

令和6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

加熱式たばこばく露が生体に及ぼす影響についての動物実験研究

分担研究者 牛山 明 国立保健医療科学院
分担研究者 進藤 佐和子 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

加熱式たばこは、発生する有害化学物質量を低減しているとされているが、化学物質の複合ばく露は変わらず起こるため健康への影響が懸念され動物を用いた研究はその理解の一助となる。

本年度は異なる銘柄の加熱式たばこを用いた際のマウスへのニコチン取り込み量の比較と、マウスの疾病モデルとしてぜん息モデルを用いて加熱式たばこの病態への影響に関する研究を実施した。

異なる加熱式たばこのばく露を比較したところ、いずれの銘柄においてもニコチンの体内への吸収が発生したが、銘柄によって体内のニコチンの濃度が異なることが明らかとなった。この結果はスティックから発生するニコチン濃度に関連するものと考えられた。また、ぜん息病態モデルマウスに加熱式たばこをばく露したところ、アレルギー特有のIgEレベルの上昇や気管上皮の肥厚などがみられたが、本年度の喫煙の条件ではたばこばく露の有無の間に統計的な有意差は認めなかった。引き続きの検討が必要である。

A. 研究目的

我が国では喫煙率が下がっている一方で、加熱式たばこの使用率が20代から40代の間で高くなっていることが報告されている。令和5年度国民健康・栄養調査によると喫煙者のうち男性38.5%、女性42.3%が加熱式たばこを利用しており、若い世代ほど多く利用している傾向がある。女性20代の喫煙者のうち、85.7%が加熱式たばこを利用している。紙巻きたばこより加熱式たばこの燃焼温度が低いことによって有害物質の発生が抑制されていると謳っているが、グリセロール、プロピレングリコール、メンソールなどの物質は紙巻きたばこより加熱式たばこに多く含まれている。多くの先行研究により、紙巻きたばこの健康影響・生体影響については明らかとなっているが、加熱式たばこは歴史が浅く、データが不十分なた

め、更なる研究が必要とされている。本分担研究では動物実験を通じて加熱式たばこの健康へ影響を明らかにすることを目的とする。

本年度の研究は2つのテーマを取り上げた。1つ目は異なる加熱式たばこデバイスを用いたマウスへのばく露がどのように異なるのかを検証した。これまで分担研究者らはブレード加熱式IQOSばく露を行ってきたが、ブレード加熱式IQOSはすでに販売を終了しており、誘導加熱型IQOSに更新されている。また、他社の製品もglo hyperやPloom X ADVANCEDといった製品に更新されていることから、現在市販されているそれぞれの製品を使用し、マウスへのばく露をした際にニコチンの吸収に異なる性質が認められるのかを検証した。

2つ目の研究としては、病態への影響を検討し

た。今年度は、ぜん息モデルマウスを作成し、加熱式たばこを暴露した際の病態への影響について調べた。紙巻きたばこの煙には、体内の酸化や炎症を引き起こし、活性酸素を産生する物質が多く含まれている。紙巻たばこはぜん息を誘発し悪化させるという報告がある。他方で、加熱式たばことぜん息との関係性を調べた研究は限定的である。本研究では加熱式たばこのばく露影響の観察を目的としたぜん息モデルを用いて、加熱式たばこの影響を検討した。

B. 研究方法

1. 加熱式たばこばく露装置およびばく露方法

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)。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。また、異なるデバイスの比較においては、IQOS イルマ(TEREA REGULAR)、glo HYPER pro (LUCKY STRIKE RICH TABACCO)、Ploom X ADVANCED (MEVIUS DEEP REGULAR)を使用した(カッコ内は使用したスティック)。なお、glo HYPER proは、standard modeの他により強いたばこ感を味わえるboost modeもあるため双方の条件で実験をした。

glo HYPER pro とPloom X ADVANCEDはプラスチックの筒状治具を用いてデバイスを固定させた。スティック1本ごとのばく露時間：IQOS ILUMA及びIQOS 3 DUOは6分、glo HYPER proのstandard modeは4.5分でboost modeは3分、Ploom X ADVANCEDは5分間ばく露した。

2. 尿中のニコチン代謝物の定量

本研究では、ニコチンの主要代謝物であるコチニンと3-ヒドロキシコチニンの尿中濃度を測定した。本研究では、日本エスエルシー社より購入

したC57BL/6マウス6週齢(オス、体重19-23g)を使用した。マウスは専用ケージで、気温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50\pm 15\%$ 、明暗が12時間ごとに調節される環境で飼育した。

マウス(各群5匹)に加熱式たばこ10本ばく露し、ばく露終了から1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、6時間後の5点において採尿し、測定まで -80°C で保管した。

