

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04041

研究課題名（和文）肺微小循環と肺胞マクロファージの挙動変化を指標にした加熱式たばこの健康影響の解明

研究課題名（英文）A Study on the Health Effects of Heated Tobacco Products Measured by Changes in Pulmonary Microcirculation and Alveolar Macrophage Behavior

研究代表者

牛山 明（Ushiyama, Akira）

国立保健医療科学院・その他部局等・部長

研究者番号：60291118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：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、生体影響評価に活用できることを示した。マウスにIQOS主流煙をばく露したところ、肺胞マクロファージ内の還元型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、および肺胞マクロファージ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が起こることを示した。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。本研究では加熱式たばこの健康ハザードの同定のためのエビデンスを提供できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加熱式たばこについて、人の疫学的な調査で健康影響を明らかになるまでに、更に時間が必要である。しかし、健康影響があるとすればエビデンスを蓄積していく必要がある。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、新たな健康脅威となるかもしれない加熱式たばこの動物実験の実施可能性において新たな領域を開拓した。マウスを用いて実際にばく露実験を行い、生体影響の一部を明らかにしたことは、今度の加熱式たばこの健康ハザード評価において重要な知見となるエビデンスを提供できた。公衆衛生学、衛生学の観点から、非常に意義のある研究結果を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a highly accurate exposure device based on the characteristics of heated tobacco products and demonstrated its potential for use in evaluating biological effects. Exposure of mice to IQOS mainstream smoke was shown to cause an oxidative stress response accompanied by a decrease in the concentration of reduced glutathione in alveolar macrophages, as well as alveolar macrophage foaming. We also showed that even short-term exposure can cause changes in cytokine levels and alveolar morphology. We demonstrated the usefulness of a new technique that can evaluate the immediate effects of smoking through imaging techniques that measure blood flow dynamics in the pulmonary microvasculature during exposure to mainstream aerosol. This study has provided evidence for the identification of the health hazards of heated tobacco.

研究分野：衛生学

キーワード：加熱式たばこ 生体影響 動物実験

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。

2. 研究の目的

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することを目的とした。

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。

3. 研究の方法

(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

加熱式たばこの特性を鑑み、ばく露装置の新規開発を実施した。

(2) 加熱式たばこ主流煙をばく露した際の生体影響評価

開発したばく露装置を使って、生体影響評価として、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 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、肺胞マクロファージ (Alveolar macrophage; 以下 AM) の形態変化、血中サイトカインレベルの変動、および 肺の組織学的評価を行った。

(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。

4. 研究成果

(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

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。次にこの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。

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。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た。以上より、開発した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。

(2) 加熱式たばこ主流煙をばく露した際の生体影響評価

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。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。

肺胞マクロファージ (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。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。

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。

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。

(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

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 の作製とその観察系を構築した。

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。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。

成果は以下の通りとなる。

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sawa Marie, Ushiyama Akira, Inaba Yohei, Uchiyama Shigehisa, Hattori Kenji, Ogasawara Yuki, Ishii Kazuyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 A Newly Developed Aerosol Exposure Apparatus for Heated Tobacco Products for In Vivo Experiments Can Deliver Both Particles and Gas Phase With High Recovery and Depicts the Time-Dependent Variation in Nicotine Metabolites in Mouse Urine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nicotine & Tobacco Research	6. 最初と最後の頁 2145 ~ 2152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ntr/ntab123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimoto-Kusunose S., Sawa M., Inaba Y., Ushiyama A., Ishii K., Hattori K., Ogasawara Y.	4. 巻 589
2. 論文標題 Exposure to aerosol extract from heated tobacco products causes a drastic decrease of glutathione and protein carbonylation in human lung epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 92 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawa Marie, Ushiyama Akira, Inaba Yohei, Hattori Kenji	4. 巻 610
2. 論文標題 Increased oxidative stress and effects on inflammatory cytokine secretion by heated tobacco products aerosol exposure to mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 43 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤麻理恵，牛山明，稲葉洋平，中館和彦，服部研之．
2. 発表標題 加熱式たばこエアロゾルを短期間ばく露した際のマウス肺の組織学的評価．
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤麻理恵, 石川智, 牛山明, 服部研之.
2. 発表標題 IQOSエアロゾルばく露は肺組織及び肺胞マクロファージに酸化ストレスを発生させる
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲葉洋平, 内山茂久, 戸次加奈江, 牛山明.
2. 発表標題 加熱式たばこIQOS互換性の違いによる有害化学物質発生量の比較
3. 学会等名 第56回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤 麻理恵, 牛山 明, 服部 研之, 中舘 和彦, 石井 一行
2. 発表標題 高濃度酸素連続吸入による酸化ストレスが肺胞上皮細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	稲葉 洋平 (Inaba Yohei) (80446583)	国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官 (82602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	服部 研之 (Hattori Kenji) (90306663)	明治薬科大学・薬学部・教授 (32684)	
研究分担者	小笠原 裕樹 (Ogasawawa Yuki) (20231219)	明治薬科大学・薬学部・教授 (32684)	
研究分担者	中舘 和彦 (Nakadate Kazuhiko) (80372895)	明治薬科大学・薬学部・教授 (32684)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関