

令和3～5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)
総合総括研究報告書

加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と受動喫煙による健康影響の研究

研究代表者 稲葉 洋平 国立保健医療科学院

研究要旨

健康増進法(改正)において、国は受動喫煙の防止に関する施策の策定に必要な調査研究を推進するように努めることとされている。加熱式たばこについては、紙巻たばこと比較して販売からの歴史が浅いことから、現時点の科学的知見では、加熱式たばこの受動喫煙による将来的な健康影響をまだ分かっていないことも多いため更なる科学的根拠の蓄積が必要とされている。これまでに研究班では、紙巻たばこで蓄積した成分分析の技術的知識をもとに新たな技術を開発してきており、WHO たばこ研究室ネットワークで国際標準化された分析法の開発を行ってきた(WHO TobLabNet SOP 8 and 9)。さらに、「加熱式たばこ副流煙の分析法を開発し、成分分析を一部実施」している。本研究では、これらの研究成果(分析法、実験装置)を基盤として、加熱式たばこ等の新たなたばこ製品について、①主流煙および環境たばこ煙の成分分析および評価、②動物実験を基盤として曝露マーカー、毒性試験、③副流煙の室内でのシミュレーションと実験環境下での実測などから受動喫煙による健康影響を研究、④加熱式たばこおよび新たなたばこ製品についての評価手法を検討、⑤本研究によって開発された健康影響の評価手法に従って、加熱式たばこなど新たなたばこ製品の評価を実施し、受動喫煙防止のための施策に活用することを目的としている。

3年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析を行った。分析法を確立し、新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量が上昇していることが確認された。また、加熱式たばこ紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要がある。曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。電子たばこにおいても出力、電子たばこリキッドのグリセロールの配合率によってカルボニル化合物の発生量にさが生じることなども解明された。加熱式たばこの受動喫煙の健康影響を評価するために、加熱式たばこ副流煙の分析を行った。この結果をもとに喫煙者のシミュレーションを行なったところ、副流煙よりも呼出煙の影響が大きいことが評価された。

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。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た。そして開発したばく露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・評価を行った。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。

研究分担者	所属施設名
高橋 秀人	帝京平成大学
牛山 明	国立保健医療科学院
戸次加奈江	国立保健医療科学院
煙山 紀子	東京農業大学 (2, 3 年度)
杉田和俊	麻布大学
中舘 和彦	明治薬科大学
李 時桓	名古屋大学
鳥羽 陽	長崎大学
中田 光紀	国際医療福祉大学
戸塚 ゆ加里	日本大学
中江 大	帝京平成大学 (初年度)

研究協力者	所属施設名
内山 茂久	国立保健医療科学院
小井川 奈々	千葉大学
斎藤みのり	千葉大学
美谷島 克宏	東京農業大学
中江 大	帝京平成大学
小宮 雅美	国立がん研究センター研究所
服部 研之	明治薬科大学
須藤 江里子	明治薬科大学
若井 美樹	明治薬科大学

A. 研究背景と目的

健康増進法（改正）において、国は受動喫煙の防止に関する施策の策定に必要な調査研究を推進するように努めることとされている。加熱式たばこについては、紙巻たばこと比較して販売からの歴史が浅いことから、現時点の科学的知見では、加熱式たばこの受動喫煙による将来的な健康影響をまだ分かっていないことも多く、更なる科学的根拠の蓄積が必要とされている。

研究代表者が所属する国立保健医療科学院は、

紙巻たばこで蓄積した成分分析の技術的知識をもとに新たな技術を開発してきており、2014 年には WHO-CC 指定協力研究センターに認定され、さらに、WHO-TobLabNet(たばこ研究室ネットワーク)に参画し、常に新しい技術開発に関する情報交換・国際標準化された分析法の開発を行ってきた (WHO TobLabNet SOP 8 and 9) 。また、「国際標準化された分析法を使用して、日本国内で販売されている加熱式たばこ製品群の成分分析を行い、学術論文においても発表」している (JUOE. 2017; 39: 201-07, Chem. Res. Toxicol. 2018, 31, 7, 585-593, Chem. Res. Toxicol. 2020, 33, 2, 576-583) 。これまでには、「加熱式たばこ副流煙の分析法を開発し、成分分析を一部実施」している (H30-R3 厚生労働行政推進調査事業費補助金) 。また、AMED 研究等で、加熱式たばこ喫煙者、加熱式たばこ受動喫煙者の曝露成分の分析法の開発、実態調査を行い、加熱式たばこの家族においてニコチン代謝物、たばこ特異的な発がん性物質を確認した。さらに、動物曝露用の加熱式たばこ喫煙装置の開発を行い、その曝露量を分析し、現在は論文が公開されている。

