

加熱式たばこ製品の特性に基づくばく露装置の新規開発と

ハザード同定を目的とする *in vivo* 研究への応用

Development of a New Exposure Apparatus Based on Characteristics
of Heated Tobacco Products and Its Application to *in vivo* Studies for
Hazard Identification

平成 30 年度入学 澤 麻理恵 (Sawa, Marie)

近年、国内においては従来の燃焼式たばこに変わり、新型たばこ製品「加熱式たばこ」の普及が著しい。加熱式たばこは専用のデバイスに入れたたばこ葉を電気で加熱し発生させた主流煙を吸引するたばこである。燃焼式たばこと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。その理由として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ことが挙げられる。したがって、加熱式たばこの特性を考慮した新たなばく露系の構築およびその妥当性の検討が必要であり、それに基づいた生体影響の評価が求められている。

本研究では、はじめに加熱式たばこ主流煙の動物ばく露装置の開発に取り組み、加熱式たばこの主要な製品である IQOS 主流煙の化学分析および主流煙をばく露したマウスの生理的な応答を評価することで装置の妥当性を検証した¹⁾。次に、開発した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。さらに肺胞を取り巻く微小血管の血流動態のリアルタイムイメージング手法による新たな評価法を工夫し、IQOS 主流煙ばく露マウスに応用した。

1. 加熱式たばこ製品の特性に基づくばく露装置の新規開発

加熱式たばこ主流煙の凝結を防ぐために、密閉型チャンバー内に位置させたたばこデバイスに空気を送り込むことで主流煙を発生させる 2 型ばく露装置を開発した (図 1)。

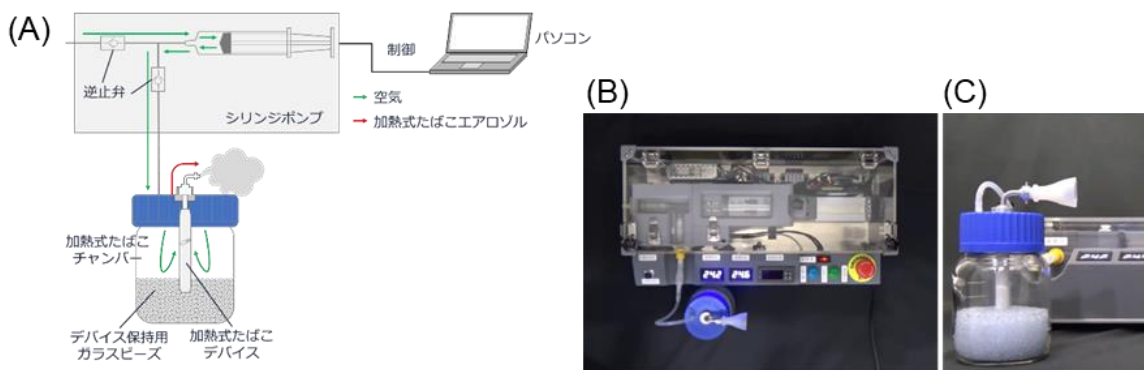


図1 加熱式たばこ主流煙をばく露する装置 (2型ばく露装置)

(A) 2型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。コンピューター制御されたシリンジポンプで、スティック1本あたり、喫煙法の国際規格にのっとり一定の空気量 (55 mL) を一定の間隔 (30秒ごと) で12回送気する。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主流煙として排出される。

(B) 2型ばく露装置の全体写真を示す。(C) IQOSデバイスおよびスティックを入れた状態の加熱式たばこチャンバーを示す。主流煙の吐出口につけたマスクにマウスの鼻部を配置しばく露を行う。

2 型ばく露装置を用いて IQOS 主流煙を捕集して分析を行ったところ、従来の化学分析用捕集装置と同等レベルの化学物質量であった。次に 2 型ばく露装置を用いて IQOS 主流煙をばく露したマウスの尿中ニコチン代謝物を定量したところ、コチニンはばく露 1 時間後、3-ヒドロキシコチニンは 2 時間後がピークであった (図 2)。

