

令和3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  
研究協力者 澤 麻理恵 明治薬科大学

研究要旨

近年、国内においては新型たばこ製品「加熱式たばこ」の普及が著しい。加熱式たばこは燃焼式たばこ煙の発生原理が大きく異なり、たばこ葉が燃焼しない温度で加熱することで燃焼によって発生する有害化学物質量を低減していることがたばこ産業側の主張であるが、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る。これまで加熱式たばこ主流煙の化学分析結果は報告されているが、生体影響に関する報告は少ない。その理由は動物等に加熱式たばこ主流煙を適切にばく露する装置がないためであり、動物実験を精度良く行うためにもその装置開発は重要である。本研究では、我々が開発した動物ばく露装置について実際にマウスに加熱式たばこをばく露して装置としての妥当性を検証した。次に、装置を用いて加熱式たばこの健康ハザードの同定を目的とした生理学的評価、組織学的評価を行った。本装置を用いてマウスに IQOS 主流煙をばく露したところ、肺胞マクロファージ (AM) 内の還元型 GSH 濃度の減少を伴う酸化ストレス応答が発生していること、および AM の泡沫化が起きることが示された。一方で、組織学的変化においては、短期間のばく露では明確な変化は認められず、より長期間のばく露・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と考えられる。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。

**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**

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。

#### 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とと比較し、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

#### マウスへのばく露方法

ばく露の際には、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。ばく露装置を用いて、喫煙法は HCI 法で行った。マウスの保定時間は拘束ストレスの可能性を考慮し、連続で 60 分を超えないこととした。

#### 尿中ニコチン代謝物の定量

IQOS ヒートスティック 1 本分の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。

#### 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. 生理・生化学的解析

#### 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°C、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。

#### 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。

#### 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°C、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。

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

## 4. 病理組織解析

### 光学顕微鏡を用いた病理組織解析

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 μm 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。

### 電子顕微鏡を用いた微細病理組織解析 1

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

肺の一部を用いて解析した。上記手法によりパラフィン包埋し、5 μm 厚または 100 μm 厚に薄切した組織をスライドガラスに載せた後、脱パラフィン処理、凍結乾燥後、オスミウムコートを施した。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、検鏡、撮影し、微細構造変化を解析した。

### 電子顕微鏡を用いた微細病理組織解析 2

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、プロピレンオキサイド液置換後、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。

## C. 結果及び考察

### マウスのばく露装置と化学物質の定量

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 3)。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。

### マウスを用いたばく露と生理・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  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )となり、2時間後にはおおよそ半量(3.32  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )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  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )となった(図4)。(すべてクレアチニン補正值)

次に、尿中のニコチン代謝物が呼吸器を通じて体内に吸収された IQOS エアロゾル中のニコチンであることを明らかにするため、IQOS エアロゾルばく露直後のマウス血漿中のニコチンを GC-MS で定量した。IQOS5 本分のエアロゾルをばく露したマウスの血漿中から高濃度のニコチンと同時にコチニンも検出された(表1)。

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5)。エアロゾルばく露前は 37.6°C  $\pm$  0.8°C 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°C  $\pm$  0.5°C)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6)。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7)。また、IQOS エアロゾルばく露により GSSG 濃度の割合が有意に増加した。しかし、肺組織においては IQOS エアロゾルばく露の量的反応関係は認められなかった。肺胞マクロファージおよび肺組織において IQOS エアロゾルばく露による酸化ストレスの増大が認められたため、全身への影響を検討することを目的にマウス血漿中の総抗酸化能試験を行ったが、群間に有意差はみられなかった(データは未表示)。

#### 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、光学顕微鏡下で検査を行なった。

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されていない肺組織(図7A)は、どの検査項目によっても正常を示した。また、IQOS の短期間ばく露マウス(1日4本1日ばく露群、1日4本2日ばく露群)の両群(図7BとC)について同様の検討を行ったが、今回の検討において全ての項目で正常と相違ない構造を示した。これらの結果から、本研究において用いた短期間の IQOS ばく露では、

