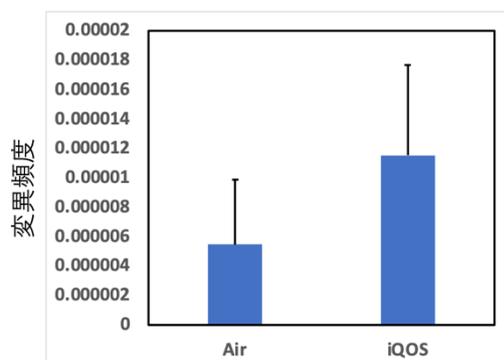


表2-1 変異スペクトル解析(数)

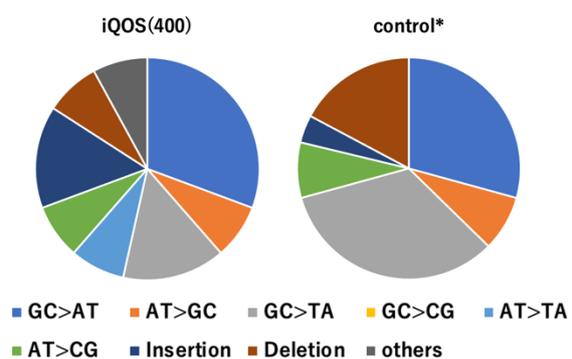
#	Aircontrol	iQOS(400)	control*
GC>AT	1	4	7
AT>GC	0	1	2
GC>TA	2	2	8
GC>CG	0	0	0
AT>TA	0	1	0
AT>CG	1	1	2
Insertion	0	2	1
Deletion	0	1	4
others	0	1	0
Total	4	13	24

表2-2 変異スペクトル解析(%)

%	Aircontrol	iQOS(400)	control*
GC>AT	25	31	29
AT>GC	0	8	8
GC>TA	50	15	33
GC>CG	0	0	0
AT>TA	0	8	0
AT>CG	25	8	8
Insertion	0	15	4
Deletion	0	8	17
others	0	8	0
Total	100	100	100

*control は historical data (Totsuka Y. et al., Particle and Fibre Toxicology, 2009, 6:23)

図10 変異スペクトル解析の比較



研究成果の刊行に関する一覧表

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

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
Kobayashi T, Kimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Odagawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and p-Aniline Formed by In Vitro Metabolism.	Chem Res Toxicol.	35(9):	1625-1630	2022
Narita T, Tsunemitsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamada T, Fujii G, Yoshikawa Y, Satoh M, Kawanishi M, Sugimura H, Itahashi Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M	Induction of DNA Damage in Mouse Colorectal Tumor by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer.	In Vivo.	Mar-Apr;36(2):	628-634.	2022
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

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和4年 5月 2日

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 鳥山 正晴

次の職員の(令和) 3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 加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と受動喫煙による健康影響の研究
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 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 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 未受講

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。

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
Bekki K, Uchiyama S, Inaba Y, Ushiyama A.	Analysis of furans and pyridines from new generation heated tobacco product in Japan.	Environ Health Prev Med	26	89	2021
Sawa M, Uchiyama A, Inaba Y, Uchiyama S, Hattori K, Ogasawara Y, Ishii K.	A Newly Developed Aerosol Exposure Apparatus for Heated Tobacco Products Can Deliver Both Particles and Gas Phase With High Recovery and Depicts the Time-Dependent Variation in Nicotine Metabolites in Mouse Urine.	Nicotine Tob Res.	23	2145-2152	2021
Sawa M, Uchiyama A, Inaba Y, Hattori K.	Increased oxidative stress and effects on inflammatory cytokine secretion by heated tobacco products after aerosol exposure to mice.	Biochem Biophys Res Commun.	2022	610	43-48
Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogasawara K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism.	Chem Res Toxicol.	35	1625-1630	2022
Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshie N, Komiya M, Hamamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Saito M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M.	Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer.	In Vivo	36	628-634	2022
黄載雄, 李時桓	加熱式タバコの喫煙による呼吸特性と化学種物質の挙動特性	日本建築学会大会学術講演梗概集	40733	1591-1592	2022
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