

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
分担研究報告書

揮発性有機化合物代謝物の一斉分析法の確立と日本人喫煙者および受動喫煙者への適用

研究分担者 稲葉洋平 国立保健医療科学院
研究代表者 大森久光 熊本大学
研究分担者 櫻田尚樹 産業医科大学
研究分担者 緒方裕光 女子栄養大学
研究協力者 尾上あゆみ 熊本大学

研究要旨

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

喫煙者の分析結果は、加熱式たばこ喫煙者が27名、紙巻たばこ喫煙者が21名そして併用者が20名そして非喫煙者が37名であった。紙巻たばこ喫煙者が加熱式たばこ喫煙者と比較して分析値が高い成分は3-HPMA, CYMA, 2-HPMA, AMCCなどが確認された。特にCYMAは紙巻たばこ喫煙者50.7 ng/mg creatinineに対して加熱式たばこ喫煙者が1.81であった。加熱式たばこ喫煙者と非喫煙者のVOC代謝物量を比較すると加熱式たばこ喫煙者はAAMA, AMCC, 2-HPMA, DHBMAとHPMMA値が非喫煙者よりも高い結果となっていた。その結果、VOC代謝物の分析によって喫煙者の曝露実態が、たばこ製品ごとに異なることが分かってきた。さらに加熱式たばこ喫煙者においてもVOCの曝露が生じていることが確認された。

次に日本人受動喫煙者114名の尿試料について、尿中VOC代謝物の分析を行なった（Table 2）。受動喫煙者の内訳は、加熱式たばこ受動喫煙者が39名、紙巻たばこ受動喫煙者が37名そして併用者の受動喫煙者が38名であった。その結果、受動喫煙者と非喫煙者のVOC代謝物の値には大きな差は認められなかった。今後、サンプル数が増えることで受動喫煙者と非喫煙者のVOC代謝物の実態評価が可能になると考えている。

- A. 研究目的 たばこ特異的ニトロソアミン代謝物の分析を行ってきた。
これまで分担研究者は、日本人喫煙者に加えて受動喫煙者のニコチン代謝物、 たばこ煙には、多くの有害化学物質が含

まれており[1], その有害化学物質の曝露による生体への影響が結論づけられている。現在までにたばこの主流煙には 5,300 種類以上の化学物質が含まれていると報告されている[2]。さらに主流煙は, IARC の発がん性リスク一覧のグループ 1 とされた「ヒトに対する発がん性が認められる」化合物が確認されている。このグループ 1 には, 厚生労働省によって室内濃度指針値が定められているホルムアルデヒドが含有され, 有害化学物質のアセトアルデヒド, アクロレイン, アクリルアミド, アクリロニトリルなどの揮発性有機化合物なども含まれている[1]。

加熱式たばこは, 加工されたたばこ葉を携帯型の装置で加熱することによって発生する煙(エアロゾル)を吸引するたばこ製品である。このたばこ製品は, 燃焼を伴わないために紙巻たばこから発生する有害化学物質の発生を抑制する。2014 年に販売開始された IQOS をはじめとする加熱式たばこの主流煙(エアロゾル)は, 燃焼由来の有害化学物質が 90%近く削減されている。しかし, 低減されていない有害化学物質が存在している。また, 加熱式たばこのエアロゾルの有害化学物質の成分数は大幅に低減されていないため, 加熱式たばこを使用する限り化学物質の複合曝露は継続されている。加熱式たばこ主流煙の揮発性有機化合物は, 紙巻たばこと比較すると軽減されている[3,4]。しかし, 実際に日本人喫煙者および受動喫煙者に対してどの程度の曝露量であるか, 報告数が少ない。そこで本研究では, 加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の揮発性有機化合物代謝物の分析法を確立し, 日本

人喫煙者, 受動喫煙者の揮発性有機化合物代謝物 (Volatile Organic Compounds: VOC 代謝物) の分析を行なった。

B. 研究方法

(1) 被験者

本研究の被験者は, 今年度の本研究班の研究に参加した喫煙者・受動喫煙者および非喫煙者の尿試料を使用した。本研究計画「加熱式たばこの健康影響評価のためバイオマーカーを用いた評価手法の開発」(受付番号 倫理第 2150 号) は, 熊本大学の倫理委員会で審査され, 2020 年 11 月 12 日付けで承認された。さらに本研究を実施するために, 国立保健医療科学院においても倫理委員会で審査され, 承認された (NIPH-IBRA#12317)。

