

# 博士論文

タバコ煙由来有害化学物質の高感度分析法の  
開発と生体曝露評価に関する研究  
ーインチューブ固相マイクロ抽出法を用いる  
オンライン自動分析システムの構築ー

Study on development of high-sensitivity analysis method for harmful  
chemical substances derived from tobacco smoke and evaluation of  
biological exposure  
-Construction of on-line automatic analytical system  
using in-tube solid-phase microextraction-

令和2年3月  
就実大学大学院 医療薬学研究科 疾病治療薬学専攻  
病態解析診断薬学分野 疾病診断分析薬学研究室  
石崎 厚

## 目次

略語表 .....	1
緒論.....	3
I. タバコ <span>の</span> 健康影響.....	3
i) タバコ <span>の</span> 有害性評価.....	3
ii) 受動喫煙 <span>の</span> 現状と健康影響.....	4
II. タバコ煙 <span>の</span> 成分.....	6
i) タバコ煙中 <span>の</span> 有害化学物質.....	6
ii) 加熱式タバコ <span>から</span> 発生する化学物質.....	7
III. インチューブ SPME 法.....	9
IV. 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) <span>に関する</span> これまでの研究.....	12
i) PAHs <span>の</span> 生成と分布.....	12
ii) PAHs <span>の</span> 体内動態と毒性.....	13
iii) PAHs <span>の</span> 生体曝露と分析法.....	15
V. タバコ特異的ニトロソアミン類 (TSNAs) <span>に関する</span> これまでの研究.....	16
i) TSNAs <span>の</span> 生成及び体内動態.....	16
ii) TSNAs <span>の</span> 分析法.....	16
VI. 本研究 <span>の</span> 目的.....	18
本論.....	19
第 1 章 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) <span>の</span> 分析.....	19
1-1 実験方法.....	19
1-1-1 分析対象 PAHs と調製.....	19
1-1-2 装置及び分析条件.....	19
1-1-3 インチューブ SPME/蛍光検出 HPLC (HPLC-FLD) 法.....	19
1-1-4 タバコ試料 <span>の</span> 主流煙及び副流煙 <span>の</span> 捕集.....	22
1-1-5 タバコ葉及び煙試料と毛髪試料 <span>の</span> 調製.....	22
1-1-6 生活習慣 <span>に関する</span> アンケート調査.....	23
1-1-7 添加回収試験.....	24

1-2	結果及び考察.....	25
1-2-1	PAHs の励起及び蛍光スペクトル.....	25
1-2-2	インチューブ SPME 条件の最適化.....	29
1-2-3	インチューブ SPME/HPLC-FLD 法による標準クロマトグラム.....	32
1-2-4	バリデーション.....	32
1-2-5	添加回収試験.....	33
1-2-6	タバコ葉試料中の PAHs 含量測定.....	37
1-2-7	タバコ煙試料中の PAHs 含量測定.....	39
1-2-8	毛髪試料中の PAHs 含量測定と生体曝露評価.....	41
第2章	タバコ特異的ニトロソアミン類 (TSNAs) の分析.....	44
2-1	実験方法.....	44
2-1-1	分析対象 TSNAs と調製.....	44
2-1-2	装置及び分析条件.....	44
2-1-3	インチューブ SPME/LC-MS/MS 法.....	46
2-1-4	タバコ試料の主流煙及び副流煙の捕集.....	46
2-1-5	タバコ葉及び煙試料と毛髪試料の調製.....	46
2-1-6	生活習慣に関するアンケート調査.....	50
2-1-7	添加回収試験.....	50
2-2	結果及び考察.....	51
2-2-1	インチューブ SPME 条件の最適化.....	51
2-2-2	インチューブ SPME/LC-MS/MS 法による標準クロマトグラム.....	53
2-2-3	バリデーション.....	53
2-2-4	添加回収試験.....	56
2-2-5	タバコ葉試料中の TSNAs 含量測定と生体曝露評価.....	56
2-2-6	タバコ煙試料中の TSNAs 含量測定.....	58
2-2-7	毛髪試料中の TSNAs 含量測定.....	61
結論	.....	64
I.	多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の分析.....	64

Ⅱ. タバコ特異的ニトロソアミン類 (TSNAs) の分析.....	64
参考文献.....	66
発表論文.....	76
学会発表リスト.....	78
謝辞.....	81

略語表

化合物名・物質名

PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons	多環芳香族炭化水素類
Nap	Naphthalene	ナフタレン
1-MNap	1-Methylnaphthlene	1-メチルナフタレン
2-MNap	2-Methylnaphthlene	2-メチルナフタレン
Ace	Acenaphthene	アセナフテン
Flu	Fluorene	フルオレン
Phe	Phenanthrene	フェナントレン
Ant	Anthracene	アントラセン
Flt	Fluoranthene	フルオランテン
Pyr	Pyrene	ピレン
BaA	Benz[ <i>a</i> ]anthracene	ベンゾ[ <i>a</i> ]アントラセン
Chr	Chrysene	クリセン
BbF	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	ベンゾ[ <i>b</i> ]フルオランテン
BkF	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	ベンゾ[ <i>k</i> ]フルオランテン
BaP	Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	ベンゾ[ <i>a</i> ]ピレン
BghiP	Benzo[ <i>ghi</i> ]perylene	ベンゾ[ <i>ghi</i> ]ペリレン
IP	Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyrene	インデノ[1,2,3- <i>cd</i> ]ピレン
DahA	Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracene	ジベンゾ[ <i>a,h</i> ]アントラセン
PDMS	Polydimethylsiloxane	ポリジメチルシロキサン
DVB	Divinylbenzene	ジビニルベンゼン
TSNAs	Tobacco-specific nitrosamines	タバコ特異的ニトロソアミン類
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)- 1-butanone	4-(メチルニトロソアミノ)-1-(3- ピリジル) -1-ブタノン
NNN	<i>N'</i> -nitrosonornicotine	<i>N'</i> -ニトロソノルニコチン
NAT	<i>N'</i> -nitrosoanatabine	<i>N'</i> -ニトロソアナタビン
NAB	<i>N'</i> -nitrosoanabasine	<i>N'</i> -ニトロソアナバシン
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)- 1-butanol	4-(メチルニトロソアミノ)-1-(3- ピリジル) -1-ブタノール

手法・装置名

SPME	Solid-phase microextraction	固相マイクロ抽出
GC	Gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
MS	Mass spectrometry	質量分析装置
MS/MS	Tandem-mass spectrometry	タンデム質量分析装置
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
DAD	Diode array detector	ダイオードアレイ検出器
TEA	Thermal energy analyzer	熱エネルギーアナライザー
FLD	Fluorescence detector	蛍光検出器

## 緒論

### I. タバコ健康影響

#### i) タバコの有害性評価

近年の喫煙に起因する年間死亡数は、世界では能動喫煙によって約 500 万人、受動喫煙によって約 60 万人と報告されており[1-3]、日本人の年間死亡者は、能動喫煙によって約 13 万人[4-6]、受動喫煙によって約 1 万 5 千人（肺がん、虚血性心疾患、及び脳卒中による死亡）と推計されている[7]。喫煙の健康問題については、昔から国内外で常に取り上げられてきており、タバコの有害性に対する社会的関心は大きい。その影響は、2003 年に施行された健康増進法の第 25 条に受動喫煙防止措置に関する条文が記載され、2005 年に発効したタバコ規制に関する世界保健機関枠組み条約（FCTC）や 2012 年に第二期がん対策推進基本計画の策定、2013 年からは健康日本 21（第二次）が開始されたことなどをみても明らかである。

タバコの健康影響については、国の政府機関、国際機関及び研究グループなどが包括的評価を行っている。米国公衆衛生総監報告書は、コホート研究や症例対照研究などの疫学研究に生物学的機序を考慮してタバコと各疾患との因果関係の評価を 50 年以上にわたって行ってきた[8]。この報告書により、1964 年に初めて行われた喫煙と健康に関する包括的評価において、喫煙と男性の肺がん及び喉頭がんとの間に因果関係があると結論付けられた[9]。以降、50 年以上にわたり 30 以上の報告書が作成されている。2006 年に出された能動喫煙に関する報告書では、16 のがん種をはじめとして、循環器疾患、呼吸器疾患及び生殖障害など多くの疾患について因果関係があるかどうかの判定が行われた[10]。受動喫煙については、1986 年の報告書において初めて肺がんの原因であると結論付けられた[11]。その後、2004 年から喫煙の健康影響については、疾患との因果関係の判定を判定する Table 1 に示した 4 つの判定レベルを採用している[8]。また、2014 年には、最初の報告書から 50 年後の節目として、「喫煙と健康—50 年間の進歩公衆衛生総監報告書」が作成された。この報告書で、能動喫煙では 12 のがん種及び 17 の疾患、受動喫煙では肺がんを含めた 9 の疾患が『科学的証拠が喫煙との因果関係を推定するのに十分である（レベル 1）』と判定された[8]。

また、国際がん研究機関（IARC）もタバコの発がん性について評価してきた。報告内容は IARC モノグラフシリーズの中にまとめられ、発がん性の評価は疫学研究を主

Table 1 米国公衆衛生総監報告書で用いられる因果関係判定の4つのレベル

レベル	判定
レベル1	科学的証拠は、因果関係を推定するのに十分である。
レベル2	科学的証拠は、因果関係を示唆しているが十分ではない。
レベル3	科学的証拠は、因果関係の有無を推定するのに不十分である。
レベル4	科学的証拠は、因果関係がないことを示唆している。

に動物実験やメカニズム研究も含めて包括的に行われており、最終的にグループ1からグループ4の5段階に分類されている (Table 2)。タバコに関しては、IARC モノグラフシリーズの第38巻 (喫煙) [12], 第83巻 (タバコ煙と受動喫煙) [13], 第89巻 (無煙タバコとN-ニトロソアミン) [14], で報告され、第38巻において『タバコ煙がヒトに対して発がん性があるという十分な証拠がある』(現在のグループ1に相当)と結論付けられ[12], 第83巻では能動喫煙及び受動喫煙ともに『ヒトに対して発がん性がある (グループ1)』と判定された[13]。

さらに国内では、国立がん研究センターと健康研究センターが中心となり、科学的根拠に基づく日本人のがんリスクを総合的に評価する目的で、2003年の世界保健機関 (WHO) /国際連合食糧農業機関 (FAO) による報告書「食物、栄養と慢性疾患の予防」[15]における評価方法に準拠し、4段階で喫煙を含む予防危険因子とがんとの関連を包括的に評価している (Table 3) [16]。

## ii) 受動喫煙の現状と健康影響

受動喫煙は、健康増進法25条にて「室内又はこれに準ずる環境において、他人のタバコの煙を吸わされることをいう」と定義されている。日本では、昭和50年代から受動喫煙に起因する健康上の悪影響について社会的な関心が高まり、2000年に始まった健康日本21のタバコ対策の4本柱の一つとして「公共の場や職場での分煙の徹底及び効果の高い分煙についての知識の普及」という目標が立てられた[17]。また、2020年東京オリンピック・パラリンピックの開催に向けて、健康増進の観点に加えて、受動喫煙防止のための効果的な法整備が国際オリンピック委員会 (IOC) とWHOの要請のもとに進められてきた。それにより、2020年4月からは改正健康増進法により特定場所以外での喫煙が全面禁止となり、事業者は施設や従業員に対して受動喫煙対策を講じな

Table 2 国際がん研究機関（IARC）による発がん性評価の分類

分類	内容
グループ1	ヒトに対して発がん性がある。 ヒトにおいて「発がん性の十分な証拠」がある。
グループ2A	ヒトに対しておそらく発がん性がある（probable）。 ヒトにおいて「発がん性の限定的な証拠」があり，実験動物において「発がん性の十分な証拠」がある。
グループ2B	ヒトに対する発がん性が疑われる（possible）。 ヒトにおいて「発がん性の限定的な証拠」があり，実験動物では「発がん性の十分な証拠」があるとはいえない。
グループ3	ヒトに対する発がん性について分類することができない。 ヒトにおいては「発がん性の不十分な証拠」であり，実験動物において発がん性の不十分な又は限定的な証拠の場合。
グループ4	ヒトに対しておそらく発がん性がない。 ヒト及び実験動物において「発がん性がないことを示唆する証拠」がある。

5

Table 3 「科学的根拠に基づく発がん性・がん予防効果の評価とがん予防ガイドライン提言に関する研究」班による科学的根拠としての信頼性の強さ

判定	内容
確実	疫学研究の結果が一致していて，逆の結果はほとんどない。相当数の研究がある。 なぜそうなるのか生物学的な説明が可能である。
ほぼ確実	疫学研究の結果がかなり一致してはいるが，その方法に欠点（研究期間が短い，研究数が少ない，対象者数が少ない，追跡が不完全など）があったり，逆の結果も複数あったりするために決定的ではない。
可能性あり	研究は症例対照または横断研究に限られる。観察型の研究の数が十分でない。疫学研究以外の，臨床研究や実験結果などからは支持される。確認のために，もっと多くの疫学研究が実施され，その理由が生物学的に説明される必要がある。
データ不十分	2, 3 の不確実な研究があるにとどまる。確認のために，もっと信頼性の高い方法で研究が実施される必要がある。

ければならなくなり、違反すると罰則が課せられる[18]。

受動喫煙の要因であるタバコの副流煙と主流煙に含まれる成分はほぼ同じであるが有害化学物質の量は、副流煙の方が主流煙よりも多いことが知られている[19]。喫煙により副流煙に含まれる有害化学物質が一気に拡散することで喫煙者の周囲にいる非喫煙者に多大な影響を与えることになり、様々な健康影響が報告されている[10-22]。一般的に副流煙は高濃度に有害化学物質を含むものの、発生直後から飛散して環境中の空気で希釈されることから非喫煙者は主流煙を全て吸い込む喫煙者に比べ有害性が低くなると考えられる。しかし、それは喫煙者と比較したときの条件であって受動喫煙の健康影響は、環境によって大きく変化する。例えば、狭い室内や換気設備が十分ではない場所などではタバコの副流煙の曝露量は多くなることが予測され、非喫煙者の健康被害につながると考えられる。また、前述したように、2014年に作成された米国公衆衛生総監報告書にて、受動喫煙で肺がんを含めた9の疾患が『科学的証拠が喫煙との因果関係を推定するのに十分である（レベル1）』と判定され[8]、IARCのモノグラフシリーズの第83巻では受動喫煙は『ヒトに対して発がん性がある（グループ1）』と判定された[13]。このように国際的にも受動喫煙による健康影響は深刻な問題となっている。

## II. タバコ煙の成分

### i) タバコ煙中の有害化学物質

タバコの喫煙と様々ながん種との因果関係は、タバコの煙に含まれている発がん性物質に起因している。タバコの主流煙に含まれる成分量の 95.5%がガス成分、3.52%が粒子成分（タール）であり、0.28%がニコチンとされている [23]。その主流煙に含まれる化学物質は粒子成分が約 4300 種類、ガス成分が約 1000 種類で、合計約 5300 種類も存在している[23-26]。これらの化学物質の中には、500 種類を超える変異原性及び発がんに関連する物質も存在している[24,25]。

タバコ煙中の粒子成分には、IARCグループ1の化学物質として、大気汚染物質でもある多環芳香族炭化水素類（PAHs）のベンゾ[a]ピレン、タバコ特異的ニトロソアミン類（TSNAs）である4-(メチルニトロソアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン（NNK）と N'-ニトロソノルニコチン（NNN）、重金属類のニッケル化合物、カドミウム及びカドミウム化合物、ヒ素及び無機ヒ素化合物、ベリリウム及びベリリウム化合物、6価クロ

ムと自然放射性核種のポロニウム-210, 4-アミノビフェニル, 2-ナフチルアミンの芳香族アミン類などがあり, ジベンゾ[a,h]アントラセン, ベンゾ[a]アントラセンなどのPAHsは, 発がん性に関する成分である。

一方, ガス成分には, IARCグループ1に分類されているベンゼン, 1,3-ブタジエン及びホルムアルデヒド, その他にアセトアルデヒド, アクロレインをはじめとするカルボニル類やスチレン, トルエンを含む揮発性有機化合物, さらにジメチルニトロソアミンをはじめとする揮発性ニトロソアミン類などが含有されている。

2012年にアメリカ食品医薬品局 (FDA) は, これらのタバコ煙に含有される化学物質の中で, 喫煙者及び非喫煙者に有害または潜在的に有害な成分93物質のリストを発表した[27]。また, WHOタバコ製品規制のための技術部会は2013年12月に紙巻きタバコの煙に含まれる7,000種以上の化学物質の中から, IARCグループ1に指定された成分を中心した38種類の有害化学物質リストを作成した[28]。この2つのリストの中に共通してPAHsのベンゾ[a]ピレン, TSNAsであるNNK及びNNNが含まれている。Table 4にWHOとFDAで共通してリストアップされた有害化学物質とその物質のIARCグループ及び発がん性の有無についても併せて示す。

## ii) 加熱式タバコから発生する有害物質

前述したように, タバコ煙の有害性が社会問題となっていることを受けて各国で無煙タバコ (嗅ぎタバコ) や電子タバコが販売された。しかし, これらも紙巻きタバコ同様に使用者への健康影響が指摘されている。IARCは, 無煙タバコが口腔がん, 膀胱がんや食道がんの原因になることが示されており, グループ1に分類されている[14,29]。嗅ぎタバコについては, 動物実験でも発がん性を示す十分な科学的根拠もあると判断していると結論づけられている[14]。無煙タバコに含まれている主な発がん物質は, ベンゾ[a]ピレンをはじめとするPAHs, TSNAs, ホルムアルデヒドなど30種類ほどであり, がん以外にも循環器疾患, 糖尿病, 歯周病などのリスクが高まることが報告されている[29,30]。

また, 電子タバコに含まれるグリコール類からは, 熱分解によりIARCでグループ1に分類されているホルムアルデヒドが生成される。電子タバコから発生するホルムアルデヒドの量は, 紙巻きタバコよりも多いという報告もある[31-33]。

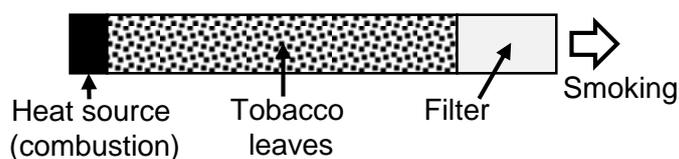
さらに近年, 有害物質の発生が少ないとされる加熱式タバコが急速に普及し始めて

Table 4 WHOとFDAで共通してピックアップされた有害化学物質リスト

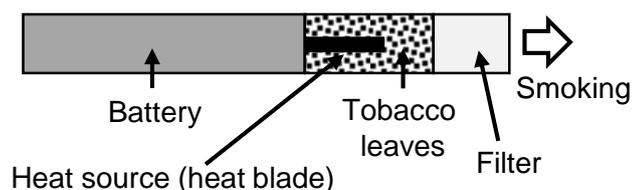
成分	IARCグループ[28]	発がん性
アセトアルデヒド	2B	○
アセトン		
アクロレイン	3	
アクリロニトリル	2B	
4-アミノビフェニル	1	○
1-アミノナフタレン	3	○
2-アミノナフタレン	1	○
アンモニア		
ベンゼン	1	○
ベンゾ[a]ピレン	1	○
1,3-ブタジエン	1	○
カドミウム	1	○
一酸化炭素		
カテコール	2B	○
クレゾール ( <i>o</i> -, <i>m</i> -及び <i>p</i> -クレゾール)		○
クロトンアルデヒド	3	○
ホルムアルデヒド	1	○
シアン化水素		
イソプレン	2B	○
鉛	3	○
水銀	3	○
NNK	1	○
ニコチン		
NNN	1	○
フェノール	3	
プロピオンアルデヒド		
キノリン		○
トルエン	3	

いる。背景には販売メーカー側から紙巻きタバコよりも有害物質の量が少なく、副流煙も発生しないとされていることである。Fig. 1 に紙巻きタバコと加熱式タバコの構造を示す。紙巻きタバコとは異なり、タバコ葉を直接燃焼させるのではなく、加熱用ブレードによりタバコ葉を加熱したり (IQOS, glo)、ニクロム線によりリキッドを加熱して

(1) Conventional combustion cigarette



(2) Heated tobacco product (IQOS, glo)



(3) Heated tobacco product (Ploom TECH)

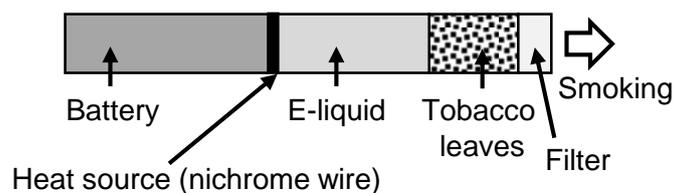


Fig. 1 紙巻きタバコと加熱式タバコの構造

発生したミストをタバコ葉に通じる (Ploom TECH) といったものである。しかし、これらの安全性に関しては少しずつ報告されてきているが[34-36], 検討は十分と言えない。

### III. インチューブ SPME 法

これまでの前処理法は、操作が複雑で所要時間も長く、分析者のテクニックによって左右されるために、人為的誤差や分析精度の低下の原因となっていた。さらに、多量の試料や有機溶媒を必要とするため、分析者の健康障害や環境汚染の原因となるなど様々な問題点が指摘されている。1990年 Pawliszyn らによって、サンプリングから試料中の目的成分の抽出、濃縮、クロマトグラフィーへの導入が簡便に行える固相マイクロ抽出 (SPME) 法[37]が開発された。その後、GC用キャピラリーカラムが SPME ファイバーを裏返した構造を有していることに着目し、これを抽出媒体に応用したインチューブ SPME 法[38,39]が開発され、HPLC や LC-MS 及び LC-MS/MS と連結したオンライン自動分析システムにより様々な分野での応用が報告されている[40-47]。インチューブ

SPME 法の分析への応用例は、食品[48-52]、環境[53-57]または生体試料[58-71]などの多岐にわたる。インチューブ SPME 法の原理は、試料溶液相と SPME 固定相との分配係数に則して、試料中の化合物全量を抽出分析するのではなく、分配平衡に達した固定相中の化合物を抽出する。従って、二相間で化合物が分配平衡に到達する時間が抽出時間となり、化合物量（抽出量）は、化合物の分配係数に応じて試料中の化合物濃度に比例するため、定量分析が可能となる。インチューブ SPME 法では試料溶液の流れの中で抽出が行われ、きわめて細いキャピラリーカラム内で試料中の目的化合物を内壁の固定相に吸着・濃縮させることができ、分析装置との接続によりオンラインで前処理と分析が連続して行える。

Fig. 2 にインチューブ SPME 法の概要を示す。インチューブ SPME 法は、まず、一定量の試料をオートサンプラー用バイアル瓶に量り取り、計量ポンプによって吸引と吐出を繰り返すことにより、カラムコネクターの間に取り付けた GC 用キャピラリーカラム内に試料中の目的化合物を吸着、濃縮させる。次に六方バルブを切り替えて、脱離溶媒または移動相をバックフラッシュで流し込むことにより、キャピラリーカラム内に濃縮した目的化合物を脱離させて HPLC カラムに移送する。その後、HPLC カラムで分離された目的化合物は検出器で検出し、ワークステーションによりデータ解析を行う。ここで、インジェクションループは、サンプルによる計量ポンプの汚染を防ぐ目的で取り付けられている。キャピラリーカラムの接続は、Fig. 3 に示すように 2.5 cm の 1/16 インチのポリエーテルエーテルケトン (PEEK) チューブにキャピラリーを通し、1/16 インチの SS ユニオン (0.25  $\mu\text{m}$  bore) とフェラルで固定している。これら試料溶液の吸入/吐出、バルブの切り替え、周辺機器のコントロール及びメソッド、データ処理はすべてワークステーションで管理されている。

インチューブ SPME 法の抽出媒体であるキャピラリーカラムには、市販の GC 用キャピラリーカラムの他、キャピラリーカラムに固定相担体を充填したもの、ファイバーを充填したもの、モノリスキャピラリーカラムなどが用いられている。ファイバー SPME と同様に、液相タイプで極性の低い PDMS や極性のある Carbowax などのコーティング剤はキャピラリーカラム内壁に化学結合され、安定した固定相であるが、膜厚が比較的小さく吸着量も限られる。一方、多孔性の PLOT タイプのコーティング剤は、キャピラリーカラム内壁に塗布されているため、剥離しやすいが、膜厚が比較的大きいため、吸着量も多くなる。また、キャピラリーカラムの膜厚とともに、内径や長さは吸着量に大

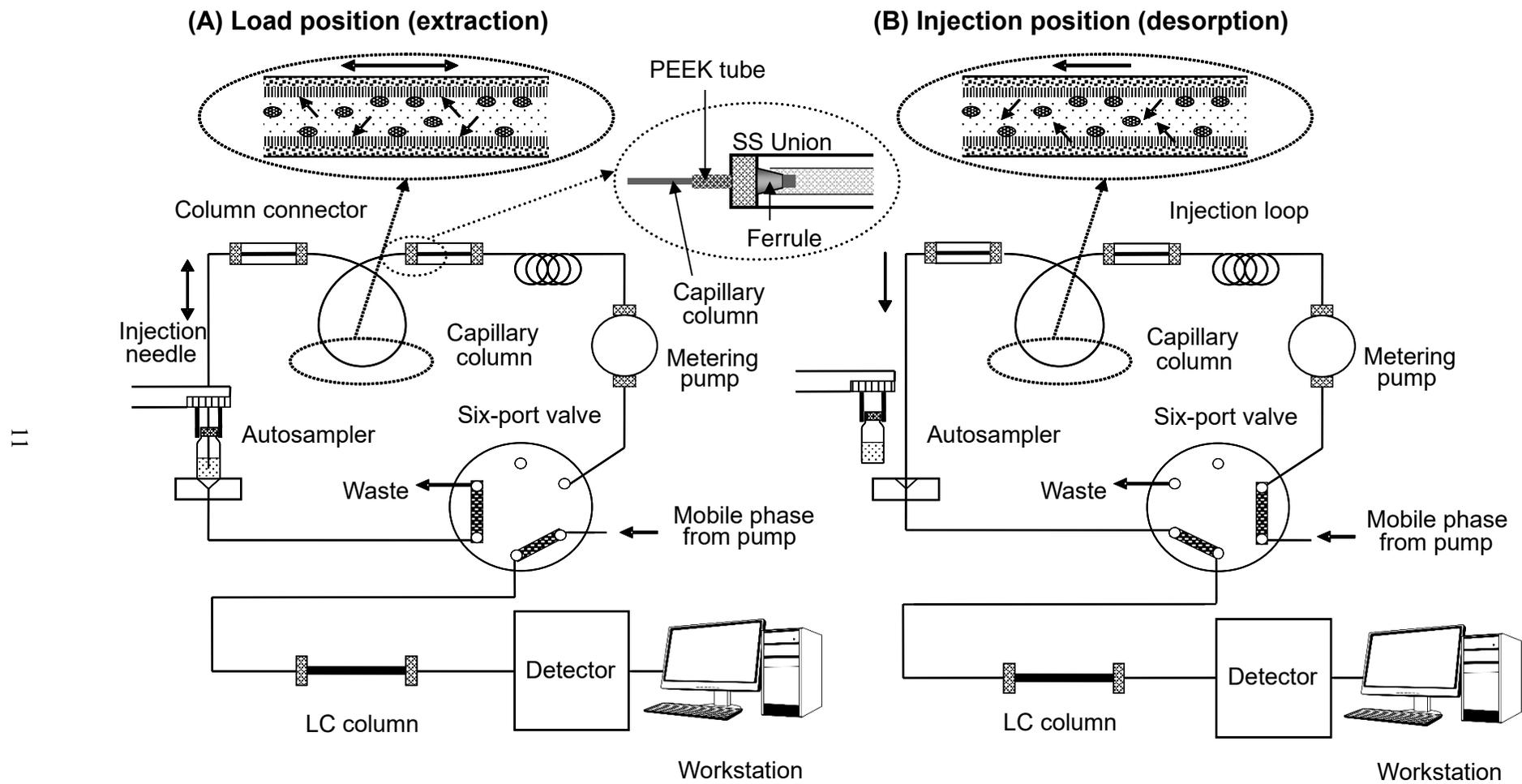


Fig. 2 オンラインインチューブ SPME 法の概要

大きく影響するが、ピークバンド幅を抑えて吸着量を多くするために、通常、内径 0.32 mm、長さ 60 cm のものが用いられている。インチューブ SPME 法は、溶液の流れの中でオンライン自動分析が可能で、ファイバー SPME 法で対応できない化合物を含め広範囲の化合物の分析に対応できる。しかし、内径の細いキャピラリーカラム内へ試料を注入するため、キャピラリーカラムを詰まらせるような粒子を十分除去しておかなくてはならない。インチューブ SPME 法の特徴を Table 5 に示す。

