The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	非燃焼吸引型たばこの生体リスクに関する研究
Author(s)	三浦, 直樹
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73509
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

2019 年度（令和元年度）博士論文

非燃焼吸引型たばこの
生体リスクに関する研究

学位申請者

三浦直樹

目次

目次 1

略語一覧 2

緒論 4

第一章　NCIT 使用時の Nicotine の曝露量と血中動態の解析 6

第二章　NCIT 使用時の HPHCs への曝露実態の解析 17

第三章　NCIT 使用による生体影響評価：動脈硬化関連マーカーの変動解析 30

総括 45

結論 47

謝辞 48

参考文献 49

略語一覧

11-DHTXB2	:	11-Dehydrothromboxane B2
1-OHP	:	1-hydroxypyrene
3-HPMA	:	3-hydroxypropylmercapturic acid
4-ABP	:	4-aminobiphenyl
8-epi-PGF2α	:	8-iso-prostaglandin F2α
8-OHdG	:	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
AUC	:	area under the plasma nicotine concentration vs. time curve
BMI	:	body mass index
CC1	:	1 mg ISO tar conventional cigarette
C_{max}	:	maximum plasma concentration
COHb	:	carboxyhemoglobin
DHBMA	:	dihydroxybutenylmercapturic acid
FIB	:	fibrinogen
GLU	:	glucose
HbA1c	:	hemoglobin
HDL-Cho	:	high-density lipoprotein cholesterol
HMPMA	:	3-hydroxy-1-methylpropyl-mercapturic acid
HPHCs	:	harmful and potentially harmful constituents
hs-CRP	:	high sensitive-C reactive protein
LDL-Cho	:	low-density lipoprotein cholesterol
MDA	:	Malondialdehyde
MHBMA	:	monohydroxybutenylmercapturic acid
NCIT	:	non-combustion inhaler type of tobacco product
NNK	:	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NS	:	non smokers
PET	:	positron emission tomography
RBC	:	red blood cell

SCN	:	thiocyanate
sICAM-1	:	soluble intercellular adhesion molecule-1
SM	:	smokers
S-PMA	:	S-phenylmercapturic acid
$t_{1/2}$	:	elimination half-life
T-Bil	:	total bilirubin
TC	:	total cholesterol
TMA	:	trans, trans-muconic acid
t_{max}	:	time to reach Cmax
Total NNAL	:	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and glucuronide
WBC	:	white blood cell

緒論

たばこは、嗜好品として、味や香りを愉しみつつ、時に、リフレッシュや会話・交渉をスムーズに運ばせる側面も有している。そのため、たばこは、歴史の中で人々の生活や価値観の変遷にあわせ、その役割や形態を変化させながらも、人々に受容されてきた。

たばこは、アメリカ大陸を起源とするナス科の植物で、7-8 世紀のマヤ文明の時代にはすでに、神事や儀式、呪術師の治療として使用されている[1]。その後、15 世紀のコロンブスによるアメリカ大陸到達を機に、新しい食物や果物などと一緒に、たばこも世界各地に伝播され、嗜好品として生活に浸透することとなった。例えば、日本においては、江戸時代に、たばこ葉を細かく刻み、煙管 (キセル) を用いて嗜む独自のスタイルが定着した[1]。また、北欧では、16 世紀のフランスにおける喫煙規制を背景に、嗅ぎたばこを由来とするオーラルたばこ : snus (歯と歯茎の間に挟んで使用する形態の非燃焼型たばこ) が定着し、現在でも多くの人に受け入られている[2]。さらに現在、最も一般的な形態である紙巻たばこについては、19 世紀半ばの機械産業の技術進展とともに普及し、たばこの歴史から眺めれば、ごく最近に一般化した形態である。

このように、たばこは、社会の中でヒトと共生してきたものの、近年の科学の進展に伴って、紙巻たばこの煙中には Nicotine をはじめ、数千種以上の化学成分が存在し、健康への影響が懸念される物質 (Harmful and potentially harmful constituents、HPHPs) が複数含まれていることが報告されている[3]。また、疫学研究を中心とした科学的調査によって、喫煙は、肺がんや虚血性心疾患、慢性閉塞性肺疾患など、多くの疾病のリスク因子であることが明らかにされており[4]、現在では、喫煙による健康問題が広く社会に認知されている。さらに、能動喫煙のみならず、周囲への影響 (受動喫煙) についても健康リスクが指摘されており[4]、喫煙場所の規制も世界的に広がっている。その一方で、たばこは、このような健康へのリスクが広く認知された現在においても、日常のアクセントとしての嗜好品の役割も求められている。

このような背景から、たばこが引き続き、嗜好品・文化としての価値や役割を果たし、社会と共生していくためには、喫煙による健康問題を解決することが喫緊の課題である。本課題に対して、申請者は、引き続き社会と共生しうる理想のたばことして、「①HPHCs を発生せず、生体への悪影響が無いうえで、②使用者に嗜好品として受容されるたばこ」

と考えている。すなわち、HPHCs さえ発生しなければ、使用者自身の健康リスクはもとより、周囲への影響の問題も同時に解決することが可能である。したがって、①の「HPHCs を発生せず、生体への悪影響が無い」ことを達成するにあたって、紙巻たばこの喫煙による健康リスクの主要因が、たばこ葉を燃焼させることで発生する HPHCs であると考えられることを踏まえると、「燃焼を伴わないこと」が重要と考えた。また、②の「使用者に嗜好品として受容されるたばこ」であるためには、紙巻たばこの喫煙者がたばこに求める価値や満足に応えることが重要であり、生活の中での嗜好品として、「紙巻たばこの喫煙所作や味香りを再現すること」が合理的である。