もしくは1日あたりのばく露量では肺の組織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。もしくは、構造変化があったとしても光学顕微鏡では確認出来ない程の微細な構造変化である可能性があり、後者の可能性を確認する必要がある。

#### 電子顕微鏡 (SEM) による病理組織解析

次年度において本格的に解析を行う電子顕微鏡を用いた肺の微細構造変化解析のため、まず光学顕微鏡解析に用いた肺組織と同じ組織切片解析を行なった。パラフィンを除去(脱パラフィン)し、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて微細構造を解析した。種々の解析法の検討を行った結果、図8のA-Cに示すように、表面構造の微細な変化を確認可能になった。さらに図8のD-Fに示すように、100 $\mu$ m厚に薄切した組織標本作製手法も確立したことで、立体的な構造変化の解析が可能と判断できた。本年度は詳細な病理解析は行っていないので、次年度、本格的な解析を行うことで、光学顕微鏡では明らかにすることができなかった肺胞表面での微細構造変化の有無を明らかにできるものと考えている。

#### 電子顕微鏡 (TEM) による病理組織解析

次年度において解析を行う電子顕微鏡を用いた肺の微細構造変化解析のため、手法の確立をおこなった。上記のSEMを用いた解析では、細胞の表面構造解析が主体であるが、病理変化が断面像、すなわち細胞内での変異の可能性もある。そのため、断面解析が可能な透過型電子顕微鏡 (TEM) にて微細構造を解析する必要がある。本年度にて、種々の解析法の検討を行った結果、図9に示すような微細構造を確認可能になった。本年度は詳細な病理解析は行っていないので、次年度、本格的な微細構造解析を行うことで、光学顕微鏡では明らかにすることが出来なかった肺を構成する種々の細胞内微細構造変化を明らかに出来るものと考えている。

#### 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、ニコチンを含むたばこエアロゾル成分が肺を介してマウスに取り込まれ、短期のばく露であっても肺胞マクロファージ (AM) 内の還元型GSH濃度の減少を伴う酸化ストレス応答が発生していることが示された。一方で、光学顕微鏡および電子顕微鏡観察による組織学的変化においては、短期間のばく露では明確な変化は認められず、より長期間のばく露・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。

#### E. 参考文献

- (1) Health Canada Test Method T-115. Determination of the tar, water, nicotine and carbon monoxide in mainstream tobacco smoke. 1999.
- (2) WHO. Standard operating procedure for intense smoking of cigarettes: WHO Tobacco Laboratory Network (TobLabNet) official method (Standard operating procedure 01). Geneva, World Health Organization, 2012.

#### F. 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.

## 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-

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.

## 3. その他

牛山明, 稲葉洋平. WHO 協力センター報告 3 Tobacco Testing and Research (国立保健医療科学院) の活動について. 目で見ると WHO2021 年秋号 No.78, 公益社団法人日本 WHO 協会