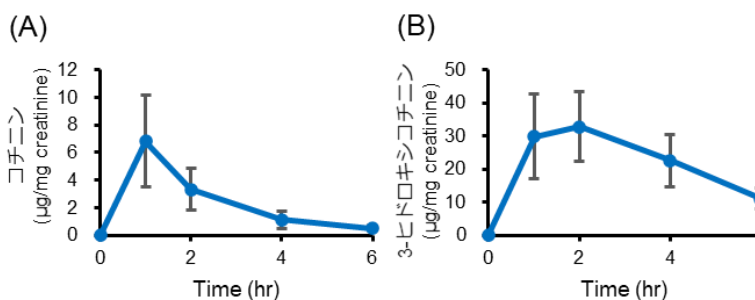


図2 IQOS主流煙ばく露後のマウスの尿から検出される (A) コチニンおよび (B) 3-ヒドロキシコチニン量の変化
マウスC57BL6/N(雄)にIQOSスティック1本分の主流煙をばく露し、ばく露前、ばく露後1,2,4,6時間後の尿を採尿しニコチンの主要代謝物のコチニンと3-ヒドロキシコチニンを定量した。尿は前処理後LC-MS/MS (Xevo TQ-S, Waters)で定量し、別途定量した尿中のクレアチニン濃度で補正した。
Mean ± SD (n=7)

また IQOS 主流煙ばく露直後の血漿中には、ニコチンおよびコチニンが検出された(表 1)。さらに IQOS 主流煙ばく露直後から、末梢血管収縮に伴うマウス体表面温度の低下も確認することができ

表1 IQOS主流煙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 ng/mL	Cotinine ng/mL
マウス1	253	257
マウス2	284	217

マウスC57BL6/N(雄)にIQOS 5本分の主流煙をばく露し、ばく露直後の血漿中のニコチンおよびその代謝物であるコチニンを定量した。血漿は前処理後、GC-MSを用いて定量した。

きた。以上より 2 型ばく露装置はマウスへの加熱式たばこ主流煙ばく露実験に適用できる十分な性能があることが明らかとなった¹⁾。

2. 加熱式たばこ主流煙をばく露した際の生体影響評価

マウスに IQOS 主流煙の経鼻的ばく露を行い、肺を中心とした生体影響に関する検討として①グルタチオン (GSH) の酸化還元状態を指標とした酸化ストレス応答、②肺胞マクロファージ (Alveolar macrophage; 以下 AM) の形態変化、③血中サイトカインレベルの変動、および④肺の組織学的評価を行った。

① GSH の酸化還元状態を指標とした酸化ストレス応答

蛍光試薬 (QuicGSH3.0) を用いて AM 中の還元型 GSH 濃度を細胞単位で測定した。IQOS レギュラースティックを 5 本/日で 1 日ばく露した群 (5s1d 群)、5 本/日で連続 2 日ばく露した群 (5s2d 群) および対照群 (Control 群) で比較したところ、肺胞マクロファージ

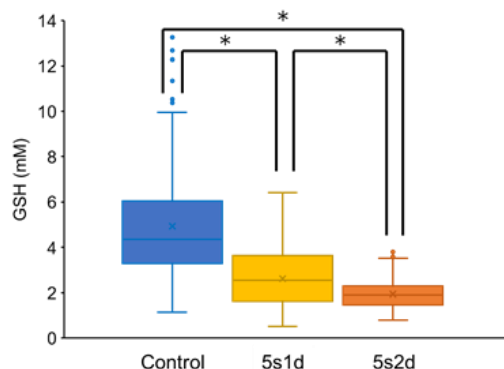
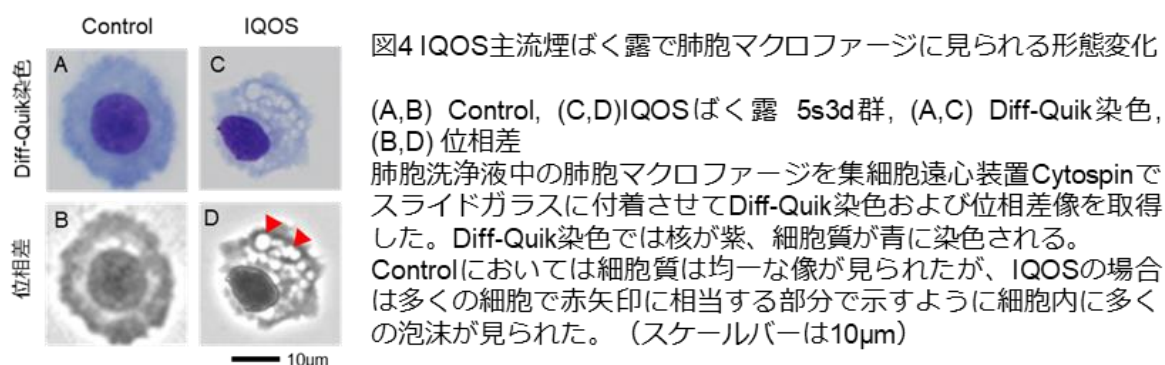