Table 5 インチューブ SPME 法の特徴

- 
- 1) 有機溶媒をほとんど必要としないため、分析者の健康や環境に優しく、簡便かつ迅速に水溶液から有機化合物を抽出、濃縮できる。
  - 2) 試料をオートサンプラーにセットするだけで、その後の抽出、濃縮、脱離、分離、検出、データ処理までをオンラインで自動的に行える。
  - 3) 人による手間と時間を節約できるため、省力化と高精度を実現できる。
  - 4) HPLC, LC-MS または LC-MS-MS との接続により低分子から高分子、揮発性から不揮発性化合物、熱に不安定な化合物まで広範囲の化合物に対応できる。
  - 5) SPME 用キャピラリーカラムは繰り返し使用でき、低コストである。
  - 6) 様々な固定相を持つ市販の GC 用キャピラリーカラムを利用できるので、分析対象の化合物に選択的な抽出が可能である。
  - 7) 試料を抽出する前にインジェクターニードルとキャピラリーカラムをメタノールや移動相で洗浄することにより、キャリーオーバーはほとんど認められない。
  - 8) オートサンプラーにより多数の検体を処理でき、無人での夜間運転も可能である。
- 

#### IV. 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) に関するこれまでの研究

##### i) PAHs の生成と分布

PAHs は、炭素と水素原子からなる 2 つ以上の芳香環が縮合した化合物の総称である。100 以上の化合物が存在すると言われており [72]、一般的に融点や沸点が高く、分子量の増加に伴い水への溶解性が低下するが、有機溶媒に溶けやすく高い親油性を有している。PAHs は、有機物質の不完全燃焼や熱分解の過程で発生し、脂肪族炭化水素の燃焼で生じるアセチレンやポリアセチレン化合物の環化反応や、それらの反応によって生成した低分子芳香族炭化水素が互いに反応して生成すると考えられている [73,74]。

Fig. 3 に示すように、PAHs は大気をはじめ、水質、土壌、食品など環境中のあらゆるところに存在する。特に、家庭内で発生する PAHs は、タバコの煙や食品の加工・加熱調理の過程によっても生成されることが知られている[75]。喫煙により直接主流煙を取り込んだり、受動喫煙により曝露される。また、食品を薪やバーベキューグリルなどで直接加熱したり、燻製のような燻す調理の場合、燃料の燃焼によって生じた PAHs が直接食品に接触して汚染すると考えられる。さらに、最近我々は、食品だけではなく生薬にも様々な PAHs が含まれていることを報告した[48,49]。

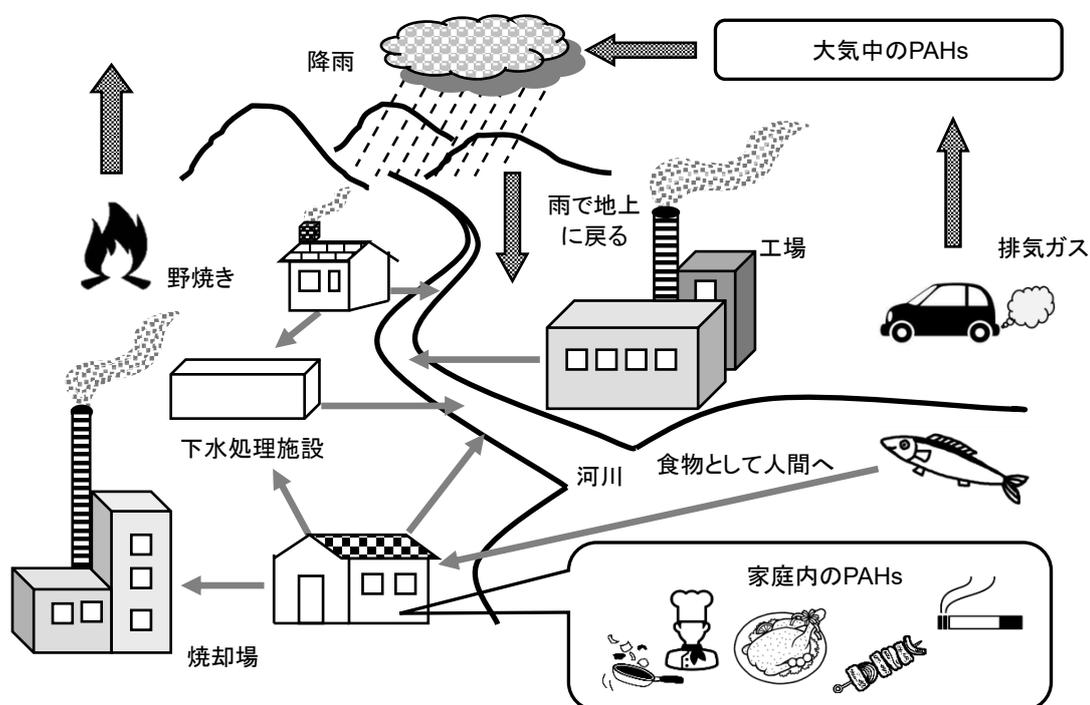


Fig. 3 生活環境中における PAHs の発生源

## ii) PAHs の体内動態と毒性

PAHs は、肺や消化管、皮膚を介して生体内に取り込まれ、すべての臓器に分布するが、特に腎臓や肝臓、脂肪組織に蓄積する。PAHs は、芳香環の水酸化、さらにはそのグルタチオン抱合体、硫酸抱合体あるいはグルクロン酸抱合体として、尿や便から解毒排泄される。しかし、一部は P450 (CYP1A1, CYP1B1 などの分子種の関与) によりエポキシ体に変換され、発がん性を発揮する。Fig. 4 にベンゾ[a]ピレンの代謝活性経路を示す。P450 により酸化を受けたベンゾ[a]ピレンはエポキシ体となり、その後、エポキ

シドヒドロラーゼにより加水分解を受けてジオールへと代謝される。さらに P450 による酸化反応でベンゾ[a]ピレンの代謝物の中でもっとも活性が高い 7,8-ジヒドロジオール 9,10-エポキシドが生成される。これが DNA 塩基と共有結合し、付加体を形成することにより発がんの原因となる[76, 77]。また, Table 6 に示すように, 多くの PAHs は動物実験では細胞毒性や変異原性, 発がん性が認められているものの, ヒトに対する発がん性は証明されていない[78-81]。

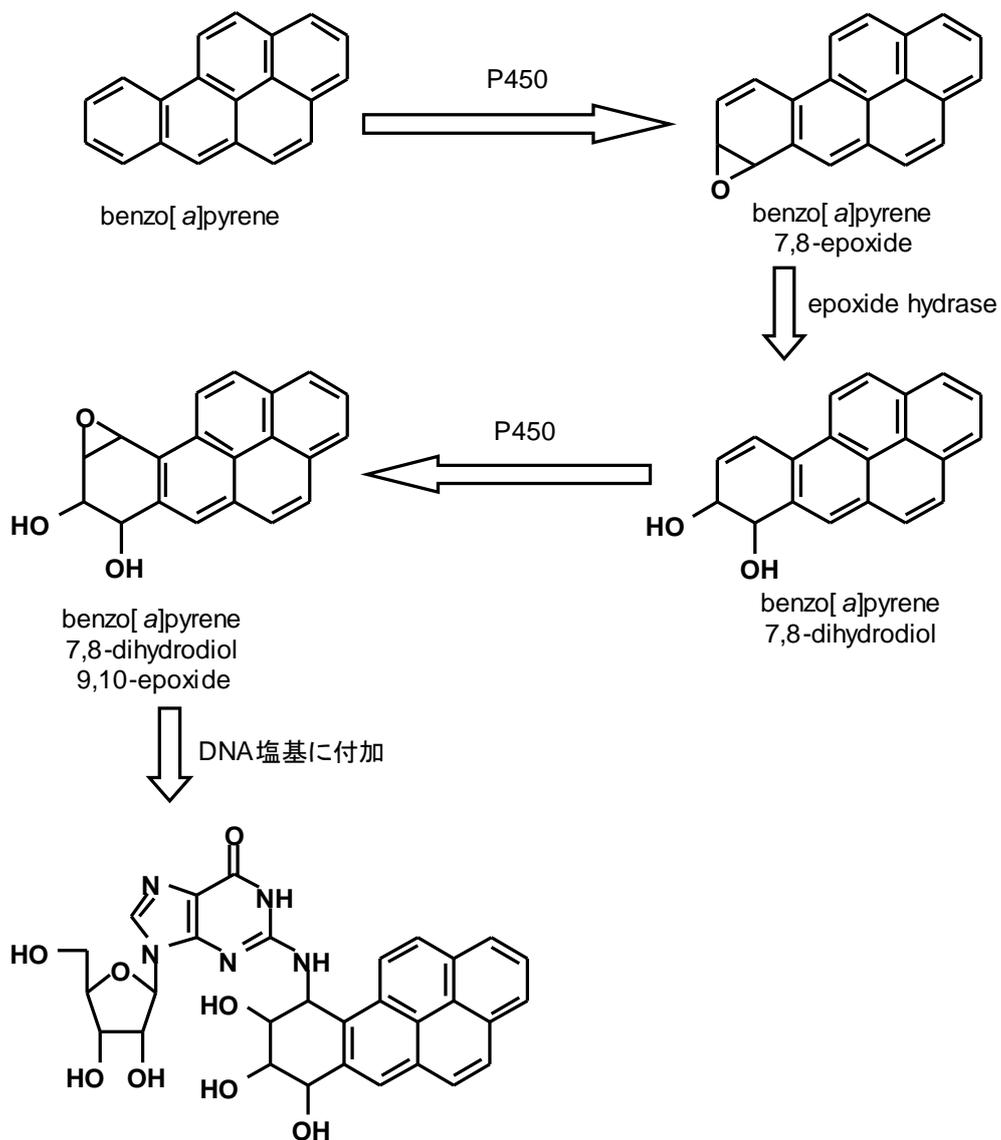


Fig. 4 ベンゾ[a]ピレンの代謝活性経路

Table 6 ヒト及び実験動物における発がん性の証明の程度と IARC モノグラフで評価された作用並びに相対効果[79]

Compound	Evidence for carcinogenicity <sup>1)</sup>		Ranking <sup>1)</sup>	Relative potency	TEF
	Human	Animal			
Naphthalene					
Acenaphthylene					
Acenaphthene					
Fluorene	ND	I	3		
Anthracene	ND	I	3		0.001
Phenanthrene	ND	I	3	0.232	0.001
Fluoranthene	ND	I	3		
Pyrene	ND	I	3		0.001
Chrysene	ND	L	2B	0.81	0.01
Benz[ <i>a</i> ]anthracene	ND	S	2B	0.0044	0.1
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	ND	S	2B	0.145	0.1
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	ND	S	2B	0.061	0.1
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	ND	S	1	1.0	1.0
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyrene	ND	S	2B	0.232	0.1
Benzo[ <i>ghi</i> ]perylene	ND	I	3	0.022	0.01
Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracene	ND	S	2A	1.11	5.0

<sup>1)</sup> Group 1, the compound is carcinogenic in human; Group 2A, the compound is probably carcinogenic in human; Group 2B, the compound is possibly carcinogenic in human; Group 3, the compound is not classifiable as to its carcinogenicity in humans.

TEF = toxicity equivalency factors; ND = no adequate data; I = inadequate evidence; L = limited evidence; S = sufficient evidence.

### iii) PAHs の生体曝露と分析法

1-4-1 で述べたように、PAHs は様々な環境中に存在しているが、ヒトへの曝露要因としては大気や水よりも食品による影響が大きいとされる。しかし、食品中の推定含有量から PAHs のヒトへの実際の曝露レベルを評価することは難しい。そのためヒトへの実際の曝露レベルを正確に評価するバイオマーカーと高感度で選択的な測定法が必要とされる。短期曝露評価には尿中 PAHs とその代謝物であるヒドロキシル PAHs が測定されている[82,83]。一方、長期曝露評価には毛髪が用いられてきた[84-86]。毛髪は従来から使用されてきた血液と比較して、侵襲性が低くサンプル採取の簡便さや通常の洗浄では毛髪から化合物を除去できない点などでメリットがある。しかし、毛髪中の PAHs

とその代謝物の濃度は 1 ng/mL 未満であることが多く、その分析にはガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS) や蛍光検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-FLD) が用いられてきた。しかし、GC-MS は高感度ではあるが、代謝物は誘導体化する必要がある。一方、HPLC-FLD は誘導体化の必要はないが、液-液抽出や固相抽出など化合物を濃縮するための多くの時間と面倒な前処理が必要である。

## V. タバコ特異的ニトロソアミン類 (TSNAs) に関するこれまでの研究

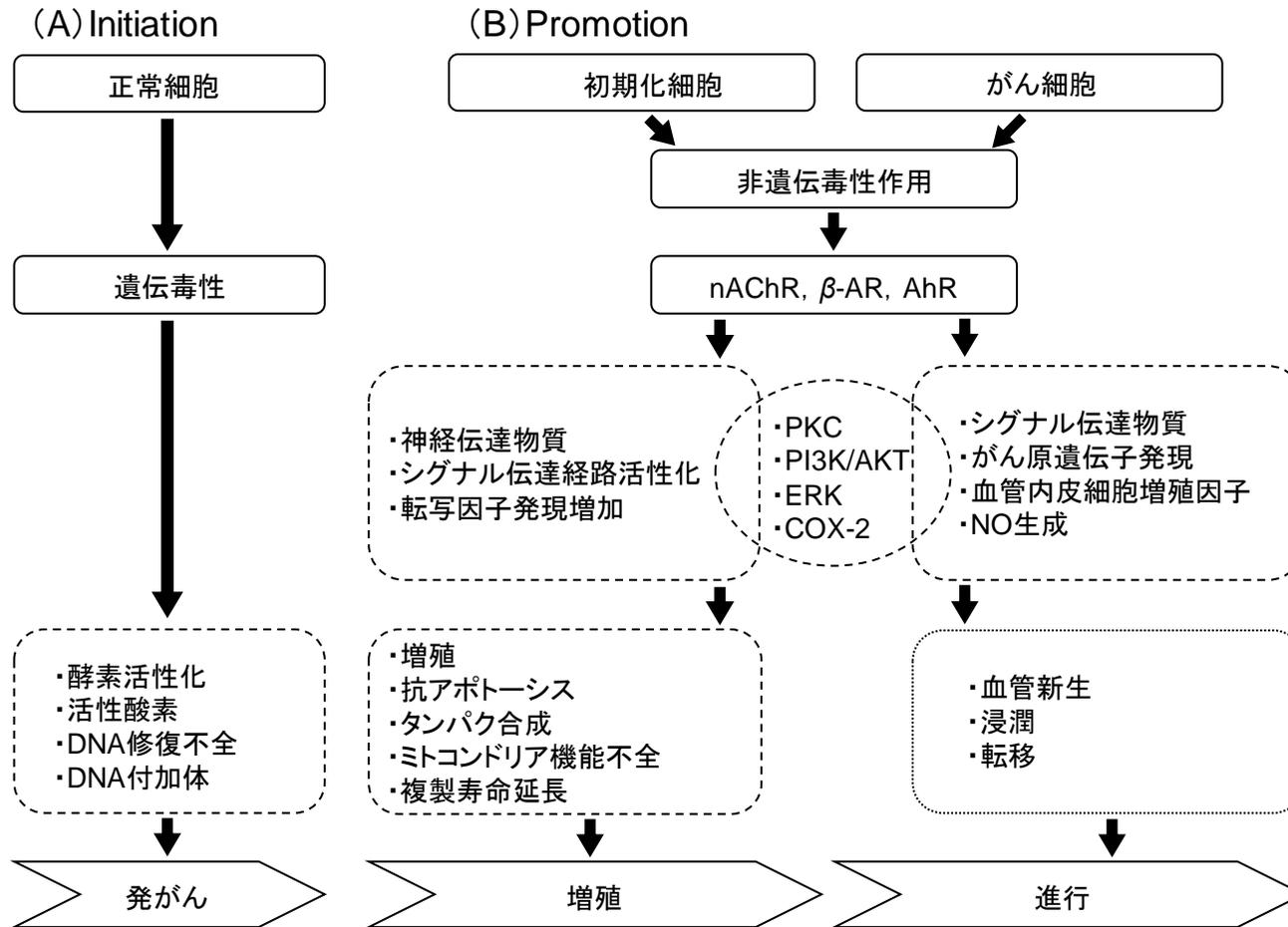
### i) TSNAs の生成及び体内動態

TSNAs は、タバコ葉中のアルカロイドであるニコチン、ノルニコチン、アナタビン及びアナバシンと亜硝酸や硝酸が反応することで NNK, NNN, *N'*-ニトロソアナタビン (NAT), *N'*-ニトロソアナバシン (NAB) が生成される[87]。このニトロソ化反応は、タバコ葉の発酵、タバコの製造や燃焼の際に熱合成により起こるとされている。この 4 種類の TSNAs のうち、NNK と NNN は IARC の分類において、『ヒトに対する発がん性が認められる』とされるグループ 1 に、NAT と NAB は『ヒトに対する発がん性が分類できない』とされるグループ 3 に分類されており[14,29]、肺、膵臓、食道、口腔の癌の誘発に関与している[26]。

Fig. 5 に示すように TSNAs の発がんメカニズムは、イニシエーションとプロモーションに分けられる。イニシエーションでは、酵素誘導、活性酸素産生、付加体形成などによる DNA の損傷を引き起こして細胞のがん化を招く。また、プロモーションでは、神経伝達物質放出により、受容体を介してしてシグナル伝達経路を活性化、転写因子の発現増加を通じて腫瘍増殖、腫瘍血管新生及び転移浸潤の促進をもたらす[88]。この発がんのメカニズムは、PAHs も同様である。

### ii) TSNAs の分析法

TSNAs は、タバコ製造工程そして喫煙時等の多くの過程で生成し、最終的に主流煙及び副流煙に含まれ、能動・受動喫煙により体内に吸収される。そのため、タバコの煙に曝露された人の TSNAs の影響を評価するには、主流煙及び副流煙中の TSNA の高感度分析法が求められる。これまでの分析にはガスクロマトグラフィー・熱エネルギーアナライザー (GC/TEA) [89,90]やガスクロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (GC-MS/MS) [91-94]、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) [36,95-



nAChR: nicotinic acetylcholine receptor,  $\beta$ -AR:  $\beta$ -adrenoceptor, AhR: aryl hydrocarbon receptor, PKC: PI3K/AKT:phosphatidylinositol 3-kinases/protein kinase B, ERK: extracellular signal-regulated kinases, COX-2: cyclooxygenase-2

Fig. 5 TSNAs 及び PAHs による発がんのメカニズム ([88]の図を改変)

98]が用いられてきた。しかし、これらの手法は、夾雑物の除去のための液-液抽出や固相抽出などの化合物を濃縮するために多くの時間と面倒な前処理が必要である。

## VI. 本研究の目的

前述のように、PAHs や TSNAs は、動物実験で発がん性や様々な毒性を有することが報告されているが、ヒトに対する毒性や健康影響については証明できる十分なデータは得られていない。PAHs は多くの種類が存在し、そのほとんどが毒性を問題視され、様々な機関で有害化学物質としてリストに挙げられている。TSNAs はタバコに特異的に含まれる化合物であるため、受動喫煙による毒性の影響が問題となっている。また、生体試料中の PAHs 及び TSNAs レベルや発生要因、生体内曝露量を明らかにすることは、ヒトに対する安全性やリスク評価を行うために必要不可欠であることから、そのための簡便・迅速かつ高感度な分析法の開発が緊急の課題となっている。しかし、従来の方法では前処理操作が複雑で所要時間も長く、分析者のテクニックによって左右されるために、人為的誤差や分析精度の低下などの問題がある。さらに、多量の試料や有機溶媒を必要とするため、分析者の健康障害や環境汚染の原因となるなど様々な問題が指摘されている。

本研究では、多くの PAHs が蛍光特性を有していることに着目し、効率的な試料前処理法として GC 用キャピラリーカラムを抽出媒体としたインチューブ SPME 法と HPLC-FLD を連結した PAHs のオンライン自動分析システムと、LC-MS/MS を連結した TSNAs のオンライン自動分析システムを構築し、簡便かつ迅速な分析法の開発を目的とした。また、開発した方法を用いて、従来の紙巻きタバコ葉及び煙と、有害物質が少ないとされ、近年市場に多く流通している加熱式タバコの葉及び煙について、PAHs 及び TSNAs の含量を測定した。さらに、毛髪試料中の PAHs 及び TSNAs 含量から長期的生体曝露レベルを測定し、生活習慣のアンケート調査から能動喫煙及び受動喫煙との関連性を解析した。

## 本論

### 第1章 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の分析[48,66]

#### 1-1 実験方法

##### 1-1-1 分析対象 PAHs と標準溶液の調製

分析対象とした PAHs は、17 種類の蛍光性 PAHs と非蛍光性の Acenaphthlene を含む Supelco 製の PAHs 18Mix を用い、内部標準物質として、重水素標識した Supelco 製の Anthracene-d<sub>10</sub> (Ant-d<sub>10</sub>) 及び Benz[a]anthracene-d<sub>12</sub> (BaA-d<sub>12</sub>) を用いた (Fig. 6)。PAHs 18Mix 及び内部標準物質はそれぞれメタノール (LC/MS 用：関東化学) に溶解し、20 µg/mL 及び 2 mg/mL 溶液として 4°C で保存し、適宜蒸留水 (LC/MS 用：関東化学) で希釈して標準溶液及び内部標準溶液とした。

##### 1-1-2 装置及び分析条件

HPLC 装置は、オンラインデガッサ、バイナリーポンプ、オンラインインジェクト方式のオートサンプラー、カラムコンパートメント、FLD 及びケミステーションから構成された Agilent 1100 シリーズ HPLC システム (Agilent Technologies 製) を用いた。分離カラムとして、ZORBAX Eclipse PAH (2.1 mm × 100 mm I.D., 3.5 µm : Agilent Technologies 製) を使用し、カラム温度は 25 °C とした。流速は 0.4 mL/min とし、分析時間は 15 分間で分析終了後に 3 分間のポストランをとった。移動相は A : 蒸留水 (LC/MS 用：関東化学)、B : アセトニトリル (LC/MS 用：関東化学) を用い、プログラムによりアセトニトリルの比率を上昇させた。また、検出器は FLD を用い、プログラムにより励起及び蛍光波長を切り換えて分析を行った。移動相及び検出器のプログラムをまとめたものを Table 7 及び Fig. 7 に示す。

##### 1-1-3 インチューブ SPME/蛍光検出 HPLC (HPLC-FLD) 法

Fig. 2 に示すように、SPME デバイスとして 60 cm の長さにカットした市販の GC 用キャピラリーカラムを 2.5 cm の 1/16 インチの PEEK チューブ (SUPELCO 製) に通し、1/16 インチの SS ユニオン (0.25 µm : SUPELCO 製) とフェラルで固定して、オートサンプラーのインジェクションループとニードルの間に取り付けた。インチューブ SPME

