

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)
総合研究報告書

加熱式たばこエアロゾルが生体に及ぼす影響に関する実験的検討

分担研究者 牛山 明 国立保健医療科学院
分担研究者 中舘 和彦 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

加熱式たばこの普及による健康リスクを推定するために生物学的研究は必須である。しかしながら、加熱式たばこはこれまでの燃焼式たばこは煙の発生機序が異なるため、従来のばく露装置をそのまま使用することは困難であり、仮に使用したとしてもそこから導かれる結果には大きな不確実性が伴うことが懸念される。加熱式たばこばく露による生体への影響を定量的に決定するためには、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要であるが、*in vivo* 実験用の標準化された加熱式たばこエアロゾルばく露装置はない。そのため本研究では、*in vivo* 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発し、開発した装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を検討した。また、開発した装置を用いて IQOS エアロゾルをばく露したマウスの生理学的応答および組織学的影響を検討することを目的とした。我々は同装置を用いて、マウスに IQOS のエアロゾルばく露を行い、健康影響アウトカムの解析を試みた。初年度は短期ばく露（1日5本で最大4日程度）のばく露をおこなって、肺胞マクロファージの泡沫化や還元型グルタチオン（GSH）が減少することを示した。また、研究の途上でばく露時の拘束ストレスの影響が懸念されたため、拘束しないばく露方法を検討した。拘束しないばく露方法を用いて最終年度までに1）血中の炎症性サイトカイン濃度への影響、2）テレメトリー法による心拍への影響、3）病理組織解析の3つの研究を最大4週間までの連続ばく露を行ったマウスで解析を実施した。

加熱式たばこばく露は、一部の指標において、生体影響と考えられる変化をもたらしたが、本研究ではばく露期間の制約もあるため健康影響を検索するためには、さらに長期間のばく露・高用量のばく露などの条件による研究が必要であると考えられた。

A. 研究目的

加熱式たばこの普及による健康リスクを推定するために生物学的研究は必須である。しかしながら、加熱式たばこはこれまでの燃焼式たばこは煙の発生機序が異なるため、従来のばく露装置をそのまま使用することは困難である。仮に使用したとしても、経路の途中でエアロゾルが結露し

結露水にニコチンが溶け込むため、正しいばく露は得られない。そのためそこから導かれる結果には大きな不確実性が伴う。したがって加熱式たばこばく露による生体への影響を定量的に決定しリスク評価をするためには、動物へエアロゾルを適切にばく露する装置を用意することが極めて重要であるが、*in vivo* 実験用の標準化された加

加熱式たばこエアロゾルばく露装置はない。そのため本研究では、in vivo 実験用の加熱式たばこの動物ばく露装置を開発し、開発した装置によって生成された加熱式たばこエアロゾルの化学分析、および実際にマウスにばく露を行った際にマウスの血漿や尿のニコチンおよびその代謝物を定量し装置の妥当性を検討した。また、開発した装置を用いて IQOS エアロゾルをばく露したマウスの生理学的応答および組織学的影響を検討した。

また、同装置を用いてマウスにエアロゾルばく露をした際の 1) 血中の炎症性サイトカイン濃度への影響、2) テレメトリー法による心拍への影響、3) 病理組織解析を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 加熱式たばこばく露装置および捕集するエアロゾルの分析

1. 1 動物用加熱式たばこ露装置

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および図2)。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。

1. 2 加熱式たばこエアロゾルの捕集

加熱式たばこばく露装置および化学分析用捕集装置 (LM4E、Borgwaldt) を用いて、IQOS ヒートスティック 3 本分のエアロゾルを Cambridge filter 1 枚に捕集した。捕集は喫煙者の喫煙行動を想定した国際的な喫煙法である HCI 法に従い、吸煙量 55 mL、吸煙時間 2 秒間、吸煙間隔 30 秒間、および通気孔を 100%閉鎖して行った。LM4E は動物用ばく露装置を用いて捕集した化学物質量と比較し、その装置の有用性を検証するために用いた。

加熱式たばこエアロゾルの化学分析

加熱式たばこエアロゾルのニコチン、水分、タールおよび一酸化炭素の定量は WHO TobLabNet が定めた標準作業手順書に基づき行った。

2. マウスを用いたばく露と生物学的ばく露量の検討

2. 1 マウスへのばく露方法

ばく露方法は、当初の実験において C57BL/6N マウスを保定用チューブに入れ、鼻部ばく露用マスクにマウスの鼻がかかるように置いた。この際には保定による拘束ストレスが予想されたため、1回のばく露では、連続で 60 分を超えないようにした。研究後半では、ばく露の際に筒状のホルダーにいれた際の拘束ストレスを回避するため、動物を保定しない(自由度の高い)ばく露用のホルダーでばく露を行った(図3)。これまでと異なるばく露法であるが、尿のニコチン代謝物の分析に基づけば高いばく露条件が達成されていることが示された。

2. 2 尿中ニコチン代謝物の定量

IQOS ヒートスティックエアロゾルばく露から 1、2、4、6 時間後に採尿し、尿中ニコチン代謝物の定量をするときまで -80°C で保存した。サンプル中のニコチン代謝物を LC-MS/MS (Xevo TQ-S、Waters Co) を用い定量した。また、尿中のクレアチニン濃度を定量し、尿中ニコチン代謝物濃度をクレアチニン濃度で補正した。

3. 生理・生化学的解析

3. 1 体表面皮膚温度測定

マウス体表面皮膚温度を IR カメラ (InfReC G100EX、日本アビオニクス株式会社) で測定するため、ばく露実験前日にマウスの背中の体毛を小動物用電気バリカン (トリマー MODEL 2100、大東電機工業株式会社) で毛刈りし、残った毛をクリームで除毛した。IQOS ヒートスティック 1 本分のエアロゾルばく露前、ばく露直後、5、10、15、30、

60、120 分後に除毛したマウス背中の IR イメージを 1 測定時間あたり 3 枚取得し、3 枚の IR イメージから平均値を算出し体表面皮膚温度とした。

3. 2 気管支肺胞洗浄および肺胞マクロファージの回収

加熱式たばこエアロゾルばく露後、気管切開して、サーフロー外筒を挿入し、PBS1 mL を充填したシリンジを接続し、肺内に PBS を注入した。PBS を注入後、シリンジの押し子をゆっくり引き、注入した液を回収した。これを 2 回繰り返す、回収した液を気管支肺胞洗浄液とした。気管支肺胞洗浄液は 4℃、100×g で 10 分間遠心分離し、上清と細胞画分（肺胞マクロファージ）に分けた。

3. 3 肺胞マクロファージ内 GSH 濃度の定量

本研究では、肺胞マクロファージ内のグルタチオン（GSH）濃度を調べる目的で蛍光指示試薬 QuicGSH3.0（五稜化薬）を使用した。QuickGSH3.0 はグルタチオン存在下で発色する 572 nm とグルタチオン非存在下で発色する 650 nm の 2 波長の蛍光強度比より細胞内グルタチオン濃度を求める手法である。基本的に販売会社の提供するプロトコールに従い実験を行った。

マウス 1 匹につき 50 細胞以上を解析し、求めた GSH 濃度の平均を各マウスの肺胞マクロファージ内 GSH 濃度とした。

3. 4 肺組織内 GSH および GSSG 濃度の定量

肺胞洗浄液を回収した後の肺組織について、GSH および GSSG を GSSG/GSH Quantification Kit（同仁化学研究所）を用いて定量した。

製品プロトコールに従い、気管支肺胞洗浄後のマウス肺組織 100 mg に 5%SSA 溶液を 0.5 mL 加えてホモジナイズし、4℃、8,000×g で 10 分間遠心分離した。上清を SSA 溶液の濃度が 0.5%となるように希釈し、所定の方法で反応をさせた。吸光度測定により求めた GSSG 濃度と総グルタチオン濃度

を用いて、次式から GSH 濃度を算出した。

$$\text{GSH 濃度} = \text{総グルタチオン濃度} - (\text{GSSG 濃度}) \times 2$$

3. 5 酸化ストレスマーカーの解析

凍結保存した臓器から ISOGEN2 を用いて、常法に従って total RNA を抽出し、Invitrogen 社の SuperScript IV VIL0 Master Mix を用いて cDNA を合成した後、表 1 に示すプライマーセットと TOYOBO の THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて RT-PCR による遺伝子発現の解析を行った。

5. 2 血中サイトカイン濃度の網羅的解析

加熱式たばこばく露の血液をマウスの頬静脈から一定量採血し、血漿を回収した。なお、採血のタイミングは、一連のばく露を開始する前、ばく露を 2 週間行った直後、ばく露を 4 週間行った直後の計 3 回であり、ばく露は 1 日 10 本（スティック）のばく露をおこなった群（以下、10S 群とする。）と 1 日 20 本のばく露をおこなった群（20S 群）、ばく露を行わずホルダーに入れ、空気をばく露した群（Air 群）、何も行わない群（Control 群）とした。

3. 6 サイトカインの定量

血しょう中のサイトカインの定量は Biolegend 社の LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel（13-plex）with Filter Plate キットおよび BECKMAN COULTER 社のフローサイトメーター CytoFLEX を使用し、メーカーマニュアルに従って分析を行った。

検出限界値以上の濃度と判定されたサイトカインについて統計解析ソフト SPSS を使用し、各群の統計解析をおこなった。統計処理は各群が等分散であると仮定して一元配置分散分析（one-way ANOVA）を行い、 $p < 0.05$ の項目について post hoc 解析を実施した。