図3 IQOS主流煙ばく露したマウスの肺胞マクロファージの細胞内還元型グルタチオンの濃度
各群で最終ばく露の24時間後に肺胞洗浄液を回収し、その中に含まれる肺胞マクロファージを用いて細胞内還元型グルタチオン (GSH) 濃度の定量を行った。GSH濃度は、蛍光プローブQuicGSH3.0 (五稜化薬) で、細胞を染色し蛍光顕微鏡を用いて2波長の異なる蛍光画像を取得し、分子内FRETの原理により2波長の蛍光強度比から細胞内GSHを定量できる。各群3匹のマウスを用い各個体50cell以上を細胞毎に定量した。Welch's ANOVAで検定を行った(* $p < 0.05$)。

内の還元型 GSH 濃度が、5s1d 群および 5s2d 群は Control 群に比べて有意に低下しており、その減少は用量依存的であった（図 3）。この結果は IQOS 主流煙ばく露により AM 内で酸化ストレス応答が発生していることを示している。

② AM の形態変化

IQOS 主流煙を経鼻的にばく露を行ったのち、気管支肺胞洗浄液に含まれる AM の形態に着目して顕微鏡下で観察した。IQOS をばく露した群については、多くの AM が泡沫化する例が多く観察された（図 4）。また一部の AM では細胞表面から突起状に触手が伸展している例もあり AM が活性化されていることが推察できた。



③ 血漿中サイトカインレベルの変動

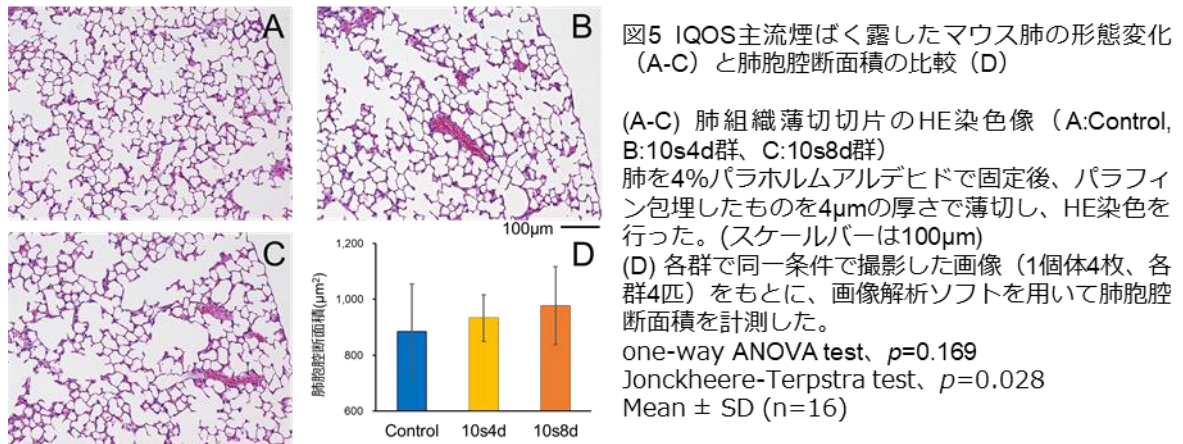
マウスの血漿を用いて、マルチプレックスアッセイ法により炎症性サイトカイン 13 項目について網羅的に解析した。その結果、Control 群と比べ IQOS 主流煙ばく露により IL-6 および GM-CSF の血漿中濃度が有意に増加した。一方で、その他のサイトカインには有意な変化はみられなかった。

④ 肺の組織学的評価

ばく露後の肺を摘出し、固定後パラフィンブロックから薄切切片を作製し、HE 染色をした検体について組織学的検討を行った。

10s4d 群（10 本/日 × 4 日）、10s8d 群（10 本/日 × 8 日）および Control

群の組織像について、画像解析ソフトを用いて肺胞腔断面積の平均値を求めたところ、IQOS 主流煙ばく露による肺胞腔断面積の有意な変化はみられなかったが、IQOS 主流煙ばく露量の増加と肺胞腔断面積の増加に統計的に有意な傾向性が認められた（図 5）。