本研究では、これらの研究成果（分析法、実験装置）を基盤として、加熱式たばこ等の新たなたばこ製品について、①主流煙および環境たばこ煙の成分分析および評価を行う。また、②動物実験を基盤として曝露マーカー、毒性試験、副流煙の室内でのシミュレーションと実験環境下での実測などから受動喫煙による健康影響を研究し、加熱式たばこおよび新たなたばこ製品についての評価手法を検討する。③本研究によって開発された健康影響の評価手法に従って、加熱式たばこなど新たなたばこ製品の評価を実施し、受動喫煙防止のための施策に活用する（総合評価）。また、新たなたばこ製品は、今後も新製品が継続的に開発、

販売されていくことが見込まれるため、最新の市場状況を反映した本研究の科学的知見の蓄積を生かしてたばこ対策の政策立案を行うことを目的としている。

①「成分分析」に関して、これまでの研究を継続し、WHO-TobLabNet 連携し、加熱式たばこの成分分析法の国際標準化を行う。加熱式たばこ製品の主流煙・副流煙分析は、毎年、市場から新たな製品や加熱装置等が投入されており、これらについて成分分析をすすめる。

②「受動喫煙の健康影響評価」に関しては、動物曝露用の加熱式たばこ喫煙装置を使用して、加熱式たばこの毒性実験を行う。亜急性曝露・中期的な曝露からの呼吸器を中心としてその他の臓器への影響を評価する。副流煙・呼出煙（主流煙の30%と報告）の分析値をもとに、加熱式たばこ喫煙室での副流煙・呼出煙の対流から加熱式たばこ専用室の条件で開口部の煙の流出量と専用室で飲食する非喫煙者の曝露量シミュレーション（曝露のリスク評価）を行う。

③上記①、②より、経年的に情報を蓄積し評価するとともに、主として最終年度に加熱式たばこの健康影響評価を行う。加熱式たばこ喫煙者に関しては、確立した喫煙法をもとに、主流煙の成分分析を実施して、リスク評価を行う。実験室において、部屋の大きさ、換気状態、喫煙本数等一定の条件下において、環境たばこ煙の捕集・分析を行い、シミュレーションの妥当性を検証する。なお、加熱式たばこ互換機、紙巻たばこを加熱式たばこの様に加熱する装置についても、必要に応じて成分分析や健康影響の評価等を行っていく。

B. 3年間の研究成果

1. 加熱式たばこ主流煙分析法の確立と国際標準化及びたばこ銘柄への適用

（加熱式たばこ、電子たばこ、紙巻たばこ用加熱装置）

本研究では3年間の研究期間で、加熱式たばこの成分分析法の確立を行い加熱式たばこ銘柄への適用を目的とした。更に、確立した分析法を電子たばこ、最近 EC サイトで販売されている「紙巻たばこ加熱装置」に着目し分析も目的とした。本研究班の分析は、我々が参加している WHO たばこ研究室ネットワーク (TobLabNet) と作成を進めてきた「WHO TobLabNet 標準作業手順書」を基盤として分析を行なっている。

3年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析法の確立を行った。新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量は加熱式たばこが販売開始された2014年と比較すると上昇していることが確認された。また、加熱式たばこと紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。電子たばこは、有害性が低いたばこ製品として報告されることもある。しかし、喫煙条件によってはホルムアルデヒドをはじめとするカルボニル化合物、連続使用による一酸化炭素の発生なども確認された。電子たばこ製品は、製品に対する規制もなく、出力と電子たばこリキッドの組合せによって、条件によっては喫煙者が想定していない有害化学物質の曝露量になっていた。また、紙巻たばこ加熱装置の調査では、電子たばこと同様に装置によっては、加熱式たばこ以上、紙巻たばこに匹敵する有害化学物質も確認された。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要