3. 6 マウス心電図の取得及び解析（短期ばく

露)

実験の48時間前までに、マウス(C57BL/6N)に対して外科的に埋め込み型マウス心電図送信器(ソフトロン)を装着した。実験直前にマウスを円筒型マウスホルダー(KN-325-C, 夏目製作所)に入れて保定をした。ホルダーを心電図受信ボードの上に置き、送信機からのアナログ信号をPowerLab4/26(AD Instruments)を介してA/D変換を行いPCに取り込んだ。取り込んだデジタルデータは、LabChartProソフトウェアおよび内臓のECG解析モジュール(AD Instrument)で処理および解析を行った。なお、マウスの心拍数は平時で600~700拍/分(10~12拍/秒)データの取得レートは1kHzとした。

3. 7 マウス心電図の取得及び解析(長期ばく露)

あらかじめ、加熱式たばこばく露装置で、1日20本のばく露を3週間行い、エアロゾルばく露に馴化したマウス(C57BL/6N)を用意した。毎日のばく露を実施しつつ、心電図を取得する実験の48時間前までに、外科的に埋め込み型マウス心電図送信器(ソフトロン)を装着した。対照としては、加熱式たばこエアロゾルに全くさらされていないマウスを用意した。実験直前に図3で示したホルダーにマウスを1匹だけ入れ、ホルダーを心電図受信ボードの上に置きばく露を行った。心電図の取得および解析は3. 6と同様である。

4. 病理組織解析

4. 1 光学顕微鏡を用いた病理組織解析

IQOSばく露マウスとコントロールマウスの肺を4%パラフォルムアルデヒド溶液にて浸漬固定した。緩衝液で洗浄後、アルコール系列で脱水、レモゾール液置換後、パラフィン包埋した。パラフィン包埋した肺組織は5 μ m厚に薄切し、ヘマトキシリン-エオシン(HE)液を用いて染色した。HE染色切片は、光学顕微鏡(LM)で撮影し、病理

組織解析を行なった。病理組織像観察については、i; 肺胞上皮組織(I型とII型)の変化解析、ii; 肺胞マクロファージの数と形態変化解析、iii; 肺胞中隔内の厚さ、血管内皮細胞の病理検査、iv; 肺胞腔への血球等の浸潤等について検討した。

4. 3 電子顕微鏡を用いた微細病理組織解析

光学顕微鏡を用いた病理組織解析で使用したIQOSばく露マウス(1日4本1日ばく露群、1日4本2日ばく露群)とコントロールマウスの肺の一部を4%アルデヒド、2%グルタルアルデヒド溶液で固定し、その後、オスミウム酸で再固定した。緩衝液で洗浄後、アルコール系列で脱水、プロピレンオキシド液置換後、エポキシ樹脂包埋した。包埋した肺組織は70nm厚に薄切し、電子染色液を用いて染色した。透過型電子顕微鏡(TEM)にて検鏡、撮影し、微細構造変化を解析した。

4. 5 免疫組織化学法による病理組織解析

上記病理組織解析で作製したパラフィン包埋後のIQOSばく露マウスとコントロールマウスの肺5 μ m厚に薄切し、レモゾール、アルコール系列、蒸留水に置換した。10 mMクエン酸ナトリウム(pH 6.0)で95度60分間、抗原賦活化した。Block Aceにてブロッキング処理を行ったのち、下記の抗体で蛍光抗体法にて検討した。

Anti-Endothelial-cell antibody, Anti-Collagen1 antibody, Anti-CD45 antibody, Anti-CD31 antibody, Anti-F4/80 antibody, Anti-TNF-alpha antibody, Anti-MIP1alpha antibody

1次抗体は4℃で一晩反応し、洗浄後、各2次抗体で発色した。蛍光染色切片は、蛍光顕微鏡で撮影し、病理組織解析を行なった。

5. 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. ばく露装置と拘束ホルダーによるマウスへのばく露

本研究では我々が独自に開発したばく露装置を用いて実験を行った(図1、図2)。ばく露装置を用いて収集した物質を分析したところ、エアロゾルの化学分析結果において粒子状およびガス状物質ともに化学分析用の捕集装置(LM4E)の捕集結果と比較してほぼ同量であった(図4)。この結果から、動物用ばく露装置は加熱式たばこのエアロゾルを大きく損失することなくマウスにばく露することができるといえる。また、カスタムメイドの鼻部ばく露用マスクを加熱式たばこエアロゾル放出ポートの先端に接続することで、マウス鼻部を直接エアロゾルでばく露することができ、以下の実験では本ばく露装置を使用することとした。

2. ばく露によるニコチン代謝物の挙動と生理・生化学応答

尿中のニコチンおよびニコチン代謝物量の変化
ばく露装置による IQOS エアロゾルばく露がマウスへ化学物質の損失なく実施できていることを検証するために、ばく露後の各時点でのマウス尿中のニコチン代謝物(コチニンおよび3-ヒドロキシコチニン)をLC-MS/MSで定量した。コチニンはばく露1時間後に高値(6.82 µg/mg)となり、2時間後にはおおよそ半量(3.32 µg/mg)となった。一方で、コチニンの代謝物の一つである3-ヒドロキシコチニンはばく露2時間後に高値(32.9 µg/mg)となった(図5)。(すべてクレアチニン補正值)

また、呼吸器から吸収されたニコチンの血管収縮作用による体表面皮膚温度の変化を経時的に測定した(図6)。エアロゾルばく露前は37.6℃±0.8℃あった体表面皮膚温度がばく露直後から徐々に低下し、30分後に最低値(33.5℃±0.5℃)

となった。さらに、ばく露120分後には元の温度に戻り、マウスの活動もばく露前の状態に戻った。一方で、エアロゾルばく露中は保定用チューブで拘束しているため、拘束ストレスが体温に影響を与える可能性があった。そのため、ばく露装置を用いて室内空気をばく露した Sham 群の体表面温度と比較したところ、IQOS ばく露群はばく露直後から60分後まで有意な体温の低下を示した。また、Sham 群の結果より、体温の低下は拘束ストレスによるものではないことが確認された。

肺に吸い込まれた加熱式たばこエアロゾルによる酸化ストレスの影響について検討するため、酸化ストレスの指標として知られているグルタチオンに着目し、IQOS エアロゾルをばく露したマウスの肺胞マクロファージの細胞内還元型グルタチオン(GSH)濃度を定量した。Control 群と比較し、IQOS エアロゾルばく露によって肺胞マクロファージの細胞内GSH濃度は有意に減少した(図7)。また、IQOS エアロゾルばく露群においても5s1d群(5本/日を1日ばく露)と比べ5s2d群(5本/日を2日ばく露)では有意に減少し、群間の量的反応関係が認められた。

IQOS エアロゾルばく露による肺胞マクロファージにおける酸化ストレスの増大が認められたため、続いて肺組織への影響を検討した。各群のマウス肺組織中の総グルタチオン濃度、GSH 濃度および酸化型グルタチオン(GSSG)濃度を定量したところ、肺組織中の総グルタチオン濃度はIQOS エアロゾルばく露によって有意差はなかったものの増加傾向であった(図8)。

3. 酸化ストレスマーカーの発現解析

加熱式タバコのエアロゾルへのばく露影響を検討するため、肺および肝臓における酸化ストレスマーカーとして以下の7種の遺伝子発現量をRT-PCR法を用いて測定した。測定対象はメタロチオネイン:Mt1、Mt2、ヘムオキシゲナーゼ1:Hmox1、チオレドキシン:Txn1、Txn2、ペルオキシレドキシ

ン：Prdx1、NAD(P)H キノンデヒドロゲナーゼ 1：Nqo1 である。また、ハウスキーピング遺伝子として、Ywhaz と Rpl13A を測定し、それぞれで補正した結果が同様であることを確認した。

IQOS のエアロゾルに直接ばく露される臓器として、肺の酸化ストレスマーカーの発現量を RT-PCR 法を用いて測定した。ケージで飼育したコントロール群の発現量を 1 とし、各遺伝子のシャムばく露群と IQOS ばく露群の相対的な発現量を図 9 に示した。Mt1 と Mt2 のみがコントロール群に対して 2 倍以上の発現誘導が観察された。しかし、この影響はシャムばく露群にも同等の影響が認められており、拘束ストレスによる影響の可能性が高いと考えられる。また、Mt1 と Mt2 以外の酸化ストレスマーカーでは、発現の誘導が観察されていない。Mt1 と Mt2 はコルチゾールによる発現誘導を受けることが報告されており、肺における発現誘導は IQOS エアロゾルによる酸化ストレスではなく、拘束ストレスによってコルチゾールの分泌量が増えたことを示唆する結果である。

次に、肝臓における酸化ストレスマーカーの遺伝子発現量を測定した。肺と同様に、ケージで飼育したコントロール群の発現量を 1 とし、各遺伝子のシャムばく露群と IQOS ばく露群の相対的な発現量を図 10 に示した。肝臓では、シャムばく露群と IQOS ばく露群においてコントロール群と比較して Mt1 と Mt2 の発現量が 100 倍以上に誘導されていた。それ以外の酸化ストレスマーカーでは、Hmox1 で 2 倍以上の誘導が認められたが、IQOS ばく露群だけではなく、シャムばく露群により強い誘導が認められた。さらに、Trx や Prdx および Nqo1 では、誘導が観察されなかった。これらの結果は、肺と同様に肝臓においても拘束ストレスにより、Mt1 と Mt2 がコルチゾール依存的に誘導されたことを示唆する結果である。

