

厚生労働科学研究費（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）  
バイオマーカーを用いた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を評価する  
ための研究

総合研究報告書

研究代表者 大森久光 熊本大学大学院生命科学研究部 生体情報解析学講座 教授

研究要旨

本研究は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的とした。本研究では、先行研究での受動喫煙の評価方法に加えて、曝露指標（尿中ニコチン代謝物）、臨床指標（炎症、呼吸機能）および肺への影響指標を分析し、加熱式たばこの使用によって影響の生じるバイオマーカーの抽出および選定を目指すことに特色がある。加熱式たばこによる受動喫煙が人の健康に及ぼす影響をバイオマーカーから予測し、評価することを最終目的とする。

本研究は、「項目 1：加熱式たばこ使用による受動喫煙曝露の実態調査（長期間の臨床指標への影響の評価）」および「項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索」で構成されている。これまでに以下の成果を得た。

項目 1：加熱式たばこ使用による受動喫煙曝露の実態調査（長期間の臨床指標への影響の評価）

令和 5 年度（初年度）から令和 7 年度（最終年度）までの 3 年間の総リクルート数は、8,299 名であり、すべて、尿、血清を保存しており、追跡調査が可能な状況にある。そのうち、呼吸機能検査なし、肺がん術後を除いた CT 検診受診者で、CT 肺気腫あり 174 名（加熱式たばこ使用者：35 名、紙巻たばこ喫煙者：35 名、加熱式たばこおよび紙巻たばこ併用者 3 名を含む）、健常者（Control: CT 肺気腫なし、呼吸機能正常）58 名（受動喫煙あり：46 名、受動喫煙なし：12 名）を対象に、呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索（項目 2）を継続している。

また、長期間の臨床指標への影響の評価のため、特に呼吸機能の経年変化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連についての分析を継続している。

項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

令和 5 年度は、微量血清サンプルからの miRNA プロファイリングの実験条件の設定のための検討を行った。微量血清サンプルからの miRNA プロファイリングの実験条件の設定のため、異なる被検者 12 名から取得した血清サンプル(200μl～1ml)から miRNA 抽出を行った。その結果、健診の残余検体で得られる検体量から本解析に必要な miRNA を分解することなく十分量取得できることが確認された。さらに、取得した miRNA サンプルから次世代シーケンサー解析用のライブラリーを作成し、そのサイズ分布及び定量解析が

ら解析に適したライブラリーを作成できることを確認した。次世代シーケンサーによる 12 サンプルの解析から、各血清サンプル中の miRNA プロファイルの取得に成功した。

令和 6 年度は、初年度にリクルートした参加者の中で胸部 CT 検診を受診した者で余剰尿、余剰血清を十分得られた 66 名（肺気腫なし 11 名、肺気腫あり 55 名）を対象として呼吸器疾患につながり得る指標であるフィブリン-3、SP-D の解析を実施した。さらに、胸部 CT 検診受診者 24 名（肺気腫なし 6 名、肺気腫あり 18 名）を対象として次世代シーケンシング（NGS : Next Generation Sequencing）による miRNA の発現プロファイル解析を実施した。取得した miRNA プロファイル結果についてクラスター分析（主成分分析）を行い、各群を分類しうるマーカー miRNA の探索のための基礎データを取得した。

令和 7 年（2025 年）度は、リクルートした研究対象者の余剰血清より、エクソソーム（細胞外小胞）miRNA を次世代シーケンサーで解析し、そのプロファイルの取得を行った。主成分分析では、肺気腫の有無でクラスターが分かれること、つまり肺病変によって miRNA プロファイルが変化することを見出し、さらに、肺障害関連 miRNA の解析、たとえばこの種類の比較や、病態に繋がるバイオマーカーの探索を行った。

血清 miRNA のレベルを肺気腫の有無でプロットすると、肺気腫で減少する miRNA や、肺気腫で増加する miRNA、さらには肺気腫のみで出現する miRNA を捉えることができた。この増減する miRNA をボルケーノプロットで解析し、統計学的に有意に上昇、低下する miRNA を割り出した。

それら miRNA の gene ontology 解析を行った結果、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患に特徴的な表現系（COPD の併存疾患）がエンリッチ（指し示め）された。このように、血清中 miRNA は肺疾患の良いバイオマーカーとなることが判明した。