3. IQOS 主流煙をばく露した際の肺微小循環系のリアルタイムイメージングと評価

IQOS 主流煙に含まれる化学物質が肺胞を介して血流に移行することが想定されるため、肺胞を取り巻く微小血管の血流動態をリアルタイムイメージング手法により調べた。本研究では、外的な要因を可能な限り排除し血流動態を記録できる Closed lung window の作製（図 6）とその観察系を構築した。

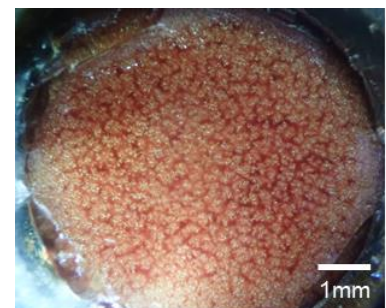


図6 本研究で作成したClosed lung window (低倍率撮影) 肺の表面近層にある肺胞及びそれを取り巻くように存在する血管網が確認できる。スケールバーは1mmを示す。

この window を装着したマウスに IQOS 主流煙 1 本分をばく露すると同時に肺微小循環の血管造影像を取得したところ、IQOS ばく露後は、ばく露前に比べて血管径の拡張がみられた（図 7）。このことから IQOS 主流煙の成分が血流動態の制御に関与している可能性が示唆された。

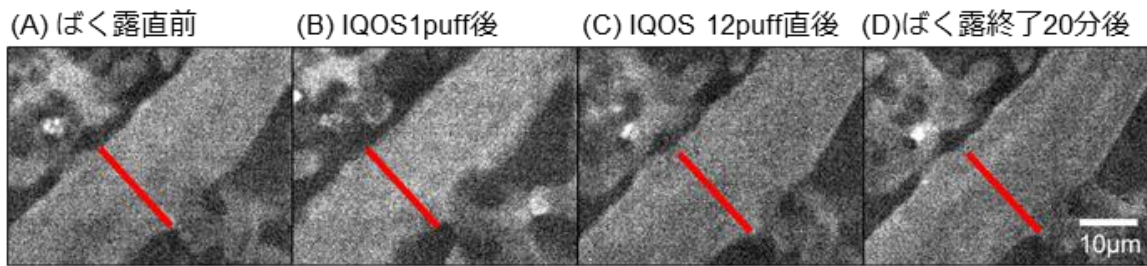


図7 IQOS主流煙ばく露した際の肺胞血管のリアルタイムイメージング画像
 A:ばく露直前、B:IQOS 1puff直後、C:IQOS 1本分(12puff)終了直後、D:ばく露終了20分後で同一部位を撮影した。イメージングは血管造影をするためTMR-デキストラン(500kDa)を投与し、共焦点ユニット(CSU-X1、横河電機)、CMOSカメラ(ORCA-Flash4.0 V3、浜松ホトニクス)を用いて画像を取得した。血管上の同じ部位に同じ長さのライン(赤線)を引いて比較したところ、12puff直後およびばく露終了20分後の血管拡張が観察された。

総括

本研究では、加熱式たばこの特性に基づく高精度のばく露装置を開発し、マウスにばく露した際のニコチンおよびその代謝物を測定することで、たばこ成分が適切にばく露されていることを確認し、生体影響評価に活用できることを示した。本装置を用いてマウスにIQOS 主流煙をばく露したところ、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。また短期的なばく露であってもサイトカインレベルや肺胞の形態学的な変化についても起こりうる影響であることを示した。主流煙のばく露時に、肺微小血管の血流動態をリアルタイムイメージングする技術を通じて、喫煙時の即時的影響の評価することができる新たな手法の有用性を提示した。

本研究で行った一連の実験により、加熱式たばこの健康ハザードの同定と、リスク評価に繋がるエビデンスを集積するための実験、評価系が確立され、その利用により更なる研究の発展が期待される。

【参考文献】

- 1) Sawa M., Ushiyama A., Inaba Y., Uchiyama S., Hattori K., Ogasawara Y., Ishii K., *Nicotine Tob Res*, 23, 2145-2152 (2021).