・測定方法

解凍した各尿サンプルを超純水で100倍希釈した。希釈した尿サンプル $10\mu\text{L}$ に100mM酢酸ナトリウムバッファー(pH4.5) $80\mu\text{L}$ 、超純水 $30\mu\text{L}$ 、水酸化ナトリウム $2.6\mu\text{L}$ 、内部標準試薬 $1\mu\text{L}$ を加えた。ENVI-Carbカラムをアセトニトリル 2mL と超純水 2mL でコンディショニングした後各尿サンプルをロードし、超純水 1mL と20%メタノール 1.5mL で洗浄した。カラムを加圧ドライアップさせ、アセトニトリル 1.5mL で溶出させた。得られたサンプルは窒素気流下で乾燥させ、抽出残渣をアセトニトリルで $100\mu\text{L}$ に調整させた。サンプルの中のニコチン代謝物をLC-MS/MS(Xevo TQ-S, Waters Co)を用い、サンプル $5\mu\text{L}$ を 40°C に加温されたカラム(CORTECS UPLC HILIC)に注入し定量した。

尿中クレアチニン濃度はLabAssay Creatinine Kitの製品プロトコルに従って定量した。測定されたクレアチニン値を使い尿濃度の補正を行った。

3. ぜん息モデルにおける加熱式たばこばく露影響

3.1 使用したマウスの飼育方法と実験プロトコル

BALB/Cマウス6週齢(メス、体重18-20g)は日本エスエルシー社より購入した。マウスは専門の飼育ケージで、気温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50\pm 5\%$ 、明暗が12時間ごとに調節される環境で飼育した。

3.2 ぜん息モデルの作成

先行研究を参考に、ぜん息モデルを以下の通り作成した。ぜん息群は、6週齢のBALB/CマウスにOVA(卵白アルブミン)とアジュバンドとして水酸化アルミニウムのエマルジョンを投与した。感作：2回(腹腔投与)、誘発：4回(鼻部投与)。1つの実験は、19日間で実施した。1日目にOVAを1匹あたり10 μ g腹腔内投与した。8日目も同様にしてOVAを1匹あたり10 μ g腹腔内投与した。15日目と18日目の2日間に1.5%OVA溶解液を超音波ネブライザー(ネスコソニック、UN-511)で1匹あたり25分間鼻部噴霧し、19日目に解剖した。

3.3 加熱式たばこばく露の方法

ぜん息+IQOS群は、ぜん息マウスに8日目から18日目まで毎日10本のIQOSをHCI法にのってばく露した。加熱式たばこデバイスとしてIQOS 3 DUO(Philip Morris)を、スティックとしてMarlboro for IQOS リッチ レギュラーを使用した。ぜん息+IQOS群のマウス4~5匹を同一のばく露用ケースに入れ、6分間/パフ \times 12パフの加熱式たばこばく露を行った。

3.4 解剖手順

実験の19日目に解剖をおこなった。麻酔後、採血した血液はヘパリンリチウム入りの採血管に入れ、遠心分離で血漿を回収した。血漿は使用時まで-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

気道を露出させ、気管切開に22Gのサーフロー留置針(テルモ)の外筒のみを気管に差し込み、ブレード絹製縫合糸で固定後、1mlをゆっくりと気管支から肺へ注入し、回収する操作を3回行った。この回収液を気管支肺胞洗浄液(Broncho Alveolar Lavage Fluid: BALF)とした。回収したBALFは1.5mlマイクロチューブに入れ、氷冷した。

BALF回収後、左葉の肺切片を1.5mlマイクロチューブに入れ、RT-PCR解析用にRNA protect reagent(Qiagen社)1mlに浸漬し、ディープフリ

ーザーに保管した。

3.5 臓器切片の作製と染色

BALFを回収する個体とは異なる個体で臓器の組織切片を回収するための解剖を行った。2.6で述べた方法に従い心採血後に、左葉の肺切片、および気管を回収し、4%ホルマリン緩衝液に48~72時間浸漬固定した。その後パラフィンブロックに包埋し、マイクロトームで4 μ mに薄切し染色用検体とした。薄切後は常法により、HE染色、PAS染色等を行い、観察はキーエンス顕微鏡を用いて実施した。

3.6 BALFの解析

3.4で回収したBALFを以下の通り解析した。BALFの一部をサイトスピン(500rpm、3分、LOW)にて、細胞をコートガラスに貼付けて、サイトキット染色液(武藤化学)で染色を行い、最後に、エンテランニューで封入した。