がある。

2. たばこ製品から発生する有害成分と室内の汚染に関する研究

近年、国内で幅広く使用される加熱式たばこは、フレーバーなどの添加物を使用した多種多様な銘柄が販売され、主流煙中の成分においても従来の紙巻たばことは異なる特徴が報告されている。これらは、加熱式たばこの副流煙や喫煙者の呼気を介して環境中へ放散され、室内汚染を引き起こす可能性も懸念されている。そこで本研究では、はじめに、これまで主流煙中からの検出が報告され有害性が指摘されているフラン類とピリジン類 1) を対象に副流煙中の濃度を調べることにした。また、たばこ煙中での有害性が懸念される他の成分として、燃焼を主な発生源とするイソシアネート酸やメチルイソシアネートなどのイソシアネート化合物は、刺激性や感作性が強く、アレルギー性疾患や神経系への影響を及ぼすことが報告されている。そこで本研究では、国内で販売される新型たばこを対象に、副流煙中の有害成分の含有量を明らかにすると共に、主流煙からのイソシアネートの発生量及び室内の環境調査を行うことで、たばこ製品から発生する有害成分と室内汚染の影響を調べることにした。本研究結果より、新型たばこから発生するイソシアネートは、加熱温度により発生量変動するものの、銘柄間での組成の違いは殆ど無いことが確認された。一方で、加熱及び燃焼温度の上昇に伴い分子量の大きなイソシアネートの発生量が増加する傾向にあり、検出されたイソシアネートのうち、特に、紙巻たばこを使用する住宅では、ICA の他、MIC が比較的多く検出される傾向にあった。このような特徴は、イソシアネートの室内濃度にも影響していることが、室内環境調査の結果から明らかとされ、紙

巻たばこを使用する住宅では、ICA と MIC いずれも I/O 比が高値を示す傾向にあった。そのため、イソシアネートが受動喫煙の健康リスク因子の一つとなる可能性も示唆された。

3. 加熱式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

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、加熱式たばこ 6 種及び電子たばこ 3 種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・定量し、紙巻たばこと比較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。加熱式たばこ及び紙巻たばこ主流煙中から最も多くて 21 種類の PAHQ を定量し、電子たばこからは 27~29 種類を定量できた。いずれのたばこにおいても 1~3 環 PAHQ が生成しやすく、検出種と組成はたばこ間で類似していた。加熱式たばこ主流煙中の PAHQ 濃度は、全ての加熱式たばこ製品で紙巻たばこの 3% 以下であり、主流煙における PAHQ の生成には、燃焼・加熱温度が深く関与していた。電子たばこでは連続使用による使用回数の増加に伴い PAHQ 濃度が上昇しており、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。

4. 紙巻たばこの加熱式喫煙における主流煙中の水銀に関する研究

近年、加熱式たばこは若い世代を中心に使用され、JT 等の専用加熱式たばこの他に、紙巻たばこ

を加熱して喫煙するデバイスも販売されており、喫煙形態が大きく変化している。また、加熱式たばこは販売されてから 10 年程度の歴史しかないことに加え、フレーバー等の蒸気を加えたものなど多様な形態があり、人への健康影響が不明な点も多い。そこで、本研究では、たばこに含まれる水銀等の金属の挙動に関する研究の一環として、加熱式として喫煙できる喫煙デバイスで標準たばこ（3R4F Research cigarettes, University of Kentucky）を電気炉で加熱し発生する水銀の測定、及び静電捕集によるその他の重金属と水銀の同時捕集を検討した。

その結果、水銀は 100℃以上で温度の上昇に従って発生量が増加することが分かった。また、デバイス（加熱装置）の温度制御の劣化による発生量のばらつきが示唆された。静電捕集を用いた金属と水銀の同時測定では水銀の捕集は静電捕集装置に影響されないことが分かった。また、静電捕集された金属類は通常の紙巻たばことして発生する量よりも加熱式喫煙の方が低いことが分かった。しかし、静電捕集を用いた同時捕集については、測定精度を向上させ、測定できる元素数を増やす必要がある。

5. 加熱式たばこの副流煙分析および受動喫煙環境下のシミュレーション評価

喫煙によって発生するたばこの煙は、主流煙と副流煙の両方の発がん物質として定義され、人の健康への危険性が広く認識されている。したがって、喫煙室などの屋内空間では、喫煙によって発生する汚染物質を効率的に除去するための換気設計が必要である。最近では、加熱式たばこ（紙巻き状の非燃焼加熱式たばこ）は従来の紙巻式たばこより発生する副流煙が少ないため、加熱式たばこ専用の室内喫煙エリアも設置されている。し

かし、加熱式たばこによる健康への危険性はまだ明らかになっておらず、室内環境における受動喫煙による有害性及びその健康影響については明確な検討事例が少ない。第 1 章では、喫煙時の加熱式たばこ呼吸特性と汚染物質の発生を実測により定量的に分析し、呼吸特性を適用した解析モデルを提案することで化学種物質の挙動特性を明らかにし、それらの結果をもとに第 2 章では、非定常計算用の数値解析モデルを構築し、構築した数値解析モデルを用いて受動喫煙防止のために喫煙者と受動喫煙者の離れた距離による有害物質の摂取量について定量的に検討した。第 3 章では実測によるエアバリア最適風速の検証と第 1, 2 章の結果をもとに数値モデルと飲食店舗モデルを構築し、受動喫煙防止のためのエアバリア型テーブルの提案・検討を行った。

6. 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

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と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、肺泡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。