IQOS エアロゾルに直接ばく露する肺と化学物質の代謝を担う肝臓において酸化ストレスマーカーの遺伝子発現量を測定した。その結果、Mt1 と

Mt2 の誘導が認められたが、シャム群と IQOS 群における誘導が同等であったことと、Nqo1 や Prdx および Trx などの酸化ストレスマーカーの誘導が観察されなかった。これらの結果は、酸化ストレスを介した発現誘導ではなく、コルチゾール依存的な拘束ストレスによる影響であることを示唆している。今後、IQOS エアロゾルのばく露影響を評価するためには、非拘束下のばく露方法を検討することが必要であると考えている。

4. 5 血中サイトカインへの影響

検出限界値より高い濃度が示された炎症性サイトカインは IL-1 α 、IL-1 β 、IL-10 の 3 つであったため、この 3 つに注目して解析を進めた。IL-1 α は加熱式たばこばく露によって、血漿中の濃度が増加する傾向がみられた。しかし数値のばらつきが大きく ANOVA 解析を行った結果は 2 週間ばく露、4 週間ばく露の血漿ともに有意差は認められなかった。

IL-1 β では加熱式たばこばく露の有無による違いは見られなかったが、IL-10 では加熱式たばこばく露によって血漿中が濃度の抑制される傾向が見られた。ANOVA 分析において 2 週間ばく露の血漿では有意差は認められなかったが、4 週間ばく露の血漿では 20S 群と Air 群において有意 ($p=0.031$) が認められた (図 11)。

5. エアロゾルばく露中のマウス心電図への影響

本研究では、マウスの循環器への急性影響を明らかにするため、埋め込み型マウス心電図送信器を C57BL/6N マウスに装着し、テレメトリー法によりマウスの覚醒下の心電図を取得した。IQOS エアロゾルは HCI 法によりばく露をおこなった。加熱式たばこばく露装置にたばこを挿さずに装置を稼働した場合、すなわち空気のみをばく露を行った場合は、心電図に大きな変化を認めないが、IQOS をセットしばく露を行うとパフの直後に心拍に変化が観察された (図 13)。心電図から RR 間

隔を1拍毎に算出し、プロットをおこなった。この結果から、IQOSエアロゾルのばく露により心拍に変動が見られることがわかる。また図12に示すように、IQOSを連続してばく露しても同様の変化が見られた。しかしながらばく露して数分以内にはRR間隔はベースラインに回復する現象もみられ、RR間隔の変化は可逆的なものであった。なおデータは示さないが、茶葉から作られたニコチンを含まないスティックのエアロゾルばく露でも類似の可逆的な現象が確認された。

これまでは、マウスにとって拘束条件かつ初めてのたばこばく露による実験であったが、次に長期間のばく露をおこないエアロゾルばく露に馴化したマウスでの検討をおこなった。またばく露の際には、非拘束型ホルダーを用い、非拘束状態においても同様な現象が起こるのか否かについて検討をした。

マウスに1日あたり加熱式たばこ20本のエアロゾルを3週間以上にわたりばく露をし、馴化をした後に、心電図を記録しながらエアロゾルばく露の影響を調べたところ、エアロゾルのパフ直後に期外収縮が見られ、馴化によってその現象が消失することはなかった(図13)。しかしながら、この影響は一過性のものであり可逆的であった。

加熱式たばこや電子たばこエアロゾルに含まれるニコチンには、その薬理的な作用で心血管系にさまざまな影響を引き起こすことが知られている。ニコチンは内皮機能不全、アドレナリン作動性ニューロンからのノルエピネフリン放出、および副腎エピネフリン放出を誘発し、全身循環および冠循環の血管収縮を引き起こす可能性がある。ニコチンによる持続的な交感神経活性化も心筋リモデリングに寄与する可能性があり、心室細動、リモデリング、線維症の発症を促進することが動物実験で示されており、本研究で見られた影響もニコチンによるものの可能性が考えられる。しかしながら、一般的にニコチンの作用であれば交感神経系が刺激され、心臓の興奮性が高め

られる作用で心拍数が上がるためRR感覚は短くなるはずである。しかしながら今回はRR感覚の延長が見られた。また今回でのデータでは、加熱式たばこの2秒のパフのあとの28秒のインターバルの間、さらには1本のスティックをばく露したあとのインターバルの間に変化がベースラインに戻る現象が見られている。この間、体内のニコチンレベルは大きな変動はないと考えられるため、ニコチン以外の有害性を持つ成分による影響の可能性もある。図14に示した通り、馴化したマウスを用いても同様の現象が起こることは、長期間のばく露でも心臓は同様の応答をし続ける可能性を示しており、心臓の肥大化や線維化を通じて心不全などの疾病につながる原因になるかもしれない、更なる長期間ばく露でどのような反応が起こるのかの検証が必要である。一方で、人とマウスで心臓の解剖学的構造や、ニコチンに対する感受性の違いも指摘されていることにも注意が必要である。

6. 光学顕微鏡(LM)による病理組織解析

肺の病理組織解析において、i; 肺胞上皮組織(I型とII型)の変化解析、ii; 肺胞マクロファージの数と形態変化解析、iii; 肺胞中隔内の厚さ、血管内皮細胞の病理検査、iv; 肺腔への血球等の浸潤等について、光学顕微鏡下で解析を行った。

コントロールマウスの肺組織の病理組織検査によって、加熱式タバコの主流煙をばく露していない肺組織は、どの検査項目によっても正常構造を示し、IQOSばく露マウスについても同様の検討を行った。今回の検討した肺組織を網羅的に解析した結果、ほぼ全ての領域において正常肺組織構造を示していた(図14)。しかし1個体の肺組織の1箇所においては、炎症様構造変化を呈していた(図14)。これらの一連の一般病理組織学的検査の結果から、今回のIQOSばく露では、ほぼ全ての肺構造へ有意な異常構造変化を誘発していない

ものと示唆されるが、ごく一部の肺組織において炎症様構造が今回初めて確認されたことは、その病理組織学的変化が稀な変化であるのか、普遍的な変化であるのかを今後詳細に検討する必要があると考察される。

7. 電子顕微鏡 (SEM) による病理組織解析

本研究では、SEM を用いて網羅的に肺組織を観察し、肺胞マクロファージの密度と形態解析をおこなった。その結果であるが、まず図 15 に肺胞像をしめす。さらに定量結果を図 16 左に示すように、コントロールと比較し IQOS ばく露では、肺胞マクロファージ細胞の数が増えていることが示された。さらに、観察された肺胞マクロファージの細胞内を観察すると、IQOS ばく露の肺内の肺胞マクロファージ細胞では、有意に異物除去を行なっている過程、すなわち消化している像が多数認められた。この過程像を持つ細胞を計測した結果を図 16 右に示すが、有意に IQOS ばく露群が多いことが示された。

IQOS のエアロゾル成分には紙巻きたばこに比べ、有害化学物質は一定程度低減しているため、どのような作用機序で肺胞マクロファージが、どのような物質を分解しているのかについては、今後詳細な検討を要すると考えている。

これらの結果から、IQOS ばく露群の肺胞マクロファージでは、なんらかの異物を処理していると考えられる。この異物を確かめるために、IT-800SHL に搭載した元素マッピング解析を行った。

図 17 にその結果の一例を示すが、空胞内の素性では、IQOS ばく露群で C (炭素) が多い傾向が示されている。ガラス板 (SiO_2) 上に組織を採取し、アルミニウム (Al) の台を使用し、 OsO_4 をコーティングしているため、それらの元素が多量に検出されているが、それらを除くと有意な違いは C (炭素) のようである。肺胞マクロファージがカーボンを含んだ炭化物、もしくは有機物を異物とみなし、処理を行なっている可能性が考えられる。

この異物処理が正常範囲内、すなわち生体内の処理能力内であれば、身体にとって不都合は生じないと考えられるが、この処理過程が能力以上となった場合には、泡沫化し、肺の組織に炎症など様々な影響をもたらす可能性が示唆される。

このような微小変異が個体差ではなく普遍的な変化であるか本格的な解析を行うことが今後必要であると考えられる。さらに、このようなミクロの肺の構造変化と肺の炎症との関連を明らかにすることが可能であると考察される。

8. 免疫組織化学法による病理組織解析

病理組織学的解析から細胞の集積が認められた領域において、マクロファージの集積や肺の線維化の有無を免疫組織学的解析により検討した。解析部位は炎症様構造を用いた。

まず、血管内皮のマーカー染色 (図 18 の左: Endthelial-cell) では、有意な差異は認められなかった。線維化の有無を検討するため collagen マーカー染色をおこなった (図 18 の右: collagen)。この結果でも有意な差は認められず、IQOS ばく露群では肺の線維化が起こっていないものと示唆された。

次に、各細胞における発現マーカーを用いて検討した。CD45 陽性白血球数 (図 19: CD45) は、両群に有意な差が認められなかった。同様に CD31 陽性血管内皮/血小板 (図 19: CD31) においても有意な差が認められなかった。マクロファージを認識する F4/80 でも有意な差が認められなかった (図 19: F4/80)。同様にマクロファージから分泌される TNF alpha においても有意な差は認められなかった (図 19: TNF alpha)。