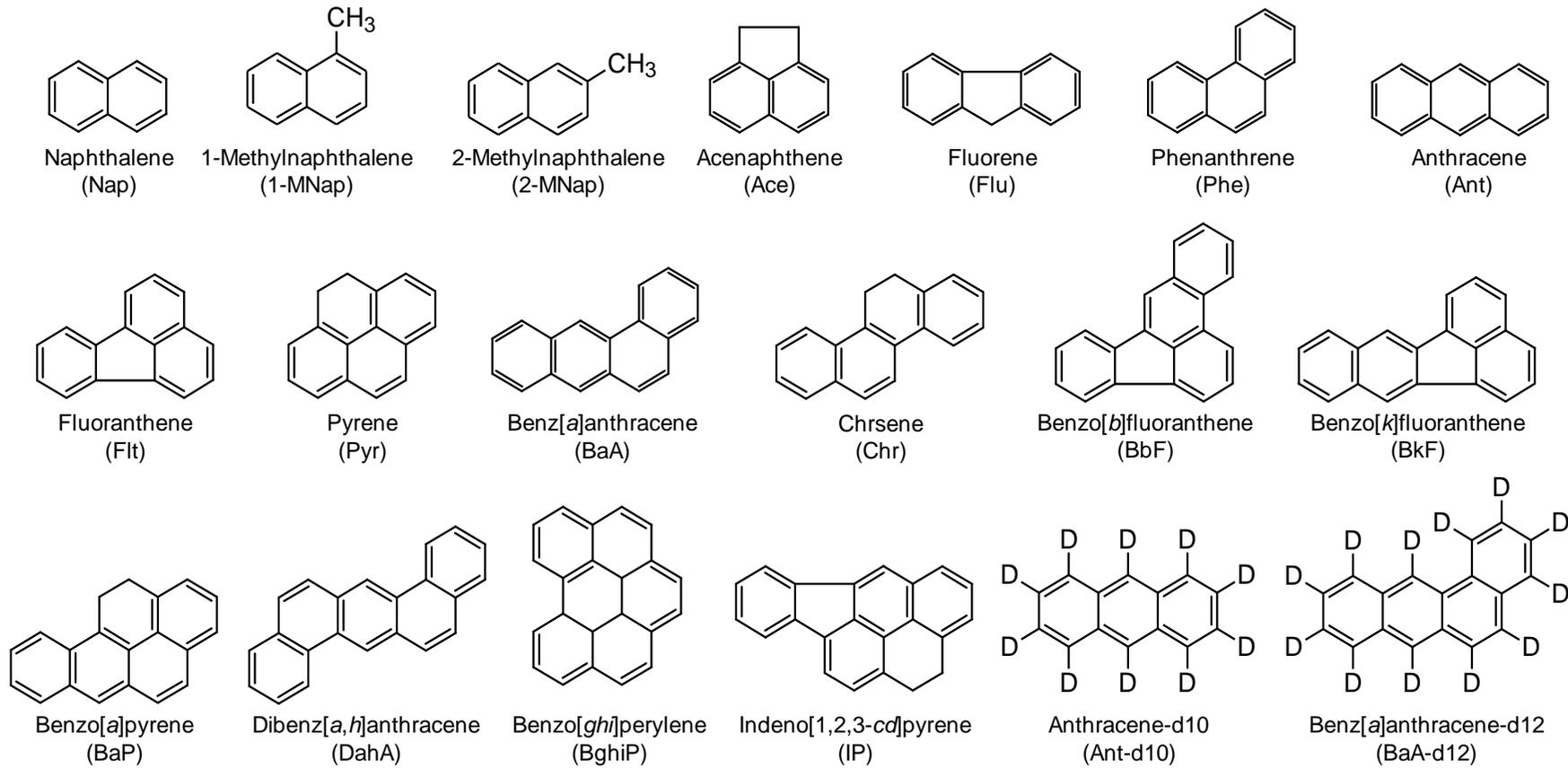


Fig. 6 分析対象の PAHs と内部標準物質の構造式

法は、ロードポジションで計量ポンプによりメタノール吸入／吐出(40  $\mu$ L, 200  $\mu$ L/min), 空気吸入 (50  $\mu$ L, 200  $\mu$ L/min), 蒸留水吸入／吐出 (40  $\mu$ L, 200  $\mu$ L/min), サンプル吸入／吐出 (40  $\mu$ L, 150  $\mu$ L/min, 20 サイクル), メタノール吸入／吐出 (2  $\mu$ L, 200  $\mu$ L/min) し、その後、六方バルブを切り替えてインジェクションポジションになるようにプログラムした。これらのインチューブ SPME 操作はすべて自動で行える。まず、試料溶液の入ったバイアルをオートサンプラーにセットし、インジェクションプログラムにより、計量ポンプでキャピラリーカラム内をメタノール及び蒸留水で洗浄コンディショニングした後、試料溶液の吸入／吐出を繰り返し、キャピラリーカラム内の固定相に化合物を吸着させた。次に、六方バルブを切り替えて移動相をキャピラリーカラム内へ流して化合物を脱離させ、移動相とともに HPLC カラムへ移送し、分離された化合物を FLD で検出、データ解析を行った。なお、抽出された化合物が吸入／吐出時に移動相により脱離されないように抽出前に空気をキャピラリーカラム内へ 50  $\mu$ L 吸入し、また、抽出終了後にインジェクションニードルに付着した試料をメタノール 2  $\mu$ L で洗浄した。なお、キャピラリーカラム内で試料の吸入／吐出を行っている際には、水／アセトニトリル (45/55, v/v) の移動相を流速 0.4 mL/min で流してラインや HPLC カラム内などのコンディショニングを行った。

Table 7 HPLC 分析における移動相及び検出器のプログラム

Mobile phase gradient conditions			FLD for PAHs analysis			
Time (min)	H <sub>2</sub> O (%)	CH <sub>3</sub> CN (%)	Time (min)	Ex. (nm)	Em. (nm)	PAHs
0	45	55	0	215	330	Nap, MNAp
1.5	45	55	3.5	220	325	Ace, Flu
7.5	0	100	5.3	250	380	Phe, Ant
10.0	0	100	7.0	280	440	Flt
12.0	45	55	7.6	270	390	Pyr, BaA, Chr
15.0	45	55	10.0	260	420	BbF, BkF
			11.7	290	415	DahA, BghiP
			12.9	250	500	IP
			15.0	215	330	

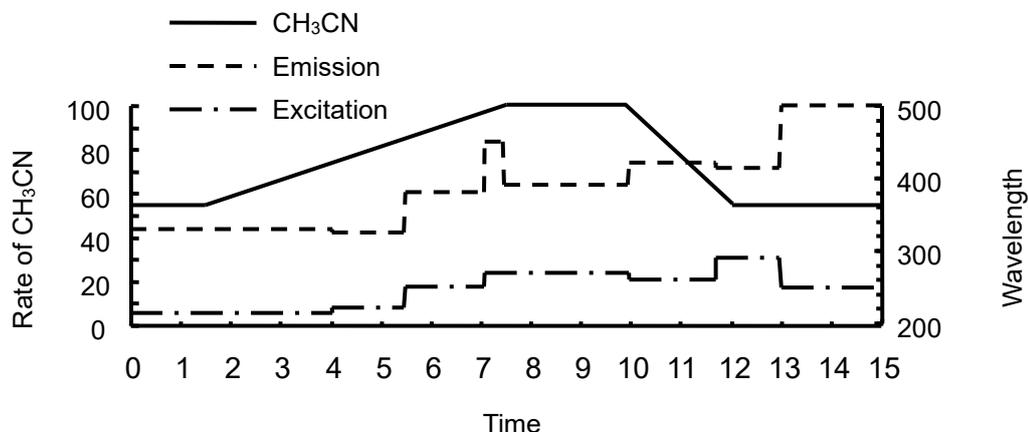


Fig. 7 HPLC 分析における移動相及び検出器のタイムプログラム

#### 1-1-4 タバコ試料の主流煙及び副流煙の捕集

本研究に使用したタバコ試料は、紙巻きタバコ (Marlboro Regular : タール 12 mg, ニコチン 1.0 mg フィリップ・モリス) と加熱式タバコの IQOS (フィリップ・モリス), glo (ブリティッシュ・アメリカン・タバコ) 及び Ploom TECH (JT) である。ただし、加熱式タバコにはタール及びニコチン量の表記はなかった。

喫煙装置 (W220×D220×H350 mm のプラスチック製の装置) を使用し、紙巻タバコについては、主流煙及び副流煙をそれぞれ 25 mL のメタノール (LC/MS 用) 中に電動ポンプによりバブリングして捕集した (Fig. 8)。加熱式タバコについては、主流煙のみを同様の操作で捕集した。ポンプの流速は 150 mL/min で紙巻きタバコの主流煙は 3 分間で 1 本をすべて吸いきるまで捕集し、副流煙は主流煙を吸引終了後 30 分間継続して捕集した。加熱式タバコは、説明書に書かれてある種類ごとの 1 回分の喫煙可能時間 (IQOS : 6 分, glo : 3.5 分, Ploom TECH : 2 分) で捕集を行った。

#### 1-1-5 タバコ葉及び煙試料と毛髪試料の調製

タバコ葉試料は、各種 1 本分のタバコ葉を共栓付き三角フラスコに入れてメタノール (LC/MS 用) 50 mL を加えて 30 分間超音波抽出を行った。その後、オートサンプラー用バイアルに抽出液 100 µL に 1 ng/mL の内部標準液を 100 µL と蒸留水を加えて全量を 1 mL とした。

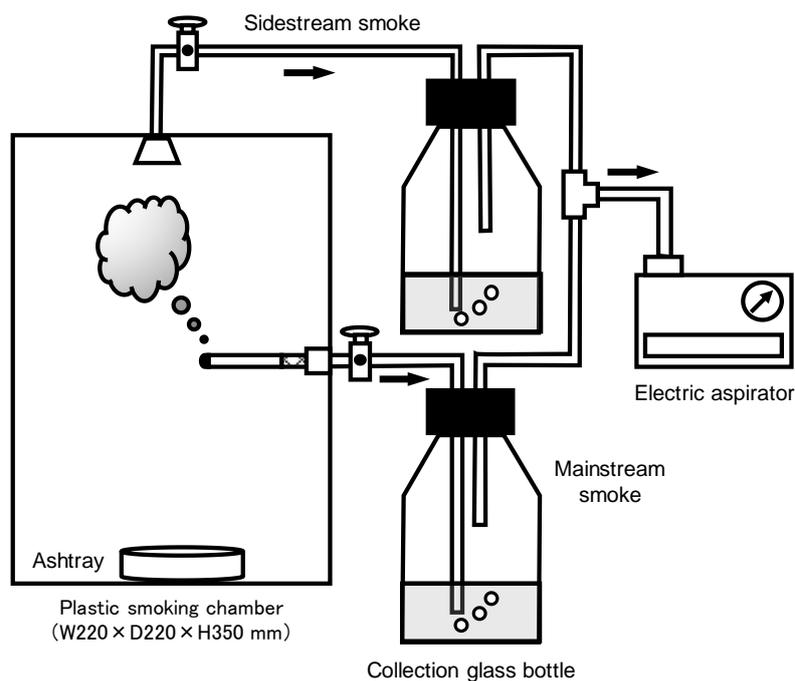


Fig. 8 喫煙装置の概要

タバコ煙試料は、オートサンプラー用バイアルに捕集した主流煙及び副流煙の溶液 500  $\mu\text{L}$  に 1 ng/mL の内部標準液を 100  $\mu\text{L}$  と蒸留水を加えて全量を 1 mL とした。

毛髪は、n-ヘキサン（特級：和光純薬）で3回洗浄し、乾燥させて5 mm 程度に切り、4 mg を 1.5 mL マイクロチューブに量り取った。そのサンプルに 50 mmol/L 水酸化ナトリウム/メタノール溶液を 400  $\mu\text{L}$  加え、60 分間超音波をかけて抽出した後、4000 $\times$ g で2分間遠心し、上清を 100  $\mu\text{L}$  ずつを3本のオートサンプラーバイアルに取り分け、それぞれに 1 ng/mL 内部標準溶液を 50  $\mu\text{L}$ 、0.2 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 5) を 100  $\mu\text{L}$ 、蒸留水を 250  $\mu\text{L}$  加え、全量を 500  $\mu\text{L}$  としてインチューブ SPME/HPLC-FLD により測定した。

#### 1-1-6 アンケート調査

毛髪サンプル提供者（40名）のうち、18~57歳の男女（喫煙者：12名、非喫煙者：12名）合計24名（男性：22名、女性：2名）については、毛髪サンプルを提供いただく際にアンケート調査を行った。アンケート内容を Table 8 に示す。（ ）内は回答項目である。

Table 8 毛髪サンプル提供時のアンケート項目

- 
- ・タバコを吸いますか？（1.吸わない 2.吸う（1日に平均 本））
  - ・現在、脱色して髪を染めていますか？（1.染めてない 2.染めている）
  - ・野菜類を摂取する頻度は？（1.少ない 2.普通 3.多い）
  - ・野菜類の調理法で最も多いのは？（1.生 2.煮る 3.揚げる 4.炒める）
  - ・肉類（牛・豚・鶏）を摂取する頻度は？（1.少ない 2.普通 3.多い）
  - ・肉類の調理法で最も多いのは？（1.生 2.煮る 3.揚げる 4.炒める 5.焼く）
  - ・肉類の焼き具合は？  
（1.焦げ目が付かない程度 2.わずかに焦げ目は付く程度 3.十分焦げ目が付く程度）
  - ・焼肉の焦げた部分を食えますか？（1.食べない 2.1/3 程度 3.2/3 程度 4.全部）
  - ・魚類を摂取する頻度は？（1.少ない 2.普通 3.多い）
  - ・魚類の調理法で最も多いのは？（1.生 2.煮る 3.揚げる 4.炒める 5.焼く）
  - ・魚類の焼き具合は？  
（1.焦げ目が付かない程度 2.わずかに焦げ目は付く程度 3.十分焦げ目が付く程度）
  - ・焼き魚の焦げた部分を食えますか？（1.食べない 2.1/3 程度 3.2/3 程度 4.全部）
- 

#### 1-1-7 添加回収試験

タバコ煙試料及び毛髪試料について 1-1-5 で示した工程に基づき、添加回収試験を行った。タバコ煙については、タバコ煙試料液に各 PAHs が 50 pg/mL 及び 500 pg/mL となるように標準溶液と 1 ng/mL の内部標準溶液を添加した。

毛髪試料についても同様に毛髪試料に各 PAHs が 50 pg/mg 及び 500 pg/mg となるように標準溶液と 1 ng/mL の内部標準溶液を添加してインチューブ SPME/HPLC-FLD により測定した。

## 1-2 結果及び考察

### 1-2-1 PAHs の励起及び蛍光スペクトル

FLD 測定するための最適励起波長及び蛍光波長を求めるために、各化合物の励起及び蛍光スペクトルを測定した。Fig. 9-1～4 に示すように各化合物に特有の励起及び蛍光スペクトルが得られ、これらの結果より、Table 8 に示す各化合物の最適波長を選択し、経時的に波長を切り替えて分析する条件を確立した。

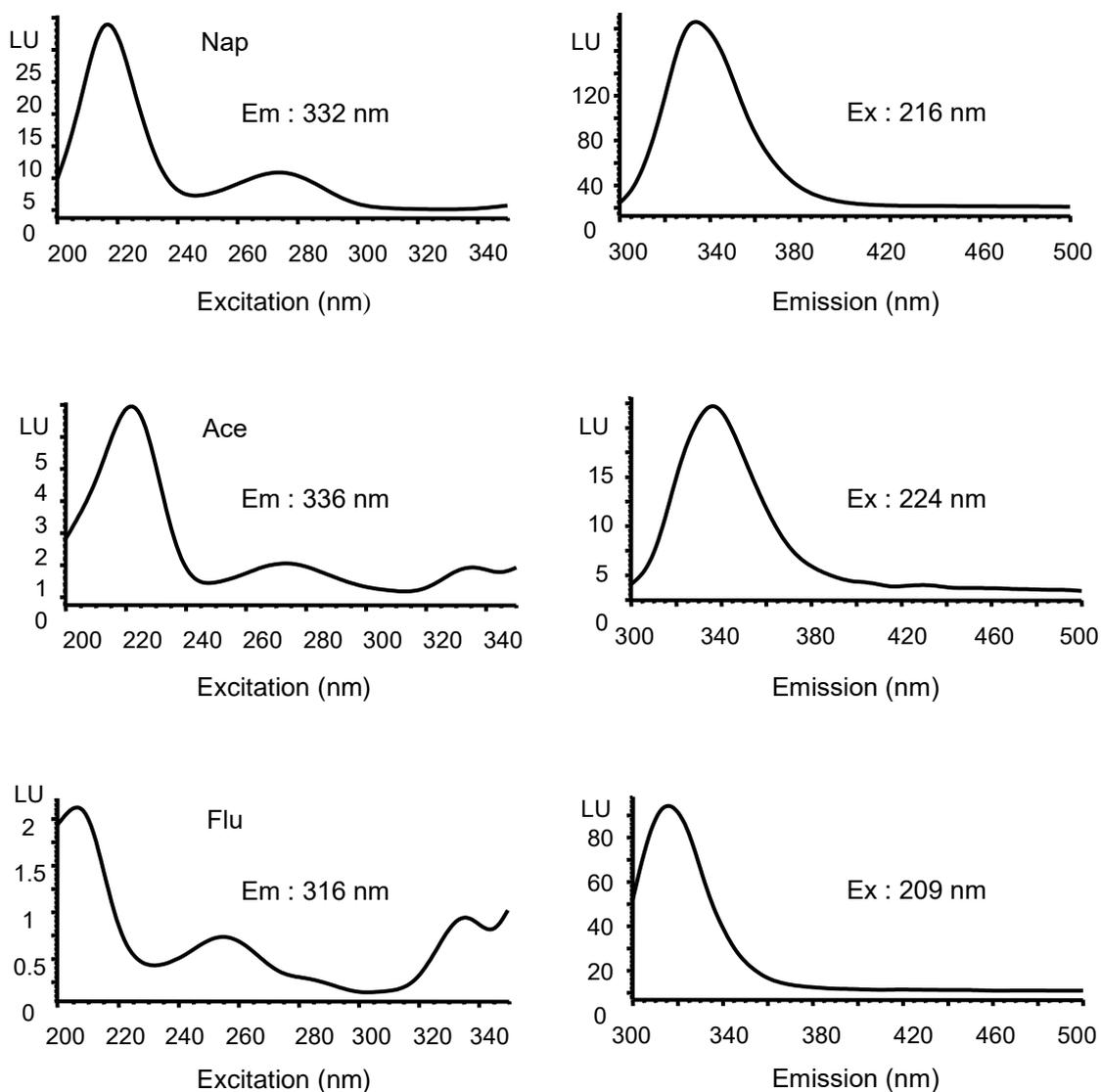


Fig. 9-1 PAHs の励起・蛍光スペクトル

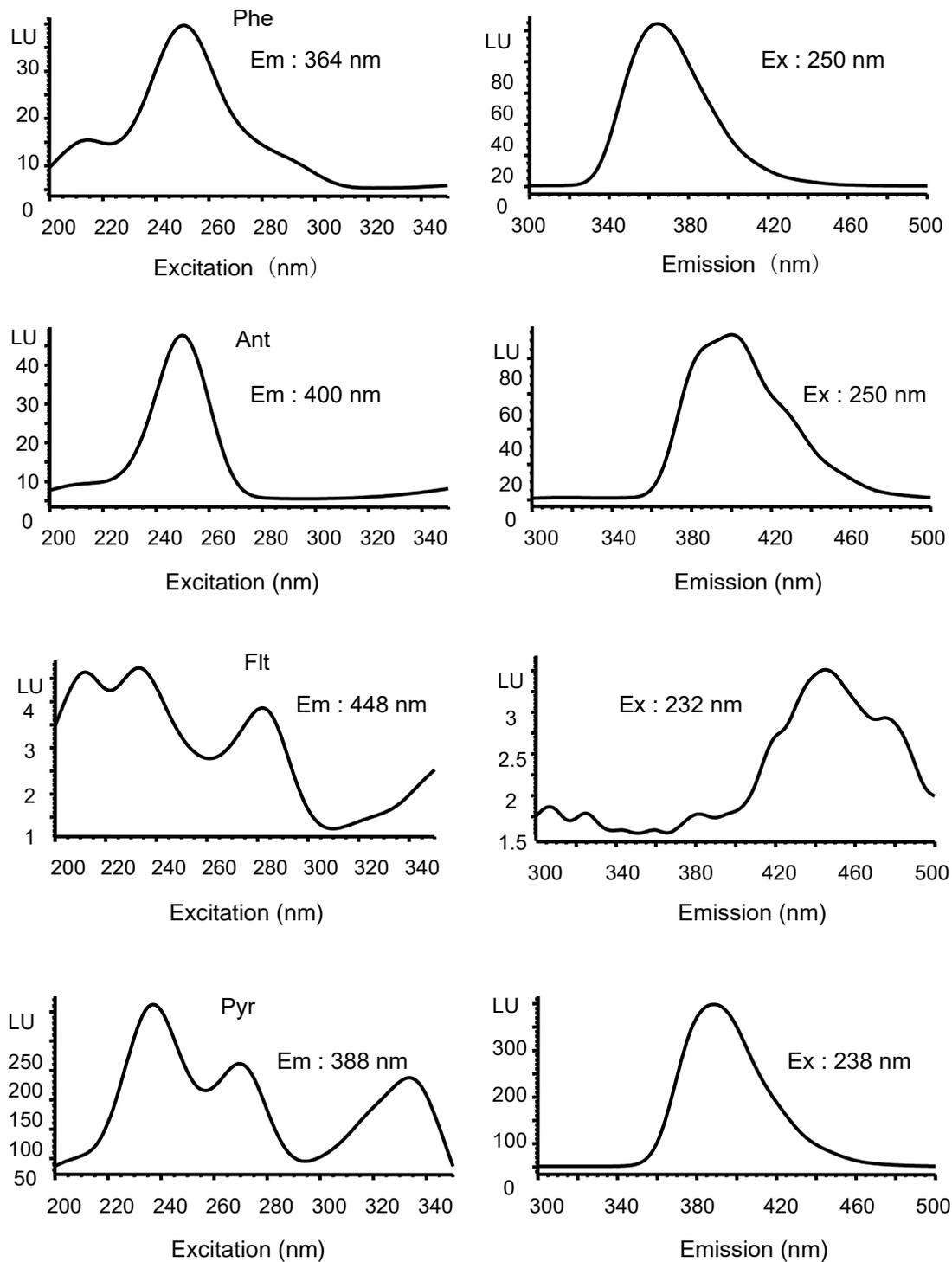


Fig. 9-2 PAHs の励起・蛍光スペクトル

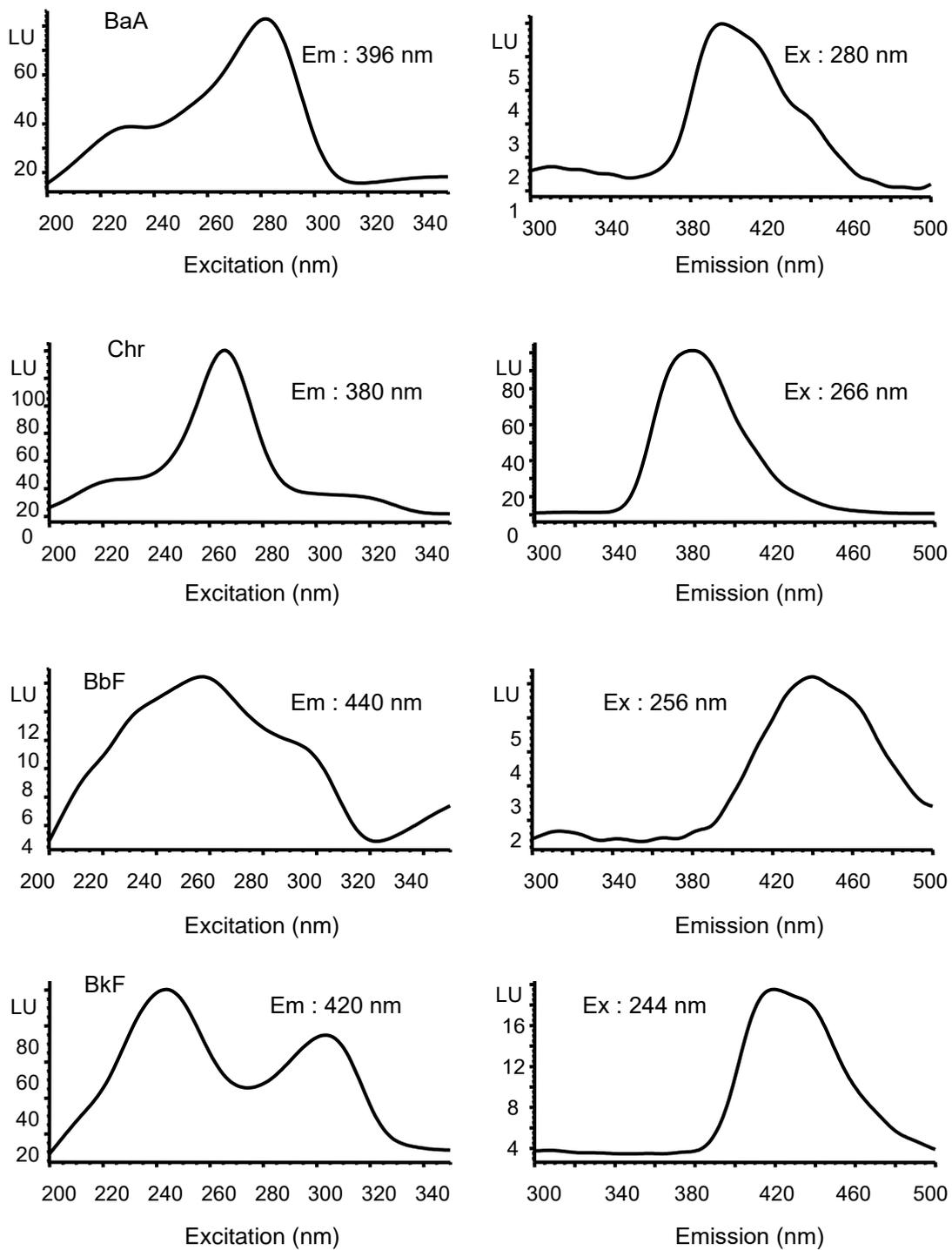


Fig. 9-3 PAHs の励起・蛍光スペクトル

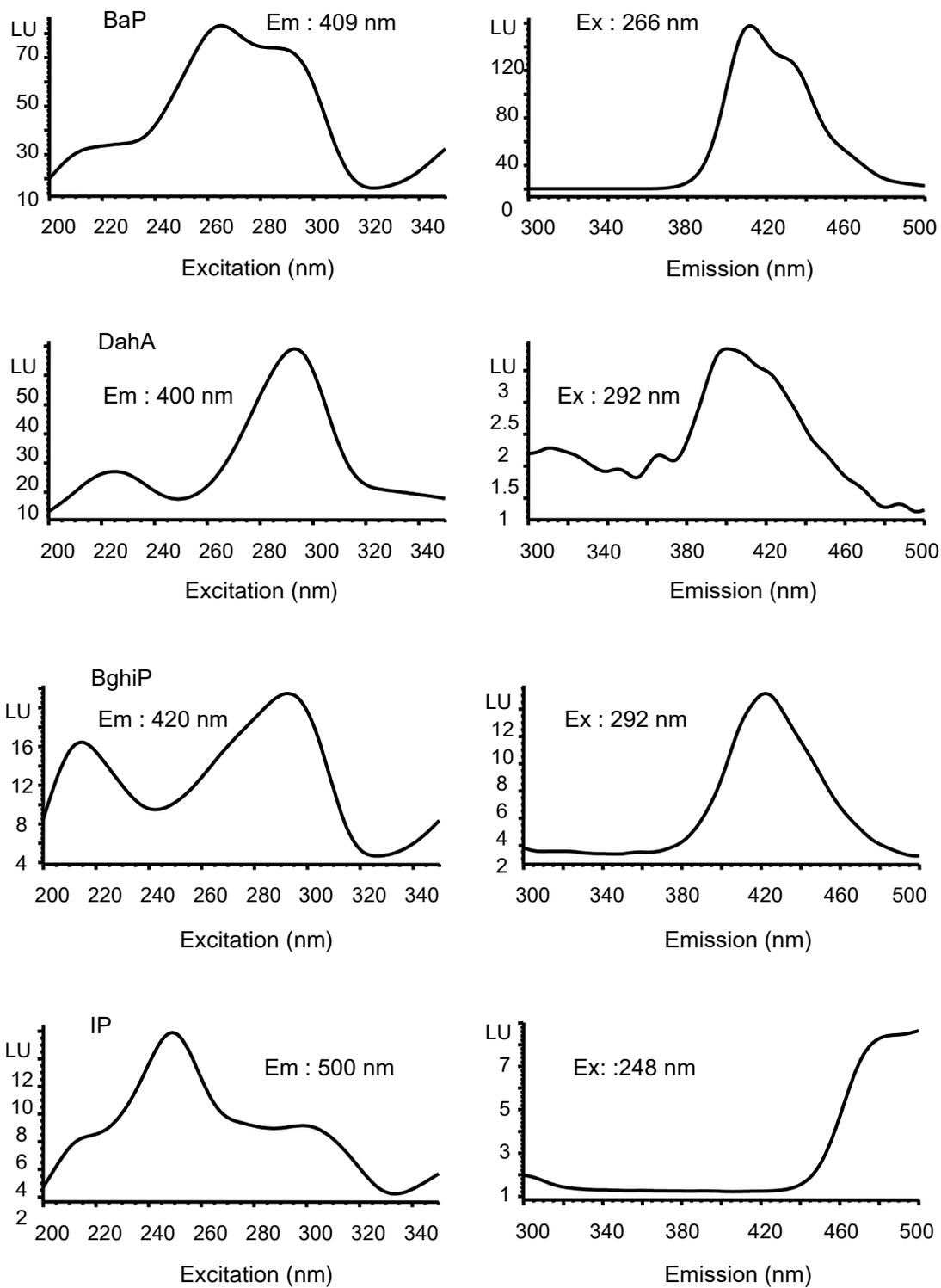


Fig. 9-4 PAHs の励起・蛍光スペクトル

## 1-2-2 インチューブ SPME 条件の最適化[48,66]

インチューブ SPME の条件として、抽出用キャピラリーカラムの種類、吸入／吐出の回数、吸入／吐出の速度及び試料中メタノール濃度について検討を行った。

抽出用キャピラリーカラムについて、CP-Sil 19CB (14% cyanopropyl-phenyl 86% polydimethylsiloxane; 0.32 mm I.D., 1.0  $\mu\text{m}$  : VARIAN), Quadrex 007-5 (5% phenyl polydimethylsiloxane; 0.32 mm I.D., 12.0  $\mu\text{m}$  : QUADREX), CP-Sil 5CB (100% polydimethylsiloxane; 0.32 mm I.D., 5.0  $\mu\text{m}$  : VARIAN), CP-WAX 52CB (polyethylene glycol; 0.32 mm I.D., 1.2  $\mu\text{m}$  : VARIAN), Supel-Q PLOT (Divinylbenzene polymer: 0.32 mm I.D., 12  $\mu\text{m}$  : SUPELCO) 及び Carboxen 1010 PLOT (Carbon molecular sieve: 0.32 mm I.D., 17  $\mu\text{m}$  : SUPELCO) の計 6 種類で検討を行った (各  $n=3$ )。Fig. 10 に示すように、CP-Sil 19CB, Quadrex 007-5 及び Supel-Q PLOT で良好な結果が得られたが、Carboxen 1010 PLOT ではほとんど抽出効果が認められなかった。CP-Sil 19CB や Quadrex 007-5 はフェニル基を有するポリマーをコーティングしたものであり、 $\pi$ - $\pi$  相互作用により PAHs を選択的に吸着したものと考えられる。Supel-Q PLOT は多孔性のポリマーであり、膜厚が大きいので吸着量が増えたものと考えられる。Nap や Ace の低分子の PAHs は Supel-Q PLOT で強い吸着が見られたが、総合的に判断して CP-sil 19CB をインチューブ SPME デバイスとして用いることにした。