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

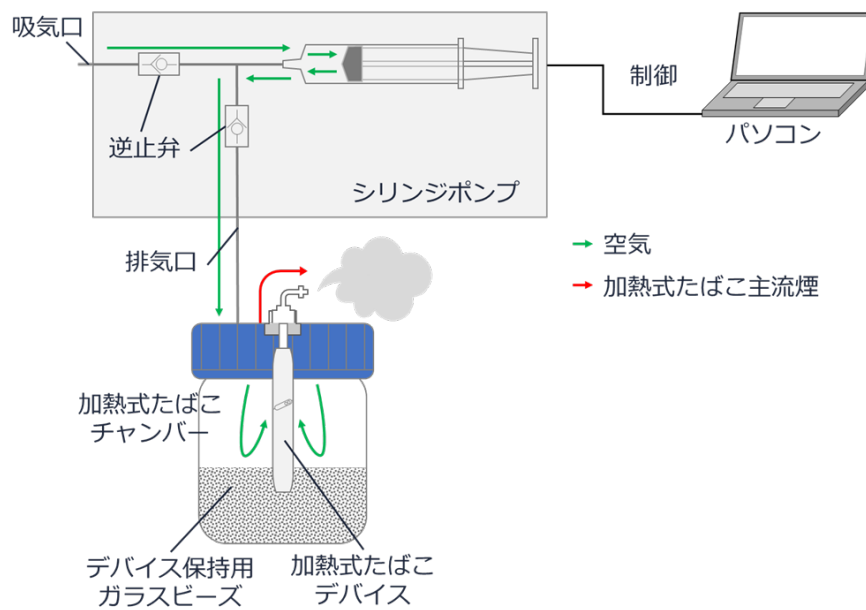


図1 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置（概念図）

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。

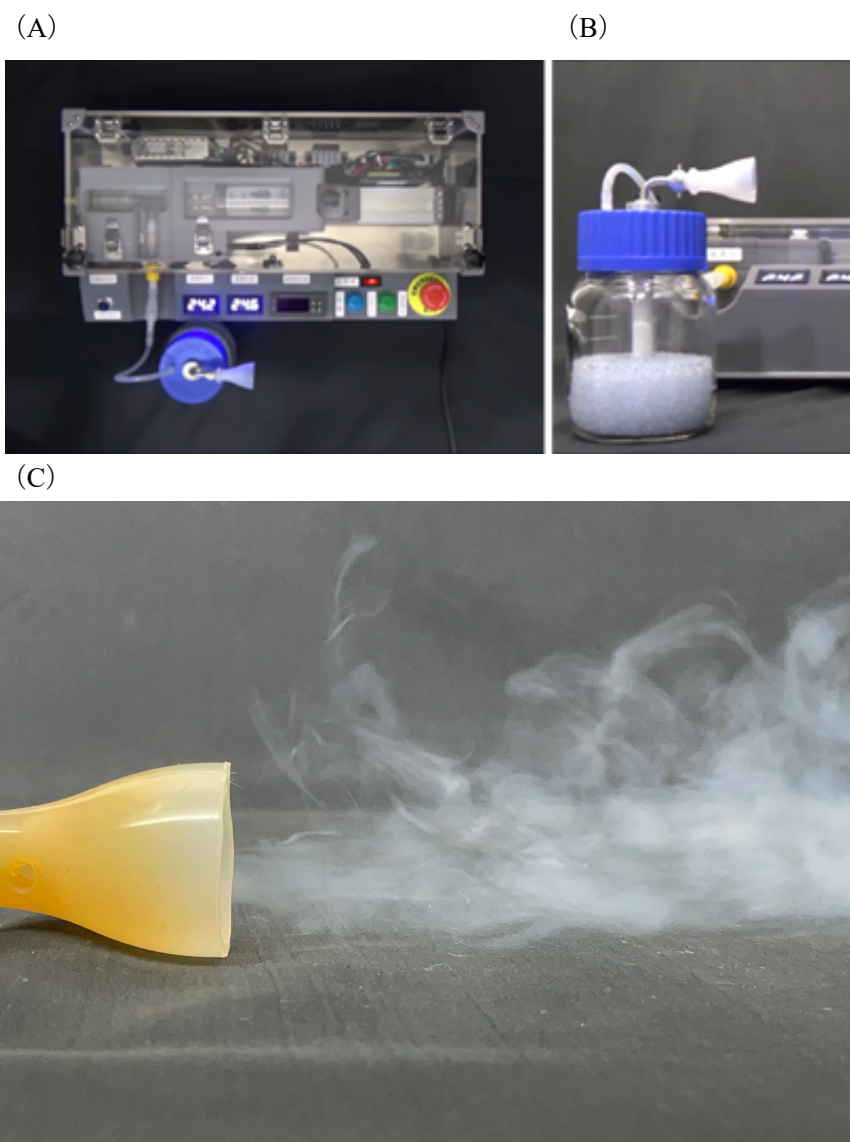