マクロファージの集積等が確認されなかったが、マクロファージの機能の亢進の有無を検討するため、マクロファージから分泌され好中球等を誘引する MIP1alpha について検討した (図 20: MIP1alpha)。その結果、IQOS ばく露群の肺で炎症様構造部位ではほぼ全てのマクロファージが

MIP1alpha 陽性であった。

この結果から、今回異常が認められた部位においては、マクロファージの集積などは認められなかったが、その部位に分布するマクロファージは活性化し、他の細胞を誘引する可能性が示唆された。しかし、これらのマクロファージの活性化を示す結果は肺全体では認められず、極めて微細な変化であることも事実である。IQOS ばく露では、今回の病理組織学的検討から肺全体での炎症という結果を導くことは難しいが、微小変異が個体差ではなく普遍的な変化であるか本格的な解析を行うことで、肺の構造変化と肺の炎症との関連を明らかにすることが可能であり、必要であると考察される。

D. 結論

本研究では、加熱式たばこ専用の動物用ばく露装置を用いて動物実験を実施した。本装置を用いてマウスに IQOS 主流煙をばく露したところ、必ずしも健康影響とは言えないが、生体影響としての変化が様々な指標で得ることができた。

特に、肺胞マクロファージへの影響や心拍への影響については、長期的影響が懸念されることから今後更にばく露期間を増やして検討する必要があると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

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.

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. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.04.042. Epub 2022 Apr 11. PMID: 35462100.

Koike S, Sato K, Sawa M, Inaba Y, Hattori K, Nakadate K, Ushiyama A, Ogasawara Y. Exposure to Heated Tobacco Products Aerosol Causes Acute Stress Responses in the Lung of Mouse. *Antioxidants (Basel).* 2022 Nov 25;11(12):2329.

2. 学会発表

澤麻理恵, 牛山明, 稲葉洋平, 中舘和彦, 服部研之. 加熱式たばこエアロゾルを短期間ばく露した際のマウス肺の組織学的評価. 日本薬学会第 142 年会 (名古屋) 2022.3.25-28.Web 予稿集.

澤麻理恵, 石川智, 牛山明, 服部研之. IQOS エアロゾルばく露は肺組織及び肺胞マクロファージに酸化ストレスを発生させる. 第 92 回日本衛生学会学術総会 (兵庫) 2022.3.21-23. 同予稿集 S205.

澤麻理恵, 牛山明, 稲葉洋平, 服部研之. 加熱式たばこの生体影響を検索するための動物用ばく露装置の開発とその有用性に関する研究. 第 69 回日本実験動物学会総会 (仙台) 2022.5.18-20.

牛山明, 澤 麻理恵, 茂木貴博, 稲葉洋平, 服部 研之. 加熱式たばこエアロゾルばく露が血中サイトカイン濃度へ及ぼす影響. フォーラム 2022 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (熊本) 2022.8.30-31. 抄録集 p.226

牛山明, 稲葉洋平, 内山茂久. 加熱式たばこエアロゾルばく露による健康ハザード探索のための

動物実験システムの構築 第 81 回日本公衆衛生学会総会. 2022.10.7-9.(甲府)同講演抄録集. p442."

牛山明, 茂木博貴, 澤麻理恵, 稲葉洋平. 加熱式たばこエアロゾルばく露による血中サイトカインの変動とその要因の検討, 第 93 回日本衛生学会学術総会. 2023.3.2-4. (東京). 同講演集 S217.

進藤佐和子, 高橋知里, 西川史織, 二瓶まどか, 塚田航大, 中舘和彦, 稲葉洋平, 牛山明, 服部研之. 加熱式たばこエアロゾルのマウスへのばく露手法の検討. 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. 同講演要旨

集 Page 181.

牛山明, 稲葉洋平. 加熱式たばこエアロゾルばく露時にマウスの ECG に生じる一過性の影響について. 第 94 回日本衛生学会学術総会; 2024.3.7-3.9; 鹿児島. 日本衛生学雑誌第 79 巻 (Suppl.) S267.

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

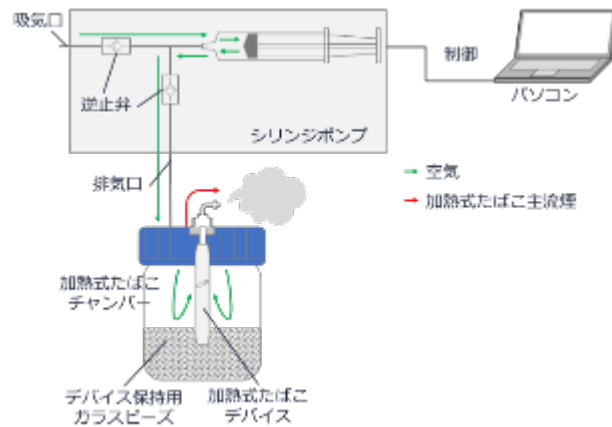


図1 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置（概念図）

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(HCI 法)。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。

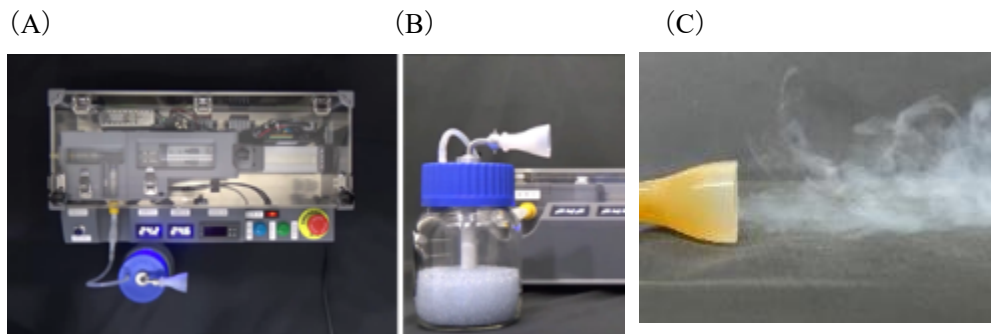


図2 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置

(A) 2 型ばく露装置の全体写真を示す。(B)IQOS デバイスおよびスティックをセットした状態の加熱式たばこチャンバーを示す。(C) エアロゾルが放出された瞬間を示す。エアロゾルの放出ポートにつけたマスクにマウスの鼻部を配置しばく露を行う。

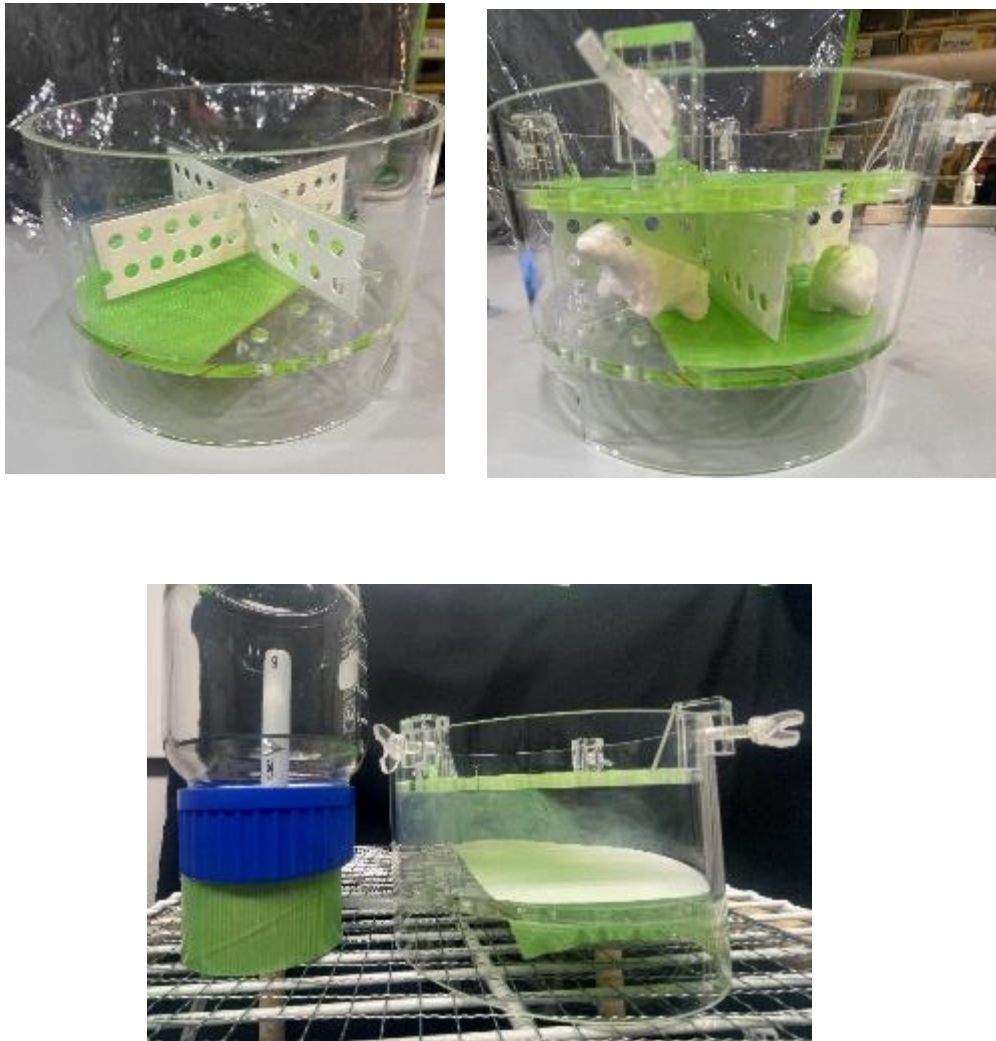


図3 動物用ばく露装置に接続する非拘束ホルダー

(A) ホルダー全体を示す。このホルダーは外径 150mm で、内部を通気性のよい仕切りで4等分ないし5等分に仕切りそれぞれの小部屋の行き来を阻害し、マウスのファイティングを防止した。(B)ホルダーにマウス模型を入れた状態。(C) ばく露装置からエアロゾルをホルダーに導入している様子。この写真では仕切りとマウスを入れていないが、実際のばく露では仕切りで区切りばく露を行う。

