

令和6年度厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)
総括研究報告書

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

研究代表者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

目的・背景；加熱式たばこの普及に伴い、従来の紙巻たばことは異なる健康影響評価法の確立が急務となっている。本研究は、日本人喫煙者・受動喫煙者を対象とし、曝露・炎症・影響・臨床の4項目による包括的健康影響評価法を開発し、その実態を明らかにすることを目的とした。先行研究から抽出された課題として、非侵襲的生体試料によるバイオマーカー分析手法の開発、加熱式たばこ喫煙者の多面的評価指標の確立、製品間の曝露量比較、環境要因を考慮した受動喫煙評価の必要性が挙げられた。

方法；喫煙者を「紙巻たばこ喫煙者」「併用者」「加熱式たばこ喫煙者」の3群と非喫煙者の計4群に分類し、喫煙歴、生活習慣、ニコチン依存度等を調査票で評価するとともに、生体試料（尿、口腔内細胞）の分析を行った。LC/MS/MSによるDNA/RNA損傷体一斉分析法を開発し、ACQUITY Premier T3カラムを用いて10成分の同時定量を実現した。遺伝毒性評価には口腔内細胞を用いた小核試験を採用した。受動喫煙者については3歳児健康診査を活用し、地域特性が異なる3自治体でWebアンケート調査のために倫理審査を行った。

結果及び考察；LC/MS/MS分析法において、従来のHILICカラムに代わりACQUITY Premier T3カラムを採用することで、分子構造が類似する1-メチルアデニンと3-メチルアデニン、8-OHdGと8-OHGuoの良好な分離を実現し、10成分すべての同時分析が可能となった。口腔内細胞を用いた小核試験では、細胞数 5×10^5 個以上を用いることで迅速な計数が可能となり、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の両方を検出できる簡便な評価システムを構築した。大規模調査体制として、人口規模と地域特性が異なる3自治体での受動喫煙調査体制を確立し、さらに職域健康診断受検者を対象とした約2,000検体の収集体制を整備した。これらの成果により、非侵襲的健康影響評価における研究参加者のリクルート体制を構築した。

結論；本研究は加熱式たばこの普及という新たな社会情勢に対応した科学的評価手法の開発において、技術的革新と実用性を両立した重要な成果を達成した。確立されたDNA/RNA損傷体同時定量法と簡便な遺伝毒性評価システムは、喫煙による健康影響の早期検出と疾患予測への応用が期待される。構築された大規模調査体制は、今後の喫煙関連健康影響研究の標準的手法となる可能性を有している。本研究成果は予防医学および公衆衛生政策の科学的根拠として重要な役割を果たし、個人の健康管理から地域保健政策まで幅広い領域での活用により、日本人の健康増進と疾病予防に大きく貢献することが期待される。

研究分担者	所属施設名
牛山 明	国立保健医療科学院
大澤 絵里	国立保健医療科学院
纈纈 朋弥	岐阜大学
戸塚 ゆ加里	星薬科大学
松尾 洋孝	防衛医科大学校
中山 昌喜	防衛医科大学校
溝上 哲也	国立国際医療研究センター

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

A. 研究背景と目的

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

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

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

3. 喫煙者について、加熱式たばこ製品の違いによる曝露量の違いがみられるのか比較検討する。
4. 加熱式たばこの受動喫煙の評価は、バイオマーカー分析に加えていくつかの環境要因「地域性（車の使用率が高い、たばこ農家が多い地域）」、「住環境（戸建、集合住宅）」、「加熱式たばこに関する認識の違い」について質問票を組み合わせる評価を行う必要がある。
5. 受動喫煙による炎症、および影響マーカーについて、尿試料から探索する。

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

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

評価の進め方

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

加熱式たばこのみの喫煙と各影響マーカーとの相関についても非喫煙者のデータと比較する。

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

B. 今年度の研究成果

1. LC/MS/MS を使用した DNA/RNA 損傷体一斉分析法の開発

たばこ煙には 5,300 種類以上の有害化学物質が含まれ、IARC 発がん性リスクグループ 1 に分類される 1,3-ブタジエン、NNK、ベンゾ[a]ピレンなどの発がん性物質や、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドなどの揮発性有機化合物が確認されている。これらの複合曝露により、がん、動脈硬化、呼吸器疾患などのリスクが増大する。

喫煙による健康影響は酸化・メチル化による遺伝情報分子の損傷が関与し、従来は DNA 損傷マーカーが評価指標とされてきたが、近年 RNA も同様に損傷を受けることが明らかとなった。本研究では、DNA/RNA 損傷体・修飾体を高感度 LC/MS/MS 法で定量し、喫煙曝露および喫煙関連疾患との関連性を検討することで、非侵襲的健康影響評価および疾患予測・重症度評価への応用を目的とした。

尿中 DNA/RNA 損傷体 10 成分を分析対象とし、固相抽出には ODS-AQ-HG カラムを使用した。分析には高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS；Qtrap5500）を用い、ACQUITY Premier T3 カラム（1.8 μ m, 2.1 \times 150 mm）を採用した。

従来多用されていた HILIC カラムに代わり、ACQUITY Premier T3 カラムを採用することで、分子構造が類似する 1-Mad と 3-Mad、8-OHdG と 8-OHGuo の良好な分離を実現した。DNA/RNA 損傷体ピーク付近の妨害成分との識別も明確になり、10 成分すべての同時分析が可能となった。検量線作成では低濃度領域での高精度分析が可能となり、実際の尿試料含有量に対応した適切な定量範囲を確立した。