図2 加熱式たばこエアロゾルの動物用ばく露装置

(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。



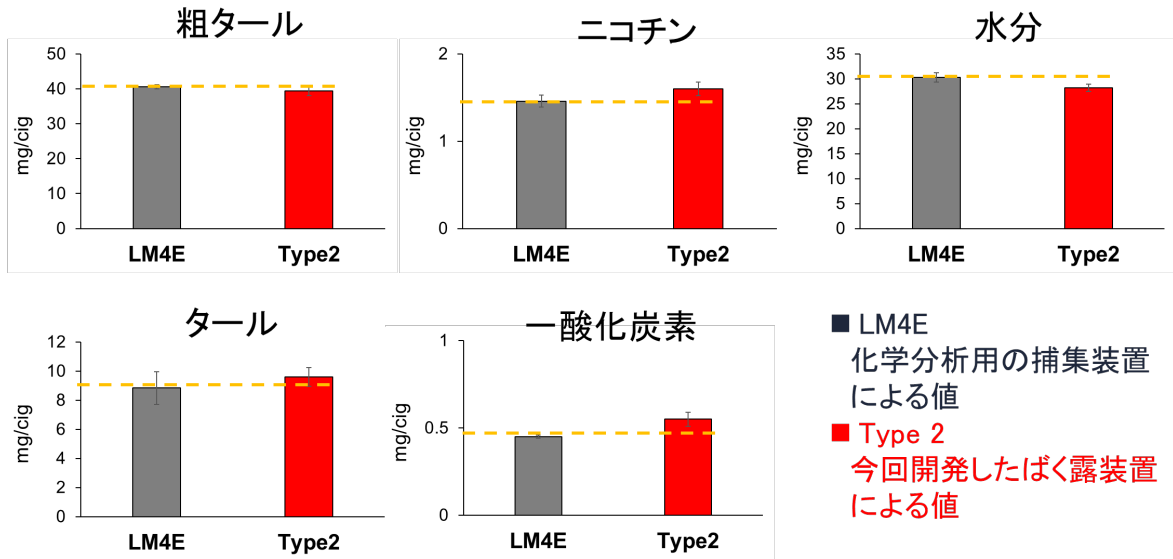


図3 各種装置を用いた IQOS エアロゾルの化学分析結果

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 ± SD (n = 5).