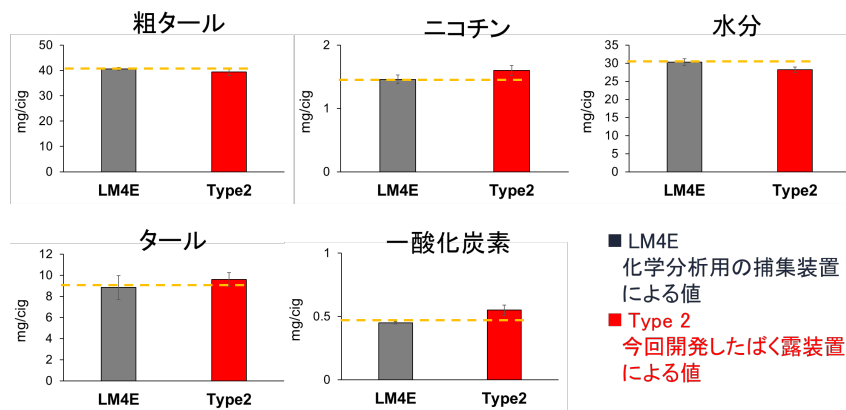


図 4 各種装置を用いた IQOS エアロゾルの化学分析結果

化学分析用捕集装置である LM4E を用いた IQOS エアロゾルの分析結果と比較した。IQOS 5 本分のエアロゾルを Cambridge filter に捕集し、捕集前後のフィルター重量差から粗タールを求めた。フィルターから抽出したサンプルから GC-TCD を用いて水分を、GC-FID を用いてニコチンを定量した。求めた粗タール量から水分量及びニコチン量を引いてタール量を求めた。また、捕集時にサンプリングバッグに集めたガス状物質から汎用赤外ガス分析計を用いて一酸化炭素を定量した。

Mean $\pm$ SD (n = 5).

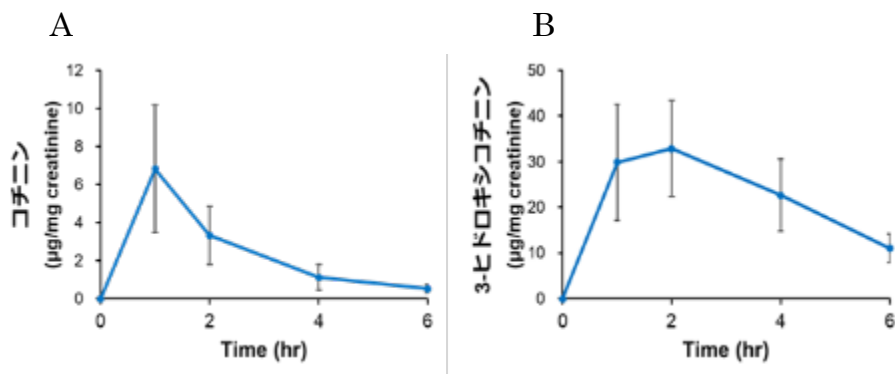


図 5 IQOS エアロゾルばく露後のマウスの尿から検出されるニコチン代謝物量の変化

マウスに IQOS 1 本分のエアロゾルをばく露し、ばく露前、ばく露後 1、2、4、6 時間後に採尿した尿のニコチンの主要代謝物である(A)コチニンと(B)3-ヒドロキシコチニンを定量した。尿は前処理後、LC-MS/MS で定量し、別途定量した尿中のクレアチニン濃度で補正した。

Mean $\pm$ SD (n = 7).

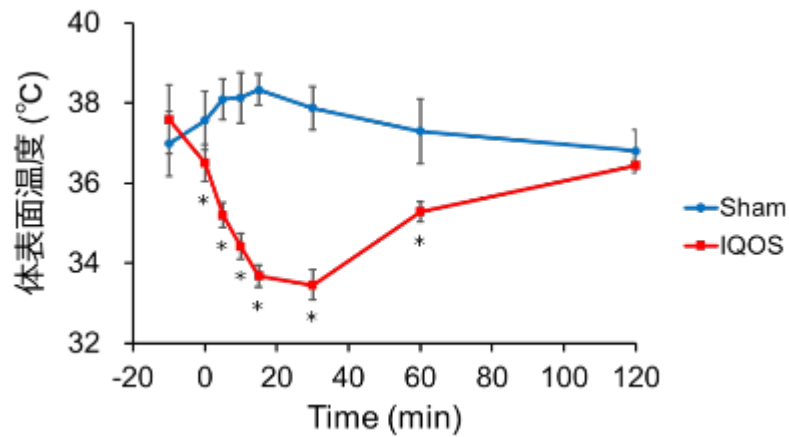


図 6 IQOS エアロゾルばく露後のマウス体表面皮膚温度の経時変化

マウスに IQOS 1 本分のエアロゾルをばく露し、ばく露前、ばく露直後、5、10、15、30、60、120 分後の体表面皮膚温度を近赤外線サーモカメラで測定した。各測定時間で得られたサーモカメラ像をもとに算出した体表面皮膚温度の経時変化を示した。

Mean $\pm$ SD (Sham, n = 5; IQOS, n = 7), * p <0.05, Student's t-test

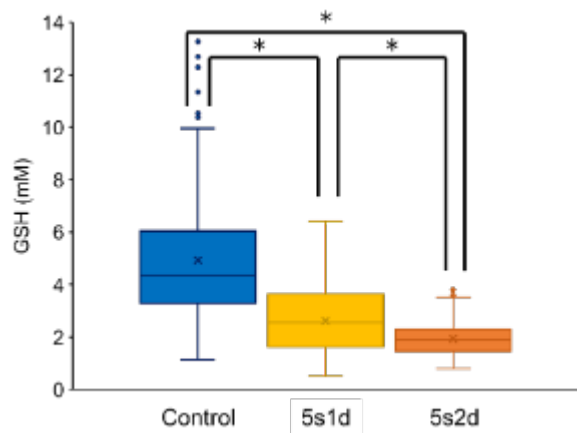


図 7 IQOS エアロゾルばく露後のマウス肺胞マクロファージの細胞内還元型グルタチオン濃度

各群で最終ばく露の 24 時間後に気管支肺胞洗浄液を回収し、その中に含まれる肺胞マクロファージを用いて細胞内還元型グルタチオン(GSH)濃度の定量を行った。

Welch's ANOVA test、post-hoc 解析は Dunnett T3 法

n = 3, * p <0.05.

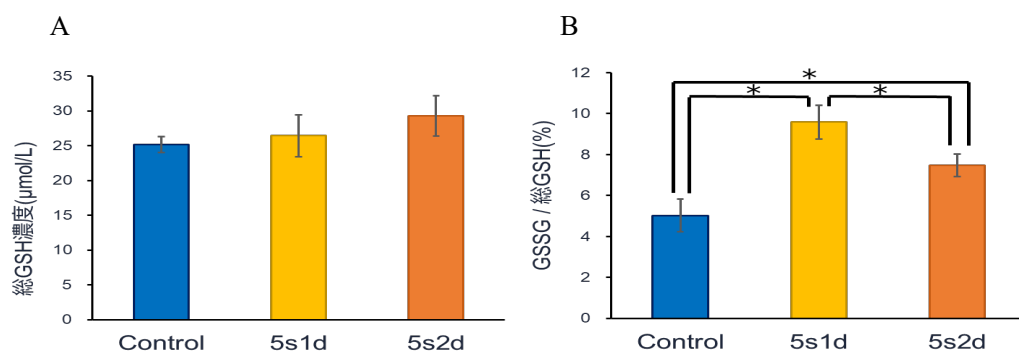


図8 IQOS エアロゾルばく露後のマウス肺組織中の(A)総グルタチオン濃度および(B)酸化型グルタチオン濃度の割合

各群の最終ばく露の24時間後の肺組織をホモジネートし、総グルタチオン濃度および酸化型グルタチオン濃度を定量した。

Welch's ANOVA test、post-hoc 解析は Dunnett T3 法

Mean ± SD (n = 3), *p<0.05.