さらに、リアル PCR による miRNA の精密定量系を組み立てた。例えば、肺気腫で有意に増加していた miR-766-3p を喫煙の種類別ごとに定量すると、この miRNA が、喫煙により誘導されること、特に、加熱式タバコで、統計学的に有意に増加することが明らかとなった。miR-766-3p は、非小細胞がんを促進させる因子として知られており、これらの結果は、加熱式タバコは紙巻きタバコと比較して肺気腫患者への肺がん発症リスクをより高める可能性があることを示唆する。

次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式タバコによる能動喫煙および受動喫煙者で有意に変動する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行い、一般の医療機関での解析可能な miRNA バイオマーカーの創出が可能となった。

これら取得データに基づいて曝露指標（尿中ニコチン代謝物）、臨床指標（特に呼吸機能）の経年変化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連について分析中である。とりわけ、肺胞破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D との相

関性を解析し、その結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

本研究成果の発信により、国民の加熱式たばこへの意識の変革および受動喫煙に対する認知の向上を促し、「改正健康増進法」で店内を喫煙可能としている施設において屋内禁煙化の選択を促すことにつながることを期待される。最終的には、本研究の成果が、受動喫煙による疾病および喫煙関連疾患の予防に貢献することが期待される。

| 研究分担者 | 所属機関名  | 職名  |
|-------|--------|-----|
| 大森久光  | 熊本大学   | 教授  |
| 黒澤 一  | 東北大学   | 教授  |
| 緒方裕光  | 女子栄養大学 | 教授  |
| 大坪和明  | 熊本大学   | 教授  |
| 首藤剛   | 熊本大学   | 准教授 |

| 研究協力者 | 所属機関名 | 職名   |
|-------|-------|------|
| 尾上あゆみ | 熊本大学  | 研究員  |
| 北川拓弥  | 熊本大学  | 研究員  |
| 河野圭亮  | 熊本大学  | 大学院生 |
| 橋本弘司  | 熊本大学  | 助教   |

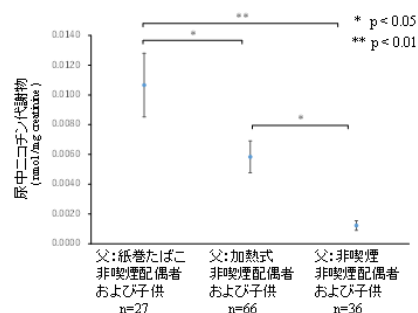
## A. 研究目的

加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響について明らかにすることが目的である。

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

早期に結論を得るよう附帯決議がなされた。

申請者らは、日本医療研究開発機構 (AMED) (2018-19 年) および厚生労働科学研究費補助金 (2019-22 年) の助成を受け、父親が加熱式たばこを使用している非喫煙家族 (配偶者と子供) の尿中ニコチン代謝物は、非喫煙・非使用家族に対して有意に高値を示し、受動喫煙による曝露の実態を明らかにした。(Onoue A, Omori H. et al. *Int J Environ Res Pub Health*. 2022, 19, 6275.)



本研究では、曝露指標に加えて、影響指標を用いた評価方法の開発を行い、加熱式たばこによる受動喫煙が人の健康に及ぼす影響をバイオマーカーから予測し、評価することを最終目的として、以下の4点について検討する。

- ① 呼吸機能、炎症、尿中のニコチン代謝物など、加熱式たばこの使用によって影響の生じるバイオマーカーの抽出・選定
- ② 疾患につながり得るバイオマーカーを用いた、加熱式たばこの喫煙及び受動喫煙の評価方法の開発
- ③ 開発した方法に基づいて実施する加熱式たばこの喫煙及び受動喫煙の評価
- ④ 国内で主に使用されている複数のマーカーの加熱式たばこについての解析

## B. 研究方法

### 項目 1：加熱式たばこ使用による受動喫煙曝露の実態調査（長期間の臨床指標への影響の評価）（全班員）

#### 【研究対象者】

人間ドック受診者を対象として、紙巻たばこ喫煙者、加熱式たばこ使用者、併用者、および非喫煙者（受動喫煙有無別）の呼吸機能の横断・縦断研究（前向き・後ろ向きコホート研究）の体制を構築する。

紙巻たばこ、加熱式たばこ、紙巻および加熱式たばこ併用者および非喫煙者（**受動喫煙有無別**）を対象とした尿中ニコチン代謝物およびNNALを測定し、曝露を評価する。