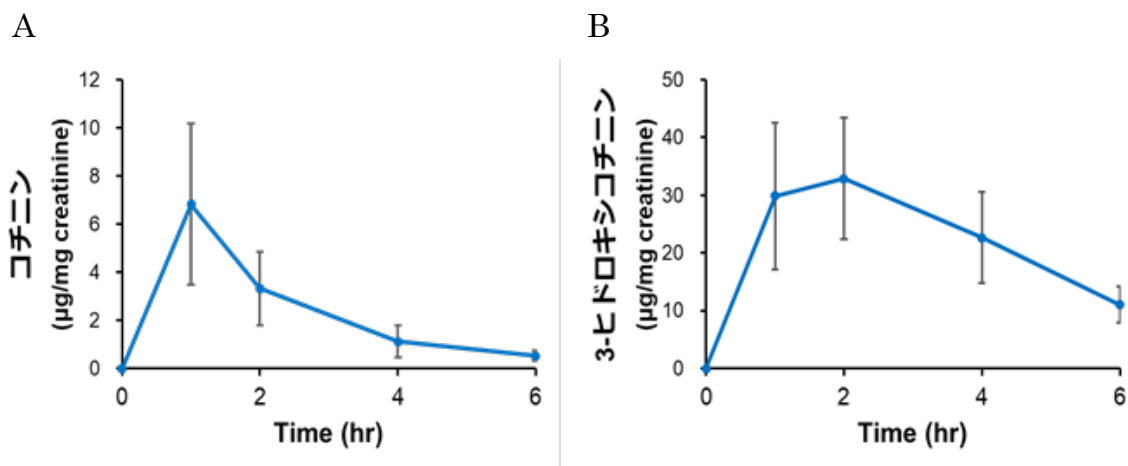


図4 IQOS エアロゾルばく露後のマウスの尿から検出されるニコチン代謝物量の変化  
 マウスに IQOS 1 本分のエアロゾルをばく露し、ばく露前、ばく露後 1、2、4、6 時間後に採尿した尿のニコチンの主要代謝物である(A)コチニンと(B)3-ヒドロキシコチニンを定量した。尿は前処理後、LC-MS/MS で定量し、別途定量した尿中のクレアチニン濃度で補正した。  
 Mean ± SD (n = 7).

表1 IQOS エアロゾルばく露直後のマウスの血漿中から検出されるニコチンおよびその代謝物

|      | Nicotine<br>ng/mL | Cotinine<br>ng/mL |
|------|-------------------|-------------------|
| マウス1 | 253               | 257               |
| マウス2 | 284               | 217               |