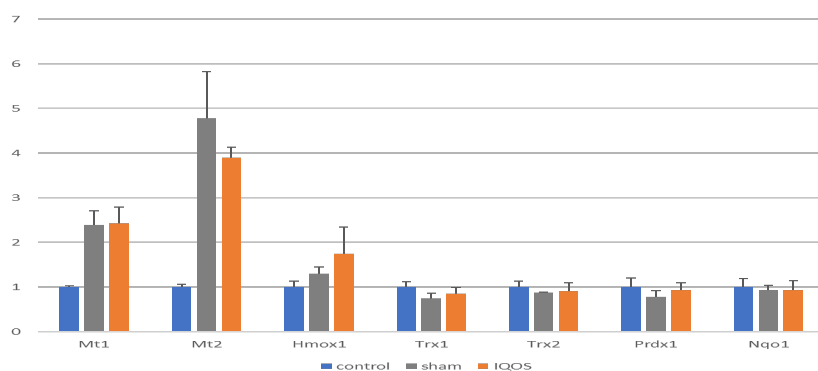


図9 肺における酸化ストレスマーカー遺伝子の相対発現量

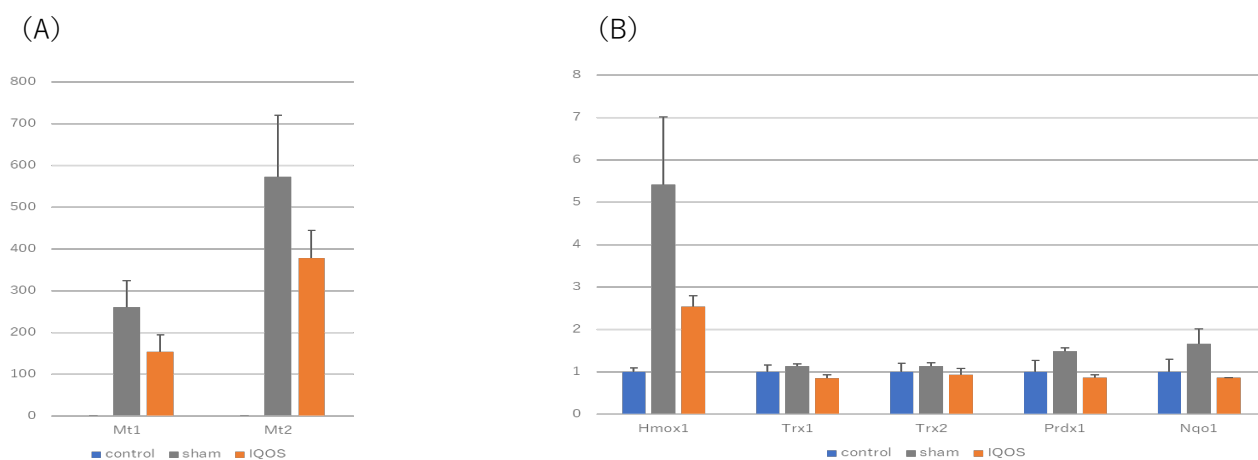


図10 肝臓における酸化ストレスマーカー遺伝子の相対発現量

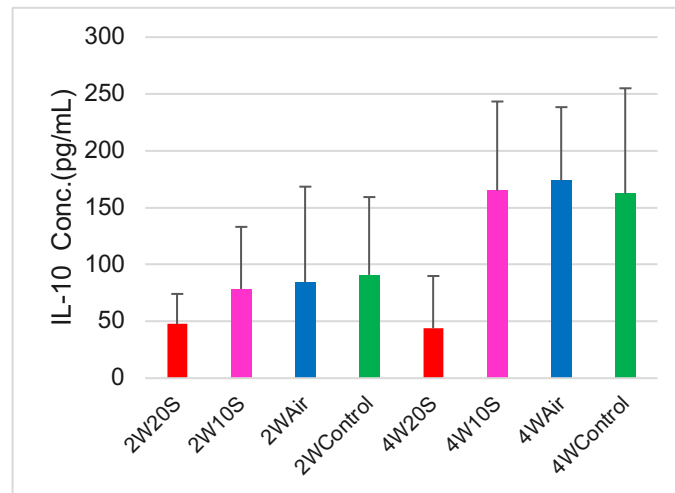


図 1 1 血漿中の IL-10 濃度

横軸の表記はそれぞれ、2W20S (20 本/日を 2 週間)，2W10S (20 本/日を 2 週間)，2WAir (空気ばく露を 2 週間)，4W20S (20 本/日を 4 週間)，4W10S (10 本/日を 4 週間)，4WAir (空気ばく露を 4 週間)，4WControl (ケージコントロール) を示す。データは Mean±SD (N=5 each) で示す。

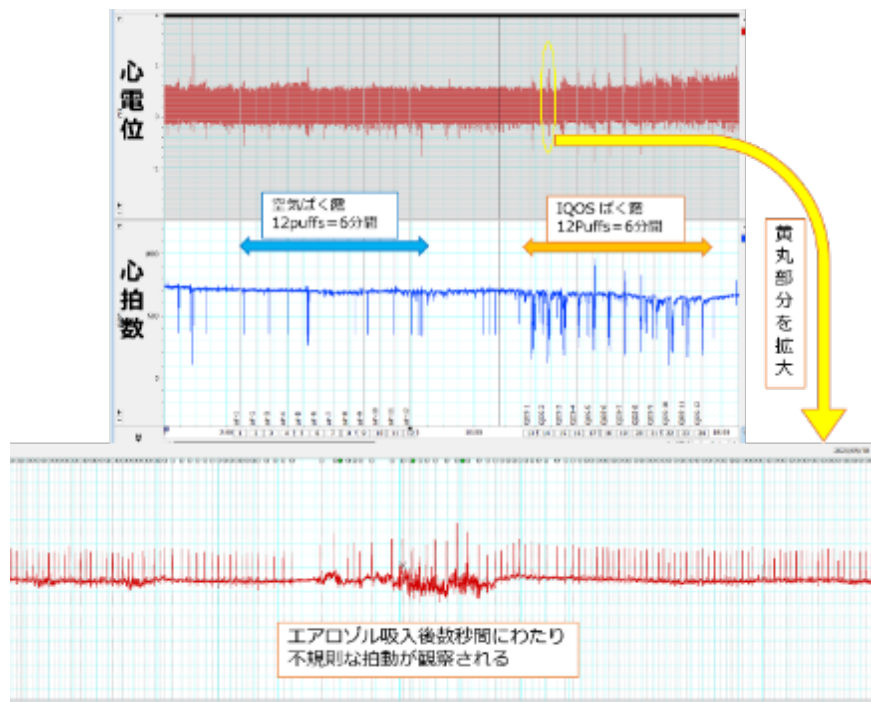
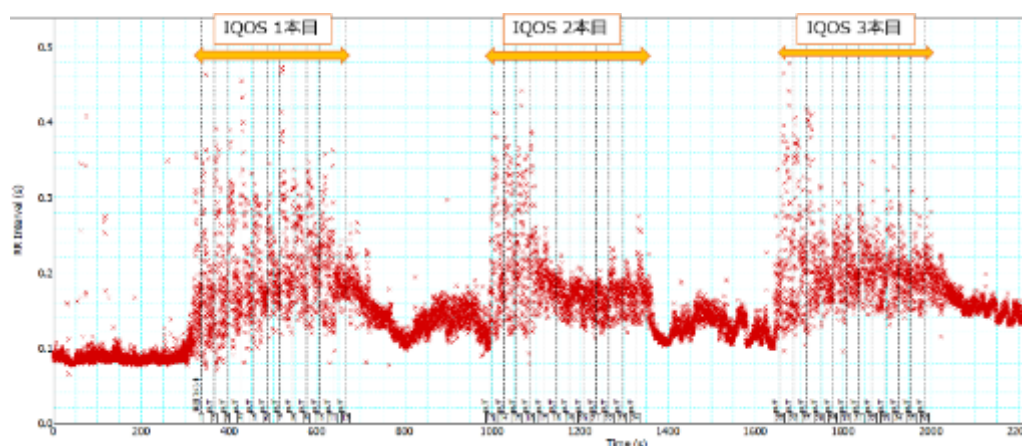
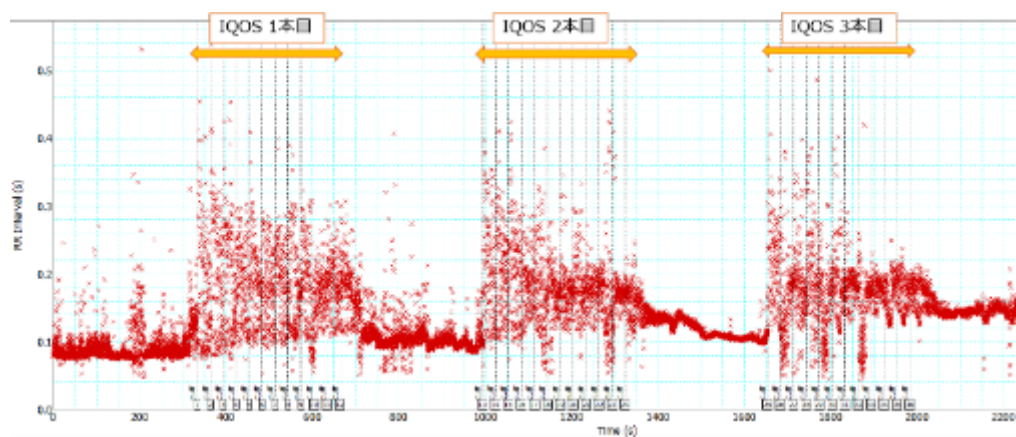