さらにBALFの一部はフローサイトメトリーで解析を行った。

3.7 ELISA法による抗OVA-IgE抗体の定量

本研究ではレビスマウスOVA-IgE ELISAキット(和光純薬富士フィルム社)を用いて血漿中に含まれる抗OVA-IgEの解析を行った。解析はメーカーの標準的手順に従った。

3.8 RT-qPCRによるぜん息関連サイトカインの発現解析

IL33はぜん息マーカーとして注目されている。本研究では肺組織中のIL33mRNA発現量をRT-qPCRで解析した。肺組織はISOGEN II(NIPPON GENE)を使用してRNA抽出を行い、prime script RT reagent kit(Takara Bio)を用いてcDNAに変換した。qPCR測定には、KAPA SYBR Fast qPCR kit(日本ジェネティクス)を用いてCFX ConnectTM Real-Time PCR System(BIO RAD)で測定した。ま

た、 β -actin mRNA 発現量で補正した相対値で OVA のぜん息誘発条件を評価した。

プライマーは以下のものを用いた。

IL33-F : TCCAACCTCCAAGATTTCCCG

IL33-R : CATGCAGTAGACATGGCAGAA

β -actin-F : CACCCGCGAGCACAGCTTCTTT

β -actin-R : TTGTCGACGACCAGCGCAGCGA

4. 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. 異なるデバイスによるニコチン吸収量の比較

各 10 本の加熱式たばこのばく露を行った後に、尿中のニコチン代謝物 (コチニンと 3-ヒドロキシコチニン (3-HC)) を定量した。いずれのデバイスを使った場合においても、コチニン、3-HC はばく露後 1 時間後にピークを示し、その後最大 6 時間に至るまで、経時的に低下した (図 2A、図 2B)。またコチニンと 3-HC を合計した数値をプロットすると、図 2C のようになり新型の IQOS ILUMA のレベルが低いことがより顕著にできた。

それぞれのデバイスを比較したところ以下の傾向がみられた。現行型 IQOS ILUMA は旧型 IQOS 3 DUO に比べ、Nicotine 代謝物の濃度が低くピーク時で約 64% 減であった (図 3A)。なお、この違いは化学分析で定量した主流煙中のニコチン濃度を反映したもの (IQOS 3 DUO : 1.57mg/stick IQOS ILUMA 0.88mg/stick) と考えられる。そのため、ニコチンの生体への移行率は製品によって大きな差がない可能性がある。

Glo hyper Pro には喫煙モードとして Standard モードと Boost モードの 2 つがある。Boost モードは、Standard モードより高い温度で加熱し、より強い喫煙を短時間で楽しむことができるモードとされている。そのため、Standard モードで吸煙可能な時間は約 5 分間であるのに対して、Boost

モードでは約 4 分間であるという特徴がある。ニコチン代謝物のデータ比較をおこなうと、両者のモード共にばく露後 1 時間で代謝物の濃度がピークとなったが、その濃度は Boost モードよりも Standard モードのほうが低かった (図 3B)。その理由としては Boost モードの 1 パフあたりのニコチン濃度が非常に高濃度のため、ばく露直後に血中濃度が非常に高いピークとなり、その分代謝が早期に進んでいる可能性が考えられる。Ploom X ADVANCED については 1 時間後のコチニン濃度およびその後の代謝速度が、旧型 IQOS 3 DUO のそれとほぼ同様であり、商品開発においては、IQOS 3 DUO を参考にした可能性がある。

総合的な考察として、いずれのデバイスにおいても一定量のニコチンの体内取り込みが確認できた一方で、Glo Hyper Pro の場合は、Boost モードで一過性に高濃度のニコチンの摂取が可能であることから、高濃度のニコチン摂取による健康障害が危惧される。また、現行型 IQOS ILUMA はスティックあたりのニコチン吸収が少ないため、強いニコチン依存がある喫煙者にとっては、1 本では十分な満足度がえられず、チェーンスマーカーになる可能性が危惧される。

2. ぜん息モデルに対する加熱式たばこの影響

2.1 ELISA 法によるマウス抗 OVA-IgE 抗体価

解剖 19 日目に血漿中の抗 OVA-IgE を ELISA で測定した。ぜん息群とぜん息+IQOS 群は、対照群と比較して抗 OVA-IgE 抗体価の顕著な増加が認められた。一元配置分散分析を行うと、対照群と比較して、ぜん息+IQOS 群では抗 OVA-IgE 抗体価について有意差がみられたが、ぜん息群とぜん息+IQOS 群間には差がなかった (図 4)。この要因として、各群内での抗 OVA-IgE 抗体価のばらつきが大きいことが挙げられる。このばらつきの大きさは、OVA 噴霧の操作によって生じている可能性が高く、ばらつきを抑えるために OVA の噴霧条件を再検討する必要がある。