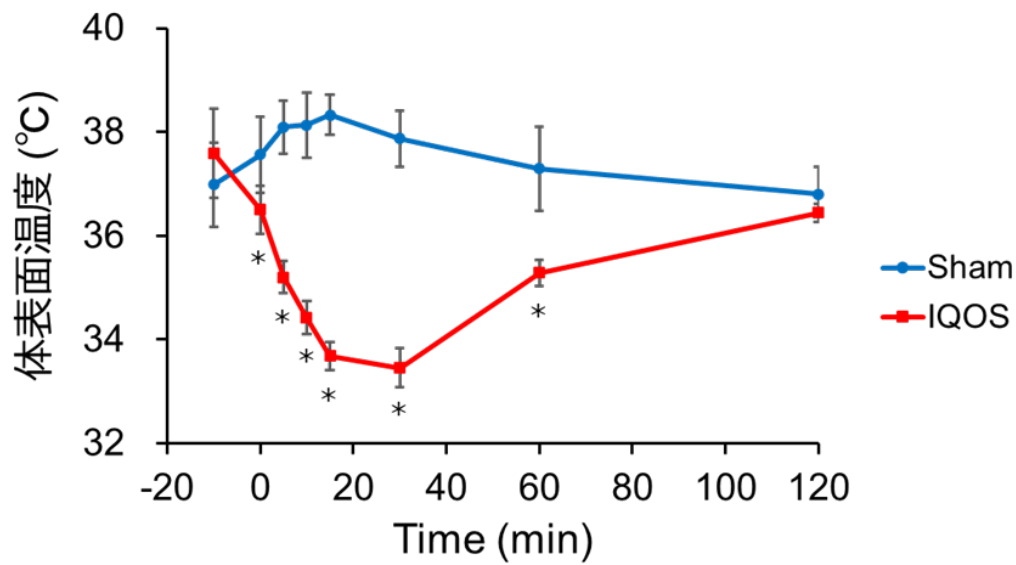


図5 IQOSエアロゾルばく露後のマウス体表面皮膚温度の経時変化

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

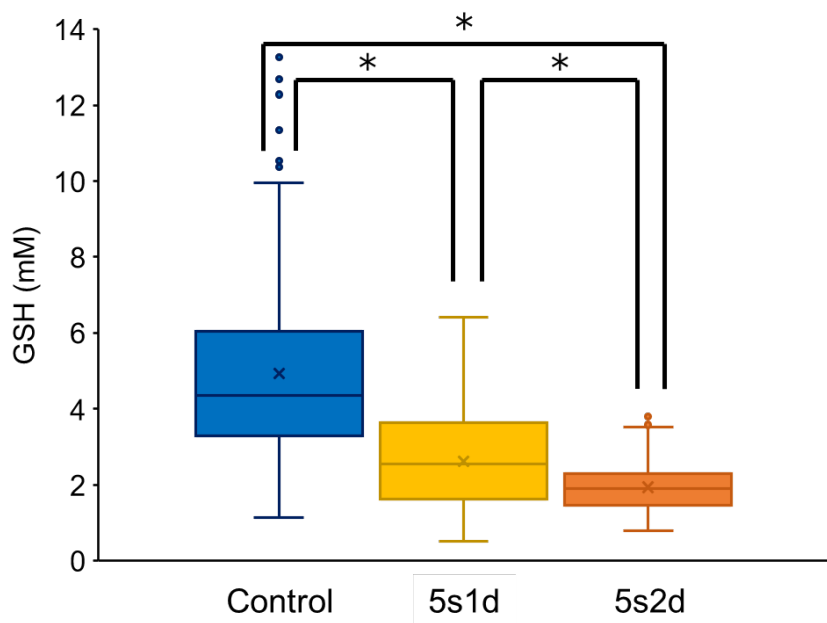


図6 IQOSエアロゾルばく露後のマウス肺胞マクロファージの細胞内還元型グルタチオン濃度

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, \* $p < 0.05$ .

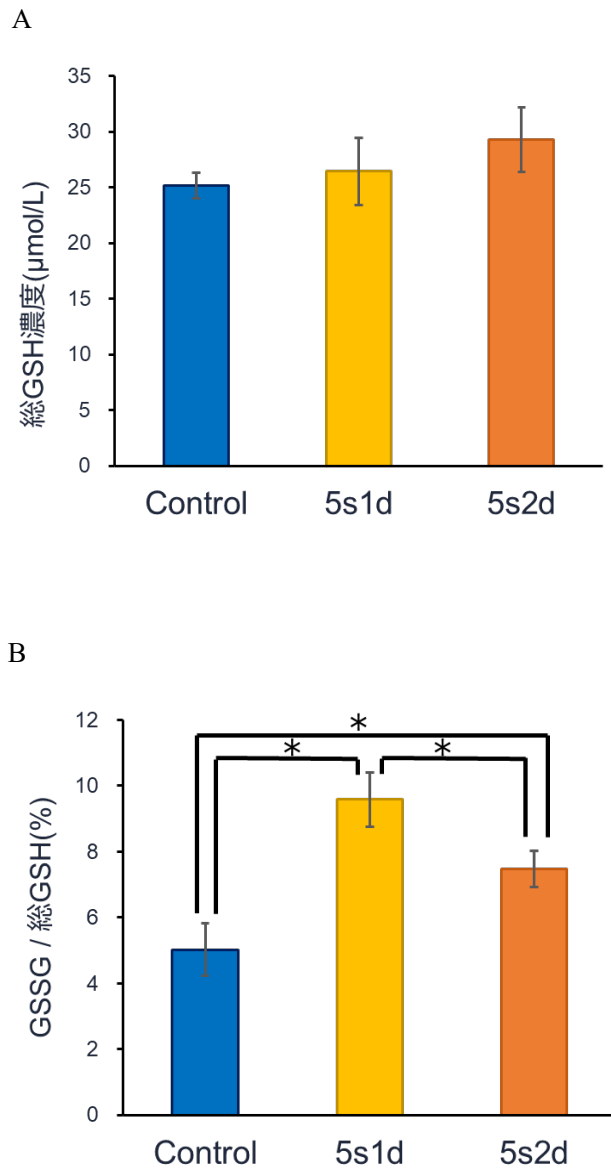


図7 IQOSエアロゾルばく露後のマウス肺組織中の(A)総グルタチオン濃度および(B)酸化型グルタチオン濃度の割合

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.