図 1 2 IQOS ばく露中の心電図

上図は埋め込み型マウス心電図送信器を装着したマウスで、連続的に心電図を記録した一例である。上図の左側で加熱式たばこばく露装置にたばこを挿さずに装置を稼働した場合、すなわち空気のみをばく露を行った場合を示す。また図の右側では、IQOS をセットしばく露を行った場合を示す。心電図の収集と同時に、心電図の RR 間隔から自動的に心拍数が算出されグラフ化されている。心拍数のグラフを見ると IQOS をばく露すると、パフ毎に心電図が乱れる傾向が見られた。そこで、IQOS の 2 パフ目（黄丸部分）の心電図を拡大したものが下図となる。エアロゾル吸入後、数秒間にわたり不規則な拍動が見られている。

3週間のばく露を行い、馴化したマウス



馴化を行っていないマウス

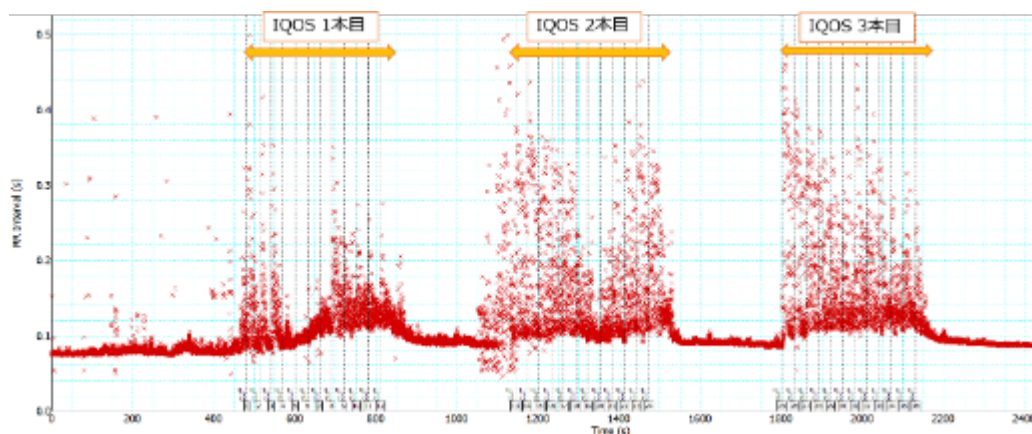


図 1 3 IQOS を連続で 3 本ばく露した際の RR 間隔の変化

IQOS を一定のインターバルをおいて連続で 3 本ばく露した際に記録された心電図をもとに 1 拍ごとの RR 間隔をプロットした。IQOS のばく露中はパフ毎に変動が見られたが、ばく露が終わるとベースラインに戻り、次のばく露が始まると、再度 RR 間隔の乱れが見られた。図中の黄色の矢印は IQOS1 本分のばく露時間（6 分間）を示す。上 2 つは馴化を行ったマウスの例（異なる 2 匹）、下は馴化を行っていないマウスの例を示す。

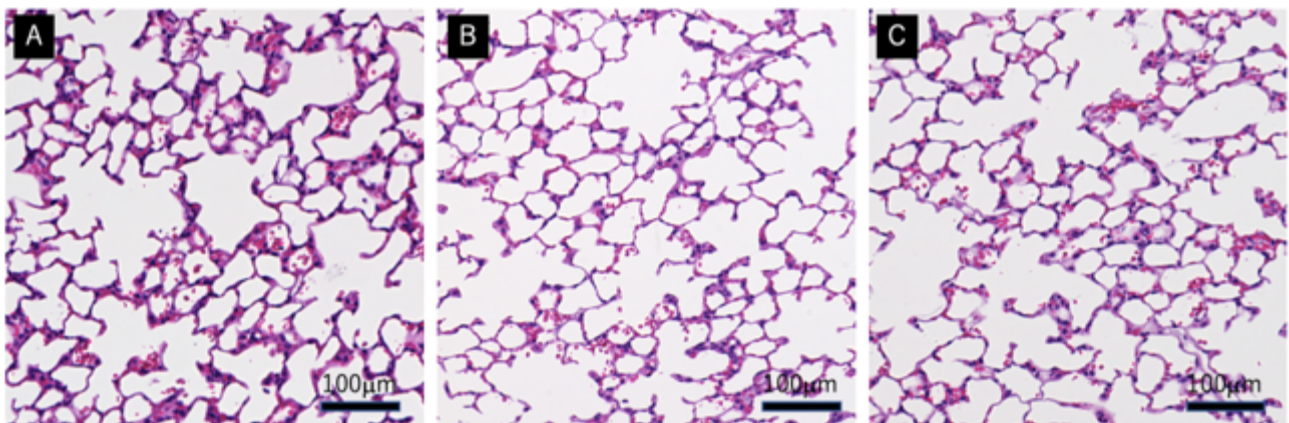


図 1 4 光学顕微鏡による病理組織解析

コントロールマウス肺の HE 染色像（図 13A）、IQOS ばく露マウス（1 日 4 本 1 日間）肺の HE 染色像（図 13B）、IQOS ばく露マウス（1 日 4 本 2 日間）肺の HE 染色像（図 13C）。

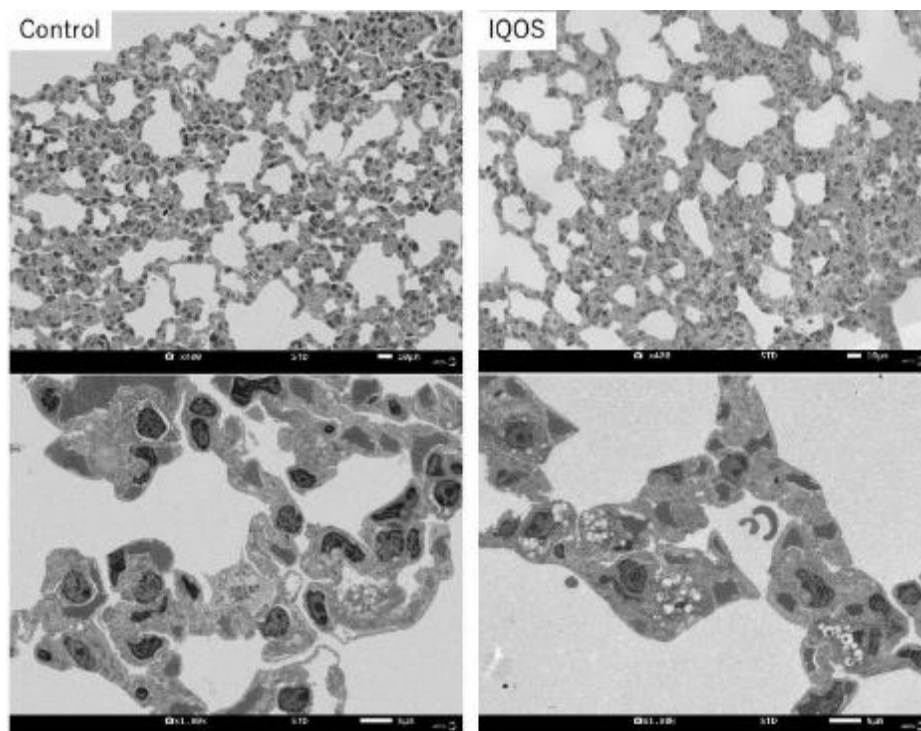


図 1 5 加熱式エアロゾルばく露後の電子顕微鏡像

コントロールの肺では、肺胞上皮細胞においても異常構造は認められない。加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウスの肺では、コントロールの肺同様に正常構造であるが、肺胞マクロファージの細胞が多く観察された。また肺胞マクロファージ内には空胞が多数認められた。

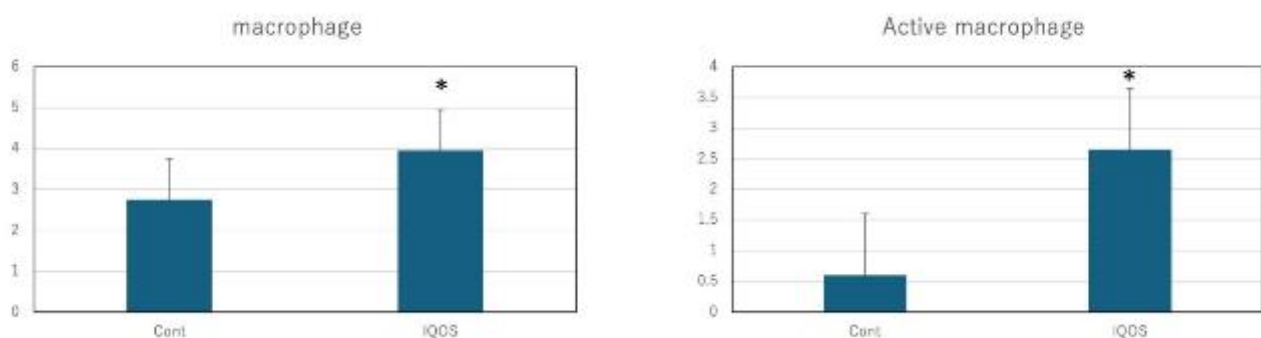


図 16 電子顕微鏡の画像解析の結果

左はマクロファージの出現数を示し、コントロール肺と比較し、加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウスの肺では肺泡マクロファージが増加していた。右は肺泡マクロファージ内に空胞が認められた細胞数を示す。コントロールマウスでは非常に少ない細胞数であるが、加熱式たばこエアロゾルをばく露したマウス肺では肺泡マクロファージ細胞内に多数の空胞が観察される細胞が増加していた。