2.2 肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞組成

回収した肺胞洗浄液 (BALF) 中に含まれる細胞核分をサイトキック染色で観察した (図 5A、B)。対照群と比較して、ぜん息群とぜん息+IQOS 群では好酸球とマクロファージの顕著な増加が認められた。また、対照群では活性化マクロファージが認められなかったが、ぜん息群とぜん息+IQOS 群では活性化マクロファージの割合が大きく増加していた (図 5C)。従来、IQOS のばく露だけでも活性化マクロファージの増加を確認していたが、ぜん息の誘導に用いた OVA のばく露においてもマクロファージの活性化が誘導され、これはアレルギー反応と密接に関連するものと考えられた。またぜん息群と比較して、ぜん息+IQOS 群では好酸球が減少していることが認められたが、この現象の機序については今後の課題である。

2.3 BALF 中の細胞のフローサイトメトリーの結果

対照群と比較して、ぜん息群とぜん息+IQOS 群では好酸球を示す領域で細胞の割合が増加していることが認められた (図 6)。ぜん息群と比較して、ぜん息+IQOS 群との有意差は認められなかった。

2.4 気管および肺組織の組織学的変化

気管・肺切片の組織観察を HE 染色と PAS 染色により顕微鏡で観察した。気管・肺組織において、対照群と比較して、ぜん息群とぜん息+IQOS 群で気管・気道上皮が肥厚している例が観察された (図 7)。しかしながらぜん息群とぜん息+IQOS 群を比較したとき、肥厚の程度に差は見られなかった。

また、PAS 染色により気管における粘液分泌の様子を観察した。気管組織において、対照群では粘液が検出されなかったが、ぜん息群、ぜん息+IQOS 群では粘液が赤く染まっている例が観察さ

れた (図 8)。

2.5 ぜん息マーカー遺伝子発現

ぜん息モデルマウスの肺組織中の IL33 (ぜん息マーカー) mRNA 発現量を RT-qPCR で解析した。発現量は β -actin mRNA 発現量で補正した相対値で OVA のぜん息誘発条件を評価した。IL33 mRNA 発現量の結果から、1.5% OVA の 2 日噴射においても健常マウスの約 2 倍まで上昇し、濃度や噴霧回数 of 減らしても十分なぜん息モデルマウスを作製できた。

D. 結論

本分担研究においては動物を用いた検討を実施したが、今年度は異なる加熱式たばこデバイスによるばく露の違いと、ぜん息モデルモデルを用いた加熱式たばこの影響について検討した。

異なる加熱式たばこデバイスの比較においては、現行の IQOS イルマが旧機種 of IQOS3 duo に比べて、大幅に少ないニコチン取り込み量であることが推測された。また、glo hyper では Boost モードは Standard モードに比べ高濃度のニコチンを短時間に発生させていることが明らかとなり、公衆衛生上の懸念につながる可能性が考えられた。

ぜん息モデルの実験においては、先行研究で検討した方法を用いてぜん息モデルマウスを作製し、加熱式たばこを暴露した際の影響を検討することを試みた。ぜん息の誘導には、一般的に用いられている OVA を使用しぜん息誘発、及び加熱式たばこのばく露を行った。抗 OVA-IgE 抗体価の定量、病理組織学的解析、BALF 中細胞解析のいずれの結果においても、対照群と比較してぜん息群とぜん息+IQOS 群でぜん息による炎症反応が認められた。しかし、病理組織学的解析と BALF 中細胞解析において、ぜん息群と比較して、ぜん息+IQOS 群でのぜん息の炎症反応の悪化を示す結果が認められなかった。また、抗 OVA-IgE 抗体価の定量に

おいてはぜん息群とぜん息+IQOS 群は群内のばらつきが大きく、統計的な差が見られなかった。ぜん息群とぜん息+IQOS 群の両群でばらつきが大きいことから、OVA 噴霧の時点でばらつきが生じている可能性が示唆される。したがって、ばらつきを抑えて一定の結果を得るために、今後 OVA 噴霧の条件を再検討する必要があると考える。

E. 引用文献

(1) 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.

(2) 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.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

牛山明, 稲葉洋平, 進藤 佐和子, 服部 研之. 加

熱式たばこエアロゾルばく露が惹起する心臓の期外収縮に関する研究. フォーラム 2024 : 衛生薬学・環境トキシコロジー;2024.9.4-5 ; 仙台.同講演要旨集.