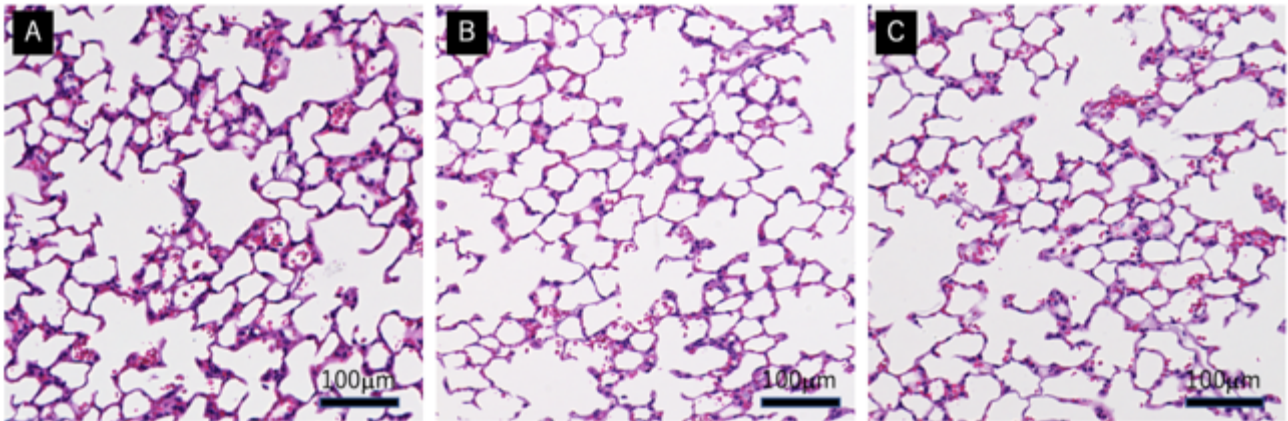


図8 光学顕微鏡による病理組織解析

コントロールマウス肺の HE 染色像 (図 8 A)、IQOS ばく露マウス (1 日 4 本 1 日間) 肺の HE 染色像 (図 8 B)、IQOS ばく露マウス (1 日 4 本 2 日間) 肺の HE 染色像 (図 8 C)。