現在、職域でのサンプル収集が順調に進行し、2025 年度分を含めると約 2,000 検体に達する見込みである。

最終年度には確立した分析法を用いて大規模一斉分析を実施し、日本人喫煙者における異なるたばこ製品間の比較、受動喫煙者の曝露状況調査を行う。DNA/RNA 損傷体および 8-isoprostane を影響マーカーとして健康診断結果との関連性解析を実施する。本研究により開発された分析法は、喫煙による健康影響の早期検出と疾患予測への応用が期待され、非侵襲的な健康管理手法の実用化に貢献する。

2. DNA 損傷分析

加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料（口腔内細胞）を用い、簡便に DNA 損傷（遺伝毒性）を評価する手法として小核試験について検討を行った。マウス正常肝臓由来の細胞に被験物質として小核試験において陽性対照物質であるメタンスルホン酸エチル(EMS)を 0、125、250 μ g/mL で 24 時間曝露し、ギムザ染色を行った後、顕微鏡下で細胞を計数し、小核保有細胞数から小核出現頻度を算出した。その結果、コントロールと比較し EMS を曝露することにより、小核出現頻度の上昇が認められた。また、細胞計数

に適している細胞数を検討するため、異なる細胞数でスライド標本を作成したところ、細胞数が少ない場合は、スライドに滴下した細胞溶液が広がってしまい顕微鏡下での計数に時間を要するが、 5×10^5 個以上の細胞数を用いることで迅速に計数できた。小核試験は、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の両方を検出することができる試験法であり、遺伝毒性解析の手法として比較的簡便である。さらに、文献調査により複数の論文において口腔内細胞を用いた喫煙による有害性評価として小核試験が用いられていることから、本研究課題においても有効な手法になると考えている。また、出現する小核の大きさが染色体異常の違いで異なり、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来の小核は比較的大きく、DNA 損傷により生じる構造異常由来の小核は小さいことがわかっており、小核の大きさの程度も評価することで、遺伝毒性メカニズムが明らかにできる可能性もある。一方、小核試験以外の評価手法として、文献検索より核異形の評価、DNA メチル化の変化、DNA 付加体解析、 γ -H2AX アッセイなども考えており、迅速かつ簡便に解析可能な方法で生体試料の解析を実施したいと考えている。

4. 3 歳児健康診査を活用した加熱式たばこによる家族の受動喫煙に関する調査体制の確立について

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

明を行うことに加え本調査で使用するアンケート調査票の作成を行った。本調査でリクルートした3自治体は人口8.5万人、3.5万人、11万人の市であり、住環境、世帯構成、喫煙率等が異なる地域である。先行研究において、加熱式たばこの受動喫煙が生じる要因は、喫煙者が受動喫煙者の近くで喫煙することにあるとの仮説を立てた[1]。そこで、喫煙者の喫煙場所、加熱式たばこの使用による周囲に対する健康影響への認識、住環境、車の保有等の項目を含め調査票を作成した。今年度は、作成した調査票、調査体制をもとに倫理審査を行った。

5. 喫煙者への調査体制の確立について

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

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

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

C. 結論

本研究では、日本人喫煙者・受動喫煙者を対象とした包括的な健康影響評価法の開発を目的とし、曝露・炎症・影響・臨床の4項目による多面的評価システムの構築に向けて、以下の成果を得た。

1. 分析手法の技術的進歩

LC/MS/MSを用いたDNA/RNA損傷体一斉分析法の開発において、従来のHILICカラムに代わりACQUITY Premier T3カラムを採用することで、分子構造が類似する成分(1-Madと3-Mad、8-OHdGと8-OHGuo)の良好な分離を実現した。これにより、10成分すべての同時分析が可能となり、非侵襲的な健康影響評価における精度と効率の大幅な向上を達成した。

2. 簡便な遺伝毒性評価手法の確立

口腔内細胞を用いた小核試験の検討により、遺伝毒性評価における実用的な手法を開発した。細胞数 5×10^5 個以上を用いることで迅速な計数が可能となり、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の両方を検出できる簡便な評価システムを構築した。

3. 大規模調査体制の基盤整備

地域特性が異なる3自治体(人口8.5万人、3.5万人、11万人)での3歳児健康診査を活用した受動喫煙調査体制を確立し、住環境、世帯構成、喫煙率等の多様な要因を考慮した包括的な調査システムを構築した。職域健康診断受検者を対象とした喫煙者調査についても体制整備を完了し、約2,000検体の収集見込みを達成した。

科学的意義と社会的インパクト

<学術的貢献>

1. DNA/RNA損傷体の同時定量による新たなバイオマーカー評価法の確立
2. 加熱式たばこと紙巻たばこの健康影響比較における科学的エビデンスの蓄積

今後の展望と課題

<短期的目標(最終年度)>

確立した分析法を用いた大規模一斉分析の実施により、日本人喫煙者における異なるたばこ製品間の詳細な比較データを取得し、健康診断結果との関連性解析を通じて、たばこによる健康影響評価手法の開発への道筋を明確化する。

<長期的展望>

本研究で開発された評価手法は、喫煙による健康影響の早期検出と疾患予測への応用が期待され、予防医学および公衆衛生政策の科学的根拠として重要な役割を果たすと考えられる。特に、非侵襲的な健康管理手法として実用化されることで、個人の健康管理から地域保健政策まで幅広い領域での活用が見込まれる。

<最終的結論>

本研究は、加熱式たばこの普及という新たな社会情勢に対応した科学的評価手法の開発において、技術的革新と実用性を両立した成果を達成した。確立された分析手法と調査体制は、今後の喫煙関連健康影響研究の標準的手法となる可能性を有しており、日本人の健康増進と疾病予防に大きく貢献することが期待される。

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