進藤佐和子, 塚田航大, 二瓶まどか, 稲葉洋平, 牛山 明. 高脂肪食マウスにおける加熱式たばこエアロゾルのばく露による非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) への影響. フォーラム 2024 : 衛生薬学・環境トキシコロジー;2024.9.4-5 ; 仙台. 同講演要旨集.

牛山明, 稲葉洋平, 岩崎夏妃, 服部研之. マウス実験における加熱式たばこエアロゾル多頭同時ばく露方法の開発とばく露評価について. 第 61 回全国衛生科学技術協議会年会; 2024. 11. 21-22; 大阪. 同講演集 p196-197.

牛山明. 加熱式たばこの健康影響 ~動物実験のエビデンス~ (大会長講演), 第 34 回日本禁煙推進医師歯科医師連盟学術総会;2025.3.1-2;埼玉. 同講演抄録集. P12.

牛山明, 大津謙吾, 稲葉洋平, 服部研之. マウスに対して異なる銘柄の加熱式たばこを曝露した際のニコチン取り込み量の比較. 第 95 回日本衛生学会学術総会;2025.3.19-21;埼玉. 日本衛生学雑誌. 2025;80(Suppl.) : S263.

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

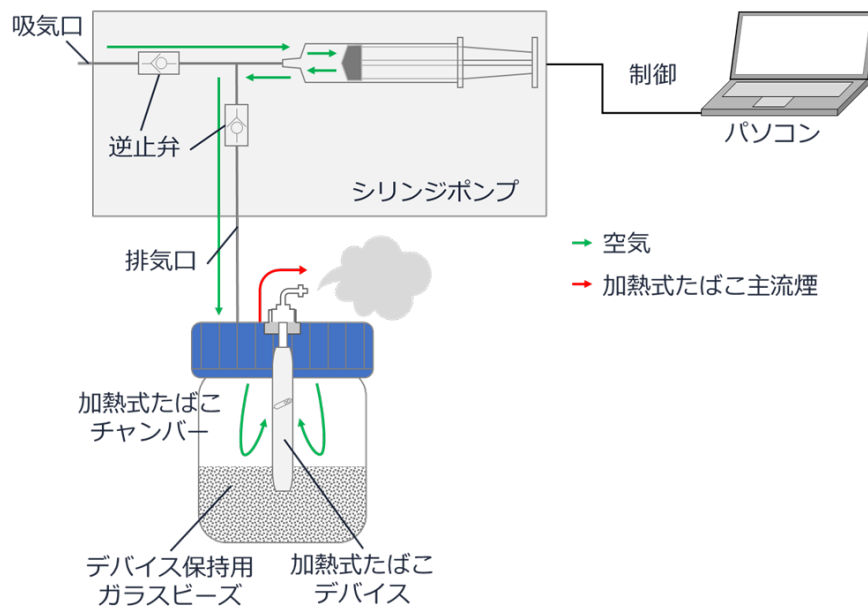


図1 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置（概念図）

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。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 A