これらの対象者に対して、呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索を継続する。

（項目 2 を参照）

#### 【質問票による受動喫煙の分析】

人間ドックの通常の間診に加えて、独自の質問票による調査をおこなった。

質問項目は、喫煙状況（加熱式たばこの種

類、紙巻たばこ喫煙歴等）、受動喫煙状況（家族の目の前での使用、最終曝露日時等）、自覚症状（咳、痰、喘息症状等）、身体状況（治療中疾患等）、新規疾患の罹患状況、職場の喫煙環境、加熱式たばこに関する知識等である。

#### 【目標サンプル数の設定に関して】

先行研究がない状況であり、明確にサンプルサイズを説明することは困難な状況にあると考えられたため、1-2、1-3 のサンプルサイズは、先行研究と同様に、Cohen の計算法（Cohen, J. 1988）により算出した。

Cohen, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, 2<sup>nd</sup> Edition.; Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates. 1988.

Cohen の計算法によると、3 群比較が主の解析方法であり、有意水準を両側で 5%、効果量は 0.4 で、目指す検出力を 0.8 の場合、それぞれ 21 以上が必要であり、目標症例数は、それぞれの群で 30 人以上とする。

### 項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

（首藤班員、河野研究協力者、大坪班員、橋本弘司研究協力者、黒澤班員、緒方班員、大森代表者）

#### 【曝露指標の分析】

・尿中ニコチン代謝物：コチニン、3-ハイドロキシコチニン（3-OHCot）

依存性化学物質。過去 2-3 日間のニコチン曝露量を反映。

・尿中たばこ特異的ニトロソアミン類：

**NNAL: 4-(methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanone**

たばこ製品由来の発がん性物質。中期的な曝露マーカー（半減期 15-45 日）

・トリプル四重極型(QQQ)LC-MS (liquid chromatography [LC] / mass spectrometry [MS] )を確立し、その手法を用いて測定する。

#### 【呼吸器疾患につながり得る影響指標の分析】

・fibulin-3: 生体を構成する殆ど全ての細胞が分泌する細胞外小胞が、細胞機能の制御や疾患の進展に大きく寄与することが報告され、現在、血液や尿等の体液を利用した疾患診断(リキッドバイオプシー)として、世界的に注目されている。慢性閉塞性肺疾患 (COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease) 患者血清のプロテオミクス解析により、エラスチン繊維の変性・破壊を反映する細胞外小胞タンパク質として同定された肺胞破壊(肺気腫)関連バイオマーカーである。(Koba T, *ERJ open research*, 2020)

・**SP-D**: 肺の II 型肺胞上皮細胞より産生・分泌される肺特異的糖タンパク質である。SP-D 遺伝子の SNPs(Rs721917, Met11Thr) が血清中の SD-P レベルの低下を招く、COPD、肺気腫と相関、血清 SP-D が喫煙者で高値、COPD 患者で高値などが報告されており、**COPD の病態バイオマーカー**である。

・次世代シーケンシング (NGS: Next

**Generation Sequencing**) による miRNA の発現プロファイル解析による病態モニタリング

本研究は、横断研究の指針である「The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement」に従って実施した。Vandenvbroucke, J.P.et al. STROBE Initiative. *Epidemiology* 2007, 18, 805-835

本研究は、熊本大学倫理委員会の承認(倫理第 2150 号、令和 5 年 8 月 18 日承認)を得て実施した。

#### C. 結果

**項目 1: 加熱式たばこ使用による受動喫煙曝露の実態調査(長期間の臨床指標への影響の評価)(全班員)**

【令和 7 年度】研究対象者の増加を図るため、令和 7 年度もリクルートを継続し、令和 7 年 1 月末までに新たに 3,000 名の研究参加に同意した者の質問票の回収および余剰尿、余剰血清を採取した。令和 5 年度と令和 6 年度と同様に回収した質問項目をエクセルに順次入力を行い、人間ドックデータを突合したデータベースを作成した。そのうち呼吸機能なし、肺癌の手術後を除く 2,954 名のうち CT 検診受診者 298 名分の余剰尿および余剰血清の分析が可能となった。CT 画像にて気腫病変を認めた対象者は 56 名であった。(加熱式たばこ使用者 12 名、紙巻たばこ喫煙者 17 名、非喫煙者 2 名を含む。)また、CT 画像で気腫病変なし、呼吸