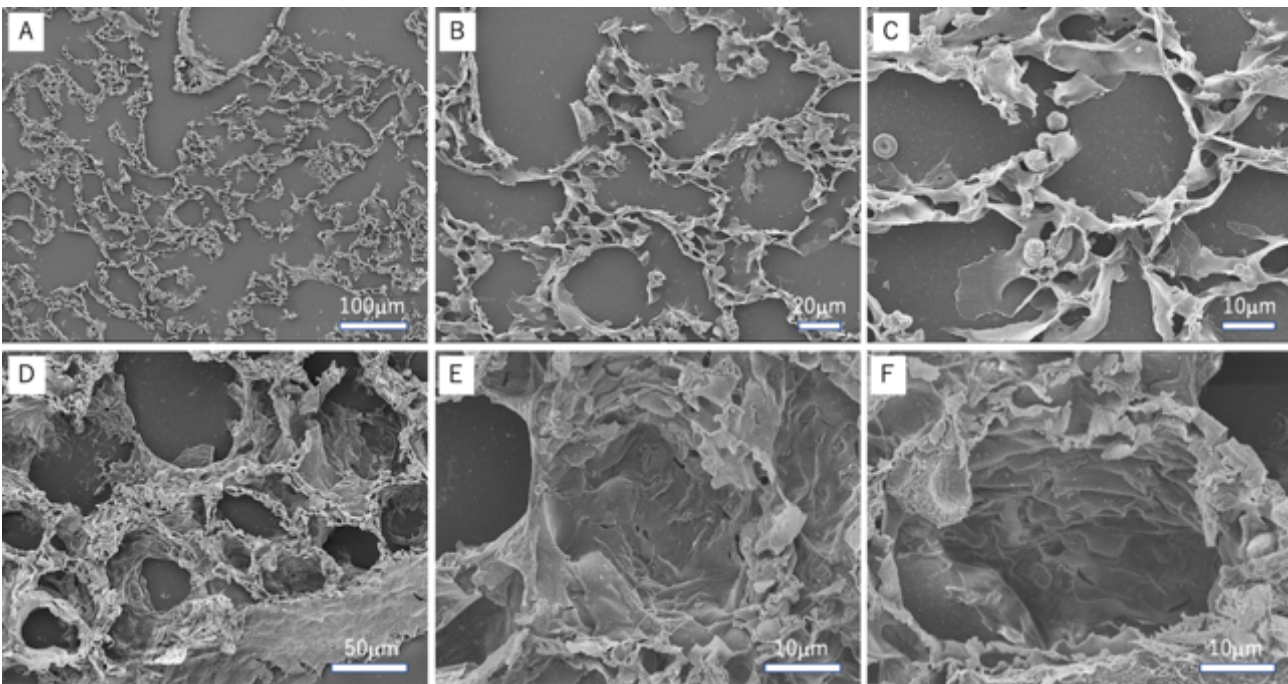


図9 操作型電子顕微鏡による病理組織解析

コントロールマウス肺の組織像。A-C は 5  $\mu\text{m}$  厚の肺組織の低倍率像から高倍率像を示している。D-F は 100  $\mu\text{m}$  厚の肺組織を示している。100  $\mu\text{m}$  厚の肺組織像では立体的な構造を捉えることが可能である。

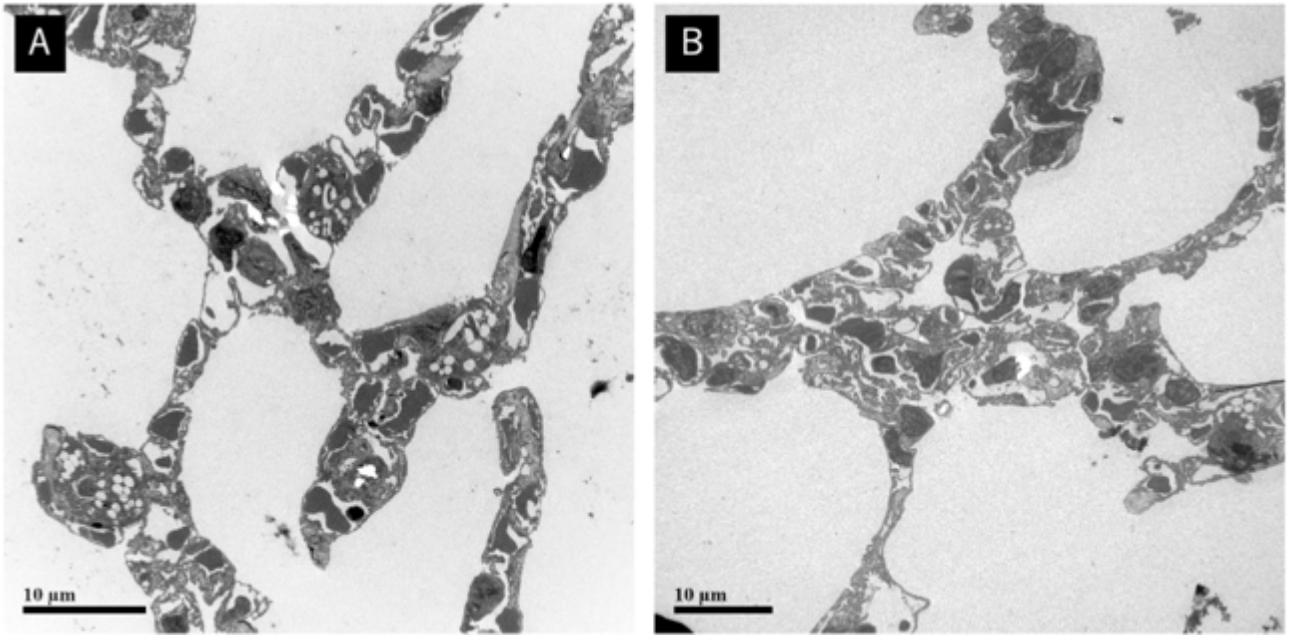


図10 透過型電子顕微鏡による病理組織解析

コントロールマウス肺の透過型電子顕微鏡像 (図10A)、IQOS ばく露マウス (1日4本1日間) 肺の透過型電子顕微鏡像 (図10B)。