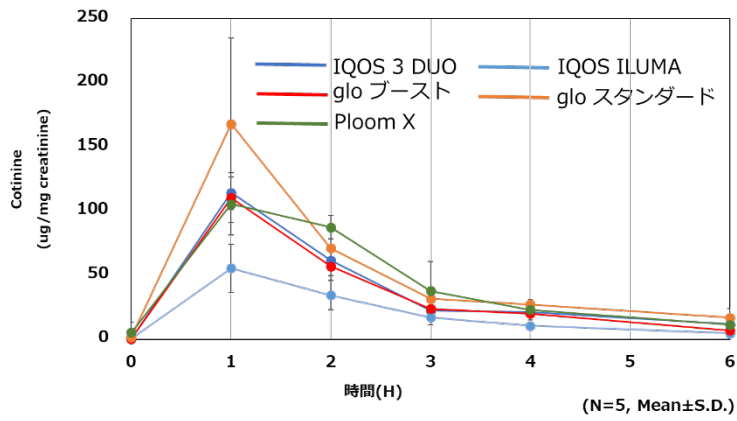


図 2 B

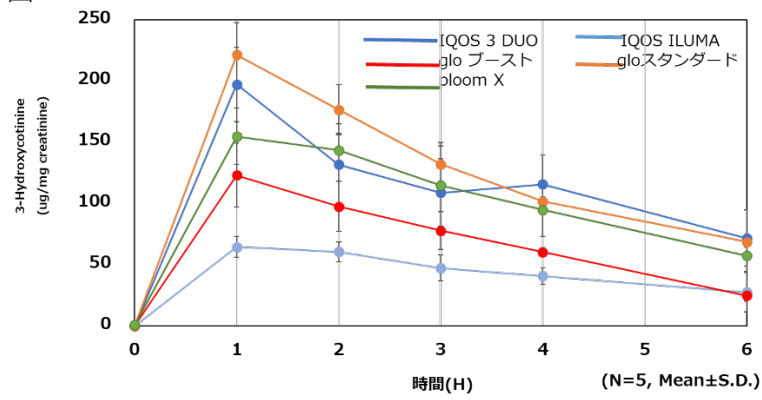


図 2 C

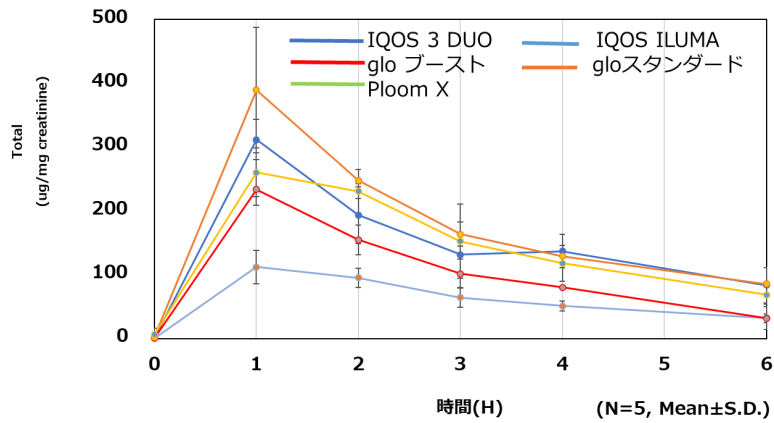


図 2 異なるデバイスでばく露をした際のニコチン代謝物の尿中濃度の変化
A:Cotinine, B:3-ヒドロキシコチニン、C: Cotinine と3-HC の合計を示す。

図 3 A

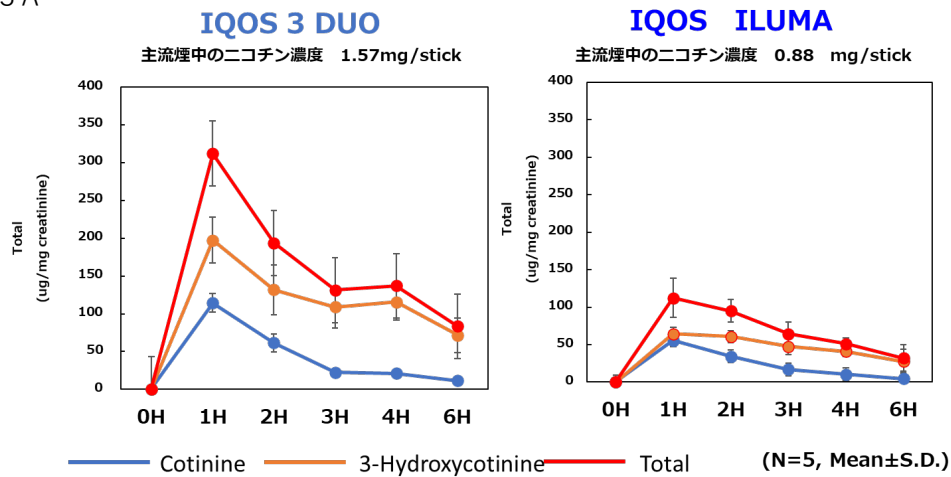


図 3 B

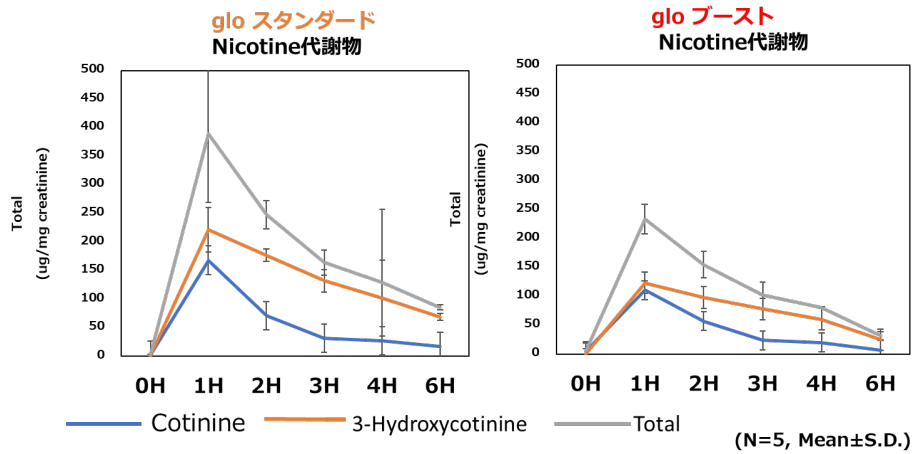


図3 異なるデバイスでばく露をした際のニコチン代謝物の尿中濃度の変化
 A) IQOS 3DUOとIQOS ILUMA の比較
 B) Glo Hyper Pro の Standard モードと Boostモードの比較