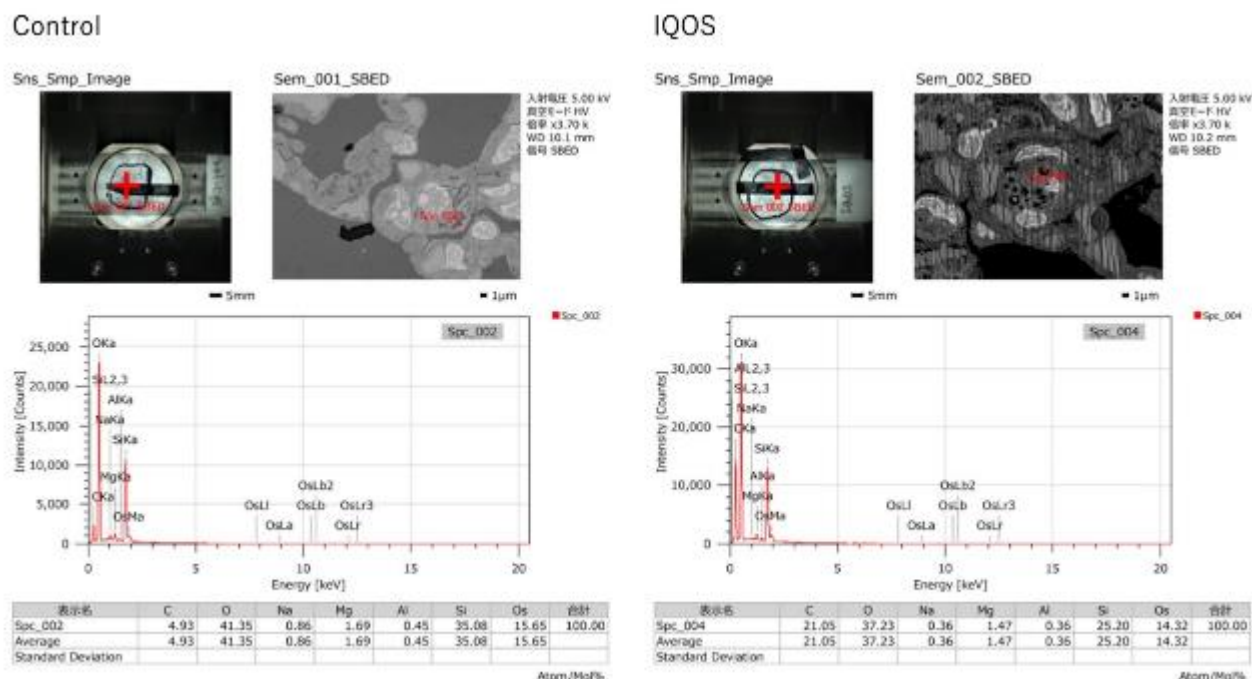


図 17 肺泡マクロファージ内に観察された空胞内の元素分析結果

コントロールと比較し、IQOS ばく露マウス肺のマクロファージでは、炭素が有意に増加していることが明らかになった。炭素を含む構成物を処理しているものと示唆される。

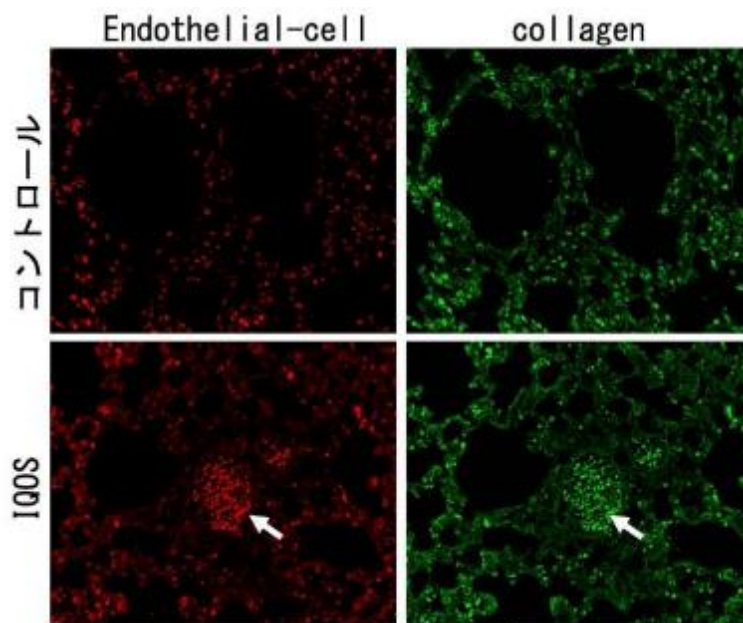


図 1 8 各抗体を用いた免疫組織化学法による像。

コントロール肺では、血管内皮細胞マーカー（赤）、コラーゲン染色（緑）とも異常構造は認められない。IQOS ばく露マウス肺の集積部位でも異常所見は観察されなかった。矢印は血管内であり、肺組織の所見を反映していない。

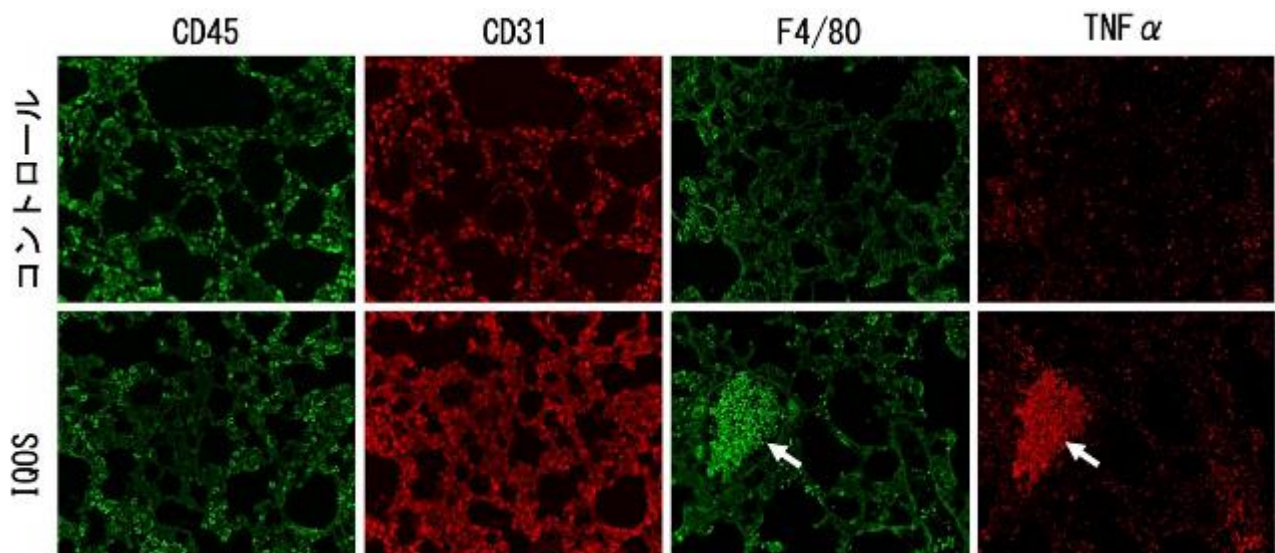


図 1 9 各抗体を用いた免疫組織化学法による像

コントロール肺ではマクロファージ細胞の異常集積や高発現は認められない。IQOS ばく露マウス肺における炎症様構造部位では、マクロファージ細胞の若干の発現上昇と集積が認められるが有意な変化ではなかった。矢印は血管内であり、肺組織の所見を反映していない。

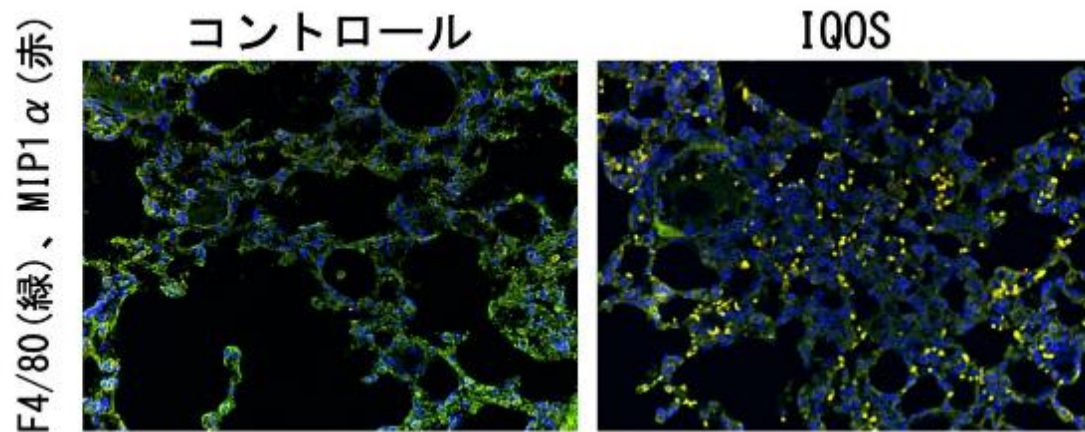


図 20 免疫組織化学法による像

コントロール肺ではマクロファージからの分泌は認められない。IQOS ばく露マウス肺の炎症様構造を呈した部位では、マクロファージからのサイトカインが確認された (黄色)。