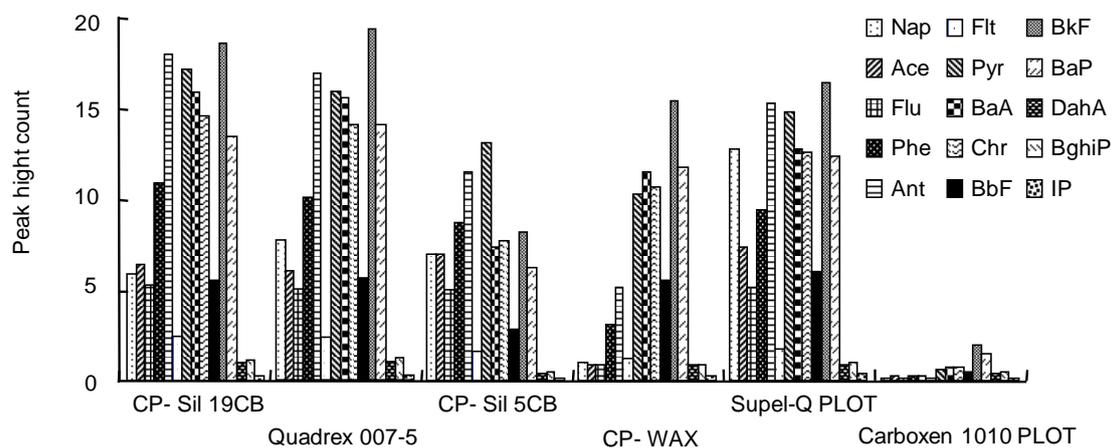


Fig. 10 インチューブ SPME におけるキャピラリーカラムの検討

抽出時の速度を一定として抽出回数を 5, 10, 15 及び 20 回で検討したとき (各  $n=3$ )、Fig. 11 に示すように吸入／吐出を多く繰り返すほど効率よく抽出できることがわかった。よって、20 回のときに最もよく抽出されたので吸入／吐出の回数は 20 回とした。

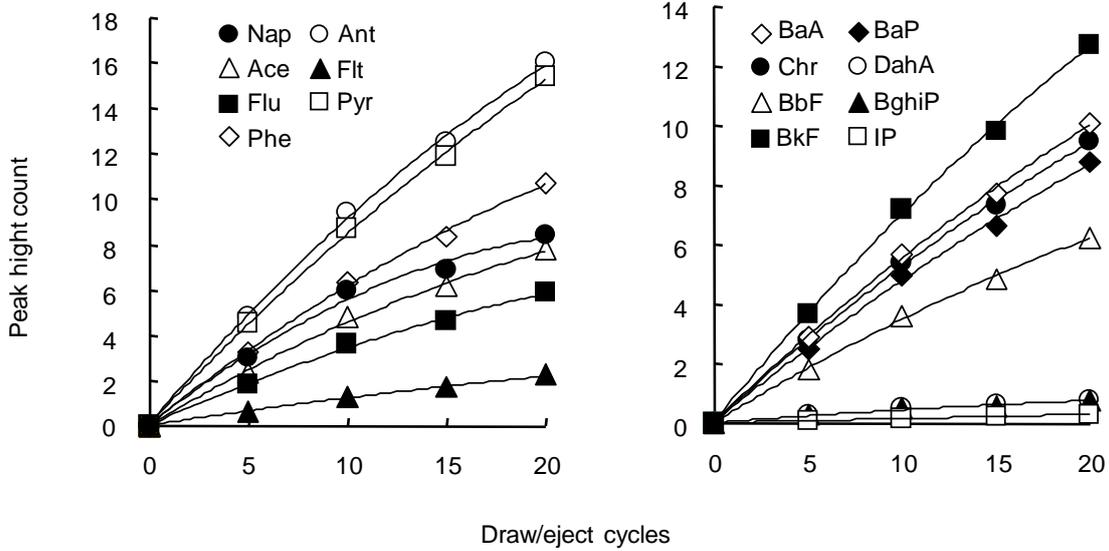


Fig. 11 インチューブ SPME における試料の吸入／吐出回数の検討

抽出時の吸入／吐出の回数を一定として、そのときの速度を 100, 150 及び 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  で検討したとき (各  $n = 3$ )、Fig. 12 に示すように 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  のときに最もよく抽出されたため、速度は 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。

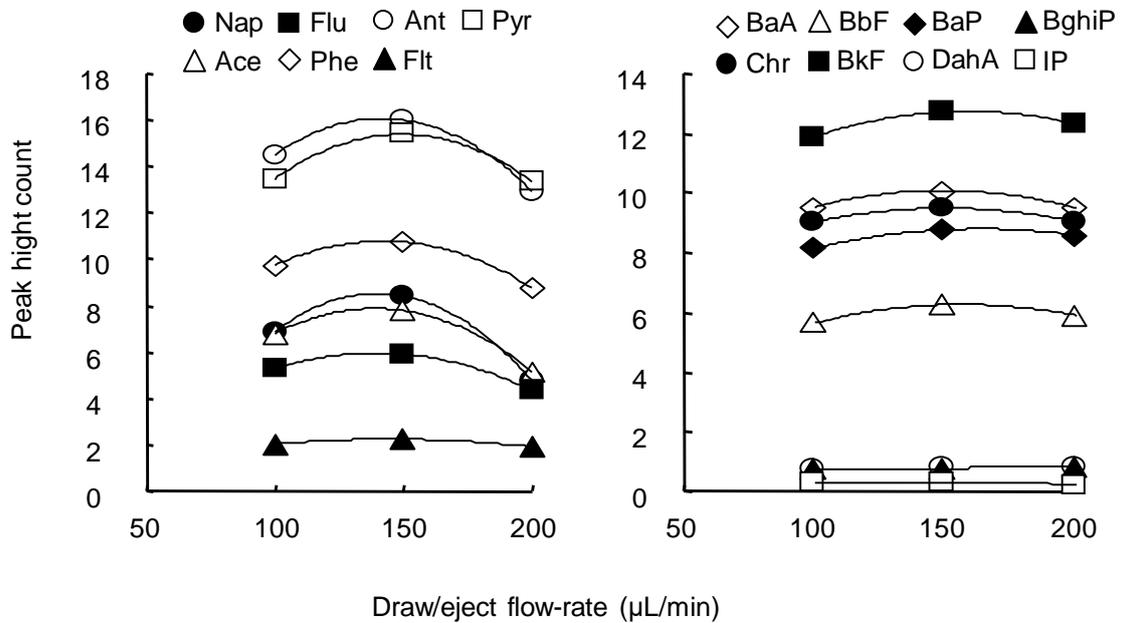


Fig. 12 インチューブ SPME における速度の検討

試料中メタノール濃度をほぼ 0%から 50%の濃度範囲で抽出効果を検討した。Fig. 13 に示すように、Nap から Pyr までの比較的分子量の化合物は、メタノールの濃度が上がるに従い抽出効果は低下した。一方、BaA より分子量の大きい化合物はメタノールの濃度を上げていくと抽出効果は上昇していくが、ある濃度を超えると低分子の方と同様に抽出効果は低下した。

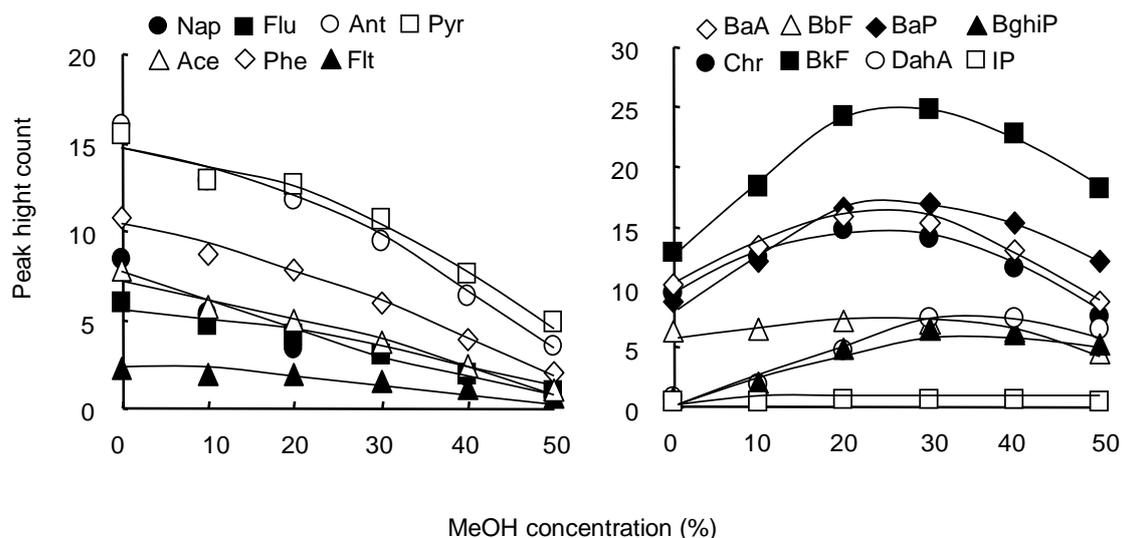


Fig. 13 インチューブ SPME における試料中メタノール濃度の検討  
(キャピラリーカラム CP-sil 19CB, 吸入/吐出回数 20 回, 速度 150  $\mu$ /min)

また、PAHs 標準溶液 1 ng/mL を用い、各メタノール濃度におけるキャピラリーコーティングへの絶対抽出率を検討した。Table 9 に示すように、Nap から Pyr までの低分子量の PAHs については、メタノール濃度が低いほど抽出率が高くなるのに対し、BaA より分子量の大きい PAHs はメタノール濃度 30%のときに抽出率が最も高くなった。これは低分子量の PAHs はメタノール濃度が高くなると移動相の方へ分配されてしまい、固定相に吸着されにくくなったためであると考えられる。一方、高分子量の PAHs は、試料溶液中にある程度メタノールが入ることにより化合物の溶解性が増し、キャピラリーカラムの固定相に吸着されやすくなるが、さらにメタノール濃度が高くなると、低分子量の PAHs と同様に移動相に分配されてしまい固定相に吸着されにくくなったためと考えられる。以上の結果から、低分子量の PAHs の抽出率低下を考慮してメタノール濃度を 20%にすることとした。

Table 9 インチューブ SPME における試料中メタノール濃度の絶対抽出率の比較

Compound	Extraction rate (%)					
	MeOH concentration					
	≤ 5%	10%	20%	30%	40%	50%
Nap	17.1	10.7	6.8	6.1	3.6	1.3
Ace	26.3	19.4	16.9	12.6	7.8	3.3
Flu	29.5	23.3	20.2	15.2	9.4	4.4
Phe	29.3	23.7	21.3	16.3	10.4	5.5
Ant	31.1	24.9	22.8	18.2	12.2	6.8
Flt	32.0	27.3	26.0	21.9	15.6	9.5
Pyr	35.2	29.4	28.8	24.2	17.3	10.9
BaA	18.3	24.2	28.9	27.8	23.6	15.8
Chr	18.8	24.5	29.3	27.8	22.8	14.9
BbF	27.1	27.6	30.5	29.8	27.2	19.1
BkF	14.1	20.3	26.8	27.4	25.2	20.0
BaP	14.4	19.9	27.1	27.6	25.0	19.9
DahA	2.7	6.1	15.7	24.6	24.7	22.1
BghiP	2.9	7.4	18.0	24.3	23.0	19.6
IP	12.4	14.9	25.4	26.8	25.6	13.2

### 1-2-3 インチューブ SPME/HPLC-FLD 法による標準クロマトグラム

PAHs 標準溶液 1 ng/mL を用い、上記の最適化の結果からインチューブ SPME/HPLC-FLD 法を行った。Fig. 14 に示すように 15 分以内に良好なピークとして分離した。

### 1-2-4 バリデーション

17 種類の PAHs についてインチューブ SPME/HPLC-FLD 法の最適条件下、低分子量側 (Nap~Pyr) を Ant-d<sub>10</sub>, 高分子量側 (BaA~IP) を BaA-d<sub>12</sub> を内部標準として対応させて検量線の直線性を調べた結果、0.02~1 ng/mL の範囲の濃度において、いずれの化合物も相関係数が 0.9979 以上となり、いずれも良好な直線性を示した。検出限界値は、

クロマトグラム上のノイズの3倍のピーク高さ ( $S/N=3$ ) を与える濃度から算出したところ、0.5~10.1 pg/mLであった。また、インチューブ SPME/HPLC-FLD 法は、直接注入 (5  $\mu$ L) 法と比較すると、17~44 倍の感度であり、再現性を示す相対標準偏差 (RSD) 値も良好であった (Table 10)。これまでの報告と比較すると、GC 分析では、通常、300  $^{\circ}$ C 以下で気化できる PAHs に限られるため、PAHs の沸点の違いにより分離・検出が難しく分析時間も長時間要していた。また LC-MS/MS と比べても検出感度が優れており、無駄な前処理にかかる時間も省けるため、本法を用いることにより、高感度かつ短時間で分析することができると考えられる (Table 11)。

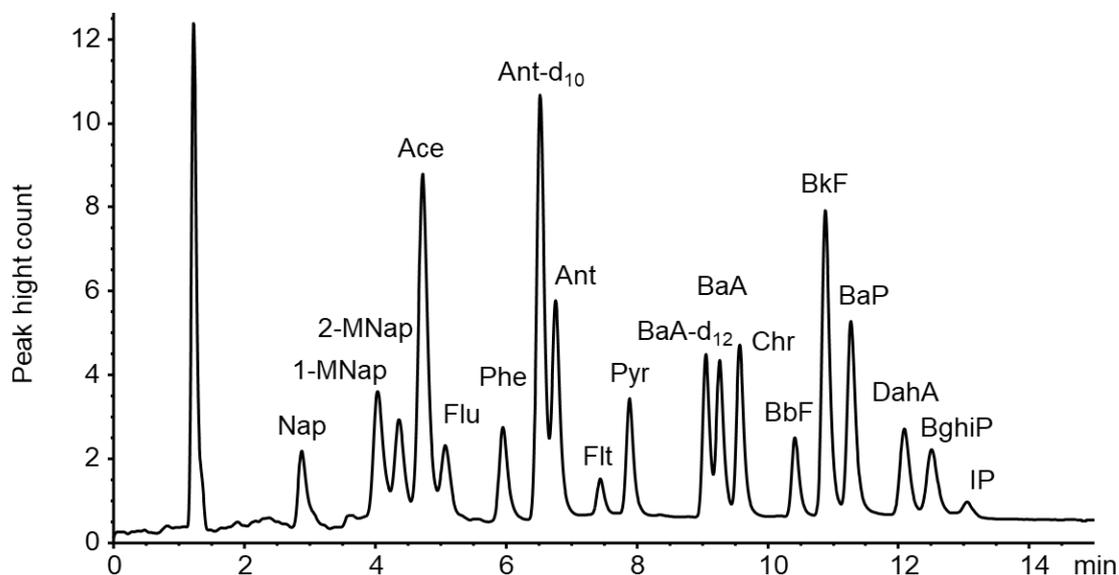


Fig. 14 PAHs 標準溶液のクロマトグラム (1 ng/mL)

#### 1-2-9 添加回収試験

タバコ煙及び毛髪試料について添加回収試験を各 3 回ずつ行った結果を Table 12 に示す。煙試料においては、回収率が低濃度で 86.7~104.0%，高濃度で 85.8~102.3%であった。毛髪試料では、低濃度で 70.1~113.3%，高濃度で 75.0~108.9%といずれも良好な回収率であった。

Table 10 インチューブ SPME/HPLC-FLD 法による PAHs 分析のバリデーション

Compound	Range (ng/mL)	Correlation Coefficient <sup>a)</sup>	LOD <sup>b)</sup> (pg/mL)		Sensitivity ratio SPME/direct	Precision (RSD <sup>c)</sup> %)	
			Direct injection	In-tube SPME		50 pg/mL	500 pg/mL
Nap	0.02–1	0.9984	245	9.3	26	2.0	1.3
1-MNap	0.02–1	0.9997	267	10.1	27	2.2	0.5
2-MNap	0.02–1	0.9992	224	8.8	26	3.2	0.6
Ace	0.02–1	0.9987	113	5.4	21	0.5	0.4
Flu	0.02–1	0.9998	206	9.8	21	4.3	0.4
Phe	0.02–1	0.9996	67	3.9	17	3.8	0.4
Ant	0.02–1	0.9995	14	0.5	29	0.6	0.1
Flt	0.02–1	1.0000	152	4.5	34	1.0	0.6
Pyr	0.02–1	0.9998	79	1.8	44	0.3	0.2
BaA	0.02–1	0.9996	43	1.0	42	1.2	0.6
Chr	0.02–1	1.0000	39	1.0	40	0.7	0.4
BbF	0.02–1	0.9999	70	2.3	30	0.7	1.1
BkF	0.02–1	0.9997	22	0.8	29	1.4	0.9
BaP	0.02–1	0.9999	30	1.2	24	1.3	1.2
DahA	0.02–1	0.9993	94	3.3	28	2.4	3.1
BghiP	0.02–1	0.9999	97	5.0	20	2.4	3.2
IP	0.02–1	0.9979	857	20.4	42	13.7	3.6

<sup>a</sup>  $n = 18$ . <sup>b</sup> Limits of detection (signal to noise ratio of 3). <sup>c</sup> Relative standard deviation ( $n = 5$ ).

Table 11 これまでの PAHs に関する分析法の比較

Analytes	Sample <sup>a)</sup>	Sample extraction <sup>b)</sup>	Analytical method <sup>c)</sup>	Linear range (ng/mL)	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mg)	Ref.
PAHs	Hair	Soxhlet	GC-MS/MS	–	0.5–5 <sup>d)</sup>	–	85
PAHs	Hair	LLE	GC-MS/MS	–	50–100	150–300	86
PAHs	MS (CC)	SPE	GC-MS	5–8000	0.2–4.6 <sup>e)</sup>	0.6–15.3 <sup>e)</sup>	99
PAHs	MS (CC)	SPE	LC-MS/MS	0.2–200	11–166	–	100
PAHs	MS, SS (CC)	SPE	LC-FLD	0.025–100	12–110	–	101

<sup>a)</sup> MS: mainstream smoke; SS: sidestream smoke; CC: combustion cigarette.

<sup>b)</sup> LLE: liquid-liquid extraction; SPE: solid-phase extraction.

<sup>c)</sup> MS/MS: tandem mass spectrometry; MS: mass spectrometry; FLD: fluorescence detector.

<sup>d)</sup> pg/mg

<sup>e)</sup> ng/mL

Table 12 タバコ煙試料及び毛髪試料における PAHs 添加回収試験

Compound	Recovery (%), mean $\pm$ SD <sup>a)</sup>			
	Smoke		Hair	
	50 pg/mL	500 pg/mL	50 pg/mg	500 pg/mg
Nap	87.8 $\pm$ 1.4	90.3 $\pm$ 5.4	77.0 $\pm$ 3.4	107.5 $\pm$ 1.7
1-MNap	102.5 $\pm$ 3.2	94.2 $\pm$ 1.2	94.5 $\pm$ 3.5	108.9 $\pm$ 1.7
2-MNap	97.1 $\pm$ 2.6	93.2 $\pm$ 0.4	81.2 $\pm$ 4.8	102.8 $\pm$ 1.5
Ace	103.2 $\pm$ 1.0	97.4 $\pm$ 0.4	99.9 $\pm$ 3.0	100.9 $\pm$ 1.4
Flu	94.6 $\pm$ 3.5	94.4 $\pm$ 1.3	105.9 $\pm$ 3.2	96.9 $\pm$ 0.7
Phe	90.4 $\pm$ 3.6	88.7 $\pm$ 1.1	96.2 $\pm$ 6.6	102.1 $\pm$ 1.9
Ant	100.6 $\pm$ 0.6	102.3 $\pm$ 0.1	104.8 $\pm$ 1.3	99.0 $\pm$ 1.1
Flt	91.8 $\pm$ 2.0	95.0 $\pm$ 0.6	101.9 $\pm$ 5.4	89.9 $\pm$ 0.4
Pyr	88.2 $\pm$ 3.6	97.0 $\pm$ 1.0	94.7 $\pm$ 4.9	98.4 $\pm$ 0.2
BaA	100.5 $\pm$ 0.4	99.1 $\pm$ 0.5	95.6 $\pm$ 1.1	98.4 $\pm$ 0.3
Chr	104.7 $\pm$ 0.8	98.0 $\pm$ 0.8	113.3 $\pm$ 3.0	101.2 $\pm$ 0.4
BbF	104.0 $\pm$ 3.3	95.3 $\pm$ 1.2	78.4 $\pm$ 2.9	77.7 $\pm$ 1.2
BkF	101.6 $\pm$ 2.5	95.6 $\pm$ 0.9	79.7 $\pm$ 1.9	75.0 $\pm$ 1.6
BaP	102.9 $\pm$ 2.5	94.8 $\pm$ 1.2	81.6 $\pm$ 1.7	78.3 $\pm$ 1.7
DahA	86.7 $\pm$ 3.2	85.8 $\pm$ 1.3	70.6 $\pm$ 1.9	101.3 $\pm$ 5.1
BghiP	89.1 $\pm$ 0.9	87.2 $\pm$ 1.8	70.1 $\pm$ 3.3	75.4 $\pm$ 4.3
IP	87.0 $\pm$ 1.3	88.4 $\pm$ 3.0		

<sup>a)</sup> Standard deviation ( $n = 3$ ).