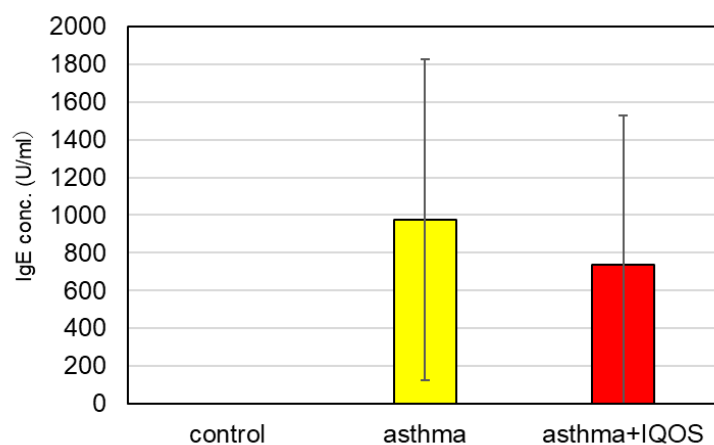


図4 血漿中の抗 OVA-IgE の濃度(ELISA 法による) 値は Mean±S.D.を示す。
(control は N=9, ぜん息群とぜん息+IQOS 群は N=11)

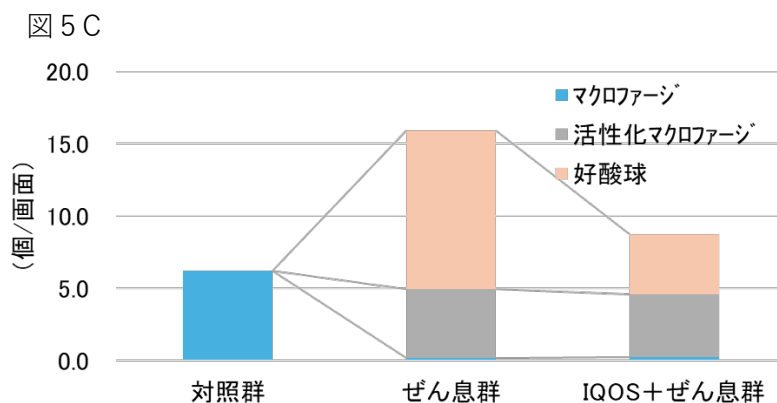


図5 肺泡洗浄液中細胞のサイトクイック染色による解析 A: サイトクイック染色した BALF の顕微鏡像、B: マクロファージと好中球の染色像、C: 視野中の細胞数 (異なる5視野の平均値を示す)

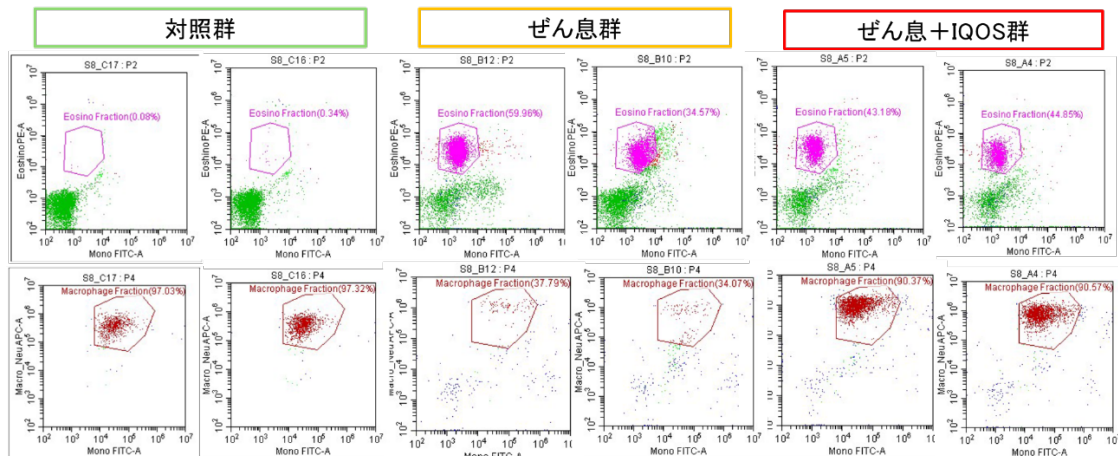


図6 肺胞洗浄液中細胞のフローサイトメリーによる解析

上下に並べているチャートが一つの個体を示す。上段のピンク色の枠内が好酸球画分を示し、下段の赤枠内がマクロファージ画分を示す。

気管(縦断面)(×20)