機能正常は 24 名であった。受動喫煙ありが 21 名、受動喫煙なし 3 名であった。

令和 5 年度（初年度）から令和 7 年度（最終年度）までの 3 年間の総リクルート数は、8,299 名であり、すべて、尿、血清を保存しており、追跡調査が可能な状況にある。そのうち、呼吸機能検査なし、肺がん術後を除いた CT 検診受診者で、CT 肺気腫あり 174 名（加熱式たばこ使用者：35 名、紙巻たばこ喫煙者：35 名、加熱式たばこおよび紙巻たばこ併用者 3 名を含む）、健常者（Control: CT 肺気腫なし、呼吸機能正常）58 名（受動喫煙あり：46 名、受動喫煙なし：12 名）を対象に、呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索（項目 2）を継続している。

また、長期間の臨床指標への影響の評価のため、特に呼吸機能の経年変化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連についての分析を継続している。

## 項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

（首藤班員、河野研究協力者、大坪班員、橋本弘司研究協力者、黒澤班員、緒方班員、大森代表者）

### 【曝露指標の分析】

・トリプル四重極型 (QQQ) LC-MS にて、測定対象であるニコチン、コチニン、3-OH コチニン、NNAL が実際に測定可能かどうか、またその測定可能な濃度域の検討を行った。

・上記 4 種類の化合物の標準物質、安定同

位体である d3-コチニン、13C6 NNAL を濃度別に流し、検量線の作製に成功した。

・検量線の範囲をもとに、尿を前処理する段階で添加する標準物質の濃度を検討し、成功したので、実サンプルでの測定を開始した。なお、本測定系では、1 サンプルおよそ 10-15 分で測定可能であり、無人状態でも継続して測定が可能であるため、理論上は、1 日（24 時間）でおよそ 96 サンプルの測定が可能となった。

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ニコチン代謝物と尿中たばこ特異的ニトロソアミン (NNAL) の曝露影響マーカーに対するトリプル四重極型 (QQQ) LC-MS による受動喫煙レベルでの高感度分析方法を確立した。

・ニコチン代謝物は、CT 肺気腫なしの群で、受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で有意に高値を示した。（ $p<0.05$ ）

### ・尿中 NNAL

・CT 肺気腫なしの群で受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で高値の傾向を示したが有意な差は認めなかった。研究期間中の全サンプルを検討している。

### 【呼吸器疾患につながり得る影響指標の分析】

#### 【血清 SP-D レベル (CT 肺気腫有無別)】

・CT 肺気腫なし（34 検体）の測定値：

平均値±SD：5.18±3.18

・CT 肺気腫あり（121 検体）の測定値：

平均値±SD：7.23±6.87

肺気腫あり群 ( $7.23 \pm 6.87$ ) が肺気腫なし群 ( $5.18 \pm 3.18$ ) と比較して **SP-D レベルが高い傾向を示した ( $P=0.095$ )**。

全体では有意差を認めなかったものの、CT 肺気腫ありの群で高値を示す者がおり、さらなる詳細な検討中である。

#### 【血清 SP-D レベル (CT 肺気腫有無別 + 受動喫煙有無別 + タバコの種類別)】

SP-D の値は、紙巻たばこ (CC) と加熱式たばこの間で差を認めなかった。

同様の影響を及ぼす可能性があると考えられた。

#### 【血清 Fibrin-3】

**Fibrin-3** レベルに関しては、肺気腫ありで高い発現を示す検体が多く見られたが、統計学的有意差は見られなかった。今後、解析検体数を増やすことで解析の信頼性を向上させる。

#### 【次世代シーケンサーによる miRNA プロファイリング】

微量血清サンプルからの miRNA プロファイリングの実験条件の設定のための検討を行った。

微量血清サンプルからの miRNA プロファイリングの実験条件の設定のため、異なる被検者 12 名から取得した血清サンプル ( $200 \cdot 1 \sim 1\text{ml}$ ) から miRNA 抽出を行った。

その結果、健診の残余検体で得られる検体量から本解析に必要な miRNA を分解することなく十分量取得できることが確認された。次に、取得した miRNA サンプルから次世代シーケンサー解析用のライブラリーを作成し、そのサイズ分布及び定量解析か

ら解析に適したライブラリーを作成できることを確認した。次世代シーケンサーによる 12 サンプルの解析から、各血清サンプル中の miRNA プロファイルの取得に成功した。

より信頼あるデータを取得するために昨年の解析から改善を試み、存在比の小さな miRNA の検出力が向上した。

この手法を用いて、胸部 CT 検診受診者 24 名 (肺気腫なし 6 名、肺気腫あり 18 名) を対象として NGS による miRNA の発現プロファイル解析を実施した。