### 1-2-6 タバコ葉試料中の PAHs 含量測定

本法を使用して紙巻きタバコの Marlboro (Regular) と加熱式タバコ 3 種類の葉試料中の TSNAs 含量を各 3 回ずつ測定した。Fig. 15 に Marlboro (Regular) 及び Ploom TECH のクロマトグラムを示す。紙巻きタバコ葉中の総 PAHs は、タバコ 1 本あたり 1362.4 ng 含まれていた。一方、加熱式タバコ葉中の総 PAHs は、IQOS でタバコ 1 本あたり 1203.2 ng, glo で 544.2 ng 及び Ploom TECH で 40.8 ng 含まれていた (Table 13)。有害化学物質が少ないとされる加熱式タバコだが、IQOS からは紙巻きタバコと同等量の PAHs が検出された。一方、glo 及び Ploom TECH からは、検出された総 PAHs 含量は少ないが、紙巻きタバコと同様に低分子量から高分子量までの PAHs が検出された。

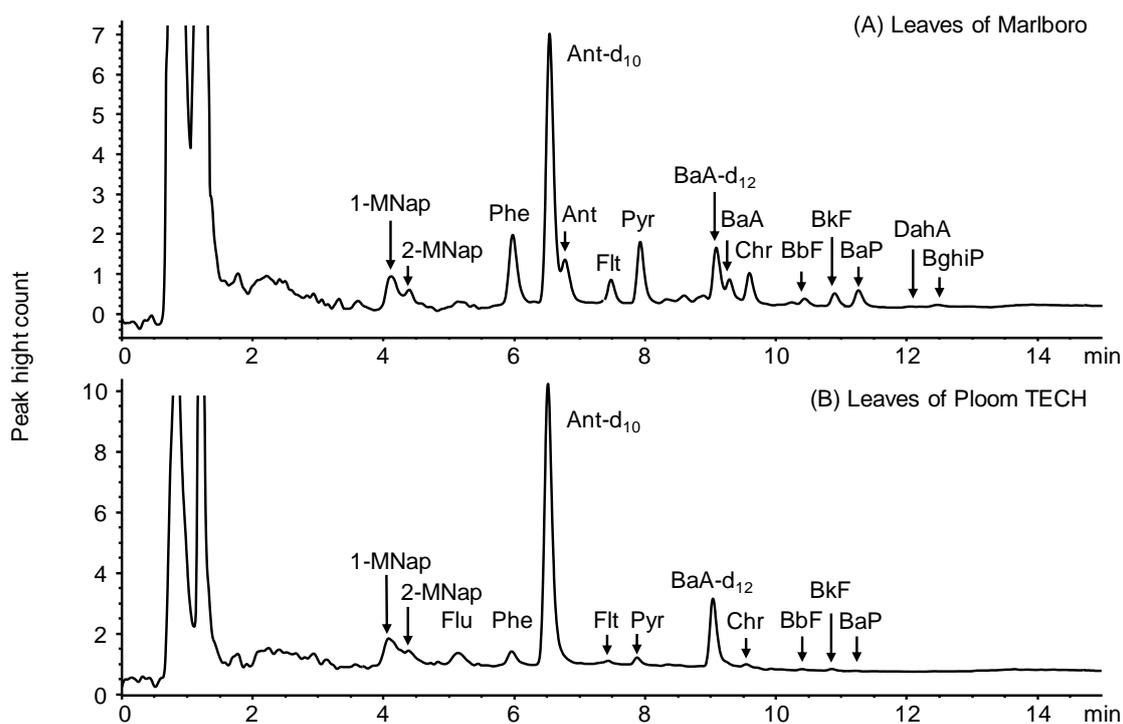


Fig. 15 タバコ葉試料から得られた PAHs のクロマトグラム

Table 13 各種タバコ 1 本あたりのタバコ葉試料中の PAHs 含量

Compound	PAHs contents (ng/cigarette) / Mean $\pm$ SD <sup>a)</sup>			
	Combustion cigarettes		Heated tobacco products	
	Marlboro (Regular)	IQOS	glo	Ploom TECH
Nap	N.D. <sup>b)</sup>	61.2 $\pm$ 3.3	N.D.	N.D.
1-MNap	71.8 $\pm$ 5.7	<LOD <sup>c)</sup>	7.7 $\pm$ 0.6	5.3 $\pm$ 0.4
2-MNap	42.4 $\pm$ 2.9	143.2 $\pm$ 0.9	7.8 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.3
Ace	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Flu	N.D.	N.D.	N.D.	11.1 $\pm$ 0.5
Phe	290.8 $\pm$ 1.3	253.2 $\pm$ 4.4	103.0 $\pm$ 3.1	5.3 $\pm$ 0.2
Ant	64.1 $\pm$ 0.9	45.3 $\pm$ 1.4	27.4 $\pm$ 0.8	N.D.
Flt	254.0 $\pm$ 4.1	230.7 $\pm$ 1.6	122.5 $\pm$ 2.3	6.0 $\pm$ 0.4
Pyr	211.3 $\pm$ 4.9	204.3 $\pm$ 5.0	117.9 $\pm$ 1.5	4.5 $\pm$ 0.4
BaA	98.8 $\pm$ 3.8	64.0 $\pm$ 1.3	33.5 $\pm$ 0.3	N.D.
Chr	132.1 $\pm$ 2.2	86.8 $\pm$ 0.8	47.1 $\pm$ 0.9	1.7 $\pm$ 0.1
BbF	58.4 $\pm$ 2.8	33.4 $\pm$ 1.0	22.3 $\pm$ 1.0	2.1 $\pm$ 0.1
BkF	33.8 $\pm$ 1.1	19.8 $\pm$ 0.5	13.0 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.0
BaP	64.9 $\pm$ 1.5	42.0 $\pm$ 1.5	26.6 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1
DahA	14.3 $\pm$ 2.4	N.D.	N.D.	N.D.
BghiP	25.8 $\pm$ 1.6	19.2 $\pm$ 1.0	15.5 $\pm$ 0.0	N.D.
IP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	1362.4 $\pm$ 4.1	1203 $\pm$ 15.1	544.2 $\pm$ 3.4	40.8 $\pm$ 1.1

<sup>a)</sup> Standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>b)</sup> Not detectable. <sup>c)</sup> Limits of detection.

### 1-2-7 タバコ煙試料中の PAHs 含量測定

本法を使用して紙巻きタバコの Marlboro (Regular) と加熱式タバコ 3 種類の煙試料中の PAHs 含量を各 3 回ずつ測定した。Fig. 16 に Marlboro (Regular) 及び Ploom TECH のクロマトグラムを示す。紙巻きタバコの総 PAHs は主流煙中で、タバコ 1 本あたり 498.9 ng, 副流煙中で 600.8 ng 含まれていた。一方, 加熱式タバコ煙中の総 PAHs は, IQOS でタバコ 1 本あたり 83.6 ng, glo で 74.3 ng 及び Ploom TECH で 11.0 ng 含まれていた (Table 14)。これまでの報告値と比較して, 高分子量の PAHs は多少低く出るものもあったが, 低分子量の方はほぼ同等であった[101]。紙巻きタバコでは, 低分子量から高分子量までの PAHs が検出され, 加熱式タバコでは, 比較的 low molecular weight の PAHs が検出された。これは, 一般的に紙巻きタバコの燃焼温度は約 700 °C と言われており, 加熱式タバコの IQOS が約 300 °C, glo が約 240 °C, そして Ploom TECH が約 30 °C とされている。このことから加熱温度が高くなるとより有害性の強い高分子量の PAHs が発生し, その発生量も増加する傾向にあると考えられる。

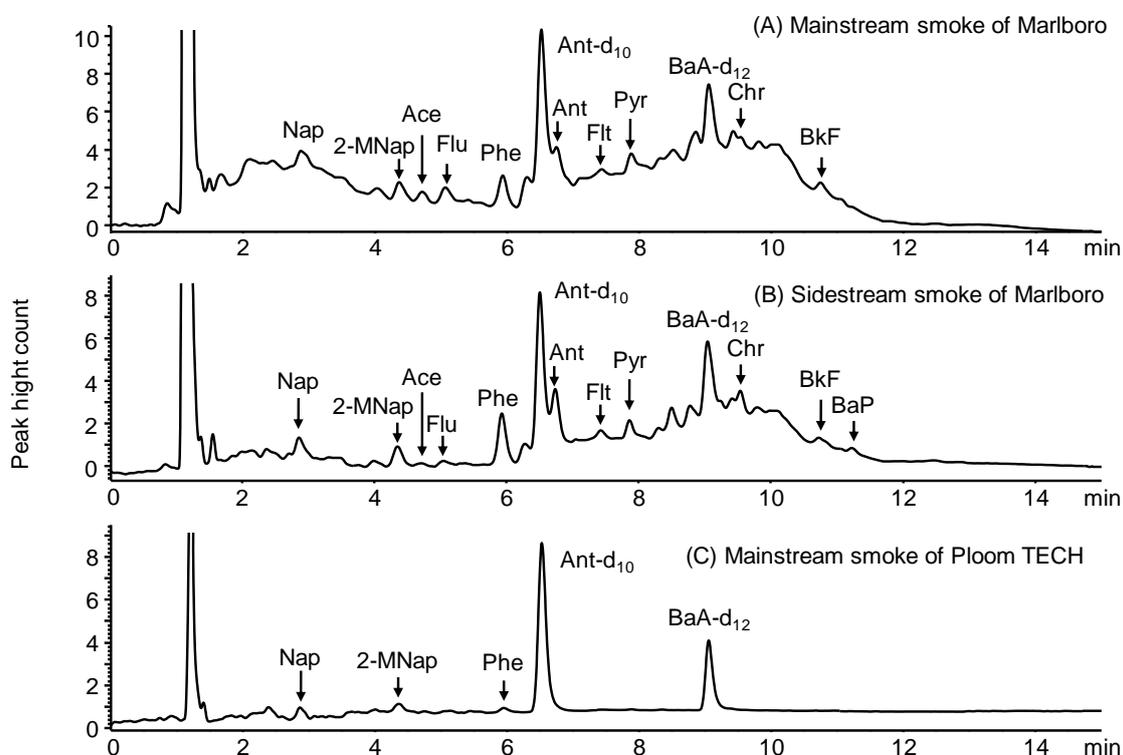


Fig. 16 タバコ煙試料から得られた PAHs のクロマトグラム

Table 14 各種タバコ 1 本あたりのタバコ煙試料中の PAHs 含量

Compound	PAHs contents (ng cigarette <sup>-1</sup> ) / Mean ± SD <sup>a)</sup>				
	Combustion cigarettes		Heated tobacco products		
	Marlboro (Regular) mainstream smoke	Marlboro (Regular) sidestream smoke	IQOS	glo	Ploom TECH
Nap	58.0 ± 5.2	64.9 ± 1.7	46.5 ± 2.0	43.3 ± 2.6	6.6 ± 1.8
1-MNap	<LOD <sup>b)</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2-MNap	48.9 ± 3.2	58.3 ± 2.9	41.5 ± 2.4	22.6 ± 4.2	2.6 ± 0.3
Ace	7.9 ± 1.0	2.7 ± 0.7	N.D. <sup>c)</sup>	N.D.	N.D.
Flu	66.3 ± 6.0	14.8 ± 1.3	N.D.	N.D.	N.D.
Phe	111.2 ± 3.0	191.0 ± 10.1	32.6 ± 1.8	8.4 ± 0.7	1.7 ± 0.1
Ant	52.5 ± 1.6	83.0 ± 3.7	N.D.	N.D.	N.D.
Flt	57.1 ± 5.5	78.1 ± 3.5	N.D.	<LOD	<LOD
Pyr	53.2 ± 5.2	51.8 ± 2.8	<LOD	<LOD	<LOD
BaA	14.3 ± 1.5	8.1 ± 0.8	<LOD	<LOD	<LOD
Chr	19.8 ± 1.4	33.1 ± 2.4	N.D.	N.D.	N.D.
BbF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BkF	9.7 ± 0.6	6.5 ± 0.8	N.D.	N.D.	N.D.
BaP	N.D.	8.4 ± 0.5	N.D.	N.D.	N.D.
DahA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BghiP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	498.9 ± 5.7	600.8 ± 9.9	83.6 ± 1.4	74.3 ± 1.8	11.0 ± 0.8

<sup>a)</sup> Standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>b)</sup> Limits of detection. <sup>c)</sup> Not detectable.

#### 1-2-8 毛髪試料中の PAHs 含量測定

本法を用いて毛髪試料中の PAHs 含量を各 3 回ずつ測定した。Fig. 17 に喫煙者と非喫煙者の毛髪試料から得られたクロマトグラムを示す。毛髪から得られた総 PAHs 含量は毛髪 1 mg あたり喫煙者 (20 名) で平均 1382.9 pg, 非喫煙者 (20 名) で 1064.7 pg であった。個別でみると, Ant 及び BaP で  $p < 0.05$  となり Nap で  $p < 0.01$  と有意差があるため, これらは喫煙による影響があると考えられる (Fig. 18)。しかしながら, PAHs は喫煙者の方から多く検出されたが, 非喫煙者からも喫煙者より含量は少ないが同じ種類の PAHs が検出されたため, PAHs の曝露要因については喫煙の有無の影響は少なく, 食事や環境による影響が大きいと考えられる。そのため, 非喫煙者にも PAHs 曝露による発がんのリスクは存在すると考えられる。これまでタバコ煙曝露と毛髪分析との関連をまとめた報告はほとんどなく, 環境要因での PAHs と生体試料との関連する報告を参考にすれば, 受動喫煙と直接結びつかないが, PAHs の長期曝露に毛髪試料は有効であると考えられる[102]。

また, アンケート調査で野菜の摂取に関して喫煙者群と非喫煙者群で PAHs 含量に有意な差が生じた。生野菜をよく摂取する喫煙者群 (4 名) と, そのほかの調理法で野菜を摂取する喫煙者群 (8 名) との間に有意な差は認められなかったが, 生野菜をよく摂取する非喫煙者群 (6 名) では, そのほかの調理法で野菜を摂取する喫煙者群 (6 名) よりも PAHs 含量が低くなり, Flu では  $p < 0.01$ , Phe 及び Flt では  $p < 0.05$  と有意な差が認められた (Fig. 19)。このことは生野菜に含まれる食物繊維などが PAHs の吸収を阻害し, 蓄積を抑制するか, あるいは体外への排泄を促進していると考えられる。

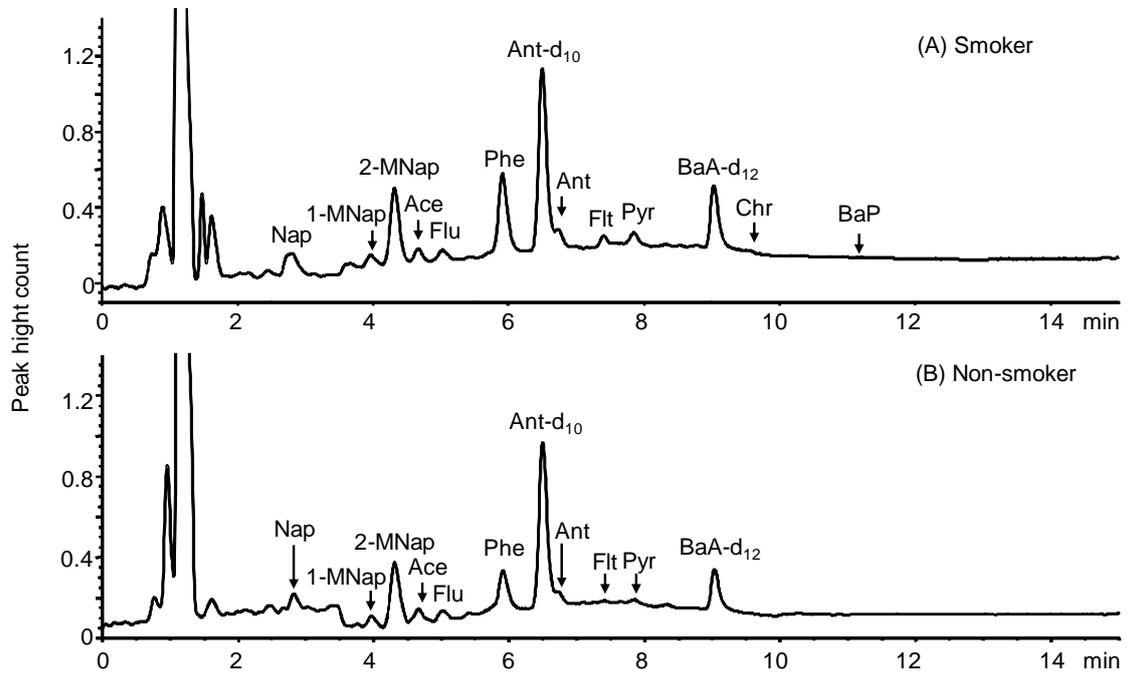


Fig. 17 毛髪試料から得られた喫煙者と非喫煙者の PAHs のクロマトグラム

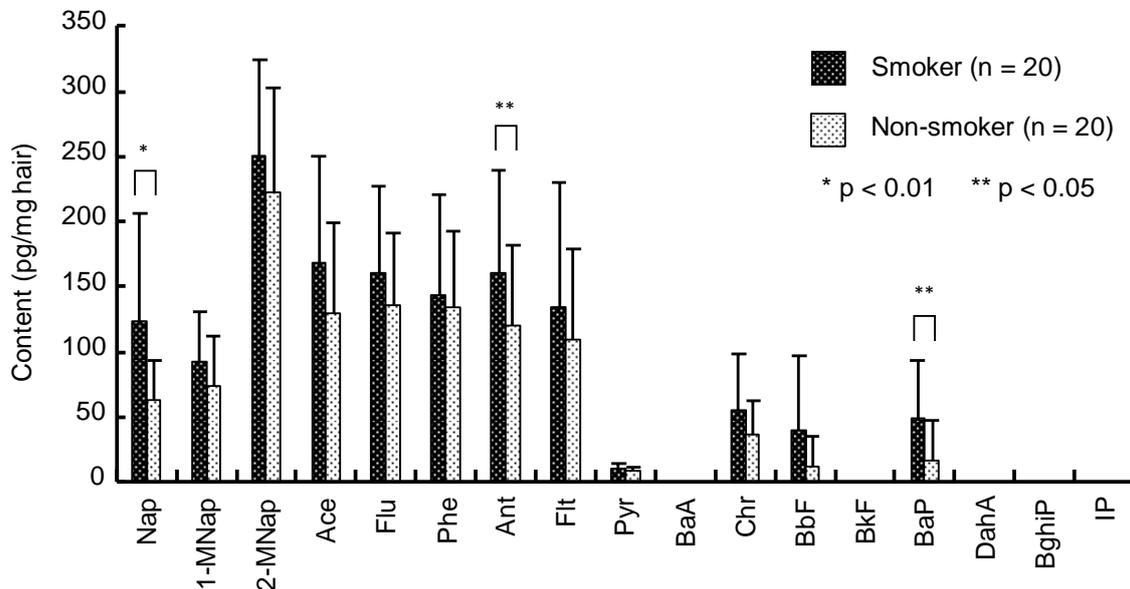


Fig. 18 喫煙者と非喫煙者の毛髪試料中の PAHs 含量の比較

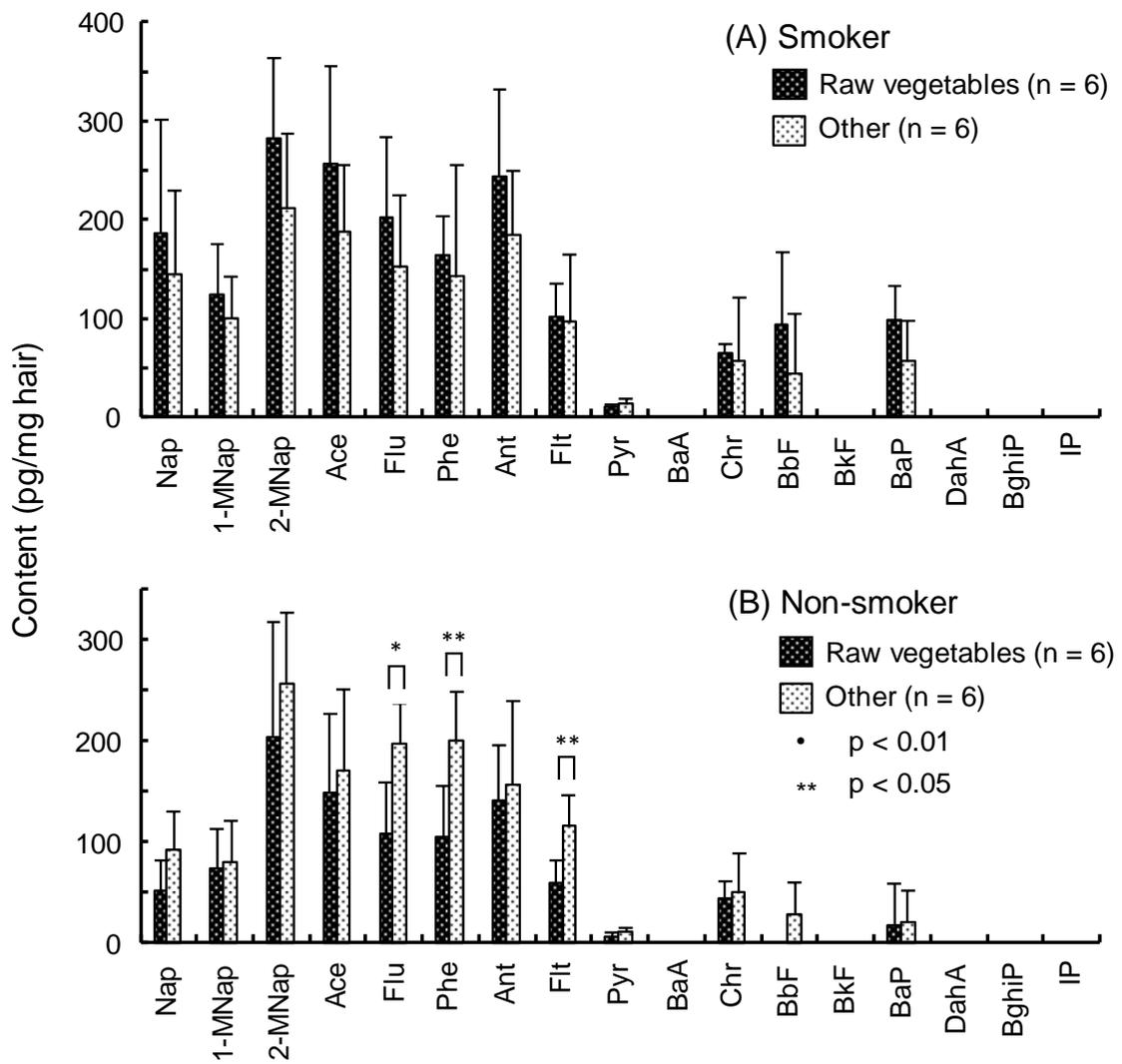


Fig. 19 生野菜摂取による喫煙者群と非喫煙者群の比較

## 第2章 タバコ特異的ニトロソアミン類 (TSNAs) の分析[103]

### 2-1 実験方法

#### 2-1-1 分析対象 TSNAs と標準溶液の調製

分析対象とした TSNAs は, Toronto Research Chemicals の NNK, NNN, NAT, NAB 及び NNAL の 5 種類であり, 内部標準物質としてそれぞれに対応した安定同位体で標識された Toronto Research Chemicals の NNK-d<sub>3</sub> (同位体純度 99.9%), NNN-d<sub>4</sub> (同位体純度 97.8%), NAT-d<sub>4</sub> (同位体純度 98.0%), NAB-d<sub>4</sub> (同位体純度 99.7%) 及び NNAL-d<sub>5</sub> (同位体純度 97.8%) を用いた (Fig. 20)。

各化合物は, アセトニトリル (LC/MS 用: 関東化学) に溶解して標準原液 (NNK: 26.0 mg/10 mL, NNN: 26.3 mg/10 mL, NAT: 5 mg/mL, NAB: 10 mg/mL 及び NNAL: 10 mg/mL) としてそれぞれ 4 °C また -20 °C で保存し, 適宜蒸留水 (LC/MS 用: 関東化学) で希釈して標準混合溶液 (NNN, NNK, NAT 及び NAB: 1 ng/mL, NNAL: 10 ng/mL) として使用した。また, 内部標準物質についても同様に, 調製して内部標準原液 (NNK-d<sub>3</sub>: 1 mg/mL, NNN-d<sub>4</sub>: 5 mg/mL, NAT-d<sub>4</sub>: 1 mg/mL, NAB-d<sub>4</sub>: 1 mg/mL 及び NNAL-d<sub>5</sub>) と内部標準混合溶液 (NNN-d<sub>4</sub>, NNK-d<sub>3</sub>, NAT-d<sub>4</sub> 及び NAB-d<sub>4</sub>: 100 pg/mL, NNAL-d<sub>5</sub>: 1000 pg/mL) とした。

#### 2-1-2 装置及び分析条件

HPLC 装置は, Agilent Technologies 1100 シリーズを使用した。移動相は, A: 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液と B: 0.1% 酢酸含有メタノールを用い, A/B = 50/50 の流速 0.2 mL/min で流した。カラムは CAPCELL PAK C18 MGIII (100 mm × 2.0 mm I.D., 5 µm; SHISEIDO), カラム温度は 40 °C とし, 分析時間は 5 分とした。移動相について, 蒸留水及びメタノールは LC/MS 用 (関東化学), 酢酸アンモニウムは HPLC 用 (ナカライ), 酢酸は LC/MS 用 (和光純薬) を使用して調製した。

MS/MS 装置は, API4000 (AB sciex) を使用した。また, ネブライザーガス用の窒素発生装置は, カケン N<sub>2</sub> ジェネレーター (カケンジェネリックス) を用い, MRM mode ESI positive で分析を行った。化合物の Q1 及び Q2 はそれぞれ NNK (208.2 → 122.1), NNN (178.2 → 148.1), NAT (190.2 → 160.2), NAB (192.2 → 162.3) 及び NNAL (210.2 → 149.2) とした。また, 内部標準物質については, NNK-d<sub>3</sub> (211.3 → 122.1), NNN-d<sub>4</sub> (182.2

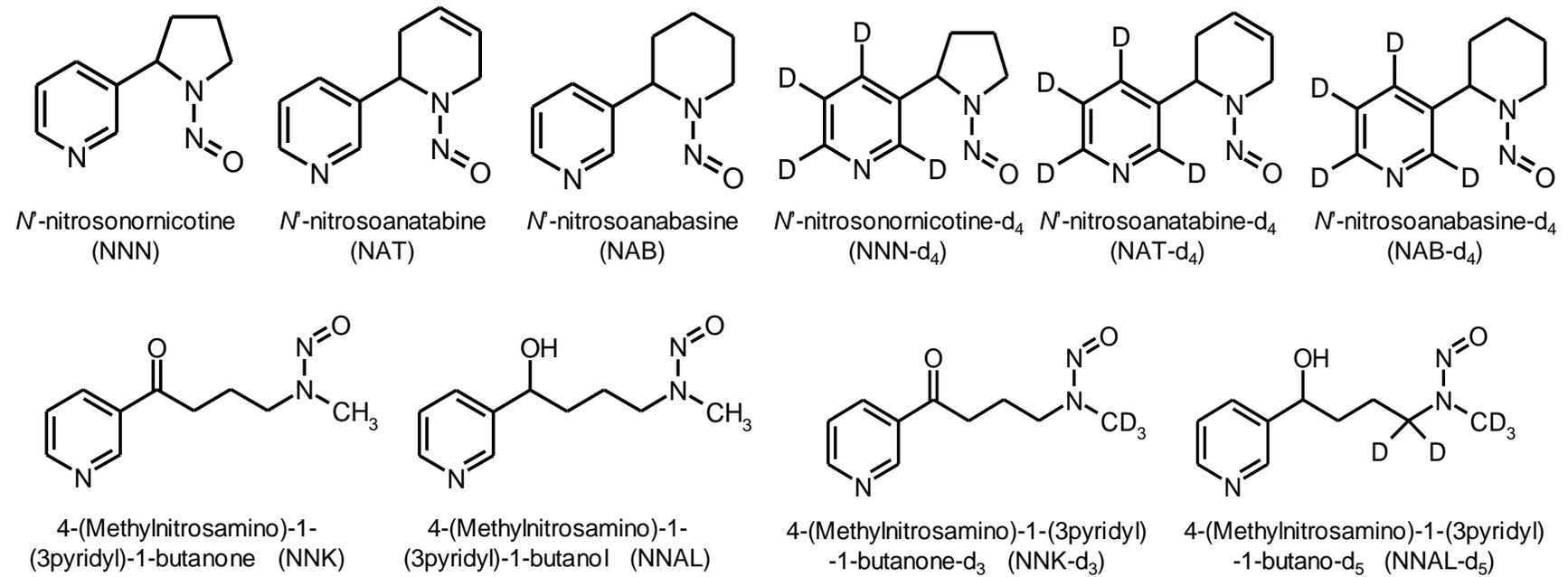


Fig. 20 分析対象の TSNAs と内部標準物質の構造式

→152.1), NAT-d<sub>4</sub> (194.2→164.4), NAB-d<sub>4</sub> (196.3→166.3) 及び NNAL-d<sub>5</sub> (215.3→150.9) とし, MS/MS 装置の各種パラメーターの最適条件を示す (Table 15)。

### 2-1-3 インチューブ SPME/LC-MS/MS 法

PAHs の分析と同様に, インチューブ SPME のプログラムを組み (Table 16), オンラインで自動分析を行った。

### 2-1-4 タバコ試料の主流煙ならびに副流煙の捕集

本研究に使用したタバコ試料は, 5種類の紙巻きタバコと IQOS (フィリップ・モリス), glo (ブリティッシュ・アメリカン・タバコ) 及び Ploom TECH (JT) の3種類の加熱式タバコである。それぞれのタール, ニコチン及び1本当たりのたばこ葉の質量を示す (Table 17)。ただし, 加熱式タバコにはタール及びニコチン量の表記はなかった。

喫煙装置は PAHs 分析で使用したのと同じものを使用し, 紙巻タバコについては, 主流煙及び副流煙をそれぞれ 50 mL の蒸留水 (LC/MS 用) 中に電動ポンプによりバブリングして捕集した (Fig. 7)。その他のポンプの流速や捕集時間については, 1-1-4 で示す PAHs 分析と同じである。

### 2-1-5 タバコ葉及び煙試料と毛髪試料の調製

タバコ葉試料は, 各種 1 本分のタバコ葉を共栓付き三角フラスコに入れて蒸留水 (LC/MS 用) 50 mL を加えて 30 分間超音波抽出を行った。その後, オートサンプラー用バイアルに抽出液 100 µL に内部標準混合液を 100 µL と蒸留水を加えて全量を 1 mL とした。

タバコ煙試料は, オートサンプラー用バイアルに捕集した主流煙及び副流煙の溶液 500 µL に内部標準混合液を 100 µL と蒸留水を加えて全量を 1 mL とした。

毛髪試料は, 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム溶液で洗浄したのち蒸留水ですすぎ, 最後にメタノールで洗浄して室温で乾燥させた。乾燥後の毛髪を数 mm に細切したのち共栓付き試験管に 5 mg を量り取り, 蒸留水を 100 µL, 内部標準混合溶液を 100 µL 加えて 80 °C で 30 分間加熱抽出を行った。その後, フィルター (孔径; 0.45 µm : 島津ジーエルシー) をろ過したろ液 100 µL に蒸留水を 400 µL を加え, 全量を 500 µL としてインチューブ SPME/LC-MS/MS 分析を行った。

Table 15 MS/MS 装置の分析条件

Compound	CAD	CUR	GS1	GS2	IS	TEM	DP	EP	CE	CXP
NNK	4	40	50	80	5000	600	50	10	15	5
NNN	4	40	50	80	5000	600	45	10	15	5
NAT	4	40	50	80	5000	600	45	10	15	5
NAB	4	40	50	80	5000	600	45	10	15	5
NNAL	4	40	50	80	5000	600	50	10	15	5
NNK-d <sub>3</sub>	4	40	50	80	5000	600	50	10	15	5
NNN-d <sub>4</sub>	4	40	50	80	5000	600	45	10	15	5
NAT-d <sub>4</sub>	4	40	50	80	5000	600	45	10	15	5
NAB-d <sub>4</sub>	4	40	50	80	5000	600	45	10	15	5
NNAL-d <sub>5</sub>	4	40	50	80	5000	600	50	10	15	5

CAD:Collision Gas (L/min), CUR:Curtain Gas (L/min), GS1:Ion Source Gas 1 (L/min), GS2:Ion Source Gas 2 (L/min), IS:Ion Spray Voltage (V), TEM:Temperature (°C), DP:Declustering Potential (V), EP:Entrance Potential (V), CE:Collision Energy (V), CXP:Collision cell Exit Potential (V)

Table 16 インチューブ SPME のプログラム

Sequence	Event	Switching valve	Vial	Draw/ejection		
				Cycle <sup>a)</sup>	Volume ( $\mu$ L)	Speed ( $\mu$ L/min)
1	Conditioning of the capillary	Load	MeOH	D/E (2)	40	200
2	Drawing of air into the capillary	Load	Empty	D (1)	50	200
3	Conditioning of the capillary	Load	Water	D/E (2)	40	200
4	Extraction of analytes into the capillary	Load	Sample	D/E (30)	40	200
5	Needle washing	Load	MeOH	D/E (1)	2	200
6	Desorption of analytes from the capillary	Inject	–	–	–	–
7	HPLC separation of analytes and return to sequence 1	Load	–	–	–	–

<sup>a)</sup> D: draw, E: ejection.