7. 加熱式たばこの曝露試験より得られたマウスの諸臓器に対する分子病理学的解析

本分担研究は、本研究の別の分担研究者である国立保健医療科学院の牛山らにより開発された主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する加熱式たばこ喫煙装置を使用して、加熱式たばこの毒性病理学的影響について解析した。本分担研究は、牛山らにより実施された、雄性 *gpt delta* マウスに、噴霧により曝露した動物実験から供給を受けた材料を用い、病理組織学的解析および組織中遺伝子発現解析を行った。タバコ喫煙装置は、

1ポートから4ポートへ改良され、一度に多くのマウスへの曝露が可能となった。さらに拘束条件から非拘束条件で5匹同時に曝露できるまで改良を重ねた。その結果、拘束条件下では体重減少と胸腺の萎縮が観察され、IQOS 曝露による免疫学的な影響が疑われたが、拘束ストレスの影響も示唆された。非拘束下においては、病理組織学的に胸腺では Air 群・IQOS 曝露群間で明らかな差はなく、曝露条件の改善によるものと考えられた。その他組織学的な変化は明らかでなかったものの、肺・腎臓などの遺伝子発現解析では、IQOS 曝露群において一部の炎症関連遺伝子並びに酸化ストレス関連因子発現に変動が認められた。このことから、本実験系では、IQOS 曝露による臓器障害を示唆する組織学的な変化は見られなかったものの、病態形成以前の段階において遺伝子発現への影響が見出された可能性があるものと考えられた。

8. 加熱式たばこの *in vivo* 遺伝毒性評価

gpt delta マウスおよび C57BL/6J マウスを用いて、IQOS 主流煙捕集液の反復気管内投与による肺を対象とした *in vivo* 遺伝毒性について検討した。研究代表者（稲葉）らが開発した方法で加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを PBS に捕集した液を、*gpt delta* マウスおよび C57BL/6J マウスに、1匹あたり 100 Lx 40 回の気管内投与を行なったのち、屠殺解剖を行なった。摘出した *gpt delta* マウス肺より抽出した gDNA の *gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、Control 群と比べて紙巻きたばこ（3R4F）群、IQOS 群の変異頻度はそれぞれ 1.3 倍、2.0 倍と上昇傾向にあった。変異スペクトルの解析を行なったところ、control と比較して 3R4F および IQOS 曝露群に共通して A:T→C:G、G:C→T:A 変異が増加した。さ

らに、IQOS 曝露群では G:C→C:G 変異の増加も観察された。

C57BL/6J マウス肺より抽出した gDNA を用いて、気管内投与による DNA 付加体の網羅的解析を行なったところ、control 群と 3R4F 群、IQOS 群の 3 つにクラスタリングができた。IQOS のクラスタリングに寄与する付加体を見出した。さらに、研究代表者（稲葉）らが開発した加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する装置を用い、雄性 *gpt delta* マウスに対して、中期曝露（4 週間）の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性についてインビトロパッケージング法により評価した。1 度目の曝露実験は IQOS を 1 回 5 本で 1 日に 1 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 IQOS 100 本相当）。この時に使用した曝露方法は *gpt delta* マウスを夏目製作所から購入した筒状フォルダー内に固定（拘束）し、4 分岐で曝露を実施し、最終曝露から 4 日目にマウスを解剖し、肺における変異原性の解析を *gpt assay* により検出した。コントロール動物は IQOS 曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定し、曝露装置を用いて空気のための曝露をおこなった（Air-control 群）。その結果、Air-control 群、IQOS 群に検出された変異頻度は殆ど変わらないことがわかった。2 度目の曝露実験では、IQOS の本数を前回より増やし、1 回 10 本で 1 日に 2 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 IQOS 400 本相当）。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを扇形の 5 区画に分けて曝露した。コントロール動物は IQOS 曝露と同様にマウスを 5 区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のための曝露をおこなった（Air-control 群）。その結果、有意差はつかないものの、IQOS 曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

C. 結論

3 年間を通じて加熱式たばこ製品の成分分析を行った。分析法を確立し、新しく日本市場に投入される加熱式たばこ銘柄の調査を行なったところ、徐々に有害化学物質の発生量が上昇していることが確認された。また、加熱式たばこと紙巻たばこ製品の分析結果を比較する論文も存在するが、比較する紙巻たばこによってその比較検討の評価が異なる場合があることも確認された。本研究期間で調査を行なった加熱式たばこ主流煙アクリルアミド量は紙巻たばこよりも高い銘柄も存在していた。今後も各たばこ製品のモニタリングを継続し、日本人喫煙者の健康影響評価を継続する必要がある。曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

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。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・評価を行った。

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