この解析から、発現上位 50 位までの miRNA において肺気腫あり検体で発現が低下している傾向が見られた。また、肺気腫あり検体のみで検出される miRNA が、発現上位 221 位以降に数多く検出されており、これらが肺気腫の病態や肺機能と関連するバイオマーカーとなる可能性がある。

また、取得した miRNA プロファイル結果についてクラスター分析 (主成分分析) を行った結果、第 1 主成分が強力な因子であることが示された。

第 1 主成分および第 2 主成分でのプロットにより、精度は劣るものの肺気腫あり、なしの検体をある程度分類しうることが示された。

さらには、主成分分析から発現上位 50 位までの miRNA において、機能的に関連あるものがクラスタリングされる傾向が見られた。

微量な余剰血清よりエクソソームに含まれる miRNA を抽出し、次世代シーケンシング (NGS: Next Generation Sequencing) による miRNA の発現プロファイル解析法およびクラスター分析 (主成分分析) 法を確立した。

今後、加熱式使用群、紙巻喫煙群、非喫煙群について、次世代シーケンサーによる miRNA プロファイリングを行う。取得した結果についてクラスター分析を行い、各群を分類しうるマーカー miRNA を見出す。

リクルートした研究対象者の余剰血清より、細胞外小胞 miRNA を次世代シーケンサーで解析し、そのプロファイルの取得を行った。主成分分析では、肺気腫の有無でクラスターが分かれること、つまり肺病変によって miRNA プロファイルが変化することを見出し、さらに、肺障害関連 miRNA の解析、タバコの種類の比較や、病態に繋がるバイオマーカーの探索を行った。

血清 miRNA のレベルを肺気腫の有無でプロットすると、肺気腫で減少する miRNA や、肺気腫で増加する miRNA、さらには肺気腫のみで出現する miRNA を捉えることができた。

この増減する miRNA をボルケーノプロットで解析すると統計学的に有意に上昇、低下する miRNA を割り出すことができた。

その miRNA の gene ontology 解析を行った結果、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患に特徴的

な表現系 (COPD の併存疾患) がエンリッチされた。このように、血清中 miRNA は肺疾患の良いバイオマーカーとなることが判明した。

通常、鎖長が短い miRNA は PCR による検出が困難であるとされるが、Loop-PCR 法を応用することで、リアル PCR による miRNA の精密定量系を組み立てた。例えば、肺気腫で増加した miR-766-3p を定量すると、この miRNA が、喫煙により誘導されること、特に、加熱式タバコで、統計学的に有意に増加することが明らかとなった。

miR-766-3p は、非小細胞がんを促進させる因子として知られており、これらの結果は、加熱式タバコは紙巻きタバコと比較して肺気腫患者への肺がん発症リスクをより高める可能性があることを示唆する。

次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式タバコによる能動喫煙および受動喫煙者で有意に変動する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行い、一般の医療機関での解析可能な miRNA バイオマーカーの創出が可能となった。

臨床指標 (特に呼吸機能) の経年変化および炎症指標 (高感度 C 反応性蛋白、白血球) との関連について分析中である。

肺泡破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D の解析結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用および受動喫煙の評価を行う（目的③）。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う（目的④）。

#### D. 考察

##### 項目 1：加熱式たばこ使用による受動喫煙曝露の実態調査（長期間の臨床指標への影響の評価）（全班員）

令和 5 年度（初年度）から令和 7 年度（最終年度）までの 3 年間の総リクルート数は、8,299 名である。尿、血清を保存している。

現時点少なくとも 2 年間の追跡調査が可能な状況にある。また、参加者の過去のデータベースを入手可能であり、Retrospective cohort study が可能であり、より長期の調査が可能となった。

さらに、今後前向きに調査することが可能であり、より長期の Prospective cohort study の構築も可能となった。

現在、長期間の臨床指標への影響の評価のため、特に呼吸機能の経年変化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連について分析を行っている。また、質問票により、特に喘息症状の有無、新規の発症疾患の有無を分析している。

##### 項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

（首藤班員、河野研究協力者、大坪班員、橋本弘司研究協力者、黒澤班

##### 員、緒方班員、尾上協力者、大森代表者）

影響指標の分析として、微量な余剰血清よりエクソソームに含まれる miRNA を抽出し、次世代シーケンシングによる miRNA の発現プロファイル解析法およびクラスター分析（主成分分析）法を確立した。

リクルートした研究対象者の余剰血清より、細胞外小胞 miRNA を次世代シーケンサーで解析し、そのプロファイルの取得を行った。その結果、肺気腫の有無、つまり肺病変によって血清 miRNA プロファイルが変化することを見出した。