Table 17 使用した紙巻きタバコと加熱式タバコ

Samples	Manufacturer	Tar (mg/cigarette)	Nicotine (mg/cigarette)	Weight of tobacco leaf (g/cigarette)
Marlboro (Regular)	Philip Morris, USA	12	1.0	0.61
Marlboro (Menthol)	Philip Morris, USA	12	0.8	0.58
MEVIUS (Menthol)	JT, Japan	1	0.1	0.56
MEVIUS (Super light)	JT, Japan	6	0.5	0.58
MEVIUS (Original)	JT, Japan	10	0.8	0.61
IQOS (Marlboro, regular)	Philip Morris, USA	—	—	0.27
glo (KENT)	British-American Tobacco, USA	—	—	0.24
Ploom TECH (MEVIUS, regular)	JT, Japan	—	—	0.29

#### 2-1-6 アンケート調査

毛髪サンプルを提供いただく際にアンケート調査を行った。アンケート内容を 1-1-6 に記載された内容に新たに項目を追加した。Table 18 に追加した項目を示す。( ) 内は回答項目である。

Table 18 毛髪サンプル提供時の追加アンケート項目

- 
- ・1日の平均睡眠時間は？ (1.6時間以下 2.6-8時間 3.8時間以上)
  - ・ストレスを感じることはありますか？  
(1.全くない 2.時々ある 3.よくある 4.毎日ある)
  - ・生活環境でタバコ煙に曝露されることはありますか？  
(1.全くない 2.時々ある 3.よくある 4.毎日ある) (場所：\_\_\_\_\_)
  - ・生活環境でタバコ煙以外の煙に曝露されることはありますか？  
(1.全くない 2.時々ある 3.よくある 4.毎日ある) (場所：\_\_\_\_\_)
  - ・お茶を飲む頻度は？ (1.飲まない 2.時々飲む 3.よく飲む 4.毎日飲む)
  - ・糖質・炭水化物を摂取する頻度は？ (1.ほとんどない 2.少ない 3.普通 4.多い)
  - ・脂質・脂肪性食品を摂取する頻度は？ (1.ほとんどない 2.少ない 3.普通 4.多い)
  - ・香辛料 (胡椒, 唐辛子等) を使う頻度は？  
(1.ほとんどない 2.少ない 3.普通 4.多い) (主に摂取する香辛料：\_\_\_\_\_)
- 

#### 2-1-7 添加回収試験

タバコ煙試料及び毛髪試料について 2-1-5 で示した工程に基づき、添加回収試験を行った。タバコ煙については、タバコ煙試料液に NNK, NNN, NAT 及び NAB : 2 pg/mL または 20 pg/mL となるように標準混合溶液と内部標準混合溶液を添加した。

毛髪試料についても同様に毛髪試料に NNK, NNN, NAT 及び NAB が 2 pg/mg, NNAL が 20 pg/mg または NNK, NNN, NAT 及び NAB が 20 pg/mg, NNAL が 200 pg/mg となるように標準混合溶液と内部標準混合溶液を添加して加熱抽出を行った。その後、インチューブ SPME/LC-MS/MS により測定した。

## 2-2 結果

### 2-2-1 インチューブ SPME 条件の最適化[102]

インチューブ SPME 法の条件として、抽出用キャピラリーカラムの種類、吸入／吐出の回数及び吸入／吐出の速度について検討を行った。

抽出用キャピラリーカラムについて、Supel-Q PLOT (Divinylbenzene polymer; 0.32 mm I.D., 12  $\mu\text{m}$  : SUPELCO), Carboxen 1006 PLOT (Carbon molecular sieve; 0.32 mm I.D., 17  $\mu\text{m}$  : SUPELCO), CP-Sil 5CB (100% polydimethylsiloxane; 0.32 mm I.D., 5.0  $\mu\text{m}$  : VARIAN), CP-Sil 19CB (14% cyanopropyl-phenyl 86% polydimethylsiloxane; 0.32 mm I.D., 1.0  $\mu\text{m}$  : VARIAN), Quadrex 007-5 (5% phenyl polydimethylsiloxane; 0.32 mm I.D., 12.0  $\mu\text{m}$  : QUADREX) 及び CP-WAX 52CB (polyethylene glycol; 0.32 mm I.D., 1.2  $\mu\text{m}$  : VARIAN), の計 6 種類で検討を行った (各  $n=3$ )。Fig. 21 に示すように Supel-Q PLOT で良好な結果が得られたが、その他のキャピラリーカラムではほとんど抽出効果が認められなかった。Supel-Q PLOT は多孔性のポリマーであり、膜厚が大きいため吸着量が増えたものと考えられる。この結果より、Supel-Q PLOT をインチューブ SPME デバイスとして用いることにした。

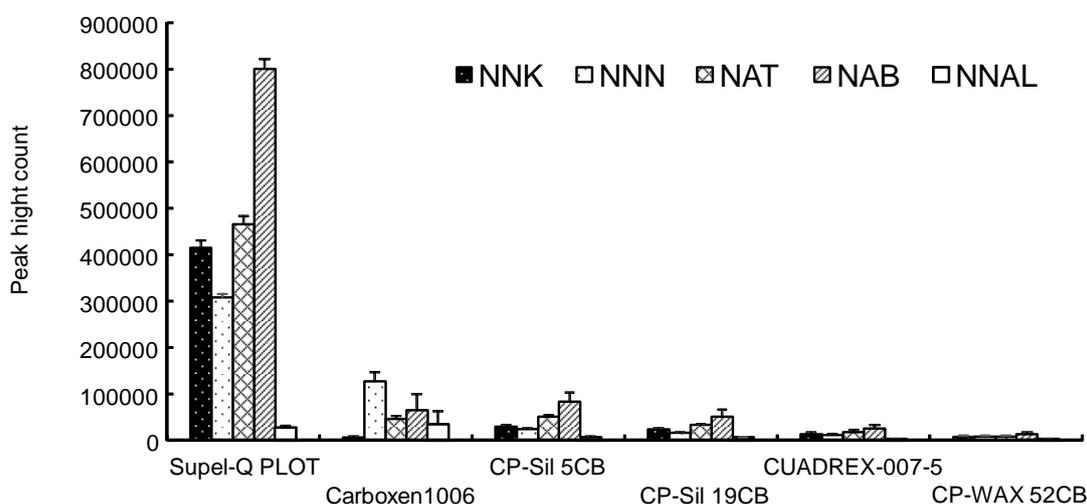


Fig 21 インチューブ SPME におけるキャピラリーカラムの検討

抽出時の速度を一定として抽出回数を 5, 10, 15, 20, 25, 30 及び 35 回で検討 (各  $n=3$ ) した結果、回数を多くするほど抽出効果は高くなったが、次第に頭打ちとなり、抽出に時間がかかる。このため、30 回のときに最も効率よく濃縮ができたため、抽出回数は 30 回とした (Fig. 22)。

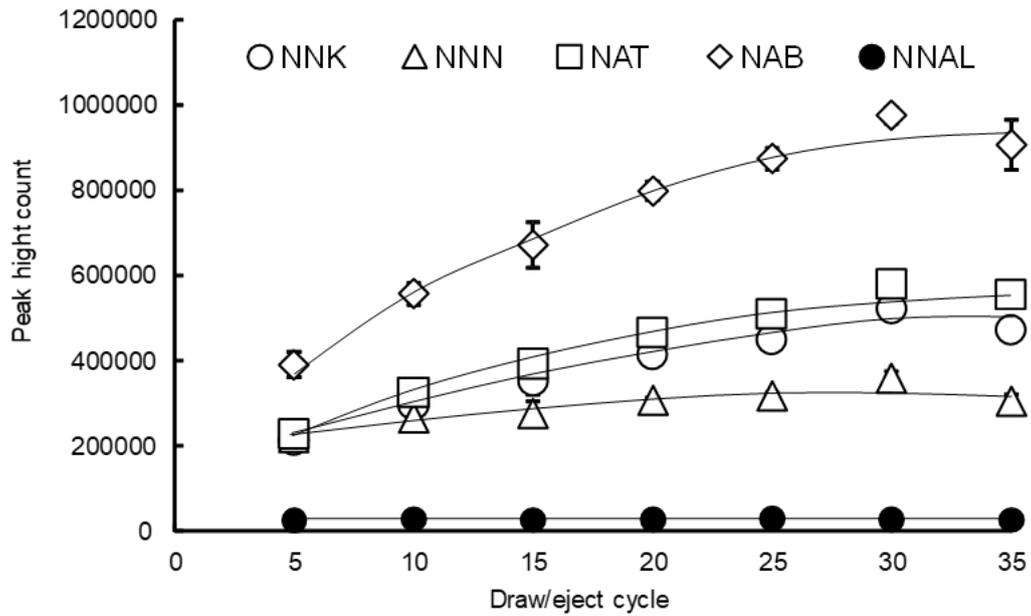


Fig. 22 インチューブ SPME における試料の吸入／吐出回数の検討の検討

抽出時の吸入／吐出の回数を一定として、その時の速度を 50, 100, 150, 200 及び 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  で検討 (各  $n=3$ ) した結果、200  $\mu\text{L}/\text{min}$  のときに最も効率よく濃縮ができたため、速度は 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。(Fig. 23)。

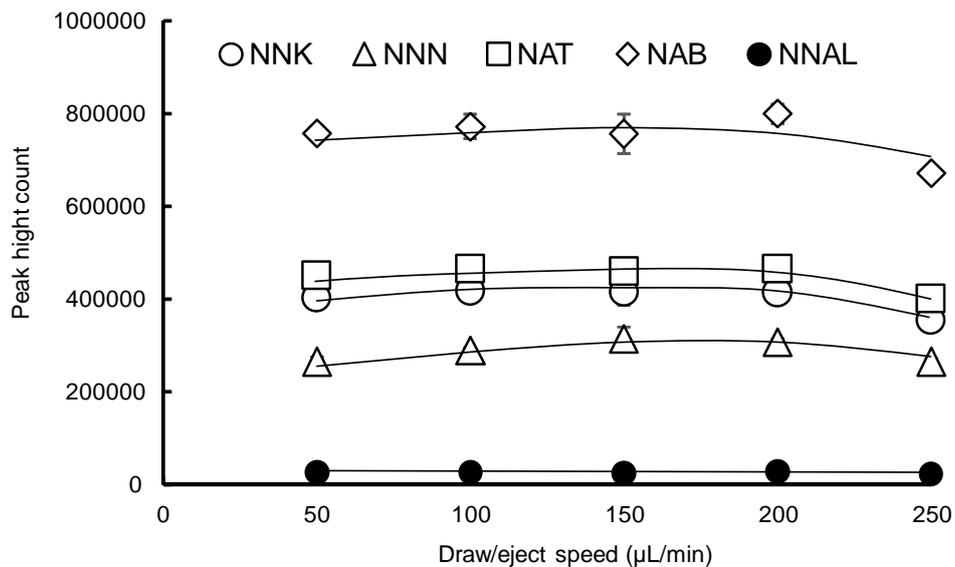


Fig. 23 インチューブ SPME における試料の吸入／吐出速度の検討

## 2-2-2 インチューブ SPME/LC-MS/MS 法による標準クロマトグラム

上記の最適化の結果からインチューブ SPME/LC-MS/MS 法を行った。Fig. 24 に示すように、分析対象 TSNA<sub>s</sub> 及びそれぞれの内部標準物質 5 種類は 5 分以内に良好なピークとして分離・検出できた。

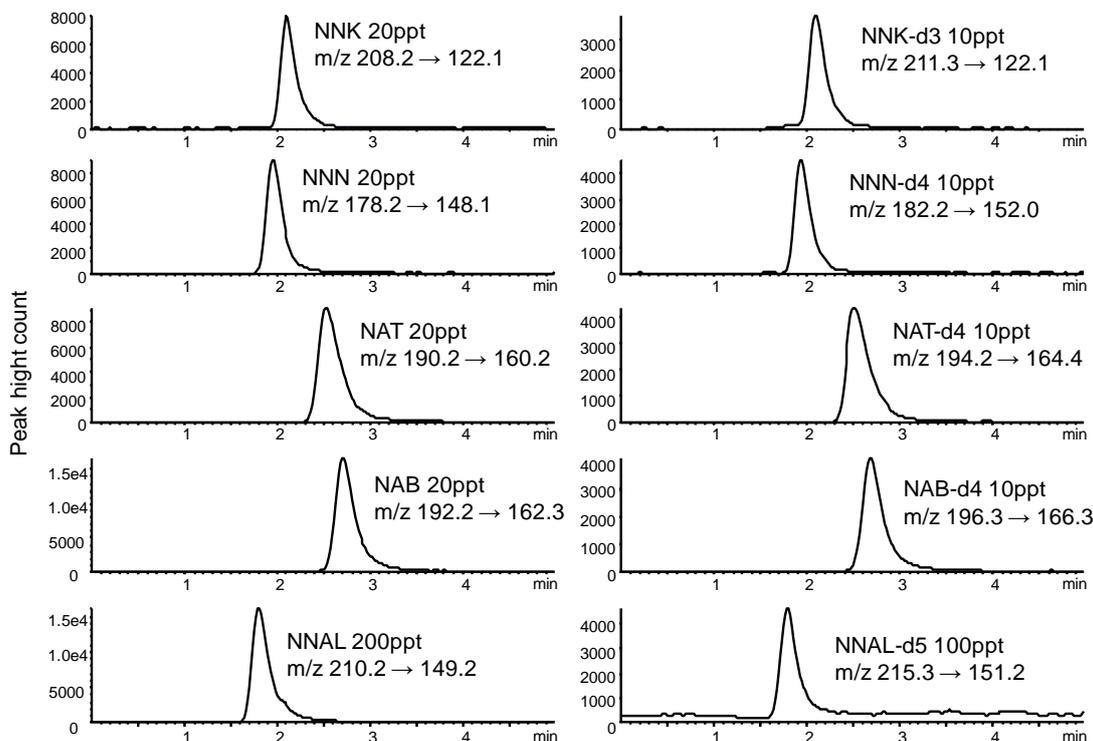


Fig. 24 TSNA<sub>s</sub> と内部標準物質の標準クロマトグラム

## 2-2-3 バリデーション

分析対象の各化合物について NNN, NNK, NAT 及び NAB は 0.5~100 pg/mL の範囲 (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 及び 100 pg/mL, 各  $n=3$ ), NNAL は 5~1000 pg/mL の範囲 (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 及び 1000 pg/mL, 各  $n=3$ ) で検量線を作成したところ、いずれの化合物でも相関係数が 0.9998 以上と良好な直線性を示した。また、再現性について、低濃度 (NNN, NNK, NAT 及び NAB : 2 pg/mL, NNAL : 20 pg/mL) と高濃度 (NNN, NNK, NAT 及び NAB : 20 pg/mL, NNAL : 200 pg/mL) で日内・日間変動 ( $n=5$ ) について測定したところ、いずれの化合物においても誤差 10%以内であった。1 ppb 溶液について直接注入法 (5  $\mu$ L inj) とインチューブ SPME 法について  $S/N=3$  として検出限界を算出したところ、0.024~1.14 pg/mL となり、直接注入法と比較して 11~51 倍の感度を得られた (Table 19)。Table 20 に示すように、本法と従来法と比較する

Table 19 インチューブ SPME/LC-MS/MS 法による TSNAs 分析のバリデーション

Compound	Linearity		LOD <sup>b)</sup> (pg/mL)		Concentration (pg/mL)	Precision (RSD <sup>c)</sup> %),	
	Range (pg/mL)	Correlation coefficient <sup>a)</sup>	Direct Injection	In-tube SPME		Intra-day	Inter-day
NNK	0.5—100	0.9999	1.0	0.049	2	3.6	6.4
					20	2.7	3.7
NNN	0.5—100	1.0000	1.8	0.040	2	7.3	9.2
					20	2.7	4.6
NAT	0.5—100	0.9999	1.1	0.024	2	4.4	5.2
					20	2.1	3.0
NAB	0.5—100	0.9998	3.5	0.068	2	3.1	8.0
					20	3.0	7.7
NNAL	5—1000	0.9999	12.9	1.14	20	4.2	7.6
					200	4.2	7.0

<sup>a)</sup>  $n = 24$ . <sup>b)</sup> Limits of detection (signal to noise ratio of 3). <sup>c)</sup> Relative standard deviation ( $n = 5$ ).

Table 20 これまでの TSNAs に関する分析法の比較

Analytes	Sample <sup>a)</sup>	Sample extraction <sup>b)</sup>	Analytical method <sup>c)</sup>	Linear range (ng/mL)	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/cig.)	Ref.
NNK, NNN, NNT, NAB	MS (CC)	SPE	GC/TEA	2–1000	–	103–213 <sup>e)</sup>	89
NNK, NNN, NAT, NAB	MS (CC)	LLE, SPE	GC-IT-MS/MS	5–6600	100–600	10–60	91
NNK, NNN, NAT, NAB	MS (CC)	LLE, SPE	GC-CI-MS/MS	0.5–200 <sup>d)</sup>	23–28 <sup>d)</sup>	77–93	93
NNK, NNN, NAT, NAB	MS (CC)	SPE	GPC-GC-MS/MS	2.00–200	30–230 <sup>d)</sup>	90–760	94
NNK, NNN, NAT, NAB	MS (CC, HTTP)	LLE	LC-MS/MS	–	–	179–650	36
NNK, NNN, NAT, NAB	MS (CC)	LLE	LC-MS/MS	1–200	3–21	–	95
NNK, NNN, NAT, NAB	MS (CC)	LLE, SPE	LC-MS/MS	0.05–50	0.2–2.0 <sup>d)</sup>	0.6–6.0	97
NNK, NNN, NAT, NAB	MS (CC)	SPE	LC-MS/MS	1–64	20–40 <sup>d)</sup>	66–132	98
NNAL	Hair	SPE, LLE, MISPE	LC-MS/MS	0.036–1.5 <sup>e)</sup>	0.08 <sup>e)</sup>	0.24 <sup>e)</sup>	104
NNN, NNK, NNAL	Hair	LLE	LC-MS/MS	0.063–50 <sup>e)</sup>	–	0.063–0.25 <sup>e)</sup>	105

<sup>a)</sup> MS; mainstream smoke; SS: sidestream smoke; SHS: secondhand smoke; CC: combustion cigarette; HTTP: heated tobacco products.

<sup>b)</sup> LLE: liquid-liquid extraction; SPE: solid-phase extraction; MISPE: molecularly imprinted solid-phase extraction.

<sup>c)</sup> TEA; thermal energy analysis, MS/MS: tandem mass spectrometry; IT: ion trap, CI: chemical ionization; GPC: gel permeation chromatography.

<sup>d)</sup> pg/cig.

<sup>e)</sup> pg/mg

と、GC/TEA や GC/MS を使用する手法よりも感度が高く、検出限界が低いことが認められた。また、これまでの LC-MS/MS での手法と同程度以上の感度であるという結果であった。どちらも測定までには煩雑な前処理を必要とし、GC では分析時間だけで約 30 分もかかるものもあるため、本法は簡便迅速に分析できると考えられる。

#### 2-2-4 添加回収試験

タバコ煙及び毛髪試料について、TSNAs の添加回収試験を各 3 回ずつ行った結果を Table 21 に示す。煙試料においては、回収率が低濃度で 87.8~103.2%、高濃度で 90.3~97.4%であった。毛髪試料では、低濃度で 94.0~98.4%、高濃度で 94.9~101.1%といずれも良好な回収率であった。

Table 21 タバコ煙試料及び毛髪試料における TSNAs の添加回収試験

Compound	Recovery (%), mean $\pm$ SD <sup>a)</sup>			
	Smoke		Hair	
	Low	High	Low	High
	concentration <sup>b)</sup>	concentration <sup>c)</sup>	concentration <sup>d)</sup>	concentration <sup>e)</sup>
NNK	87.8 $\pm$ 1.4	90.3 $\pm$ 5.4	96.1 $\pm$ 3.1	100.2 $\pm$ 1.7
NNN	102.5 $\pm$ 3.2	94.2 $\pm$ 1.2	97.4 $\pm$ 4.5	94.9 $\pm$ 4.1
NAT	97.1 $\pm$ 2.6	93.2 $\pm$ 0.4	98.4 $\pm$ 3.5	100.4 $\pm$ 1.1
NAB	103.2 $\pm$ 1.0	97.4 $\pm$ 0.4	96.5 $\pm$ 2.3	98.3 $\pm$ 1.0
NNAL	—	—	94.0 $\pm$ 4.1	101.1 $\pm$ 3.2

<sup>a)</sup> Standard deviation ( $n = 3$ ).