(2) クレアチニン測定

尿中クレアチニンの測定には, クレアチニン測定用キットである和光純薬製クレアチニン-テストワコー (Jaffé 法) を適用した。

(3) 尿中 VOC 代謝物の分析

揮発性有機化合物 (VOC) 代謝物は, Table 1 に示す 17 成分を分析対象とした。尿中 VOC 代謝物の固相抽出には, MonoSpin®C18-CX (GL サイエンス社製) を用いた。VOC 代謝物の分析は, 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS/MS ; Qtrap5500, SCIEX 社製) を使用した。LC 条件は Alwis らの方法[5]を採用した。なお, LC/MS/MS の検量線範囲は Table 2 に示した。

C. 研究結果及び考察

(1) 喫煙者の尿中 VOC 代謝物の分析

日本人喫煙者 68 名，非喫煙者 37 名の尿試料について，VOC 代謝物の分析を行った (Table 1)。喫煙者の内訳は，加熱式たばこ喫煙者が 27 名，紙巻たばこ喫煙者が 21 名そして併用者が 20 名であった。VOC 代謝物の分析結果を成分に着目すると，紙巻たばこ喫煙者が加熱式たばこ喫煙者と比較して分析値が高い成分は 3-HPMA, CYMA, 2-HPMA, AMCC などが確認された。特に CYMA は紙巻たばこ喫煙者 50.7 ng/mg creatinine に対して加熱式たばこ喫煙者が 1.81 であった。この分析結果とニコチン代謝物量を比較すると喫煙者が紙巻たばこまたは加熱式たばこを使用しているのかが判定できる可能性がある。次に加熱式たばこ喫煙者と非喫煙者の VOC 代謝物量を比較すると加熱式たばこ喫煙者は AAMA, AMCC, 2-HPMA, DHBMA と HPMMA 値が非喫煙者よりも高い結果となっていた。

(2) 受動喫煙者の尿中 VOC 代謝物の分析

日本人受動喫煙者 114 名の尿試料について，尿中 VOC 代謝物の分析を行なった (Table 2)。受動喫煙者の内訳は，加熱式たばこ受動喫煙者が 39 名，紙巻たばこ受動喫煙者が 37 名そして併用者の受動喫煙者が 38 名であった。

非喫煙者と喫煙者尿中 VOC 濃度は，喫煙者のデータとは違い，全般的に低い値であった。

受動喫煙のバイオマーカーとなる可能性のある成分は，2-HPMA と Xylene の代謝物である 2-MHA と 3-MHA, 4-MHA の合算値などが考えられた。しかしながら受動喫煙

者のバイオマーカーを VOC 代謝物で評価するためには，サンプル数が少ないことが課題としてあげられた。

最終年度は，たばこ特異的なバイオマーカーではなく，燃焼によって発生する揮発性有機化合物 (VOC) の代謝物を分析対象として評価を行った。VOC は家庭用品，家屋の床材，壁紙からも放散する成分のため非喫煙者からも検出された。今後，サンプル数が増えることによってニコチン代謝物，たばこ特異的ニトロソアミン代謝物以外のバイオマーカーとして活用の可能性が示唆された。

D. 結論

本研究では，喫煙者及，受動喫煙者および非喫煙者の VOC 代謝物の分析を行い，加熱式たばこ，紙巻たばこ及び併用者，受動喫煙者，非喫煙者の比較を行うことを目的とした。その結果，VOC 代謝物の分析によって喫煙者の曝露実態が，たばこ製品ごとに異なることが分かってきた。次に受動喫煙に関するバイオマーカーとして適用するためには，サンプル数が必要であることが分かった。

[引用文献]

- [1] IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 83: 1-1438, 2004.
- [2] Rodgman A, Perfetti TA. Alphabetical Component Index. In: The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. Rodgman A, Perfetti TA, editors. Boca Raton, FL: CRC Press, 1483-1784, 2009.
- [3] Uchiyama S, Noguchi M, Takagi N,

Hayashida H, Inaba Y, Ogura H, Kunugita N.
Simple Determination of Gaseous and
Particulate Compounds Generated from
Heated Tobacco Products. Chem Res Toxicol.
2018 Jul 16;31(7):585-593.

[4] Uchiyama S, Tomizawa T, Inaba Y, Kunugita
N. Simultaneous determination of volatile
organic compounds and carbonyls in
mainstream cigarette smoke using a sorbent
cartridge followed by two-step elution. J
Chromatogr A. 2013 Nov 1;1314:31-7.

[5] Alwis KU, Blount BC, Britt AS, Patel D,
Ashley DL. Simultaneous analysis of 28
urinary VOC metabolites using ultra high
performance liquid chromatography coupled
with electrospray ionization tandem mass
spectrometry (UPLC-ESI/MSMS). Anal
Chim Acta. 2012 Oct 31;750:152-60.