血清 miRNA のレベルを肺気腫の有無で比較解析すると、肺気腫で増減少する miRNA や、さらには肺気腫のみで出現する miRNA を捉えることができた。これら増減する miRNA をボルケーノプロットで解析することで、統計学的に有意に変動する miRNA を割り出した。その miRNA の gene ontology 解析を行った結果、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患に特徴的な表現系（COPD の併存疾患）がエンリッチされた。このように、血清中 miRNA は肺疾患の良いバイオマーカーとなることが判明した。

通常、鎖長が短い miRNA は PCR による検出が困難であるとされるが、Loop-PCR 法を応用することで、リアル PCR による miRNA の精密定量系を組み立てた。この手法を用いることで、例えば、肺気腫で増加した miR-766-3p を定量すると、この miRNA が、喫煙により誘導されること、特に、加熱

式タバコで、統計学的に有意に増加することが明らかとなった。miR-766-3p は、非小細胞がんを促進させる因子として知られており、これらの結果は、加熱式タバコは紙巻きタバコと比較して肺気腫患者への肺がん発症リスクをより高める可能性があることを示唆する。

次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式タバコによる能動喫煙および受動喫煙者で有意に変動する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行い、一般の医療機関での解析可能な miRNA バイオマーカーの創出が可能となった。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用およびその受動喫煙の評価を行っている（目的③）。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う。

また、肺泡破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D の解析を実施し、肺気腫あり検体で高くなることを示す結果を得た。

今後、臨床指標（特に呼吸機能）の経年変化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連について分析する。また、Fibulin-3 及び SP-D の解析結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用および受動喫煙の評価を行っている（目的③）。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこにつ

いての解析を行う

研究成果は順次、学会発表、論文を作成し公表する。

## E. 結語

令和 5 年度（初年度）から令和 7 年度（最終年度）までの 3 年間の総リクルート数は、8,299 名である。尿、血清を保存している。

現時点少なくとも 2 年間の追跡調査が可能な状況にある。また、参加者の過去のデータベースを入手可能であり、Retrospective cohort study が可能であり、より長期の調査が可能となった。

さらに、今後前向きに調査することが可能であり、より長期の Prospective cohort study の構築も可能となった。

加熱式たばこの呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーの開発を行った。人間ドック受診者の余剰血清より、細胞外小胞 miRNA を次世代シーケンサーで解析し、そのプロファイルの取得を行った。

主成分分析では、肺気腫の有無でクラスターが分かれること、つまり肺病変によって miRNA プロファイルが変化することを見出し、さらに、肺障害関連 miRNA の解析、たばこの種類の比較や、病態に繋がるバイオマーカーの探索を行った。

各種血清 miRNA レベルを肺気腫の有無で分析すると、肺気腫で増減する miRNA や、さらには肺気腫のみで出現する miRNA を捉えることができた。この増減する miRNA をボルケーノプロットで解析することで、統計学的に有意に上昇、低下する miRNA を割り出すことができた。

その miRNA の gene ontology 解析を行うと、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患に特徴的な表現型（COPD の併存疾患）が示された。

このように、血清中 miRNA は肺疾患の良いバイオマーカーとなることが判明した。

さらに、リアル PCR による miRNA の精密定量系を組み立てた。例えば、肺気腫で有意に増加していた miR-766-3p を喫煙の種類別ごとに解析すると、この miRNA が、喫煙により誘導されること、特に、加熱式たばこで統計学的に有意に増加することが明らかとなった。miR-766-3p は、非小細胞がんを促進させる因子として知られており、これらの結果は、加熱式たばこは紙巻たばこと比較して肺気腫患者への肺がん発症リスクをより高める可能性があることを示唆する。

次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式たばこによる能動喫煙及び受動喫煙者で有意に変動する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行い、一般の医療機関での解析可能な miRNA バイオマーカーの創出が可能となった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表（本研究に関連するもの）

なし。

### 2. 学会発表

1) 大森久光、尾上あゆみ、北川拓弥、佐藤祐樹、首藤剛、大坪和明、窪田健一、東憲孝、吉田稔、井上博雅、黒澤一、緒方裕光、稲葉洋平、大和浩、「特別報告」加熱式たばこの健康影響に関する疫学調査. 第 66 回日本呼吸器学会学術講演会. 2026 年 4 月 19 日.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

この研究において、知的財産権に該当するものはなかった。