<sup>b)</sup> NNK, NNN, NAT, NAB: 2 pg/mL, NNAL: 20 pg/mL

<sup>c)</sup> NNK, NNN, NAT, NAB: 20 pg/mL, NNAL: 200 pg/mL

<sup>d)</sup> NNK, NNN, NAT, NAB: 2 pg/mg, NNAL: 20 pg/mg

<sup>e)</sup> NNK, NNN, NAT, NAB: 20 pg/mg, NNAL: 200 pg/mg

#### 2-2-5 タバコ葉試料中の TSNAs 含量

本法を使用して紙巻きタバコ 5 種類と加熱式タバコ 3 種類の葉試料中の TSNAs 含量を各 3 回ずつ測定した。Fig. 25 に MEVIUS (Original) 及び IQOS のクロマトグラムを示す。紙巻きタバコ葉中の TSNAs は、外国産タバコの Marlboro で、タバコ 1 本あた

り NNK が 264~301 ng, NNN が 559~739 ng, NAT が 322~447 ng 及び NAB が 24~41 ng 含まれていた。一方, 国内産タバコの MEVIUS は, タバコ 1 本あたり NNK が 93~147 ng, NNN が 205~298 ng, NAT が 194~318 ng 及び NAB が 11~17 ng 含まれていた。

加熱式タバコ葉中の TSNAs は, IQOS で, タバコ 1 本あたり NNK が 85 ng, NNN が 150 ng, NAT が 106 ng 及び NAB が 8 ng 含まれていた。また, glo は, NNK が 24 ng, NNN が 41 ng, NAT が 67 ng 及び NAB が 3 ng 含まれていた。さらに Ploom TECH は, NNK が 13 ng, NNN が 151 ng, NAT が 63 ng 及び NAB が 4 ng 含まれていた。紙巻きタバコ葉中の TSNAs と比較すると, glo の含量はかなり少なかったが, IQOS や Ploom TECH は MEVIUS (Menthol) の約 45~70%含まれていた (Fig. 26)。

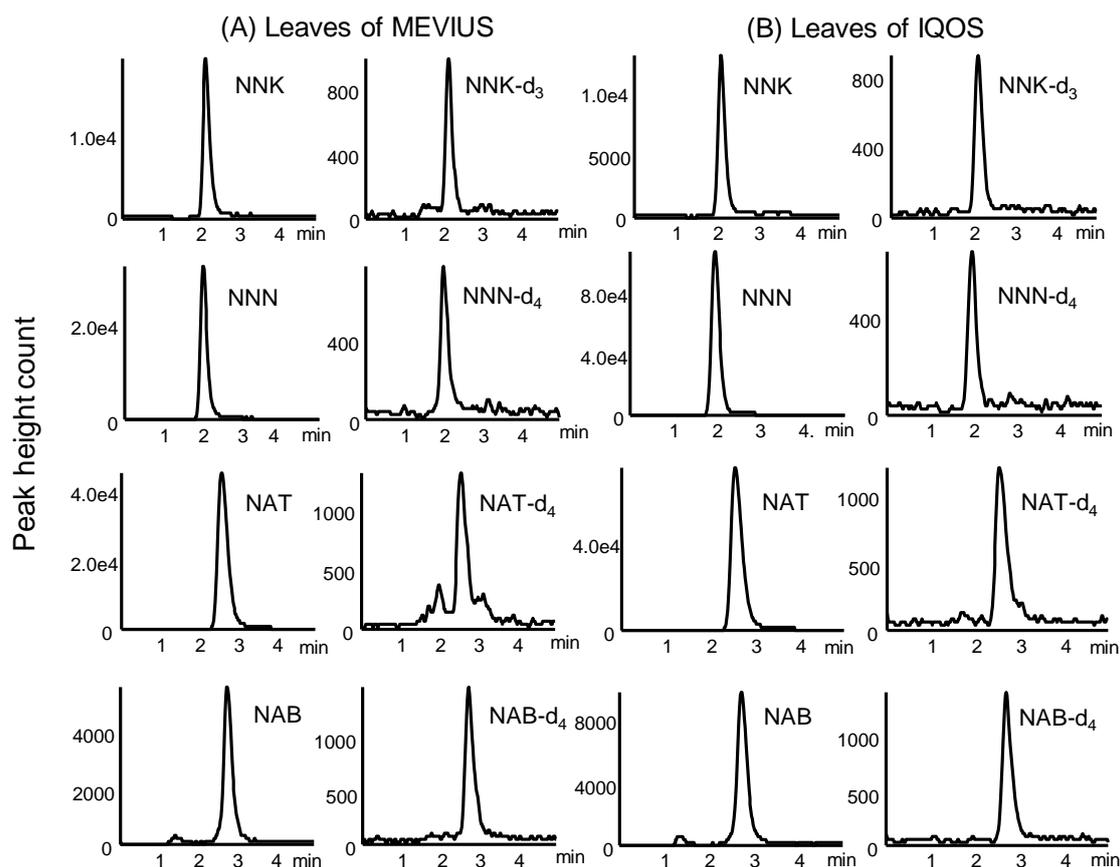


Fig. 25 タバコ葉試料から得られた TSNAs のクロマトグラム

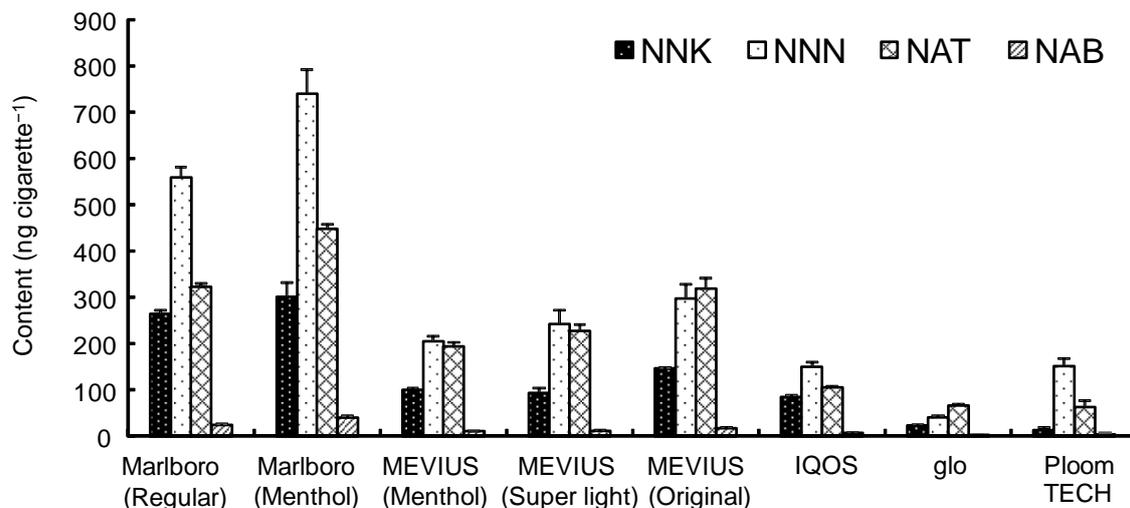


Fig. 26 各種タバコ 1 本あたりのタバコ葉中の TSNAs 含量

#### 2-2-6 タバコ煙試料中の TSNAs 含量

本法を使用して紙巻きタバコ 5 種類と加熱式タバコ 3 種類の煙試料中の TSNAs 含量を各 3 回ずつ測定した。Fig. 27 に MEVIUS (Original) の主流煙と副流煙及び IQOS の主流煙のクロマトグラムを示す。紙巻きタバコ主流煙中の TSNAs 含量は、外国産タバコの Marlboro で、タバコ 1 本あたり NNK が 4.0~6.3 ng, NNN が 4.1~5.8 ng, NAT が 3.7~3.8 ng 及び NAB が 0.56~0.59 ng 含まれていた。一方、国内産タバコの MEVIUS は、タバコ 1 本あたり NNK が 0.40~1.3 ng, NNN が 0.31~0.75 ng, NAT が 0.38~1.1 ng 及び NAB が 0.031~0.12 ng 含まれていた。

加熱式タバコ主流煙中の TSNAs 含量は、IQOS で、タバコ 1 本あたり NNK が 0.42 ng, NNN が 0.55 ng, NAT が 0.38 ng 及び NAB が 0.043 ng 含まれていた。また、glo は、タバコ 1 本あたり NNK のみが 0.18 ng 含まれており、その他 3 種類の TSNAs は検出限界以下であった。さらに Ploom TECH は、NNN が 0.16 ng 及び NAT が 0.09 ng 含まれており、NNK 及び NAB は検出されなかった。紙巻きタバコの主流煙中の TSNAs と比較すると、含量はかなり少なかったが、MEVIUS (Menthol) とほぼ同等量含まれていた (Fig. 28)。また、紙巻きタバコ副流煙中の TSNAs 含量を各 3 回ずつ測定したところ、外国産タバコの Marlboro は、タバコ 1 本あたり NNK が 2.7~4.6 ng, NNN が 1.6~2.3 ng, NAT が 0.90~1.4 ng 及び NAB が 0.28~0.30 ng 含まれていた。一方、国内産タバコの MEVIUS は、タバコ 1 本あたり NNK が 4.2~6.0 ng, NNN が 1.6



~1.9 ng, NAT が 0.74~1.5 ng 及び NAB が 0.17~0.39 ng 含まれていた。総 TSNA 含量を主流煙と副流煙に分けて比較すると、外国産の Marlboro では主流煙に多く、国内産の MEVIUS では副流煙に多く含まれていた (Fig. 29)。これまでの報告と比較すると、含有していた TSNA 含量は紙巻きタバコと加熱式タバコで同等量から 10 分の 1 ほど低い結果となった。これは煙試料の捕集方法の違いによるものと考えられる。捕集方法が異なることでタバコの火種にかかる温度に違いが生じるため、主流煙及び副流煙の組成が変わることに起因していると考えられる[97,106]。

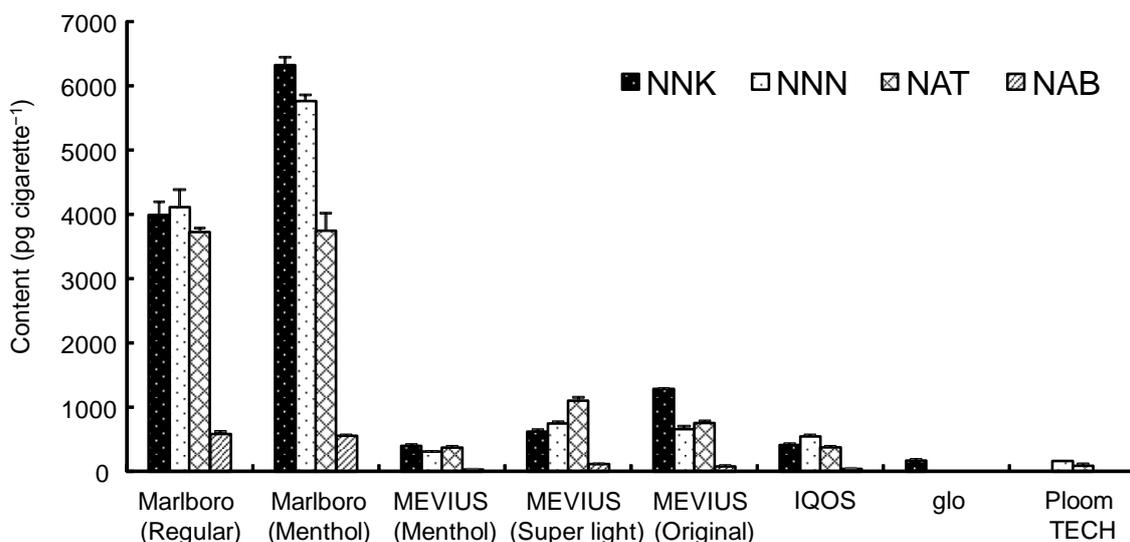


Fig. 28 各種タバコ 1 本あたりの主流煙中の TSNA 含量

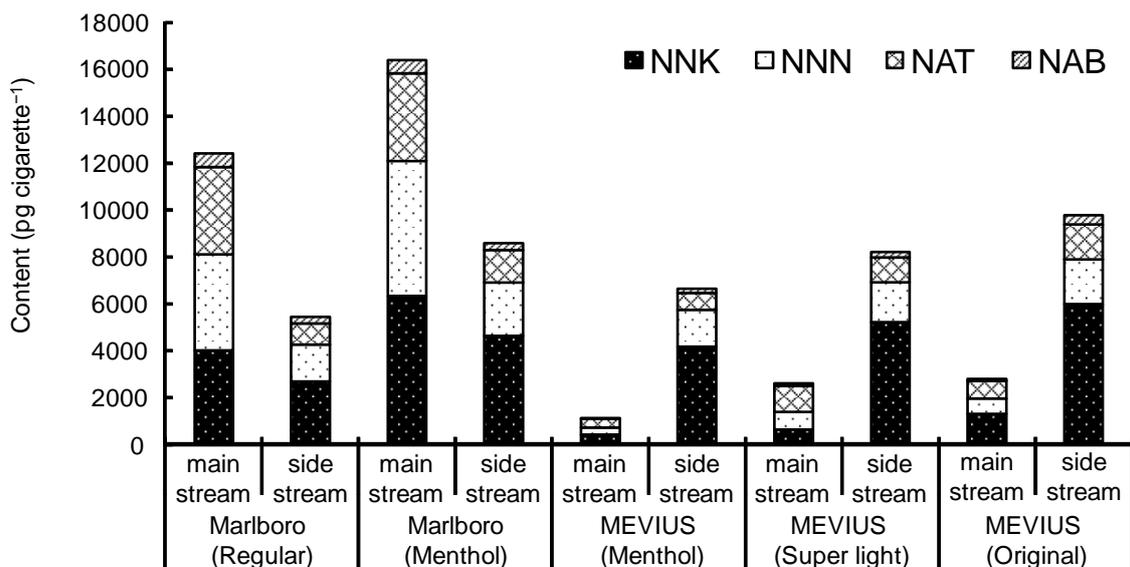


Fig. 29 各種紙巻きタバコ 1 本あたりのタバコ煙中の TSNA 含量の比較

### 2-2-7 毛髪試料中の TSNAs 含量測定

毛髪試料中の TSNAs 含量について各 3 回ずつ測定を行った。Fig. 30 に喫煙者と非喫煙者の毛髪試料から得られた TSNAs のクロマトグラムを示す。喫煙者（24 名）からは毛髪 1 mg あたり NNK が 0.05～4.11 pg, NNN が 0.12～4.69 pg, NAT が 0.03～0.32 pg 及び NAB が 0.05～1.03 pg 検出された。非喫煙者（29 名）からは NNK が 0.06～0.21 pg, NNN が 0.08～0.28 pg 検出され、NAT 及び NAB は検出されなかった。また、今回の測定では NNAL は喫煙者及び非喫煙者のどちらからも検出されなかった（Fig. 31）。これらのことより、喫煙者と非喫煙者を比較すると、喫煙者から多くの TSNAs が検出される結果となった。これまでの報告と比較すると、NNK 及び NNN は喫煙者及び非喫煙者ともにばらつきはあるものの報告されてきている値と同じような結果となった[104,105]。NNK や NNN は長期的に毛髪蓄積して、ごくわずかなサンプル量でも測定可能であることがわかった。

また、アンケート調査をした非喫煙者（14 名）のうちで『生活環境でタバコ煙に曝露されることがありますか?』という項目に対して、『毎日ある』と答えた人（2 名）の毛髪どちらからも TSNAs が検出され、『よくある、時々ある』と回答した人（8 名）の毛髪からは 1 人のみ TSNAs が検出された。さらに『全くない』と回答した人（4 名）の毛髪からは TSNAs は検出されなかった（Table. 22）。これにより、生活の中でほぼ毎日タバコの煙に曝露されている人は、受動喫煙により生体内に TSNAs が蓄積されていることが考えられる。このことより TSNAs が受動喫煙のバイオマーカーとして有用であると言える。

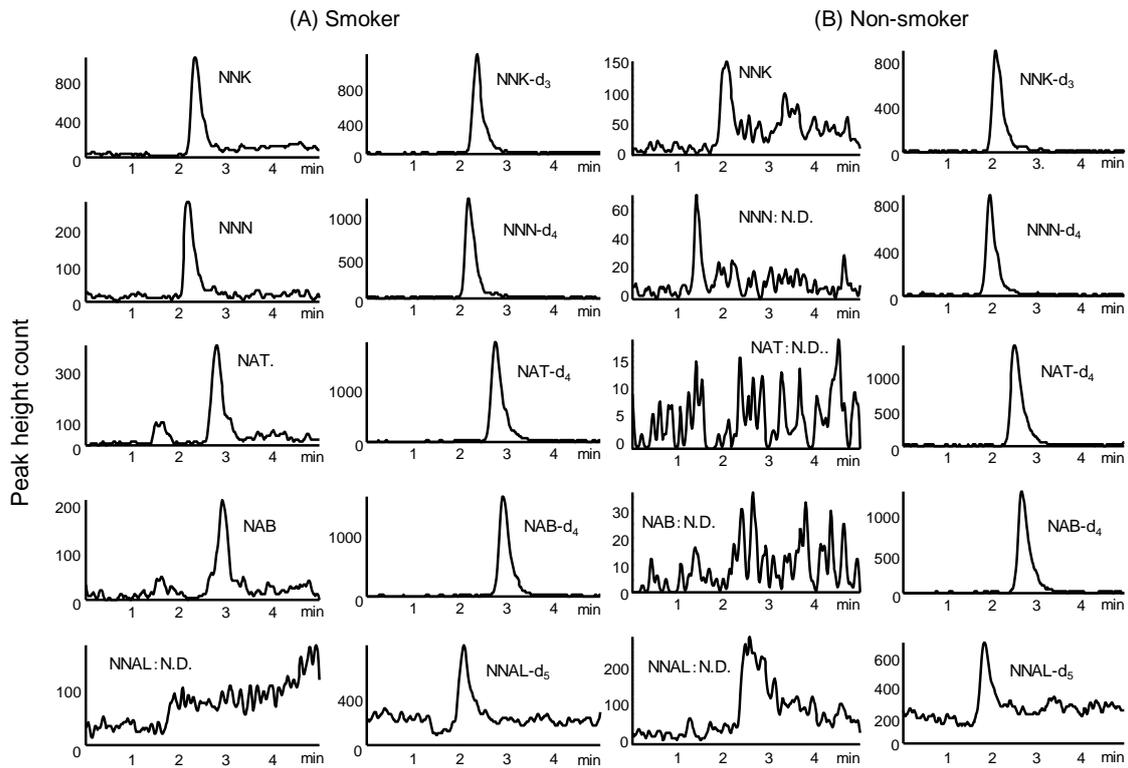


Fig. 30 毛髪試料から得られた TSNAs のクロマトグラム

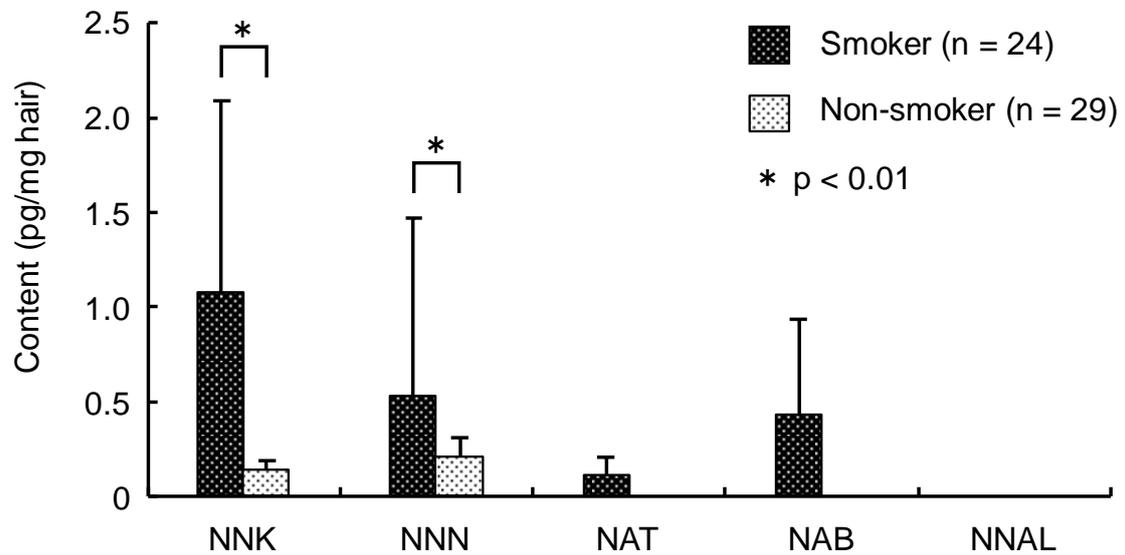


Fig. 31 喫煙者と非喫煙者の毛髪試料中の TSNAs 含量の分布

Table. 22 非喫煙者におけるタバコ煙の曝露の頻度と TSNAs 含量

Non-smoker	Contents (pg/mg hair) / Mean $\pm$ SD <sup>1)</sup>				
	NNK	NNN	NAT	NAB	NNAL
毎日あると答えた非喫煙者 ( $n = 2$ )					
A	< LOD <sup>2)</sup>	0.28 $\pm$ 0.04	N.D. <sup>3)</sup>	N.D.	N.D.
B	0.21 $\pm$ 0.03	< LOD	N.D.	N.D.	N.D.
よくある・時々あると答えた非喫煙者 ( $n = 8$ )					
C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F	< LOD	0.23 $\pm$ 0.3	N.D.	N.D.	N.D.
G	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
H	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
J	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
全くないと答えた非喫煙者 ( $n = 4$ )					
K	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
L	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
N	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

<sup>1)</sup> Standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>2)</sup> Limit of detection. <sup>3)</sup> Not detectable.

## 結論

本研究では PAHs と TSNAs の簡便かつ迅速な分析システムの開発を目的として、GC 用キャピラリーカラムを抽出デバイスとしたインチューブ SPME 法を最適化し、HPLC-FLD 及び LC-MS/MS と連結させたオンライン自動分析システムを構築した。また、本法を用いて、タバコ葉及び煙試料、さらに毛髪試料分析に応用し、それらの PAHs と TSNAs 曝露からの能動喫煙及び受動喫煙との関連について解析した。

### I. 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の分析

17 種類の PAHs は、試料中のメタノール含量を 20% として、インチューブ SPME 法により、試料 40  $\mu\text{L}$  を 150  $\mu\text{L}/\text{mL}$  の速度で 20 回繰り返し吸入/吐出をするとき、いずれの化合物も効率よく抽出でき、HPLC-FLD により 15 分以内に良好なピークとして分離・検出できた。また、検量線は 0.02~1  $\text{ng}/\text{mL}$  の範囲において相関係数が 0.9979 以上となり、いずれも良好な直線性を示した。さらに、検出限界値は 0.88~46  $\text{pg}/\text{mL}$  であり、直接注入 (5  $\mu\text{L}$ ) 法と比較して 17~44 倍の感度であった。

タバコ葉試料からは 1 本あたり 40.8~1362.4  $\text{ng}$ 、煙試料からは 11.0~498.9  $\text{ng}$  の PAHs が検出され、各種タバコの加熱温度が高いものほどより多くの PAHs が含まれていることがわかった。

毛髪試料からは非喫煙者 (総 PAHs : 1065  $\text{pg}/\text{mg}$ ) よりも喫煙者 (総 PAHs : 1383  $\text{pg}/\text{mg}$ ) で含量が多く、Nap, Ant 及び BaP について有意な差が認められた。また、アンケートにより生野菜をよく摂取している非喫煙者は、他の調理法で野菜を摂取している非喫煙者よりも PAHs 含量が低く、Flu, Phe 及び Flt で有意な差が認められた。

### II. タバコ特異的ニトロソアミン類 (TSNAs) の分析

5 種類の TSNAs は、最適化したインチューブ SPME 法により、試料 40  $\mu\text{L}$  を 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  の速度で 30 回繰り返し吸入/吐出をするとき、いずれの化合物も効率よく抽出でき、LC-MS/MS により 5 分以内に良好なピークとして分離・検出できた。また、検量線は NNN, NNK, NAT 及び NAB は 0.5~100  $\text{pg}/\text{mL}$ 、NNAL は 5~1000  $\text{pg}/\text{mL}$  の範囲で相関係数は 0.9998 以上となり、いずれも良好な直線性を示した。さらに、検出限界値は 0.024~1.14  $\text{pg}/\text{mL}$  であり、直接注入 (5  $\mu\text{L}$ ) 法と比較して 11~51 倍の感度であった。

タバコ葉試料からは、1本あたり紙巻きタバコで510.0~1529.0 ng、加熱式タバコで133.9~347.4 ngのTSNAsが検出された。一方、煙試料からは、1本あたり紙巻きタバコで1.12~16.4 ng、加熱式タバコで0.176~1.34 ngのTSNAsが検出され、有害物質が少ないとされる加熱式タバコからも、紙巻きタバコと一部同程度のTSNAsが検出された。

また、毛髪試料からは非喫煙者（総TSNAs：0.4 pg/mg）よりも喫煙者（総TSNAs：2.1 pg/mg）で含量が多く、非喫煙者からのアンケートで『生活環境でタバコ煙に曝露されることがありますか？』という項目に対して、『毎日ある』と答えた2人のどちらからもTSNAsが検出され、『よくある、時々ある』と回答した8人中1人のみTSNAsが検出された。さらに『全くない』と回答した4人からはTSNAsは検出されなかった。これにより、TSNAsが受動喫煙のバイオマーカーとして有用であり、生活の中でほぼ毎日タバコの煙に曝露されている人は、受動喫煙により生体内にTSNAsが蓄積されていることが考えられる。

以上より、本研究で開発したインチューブ SPME/HPLC-FLD 法及びインチューブ SPME/LC-MS/MS 法は、有機溶媒をほとんど必要とせず、これまでの煩雑で長時間を要していた試料前処理を、キャピラリーカラム内の固定相により簡単に抽出・濃縮して分析することが可能である。本法を用いれば、サンプリングから試料中の目的成分の抽出、濃縮、クロマトグラフィーへの導入、分離、検出、データ解析までをオンラインで自動化できるため、分析作業の効率化、省力化や分析コストの削減などが可能であり、簡便かつ迅速にPAHs及びTSNAsを高感度分析できる。現在、健康増進法の改正により政府は、2020年4月1日から特定場所以外での喫煙を全面禁止とし、受動喫煙防止対策が講じられることになっている。それほど受動喫煙による健康被害に対する社会の関心が高い証拠であると言える。本研究結果より、毛髪中PAHsに関しては受動喫煙との関連性を判断することはできなかったが、PAHs曝露を評価する手法としては有用であると考えられる。一方、毛髪中TSNAsはPAHsより含量は少ないが、受動喫煙の影響を的確に判断・評価するための有用なバイオマーカーであることがわかった。本研究で開発した手法が今後PAHs及びTSNAsの安全性やリスク評価、受動喫煙による健康被害を防止する上で、大きく寄与できると期待される。

## 参考文献

- [1] WHO Global Report Mortality Attributable to Tobacco: World Health Organization, (2012).
- [2] M. Oberg, MS. Jaakkola, A. Woodward, A. Peruga, A. Pruss-Ustun, Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet* **377**, 139-46 (2011).
- [3] Tobacco Fact sheet: World Health Organization, (2016).
- [4] N. Ikeda, M. Inoue, H. Iso, S. Ikeda, T. Satoh, M. Noda, et al., Adult mortality attributable to preventable risk factors for non-communicable diseases and injuries in Japan: a comparative risk assessment. *PLoS Med* **9**, e1001160 (2012).
- [5] K. Katanoda, T. Marugame, K. Saika, H. Satoh, K. Tajima, T. Suzuki, et al., Population attributable fraction of mortality associated with tobacco smoking in Japan: a pooled analysis of three large-scale cohort studies. *J Epidemiol* **18**, 251-64 (2008).
- [6] Y. Murakami, K. Miura, T. Okamura, H. Ueshima, Group E-JR., Population attributable numbers and fractions of deaths due to smoking: a pooled analysis of 180,000 Japanese. *Prev Med* **52**, 60-5 (2011).
- [7] 片野田耕太. 厚生労働科学研究費補助金「タバコ対策の健康影響および経済影響の包括的評価に関する研究」平成27年度報告書, (2016).
- [8] The Health Consequences of Smoking - 50 Years of Progress A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, (2014).
- [9] Smoking and Health: Report of the Advisory Committee of the Surgeon General of the Public Health Service, (1964).
- [10] The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. In: Service USPH, ed. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, (2004).
- [11] The Health Consequences of Involuntary Smoking. In: Service USPH, ed. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention,

- Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, (1986).
- [12] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 38, Tobacco Smoke. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, (1986).
- [13] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 83, Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, (2004)
- [14] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 89, Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, (2007)
- [15] WHO Technical Report Series 916. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO Expert Consultation. World Health Organization, Geneva, (2003).
- [16] 「科学的根拠に基づく発がん性・がん予防効果の評価とがん予防ガイドライン提言に関する研究」
- [17] 健康日本 21. [http://www1.mhlw.go.jp/topics/kenko21\\_11/top.html](http://www1.mhlw.go.jp/topics/kenko21_11/top.html)
- [18] 厚生労働省. 健康増進法の一部を改正する法律（平成 30 年法律第 78 号） 概要
- [19] 厚生労働省. 平成 11－12 年度タバコ煙の成分分析について（概要）.
- [20] J. Barnoya, A. Navas-Acien, Protecting the world from secondhand tobacco smoke exposure: where do we stand and where do we go from here? *Nicotine Tob. Res.* **15**, 789-804 (2013).
- [21] A. Dunbar, W. Gotsis, W. Frishman, Second-hand tobacco smoke and cardiovascular disease risk: an epidemiological review, *Cardiol. Rev.* **21**, 94-100 (2013).
- [22] M. Hori, H. Tanaka, K. Wakai, S. Sasazuki, K. Katanoda, Secondhand smoke exposure and risk of lung cancer in Japan: a systematic review and metaanalysis of epidemiologic studies, *Jap. J. Clin. Oncol.* **46**, 942-951 (2016).
- [23] A. Rodgman, TA. Perfetti, Alphabetical Component Index. In: The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke Second Edition. A. Rodgma, TA. Perfetti, editors. Boca Raton, FL: *CRC Press*, xxix–xciii (2013).
- [24] Q. Hu, H. Hou, Tobacco Smoke Exposure Biomarkers, Boca Raton, FL; *CRC Press*, (2015).