F. 研究発表

稲葉洋平, 尾上あゆみ, 緒方裕光, 井上博
雅, 黒澤一, 寒川卓哉, 町田健太郎, 樺田尚
樹, 大森 久光. 加熱式たばこ喫煙者と受動
喫煙者の尿中バイオマーカーの分析. 第93
回日本衛生学会学術総会. 2023.3.2-4. (東京)
同講演集 S185.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 分析対象の揮発性有機化合物代謝物と曝露化合物

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

Table 2 揮発性有機化合物代謝物の内部標準物質と検量線範囲

曝露物質	代謝物	内部標準	検量線濃度範囲 (ng/mL)
Acrolein	3-HPMA	3HPMA-d3	1-200
Acrolein	CEMA	CEMA-d3	1-200
Crotonaldehyde	CMEMA	CMEMA-d3	1-200
Crotonaldehyde	HPMMA	HPMMA-d3	1-200
Acrylamide	AAMA	AAMA-d3	1-200
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	AMCC	AMCC-d3	1-200
Acrylonitrille	CYMA	CYMA-d3	0.05-100
Propylene oxide	2-HPMA	2HPMA-d3	1-200
1,3-Butadiene	DHBMA	DHBMA-d7	1-200
1,3-Butadiene	MHBMA 1	MHBMA-d6	0.1-100
1,3-Butadiene	MHBMA 2	MHBMA-d6	0.1-100
1,3-Butadiene	MHBMA3	MHBMA3-d3	0.1-100
Ethylbenzen,Styrene	PGA	PGA-d5	0.2-100
Xylene	2MHA	2MHA-d7	1-100
Xylene	3MHA	3MHA-d7	1-100
Xylene	4MHA	4MHA-d7	1-100
Benzene	PMA	PMA-d5	0.01-100
Toluene	SBMA	SBMA-d3	0.01-200

Table 3 日本人喫煙者のたばこ製品別の揮発性有機化合物代謝物分析結果

曝露化合物		Amounts (ng/mg creatinine)																						
代謝物名	CEMA	Acrolein		Crotonaldehyde		Acrylamide		N,N-Dimethylformamide		Acrylonitrile		Propylene oxide		1,3-Butadiene			Ethylbenzene, Styrene		Xylene		Benzene		Toluene	
		3-HPMA	HPMA	CMEA	HPMA	AAMA	AMCC	CYMA	2-HPMA	DHBMA	MHBMA	MHBMA	MHBMA	MHBMA	1	2	3	PGA	2MHA	3MHA+4MHA	PMA	PMA	SBMA	SBMA
加熱たばこ (n=27)	130	516	360	1,356	45.6	240	1.81	21.1	466	0.57	0.24	6.71	108	20.5	15.2	<0	1.77							
併用者 (n=20)	181	1,082	551	1,571	64.7	374	43.5	74.7	540	0.70	0.59	11.5	137	29.2	43.7	<0	2.49							
紙巻たばこ (n=21)	275	1,138	677	1,771	61.7	412	50.7	60.7	577	0.54	1.35	9.05	143	25.0	35.1	<0	2.10							
非喫煙者 (n=37)	142	320	187	1,174	26.5	119	0.94	12.8	363	0.11	0.08	5.39	102	15.5	7.11	<0	2.67							

Table 4 日本人受動喫煙者のたばこ製品別の揮発性有機化合物代謝物分析結果

揮発性化合物	Amounts (ng/mg creatinine)																			
	Acrolein	Crotonaldehyde	Acrylamide	N,N-Dimethylformamide	Styrene	Acrylonitrile	Propylene oxide	1,3-Butadiene	Ethylbenzene	Xylene	Benzene	Toluene	Styrene	SBMMA						
代謝物名	CEMA	3-HPMA	CMEMA	HPVMA	AAAMA	AMCC	MA	10,247	0,68	29,5	417	0,38	0,14	5,87	117	19,9	10,4	<0	<0	2,33
加熱式たばこ 受動喫煙者 n=39	127	412	838	192	29,4	70,9	10,247	0,68	29,5	417	0,38	0,14	5,87	117	19,9	10,4	<0	<0	<0	2,33
併用者 受動喫煙者 n=38	114	511	949	218	20,3	91,6	10,487	1,14	94,1	344	0,33	0,07	3,59	126	28,6	16,6	<0	<0	<0	2,32
紙巻たばこ 受動喫煙者 n=37	118	417	968	218	24,1	96,0	11,720	1,21	88,1	413	0,79	0,13	4,63	141	32,3	14,5	<0	<0	<0	2,87
非喫煙者 n=37	142	320	1,174	187	26,5	119	8,675	0,94	12,8	363	0,11	0,08	5,39	102	15,5	7,11	<0	<0	<0	2,67