

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)
分担研究報告書

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、電子たばこ3種 (LOST VAPE THELEMA QUEST 200W KIT, Vaptio X-Hubble, INNOKIN Coolfire ULTRA) 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。電子たばこ主流煙中の PAHQ を定量した結果、最も多くて29種類の PAHQ を定量することに成功した。1〜3環 PAHQ が生成しやすく、検出種と組成は電子たばこ間で共通しており、製品の違いは検出種や組成に影響しなかった。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 濃度が上昇していた。電子たばこの連続使用によりコイルやその付近に残留物や焦げが付着し、PAHQ 生成量を増加させていると考えられ、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、日本国内では電子たばこや加熱式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、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

測定対象の電子たばこは、LOST VAPE THELEMA QUEST 200W KIT, Vaptio X-Hubble, INNOKIN Coolfire ULTRA の3種類とし、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 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 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、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。捕集の合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 (1)。

測定対象成分

環数が 1 つのベンゾキノ (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 (BeP-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 (1)。

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 $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μ m, 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 μ L 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 (1)。

C. 結果及び考察

1. PAHQ の定量性の確認

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に、THELEMA QUEST 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。電子たばこで検出が確認された 29 種類の PAHQ を分析対象として定量性を確認した結果($n = 4$), 日内および日間変動について $100 \pm 25\%$ の真度が得られ, 定量値のばらつきを示す 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. 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 THELEMA 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 1 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 (2)。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 (3)。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(4)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 (5, 6)。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 (7)。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。

3. 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 (8)。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 2 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

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。電子たばこは連続使用することでコイルやその付近に残留物や焦げが付着することが知られており、今回の PAHQ 生成量の増加に寄与していると考えられる。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ことから、PAHQ による電子たばこの健康影響をより明確にするためには、電子たばこ使用者の使用実態を考慮して注視していく必要がある。

E. 参考文献

- (1) 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).
- (2) 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).
- (3) 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).

- (4) 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).
- (5) Hajaligol M., Waymack B., and Kellogg D., Low temperature formation of aromatic hydrocarbon from pyrolysis of cellulosic materials, *Fuel*, 80, 1799-1807 (2001).
- (6) 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).
- (7) 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).
- (8) 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, 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

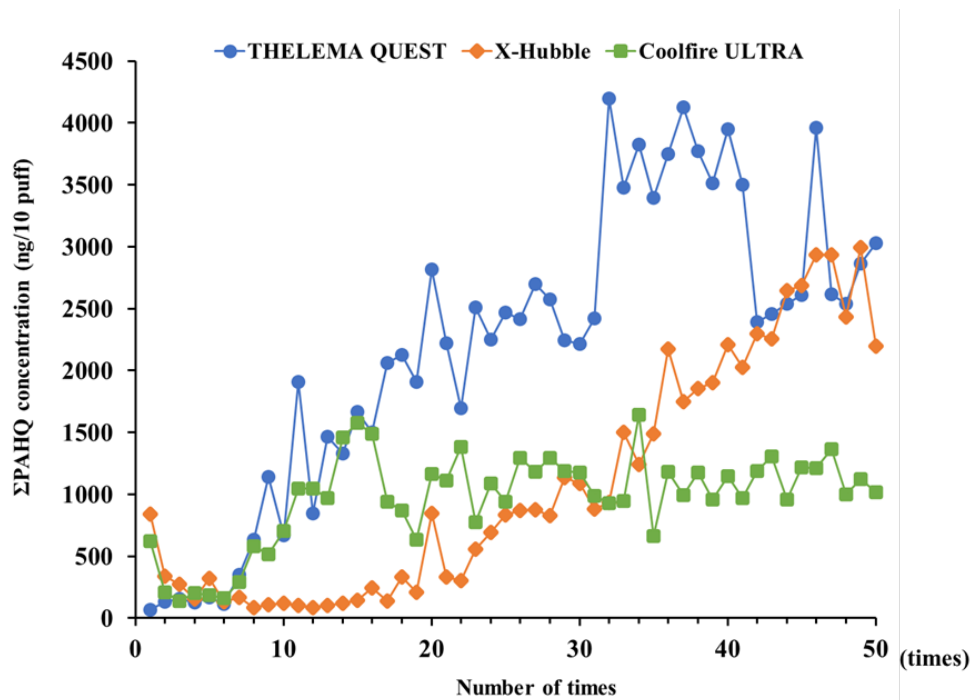


図1 電子たばこの連続使用による主流煙中総 PAHQ 濃度の変化

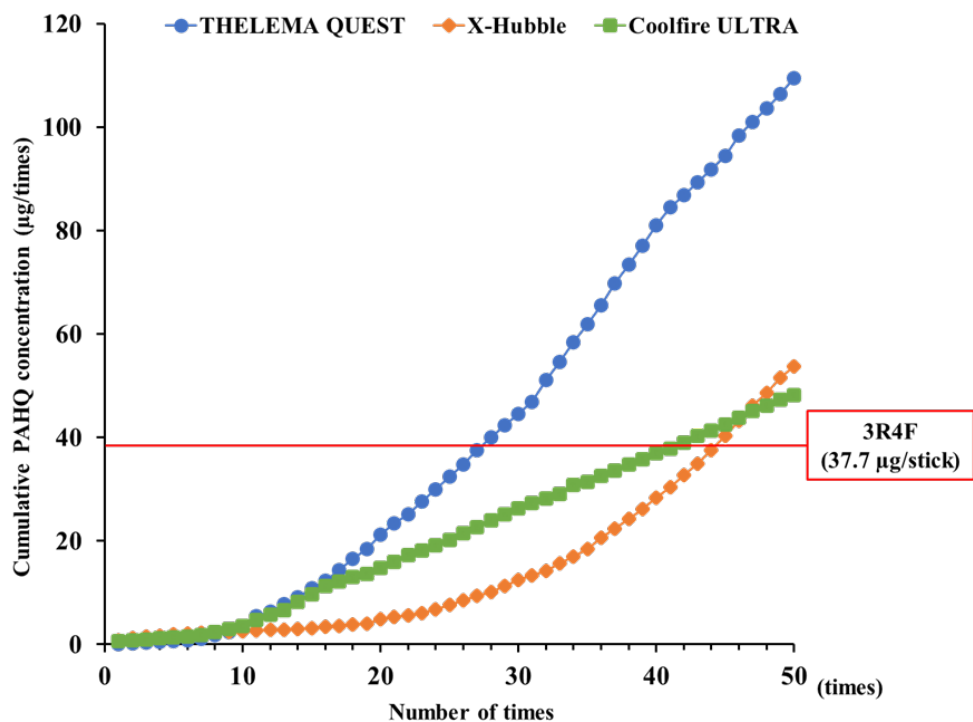


図2 電子たばこの連続使用による使用回数ごとの PAHQ 累計濃