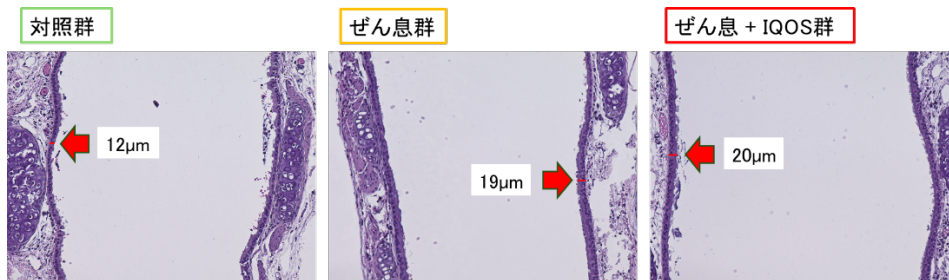


図7 気管(縦断面)のHE染色像

対照群に比べ、ぜん息群、ぜん息+IQOS群で肥厚する例が見られる例も多いが、観察対象の部位によって肥厚の差が大きくみられたため、明確な結論に至らなかった。

気管(縦断面)(×20)

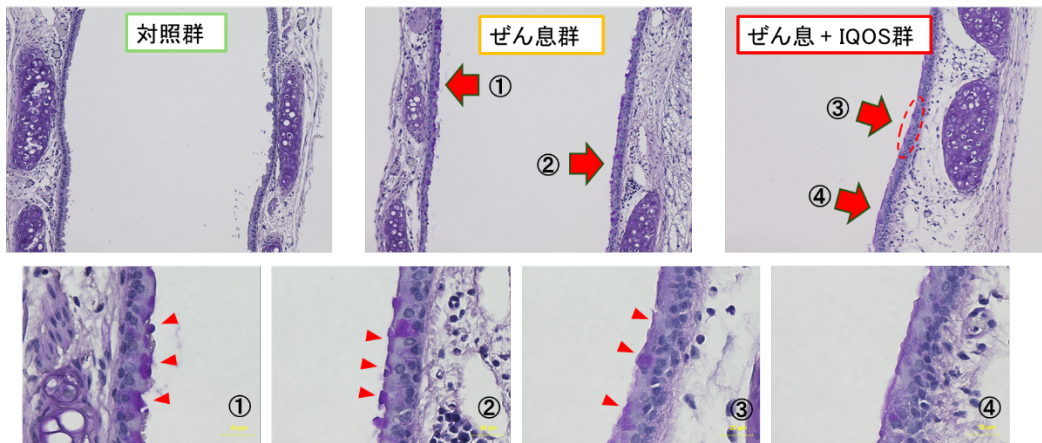


図8 気管(縦断面)のPAS染色像

対照群に比べ、ぜん息群、ぜん息+IQOS群では、気管上皮の杯細胞で粘液の分泌が促進されている像が観察された。上段の①～④の部分拡大したものが下段である。PAS陽性の粘液部分は赤い矢じりで示す部分である。

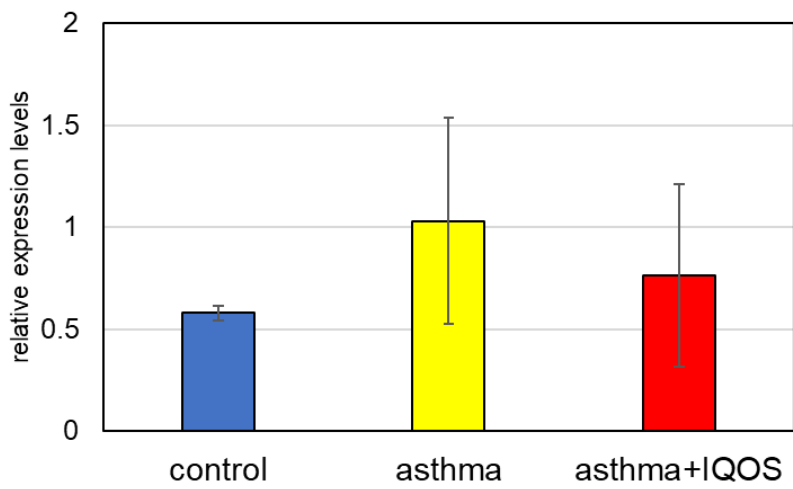


図9 ぜん息マーカー(IL-33)の発現レベル