- [25] R. Talhout, T. Schulz, E. Florek, J. van Benthem, P. Wester, A. Opperhuizen, Hazardous compounds in tobacco smoke, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8**, 613-628 (2011).
- [26] E. Konstantinou, F. Fotopoulou, A. Drosos, N. Dimakopoulou, Z. Zagoriti, A. Niarchos, D. Makrynioti, D. Kouretas, K. Farsalinos, G. Lagoumintzis, K. Poulas, Tobacco-specific nitrosamines: a literature review, *Food Chem. Toxicol.* **118**, 198-203 (2018).
- [27] FDA: Harmful and potentially harmful constituents in tobacco products and tobacco smoke; Established List, (2012).
- [28] World Health Organization. Work in progress in relation to Articles 9 and 10 of the WHO FCTC. FCTC/COP/6/14, (2014).
- [29] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100E, Smokeless Tobacco, Lyon, France, (2012).
- [30] K. Schaller, U. Nair, S. Kahnert, M. Pötschke-Langer, Snus, a harmful tobacco product, (2010)
- [31] K. Bekki, S. Uchiyama, K. Ohta, Y. Inaba, H. Nakagome, N. Kunugita, Carbonyl compounds generated from electronic cigarettes, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **11**, 11192-200 (2014).
- [32] RP. Jensen, W. Luo, JF. Pankow, RM. Strongin, DH. Peyton, Hidden formaldehyde in e-cigarette aerosols, *N. Engl. J. Med.* **372**, 392-4 (2015).
- [33] S. Uchiyama, Y. Senoo, H. Hayashida, Y. Inaba, H. Nakagome, N. Kunugita, Determination of Chemical Compounds Generated from Second-generation E-cigarettes Using a Sorbent Cartridge Followed by a Two-step Elution Method. *Anal. Sci.* **32**, 549-55 (2016).
- [34] T. Cheng, Chemical evaluation of electronic cigarettes, *Tobac. Contr.* **23** (Suppl2) ii11-ii17 (2014).
- [35] E. Yalcin, S. de la Monte, Tobacco nitrosamines as culprits in disease: mechanisms reviewed, *J. Physiol. Biochem.* **72**, 107-120 (2016).
- [36] G. Jaccard, A. Kondylis, I. Gunduz, J. Pijnenburg, M. Belushkin, Investigation and comparison of the transfer of TSNA from tobacco to cigarette mainstream smoke and to the aerosol of a heated tobacco product, THS2.2. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **97**, 103-109 (2018).
- [37] C.L. Arthur and J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica fibers, *Anal. Chem.* **62**, 2145-2148 (1990).

- [38] R. Eisert and J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* **69**, 3140-3147 (1997).
- [39] H. Kataoka, K. Saito, Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. *Bioanalysis*. **4**, 809-832 (2012).
- [40] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review, *Anal. Chim. Acta.* **655**, 8-29 (2009).
- [41] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martinez, In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: Improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. *J. Chromatogr. A.* **1217**, 2695-2702 (2010).
- [42] H. Kataoka, Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses. *Anal. Sci.* **27**, 893-905 (2011).
- [43] H. Kataoka, K. Saito, Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. *Bioanalysis*. **4**, 809-832 (2012).
- [44] ME. Queiroz, LP. Melo, Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: a review. *Anal. Chim. Acta.* **826**, 1-11 (2014).
- [45] Y. Moliner-Martinez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **71**, 205-213 (2015).
- [46] H. Kataoka, A. Ishizaki, K. Saito, Solid-phase microextraction for pharmaceutical and biomedical analysis. *Anal. Methods* **8**, 5773-5788 (2016).
- [47] H. Kataoka, A. Ishizaki, K. Saito, Online automated micro sample preparation for high-performance liquid chromatography. in *Chromatography-Separation, Identification and Purification Analysis*, Edited by N. Awwad, (InTech, Croatia), Chapter 9, 161-184 (2019).
- [48] A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* **1217**, 5555-5563 (2010).
- [49] A. Ishizaki, K. Saito, H. Kataoka, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons

- contamination in tea products and crude drugs. *Anal. Methods* **3**, 299-305 (2011).
- [50] K. Saito, R. Ikeuchi, H. Kataoka, Determination of ochratoxins in nuts and grain samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1220**, 1-6 (2012).
- [51] TT. Wang, YH. Chen, JF. Ma, MJ. Hu, Y. Li, JH. Fang, HQ. Gao, A novel ionic liquid-modified organic-polymer monolith as the sorbent for in-tube solid-phase microextraction of acidic food additives. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 4955-4963 (2014).
- [52] MA. Andrade, FM. Lanças, Determination of Ochratoxin A in wine by packed in-tube solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1493**, 41-48 (2017).
- [53] H. Kataoka, H. Shiba, K. Saito, Automated analysis of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in environmental water samples by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **4**, 1513-1518 (2012).
- [54] F. Tan, C. Zhao, L. Li, M. Liu, X. He, J. Gao, Graphene oxide based in-tube solid-phase microextraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of triazine herbicides in water. *J. Sep. Sci.* **38**, 2312-2319 (2015).
- [55] X. Wang, L. Pan, J. Feng, Y. Tian, C. Luo, M. Sun, Silk fiber for in-tube solid-phase microextraction to detect aldehydes by chemical derivatization. *J. Chromatogr. A.* **1522**, 16-22 (2017).
- [56] J. Feng, X. Wang, Y. Tian, Y. Bu, C. Luo, M. Sun, Electrophoretic deposition of graphene oxide onto carbon fibers for in-tube solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* **1517**, 209-214 (2017).
- [57] J. Pang, M. Mei, D. Yuan, X. Huang, Development of on-line monolith-based in-tube solid phase microextraction for the sensitive determination of triazoles in environmental waters. *Talanta* **184**, 411-417 (2018).
- [58] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review, *Anal. Chem. Acta.* **655**, 8-29 (2009).
- [59] H. Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 339-364 (2010).

- [60] K. Saito, K. Yagi, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52**, 727–733 (2010).
- [61] R. Yasuhara, K. Ehara, K. Saito, H. Kataoka, Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **4**, 3625-3630 (2012).
- [62] H. Kataoka, K. Ehara, R. Yasuhara, K. Saito, Simultaneous determination of testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in saliva by stable isotope dilution on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 331-40 (2013).
- [63] H. Kataoka, T. Inoue, K. Saito, H. Kato, K. Masuda, Analysis of heterocyclic amines in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **786**, 54-60 (2013).
- [64] H. Kataoka, T. Inoue, N. Ikekita, K. Saito, Development of exposure assessment method based on the analysis of urinary heterocyclic amines as biomarkers by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 2171-2178 (2014).
- [65] K. Mizuno, H. Kataoka, Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress bio marker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **112**, 36-42 (2015).
- [66] Y. Yamamoto, A. Ishizaki, H. Kataoka, Biomonitoring method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in hair by online in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1000**, 187-191 (2015).
- [67] H. Kataoka, K. Mizuno, E. Oda, A. Saito, Determination of the oxidative stress biomarker urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1019**, 140-146 (2016).
- [68] A. Ishizaki, A. Uemura, H. Kataoka, A sensitive method to determine melatonin in saliva by

- automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with stable isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **9**, 3134-3140 (2017).
- [69] MG. Santos, IMC. Tavares, AF. Barbosa, J. Bettini, EC. Figueiredo, Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification, *Talanta* **163**, 8-16 (2017).
- [70] A. Saito, M. Hamano, H. Kataoka, Simultaneous analysis of multiple urinary biomarkers for the evaluation of oxidative stress by automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with negative/positive ion-switching mode liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **41**, 2743-2749 (2018).
- [71] T. Inukai, S. Kaji, H. Kataoka, Analysis of nicotine and cotinine in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as biomarkers of exposure to tobacco smoke. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **156**, 272-277 (2018).
- [72] T. Wenzl, R. Simon, J. Kleiner, E. Anklam, Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment need for new food legislation in the European Union, *Trends Anal. Chem.* **25**, 716-725 (2006).
- [73] H. Böhm, H. Jander, PAH formation in acetylene-benzene pyrolysis, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 3775-3781 (1999).
- [74] CW. Bauschlicher Jr, A. Ricca, Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) growth, *Chem. Phys. Lett.* **326**, 283-287 (2000).
- [75] A. Dipple, CA. Bigger, Mechanism of action of food-associated polycyclic aromatic hydrocarbons, *Mutat. Res.* **259**, 263-276 (1991)
- [76] T. Shimada, Y. Fujii-Kuriyama, Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1, *Cancer Sci.* **95**, 1-6 (2004).
- [77] T. Shimada, Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **21**, 257-276 (2006).
- [78] RH. Stadler and DR. Lineback, *Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*, **245** John Wiley & Sons, Inc. (2009).
- [79] DL. Diggs, AC. Huderson, KL. Harris, JN. Myers, LD. Banks, PV. Rekhadevi, MS. Niaz, A.

- Ramesh, Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: *a perspective*, *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol.Rev.* **29**, 324–357 (2011).
- [80] GC. Bandeira, HE. Meneses (Eds.), Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Chemistry, Occurrence and Health Issues, *Nova Science Publishers Inc.* (2013).
- [81] IW. Jarvis, K. Dreij, A. Mattsson, B. Jernstrom, U. Stenius, Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment, *Toxicology* **321**, 27–39 (2014).
- [82] HW. Hagedorn, G. Scherer, J. Engl, K. Riedel, F. Cheung, G. Errington, J. Shepperd, M. McEwan, Urinary excretion of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in nonsmokers and in smokers of cigarettes with different ISO tar yields, *J. Anal. Toxicol.* **33**, 301–309 (2009).
- [83] G. St Helen, ML. Goniewicz, D. Dempsey, M. Wilson, P. 3rd. Jacob, NL. Benowitz, Exposure and kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cigarette smokers, *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 952–964 (2012).
- [84] A. Toriba, Y. Kuramae, T. Chetiyankornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa, Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human hair by HPLC with fluorescence detection: a biological monitoring method to evaluate the exposure to PAHs, *Biomed. Chromatogr.* **17**, 126–132 (2003).
- [85] W. Wang, MJ. Huang, CY. Chan, KC. Cheung, MH. Wong, Risk assessment of non-dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) via house PM<sub>2.5</sub>, TSP and dust and the implications from human hair, *Atmos. Environ.* **73**, 204-213 (2013).
- [86] B. Wang, Z. Li, Y. Ma, X. Qiu, A. Ren, Association of polycyclic aromatic hydrocarbons in housewives' hair with hypertension, *Chemosphere* **153**, 315-321 (2016).
- [87] RA. Anderson, MJ. Kasperbauer, HR. Burton, JL. Hamilton, EE. Yoder, Changes in chemical composition of homogenized leaf-cured and air-cured burley tobacco stored in controlled environments, *J. Agri. Food Chem.* **30**, 663-668 (1982).
- [88] RJ. Chen, LW. Chang, P. Lin, YJ. Wang, Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: an overview. *J. Oncol.* 654931 (2011).
- [89] ME. Counts, FS. Hsu, SW. Laffoon, RW. Dwyer, RH. Cox, Mainstream smoke constituent yields and predicting relationships from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO

- smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **39**, 111-134 (2004).
- [90] Evaluation of functional relationships for predicting mainstream smoke constituent machine yields for conventional cigarettes from the Japanese market. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **48**, 194-224 (2007).
- [91] J. Zhou, R. Bai, Y. Zhu, Determination of four tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 4086-4092 (2007).
- [92] M. Sleiman, R.L. Maddalena, L.A. Gundel, H. Destailats, Rapid and sensitive gas chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry method for the determination of tobacco-specific N-nitrosamines in secondhand smoke, *J. Chromatogr. A* **1216**, 7899-7905 (2009).
- [93] D. Wu, Y. Lu, H. Lin, W. Zhou, W. Gu, Selective determination of tobacco specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by GC coupled to positive chemical ionization triple quadrupole MS, *J. Sep. Sci.* **36**, 2615-2620 (2013).
- [94] YB. Luo, XJ. Chen, HF. Zhang, XY. Jiang, X. Li, XY. Li, FP. Zhu, YQ. Pang, HW. Hou, Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and tobacco-specific N-nitrosamines in mainstream cigarette smoke using in pipette-tip solid-phase extraction and on-line gel permeation chromatography-gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1460**, 16-23 (2016).
- [95] W. Xiong, H. Hou, X. Jiang, G. Tang, Q. Hu, Simultaneous determination of four tobacco-specific N-nitrosamines in mainstream smoke for Chinese Virginia cigarettes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and validation under ISO and "Canadian intense" machine smoking regimes, *Anal. Chim. Acta* **674**, 71-78 (2010).
- [96] K. Sugiyama, Y. Inaba, T. Ohkubo, S. Uchiyama, Y. Takagi, N. Kunugita, Determination of tobacco-specific N'-nitrosamines in mainstream smoke from Japanese cigarettes, *Nihon Eiseigaku Zasshi* **67**, 423-430 (2012).
- [97] J. Zhang, R. Bai, X. Yi, Z. Yang, X. Liu, J. Zhou, W. Liang, Fully automated analysis of four tobacco-specific N-nitrosamines in mainstream cigarette smoke using two-dimensional online solid phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* **146**, 216-224 (2016).

- [98] X. Zhang, R. Wang, L. Zhang, Y. Ruan, W. Wang, H. Ji, F. Lin, J. Liu, Simultaneous determination of tobacco minor alkaloids and tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke by dispersive solid-phase extraction coupled with ultraperformance liquid chromatography/tandem orbitrap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **32**, 1791-1798 (2018)
- [99] JE. Tarrant, K. Mills, C. Williard, Development of an improved method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream tobacco smoke. *J Chromatogr A.* **1216** (12), 2227-34 (2009).
- [100] E. Sepetdjian, A. Shihadeh, NA. Saliba, Measurement of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in narghile waterpipe tobacco smoke. *Food Chem Toxicol.* **46** (5), 1582-90 (2008).
- [101] 鳥羽陽, 本間千春, 宇於崎和香, Thanyarat CHUESAARD, 唐寧, 早川和一, 蛍光検出 HPLC を用いるタバコ煙粒子中多環芳香族炭化水素の定量. *分析化学* **63** 巻 1 号 p. 23-29 (2014).
- [102] PM. Santos, MN. Sánchez, JLP. Pavón, BM. Cordero, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in human biological samples: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **113**, 194-209 (2019).
- [103] A. Ishizaki, H. Kataoka, A sensitive method for the determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream and sidestream smokes of combustion cigarettes and heated tobacco products by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1075**, 98-105 (2019).
- [104] L. Yao, J. Yang, YF. Guan, BZ. Liu, SJ. Zheng, WM. Wang, XL. Zhu, ZD. Zhang, Development, validation, and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human hair. *Anal Bioanal Chem.* **404** (8), 2259-66 (2012).
- [105] R. Pérez-Ortuño, JM. Martínez-Sánchez, M. Fu, E. Fernández, JA. Pascual, Evaluation of tobacco specific nitrosamines exposure by quantification of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human hair of non-smokers. *Sci Rep.* **25043** (2016).
- [106] K. Bekki, Y. Inaba, S. Uchiyama, N. Kunugita, Comparison of Chemicals in Mainstream Smoke in Heat-not-burn Tobacco and Combustion Cigarettes. *JUOEH* **39** (3), 201-207 (2017).

発表論文（アンダーラインのついた番号は本論文に関係するものである。）

#### 主論文

1. A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1217** (35), 5555-5563 (2010).
2. A. Ishizaki, H. Kataoka, A sensitive method for the determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream and sidestream smokes of combustion cigarettes and heated tobacco products by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **1075**, 98-105 (2019).

#### 副論文

3. H. Kataoka, M. Itano, A. Ishizaki, K. Saito, Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3746-3750 (2009).
4. H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review. *Anal. Chim. Acta* **655** (1-2), 8-29 (2009).
5. K. Saito, K. Yagi, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52** (5), 727-733 (2010).
6. K. Saito, E. Uemura, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **658** (2), 141-146 (2010).
7. H. Kataoka, A. Ishizaki, K. Saito, On-line automated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons: Applications to herbal medicines. *Chim. Oggi* **28** (5), 21-24 (2010).
8. A. Ishizaki, K. Saito, H. Kataoka, Analysis of contaminant polycyclic aromatic hydrocarbons in tea products and crude drugs. *Anal. Methods* **3** (2), 299-305 (2011).
9. H. Kataoka, A. Ishizaki, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods and Herbal Medicines: Analysis and Occurrence. in Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry,

Occurrence and Health Issues, Edited by Guilherme C. Bandeira and Henrique E. Meneses (Nova Science Publishers, Inc., New York), Chapter 2, 45-82 (2013).

10. H. Kataoka, **A. Ishizaki**, K Saito, Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications. *Anal. Methods* **8** (29), 5773-5788 (2016).
11. Y. Yamamoto, **A. Ishizaki**, H Kataoka, Biomonitoring method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in hair by online in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **1000**, 187-191 (2015).
12. **A. Ishizaki**, A. Uemura, H. Kataoka, A sensitive method to determine melatonin in saliva by automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with stable isotope-dilution liquid chromatography-tandem. *Anal. Methods* **9** (21), 3134-3140 (2017).
13. H. Kataoka, **A. Ishizaki**, K. Saito, Online automated micro sample preparation for high-performance liquid chromatography. in *Chromatography-Separation, Identification and Purification Analysis*, Edited by N. Awwad, (InTech, Croatia), Chapter 9, 161-184 (2019).

学会発表リスト（アンダーラインのついた番号は本論文に関係するものである。）

1. インチューブ SPME/LC/MS による残留抗生物質の分析. ○石崎厚, 三谷公里栄, 片岡洋行, 日本分析化学会第 53 年会 2004.9 (千葉市)
2. インチューブ SPME/LC/MS による医薬品汚染分析. ○三谷公里栄, 石崎厚, 藤岡瑞恵, 浪かおり, 片岡洋行, 第 43 回日本薬学会中国四国支部学術大会 2004.11 (松江市)
3. 分子インプリントキャピラリーインチューブ固相マイクロ抽出法の開発. ○石崎厚, 三谷公里栄, 片岡洋行, 第 45 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2006.10 (広島市)
4. インチューブ SPME/LC/MS/MS による水環境中医薬品類の汚染分析. ○三谷公里栄, 藤岡瑞恵, 石崎厚, 片岡洋行, 第 9 回環境ホルモン学会 2006.11 (東京)
5. In-tube SPME/蛍光検出 HPLC 法による多環芳香族炭化水素類の高感度オンライン自動分析. ○石崎厚, 齋藤啓太, 埴岡伸光, 成松鎮雄, 片岡洋行, 第 47 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2008.11 (岡山市)
6. インチューブ固相マイクロ抽出/蛍光検出 HPLC 法による食品中の多環芳香族炭化水素類のオンライン自動分析. ○石崎厚, 齋藤啓太, 埴岡伸光, 成松鎮雄, 片岡洋行, 日本薬学会第 129 年会 2009.3 (京都市)
7. 高感度 LC-MS 法によるメラミン及び関連化合物の食品汚染分析. ○片岡洋行, 石崎厚, 齋藤啓太, 日本薬学会第 129 年会 2009.3 (京都市)
8. インチューブ SPME/LC-MS 法によるマイコトキシン類の高感度オンライン自動分析. ○片岡洋行, 野中結子, 板野円香, 池内里早, 石崎厚, 齋藤啓太, 第 16 回クロマトグラフィーシンポジウム 2009.5 (長崎市)
9. ファイバーSPME/GC-MS 法による皮膚分泌アルデヒド類の超高感度分析. ○齋藤啓太, 武内友紀, 福井理実, 石崎厚, 片岡洋行, 第 16 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2009.5 (長崎市)
10. インチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS 法による PFOA 及び PFOS の高感度オンライン分析. ○齋藤啓太, 上村絵美子, 石崎厚, 片岡洋行, 第 12 回環境ホルモン学会 2009.12 (東京)
11. 生薬試料における多環芳香族炭化水素類の汚染分析. ○石崎厚, 齋藤啓太, 埴岡伸光, 成松鎮雄, 片岡洋行, 日本薬学会第 130 年会, 2010.3 (岡山市)
12. ファイバー固相マイクロ抽出 (SPME)/GC-MS 法を利用した簡易体臭分析法の開発.

- 齋藤啓太, 福井理実, **石崎厚**, 片岡洋行, 日本薬学会第 130 年会, 2010.3 (岡山市)
13. インチューブ SPME/LC-MS 法による食品中オクラトキシンの高感度オンライン自動分析. ○齋藤啓太, 池内里早, **石崎厚**, 片岡洋行, 第 19 回日本環境化学討論会, 2010.6 (春日井市)
14. 生薬及び食品中に検出される多環芳香族炭化水素類の高感度オンライン自動分析. ○**石崎厚**, 齋藤啓太, 片岡洋行, 第 19 回日本環境化学討論会, 2010.6 (春日井市)
15. 食品及び環境中に発生する発がん性ヘテロサイクリックアミンの生体曝露評価. ○片岡洋行, **石崎厚**, 齋藤啓太, 第 19 回日本環境化学討論会, 2010.6 (春日井市)
16. キャピラリーマイクロ抽出/蛍光検出 HPLC による多環芳香族炭化水素類のオンライン自動分析. ○片岡洋行, 安原梨恵, **石崎厚**, 齋藤啓太, 第 21 回クロマトグラフィー科学会議 2010.10 (西宮市)
17. 分子認識キャピラリーに基づく危害化学物質のインチューブ固相マイクロ抽出法の開発. ○片岡洋行, **石崎厚**, 齋藤啓太, 大重公里栄, 日本薬学会第 132 年会, 2012.3 (札幌市)
18. 毛髪中多環芳香族炭化水素類のインチューブ SPME/HPLC-蛍光分析. ○片岡洋行, 山本祐介, **石崎厚**, 齋藤啓太, 日本分析化学会第 61 年会, 2012.9 (金沢市)
19. 毛髪中多環芳香族炭化水素類のオンラインインチューブ SPME/蛍光検出 HPLC による生体曝露評価. ○山本祐介, **石崎厚**, 齋藤啓太, 片岡洋行, 日本薬学会第 133 年会, 2013.3 (横浜市)
20. 大気中多環芳香族炭化水素類のオンラインインチューブ SPME/蛍光検出 HPLC による高感度分析. ○齋藤啓太, 井上渉, 山本祐介, **石崎厚**, 加藤久登, 増田和文, 片岡洋行, 第 22 回環境化学討論会, 2013.7.31-8.1 (府中市)
21. In-tube SPME/LC-MS/MS によるメラトニンのオンライン自動分析. ○**石崎厚**, 上村彰子, 齋藤啓太, 片岡洋行, 第 55 回日本薬学会中国四国支部学術大会, 2016.11.6 (岡山市)
22. オンラインインチューブ SPME/蛍光検出 HPLC による水環境中多環芳香族炭化水素類の分析. ○青山真鈴, **石崎厚**, 片岡洋行, 日本薬学会第 137 年会, 2017.3.27 (仙台市)
23. インチューブ SPME/LC-MS/MS 法によるストレス関連マルチバイオマーカーの同時分析. ○北川菜絵, **石崎厚**, 片岡洋行, 日本薬学会第 137 年会, 2017.3.27 (仙台市)

24. インチューブ SPME/LC-MS/MS 法によるニトロソアミン類の高感度分析法の開発. ○石崎厚, 片岡洋行, 日本薬学会第 137 年会, 2017.3.27 (仙台市)
25. インチューブ SPME/LC-MS/MS 法による尿中ニトロソアミン類の高感度分析法の開発. ○石崎厚, 片岡洋行, 日本分析化学会第 66 年会, 2017.9.10 (東京)
26. 受動喫煙バイオマーカーとしてのタバコ特異的ニトロソアミン類のオンラインインチューブ SPME/LC-MS/MS 分析. ○石崎厚, 片岡洋行, 日本薬学会第 138 年会, 2018.3.27 (金沢市)
27. オンラインインチューブ SPME/LC-MS/MS によるタバコ特異的ニトロソアミン類の高感度分析法の開発. ○石崎厚, 片岡洋行, 第 25 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2018.6.14 (弘前市)
28. オンラインインチューブ SPME/LC-MS/MS 法による紙巻きタバコ及び加熱式タバコ中のタバコ特異的ニトロソアミン類の測定. ○石崎厚, 片岡洋行, 日本薬学会第 139 年会, 2019.3.22 (千葉市)
29. 毛髪中ニコチン及びコチニンをバイオマーカーとした燃焼式及び加熱式タバコによる受動喫煙の影響評価. ○百相真希, 加地早苗, 石崎厚, 片岡洋行, 日本薬学会第 139 年会, 2019.3.22 (千葉市)
30. オンラインインチューブ SPME/LC-MS/MS による紙巻きタバコ及び加熱式タバコの葉ならびに煙中のタバコ特異的ニトロソアミン類の測定. ○石崎厚, 片岡洋行, 第 26 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2019.6.6-7 (岡山)
31. 受動喫煙バイオマーカーとしての毛髪中ニコチン及びコチニンのインチューブ SPME/LC-MS/MS 分析. ○百相真希, 石崎厚, 片岡洋行, 第 26 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2019.6.6-7 (岡山)
32. オンラインインチューブ SPME/LCMS/MS 法による各種タバコ中のタバコ特異的ニトロソアミン類の測定. ○石崎厚, 片岡洋行, 日本分析化学会第 68 年会 2019.9.11 (千葉)
33. インチューブ SPME/HPLC-FLD 法を用いた紙巻きタバコ及び加熱式タバコ中の多環芳香族炭化水素類の測定. ○石崎厚, 山本祐介, 片岡洋行, 日本薬学会第 140 年会, 2020.3.26 (京都市)

## 謝辞

本研究の研究全般にわたり就実大学薬学部生のときから直接ご指導いただきました就実大学大学院医療薬学研究科疾病治療薬学専攻病態解析診断薬学分野疾病診断分析薬学研究室・片岡洋行教授に謹んで感謝いたします。本研究に関して数々のご助言をいただきました同研究室・齋藤啓太講師に深く感謝いたします。

本論文の副査を快く引き受けていただきました病因究明創薬学研究室・鈴木利典教授ならびに生体薬物情報解析学研究室・増田和文教授に深く感謝いたします。

本研究に使用した毛髪サンプルをボランティアで快くご提供いただきました方々に感謝いたします。

最後にいつも精神的に支えてくれた家族に心から感謝いたします。