そこで申請者らは、上記の考えをもとに、非燃焼吸引型たばこ（non-combustion inhaler type of tobacco product、NCIT）を開発した。NCIT は、粉砕されたたばこ葉を充填したカートリッジを吸い口付ホルダーへセットし、火をつけないまま吸引することで、たばこの味・香りを愉しむ形態の製品である（Fig. 1）。したがって、本製品は、たばこ葉の燃焼を伴わないため、使用者および周囲への HPHCs への曝露の低減が期待できるとともに、「吸う」という紙巻たばこに近い所作であることから、嗜好品としての受容が期待される。しかしながら、NCIT は、上記のような効果は推察されるものの、新しい形態のたばこ製品であり、製品の使用に伴う生体への影響に関する知見が乏しく、NCIT を社会と共生しうる理想のたばこに向け開発していくためには、実際に NCIT を使用した際の HPHCs への曝露状況や、生体影響を裏付ける科学的データの収集が必要不可欠である。

そこで本研究では、新しい形態のたばこ製品 NCIT をヒトが使用した場合のたばこ成分の曝露実態と生体リスクについて、臨床試験で明らかにすることを目的とする。まず、たばこの主要成分である Nicotine の体内動態を解析するとともに、その他の HPHCs への曝露量を評価した。最終的に、その生体リスクを評価すべく、喫煙との関連が報告されている動脈硬化関連マーカーを指標に評価した結果、興味深い知見が得られたので、博士論文として纏めた次第である。

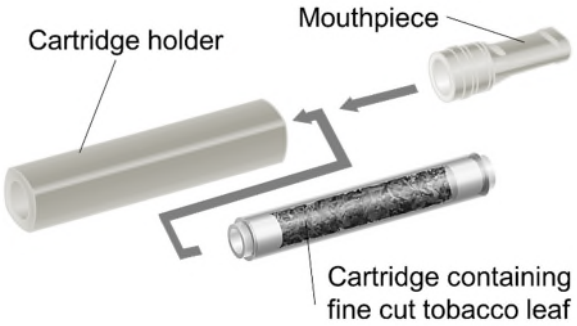

Fig. 1 非燃焼吸引型たばこ（NCIT）の構造
Mouthpiece（吸い口）と Cartridge（プラスチック製のチューブにたばこ葉を詰め、両端にフィルターを配置）、Cartridge holder（カートリッジを固定するホルダー）から構成される。たばこの香味成分は、たばこ葉の燃焼/加熱によらず、吸い口からの吸引によって口腔内に運ばれる。

本論

第一章　NCIT 使用時の Nicotine の曝露量と血中動態の解析

Nicotine は、ナス科の植物に含まれるアルカロイドで、たばこ葉の特徴的な物質である。Nicotine 単独の摂取と慢性疾患との関連については明らかとなっていないものの[5,6]、１) Nicotine は依存性を有するとともに、２) 一時的に大量摂取した場合には、頭痛や吐き気といった急性中毒症状を引き起こすことが知られている[5,6]。このような依存性物質に対しては、物質の最高血中濃度と吸収速度が、依存性に一定の影響を及ぼすと考えられており[7]、米国 FDA による、Modified Risk Tobacco Product Application (リスク改変たばこ製品申請) の企業向けガイダンスにおいても、Nicotine の血中動態は依存性を評価するうえで、重要な項目のひとつとして示されている[8]。また、急性毒性を有する物質については、毒性が発現しうる量が吸収されないように、物質の最高血中濃度と吸収量を考慮しなければならない。以上の観点から、新たな形態のたばこ製品 NCIT を評価するには、まず、ヒトが使用した際の①Nicotine の血中への吸収速度と最高血中濃度 (t_{max}、C_{max}) と、②Nicotine の吸収量 (AUC) が、紙巻たばこ喫煙時を上回らないことが望ましい。

そこで本章では、NCIT 使用時の Nicotine の血中動態について、紙巻たばこ喫煙時を対照とし、臨床試験で Nicotine の t_{max}、C_{max}、AUC を比較解析した。

第一項　材料および方法

1．試験たばこ

① 非燃焼吸引型たばこ NCIT

製品構造については Fig．1 に示した。なお本試験では、製品の基本特性以外の要素が試験結果に与える影響を最小にするため、香料をたばこ葉へ加香していないプロト品を使用した。

② 紙巻たばこ CC1

NCIT から発生する成分が極めて少ないことから、市販紙巻たばこの中で、国

際標準化機構（ISO）が定める方法[9]にて測定され、製品個装に表示されたタールおよび Nicotine の値が最も低い製品（Tar 1.0mg、Nicotine 0.1mg）のうち、日本市場で代表的な銘柄とした。

2. 試験デザイン

NCIT と CC1 をそれぞれ使用した際の Nicotine の血中動態を比較するうえで、被験者背景を合致させるため、同一被験者群による 2 ステップの試験デザインにより調査を実施した（Fig. 2）。各ステップの前には、血漿中 Nicotine および代謝物の影響を排除するため、Wash out を目的とする禁煙期間を設けた。Wash out 期間は、血漿中 Nicotine の半減期 $t_{1/2}$=1.93 時間[10]の 5 倍以上かつ尿中 Nicotine 代謝物濃度の $t_{1/2}$=19.6 時間[11]の 3 倍以上となるよう設定した。

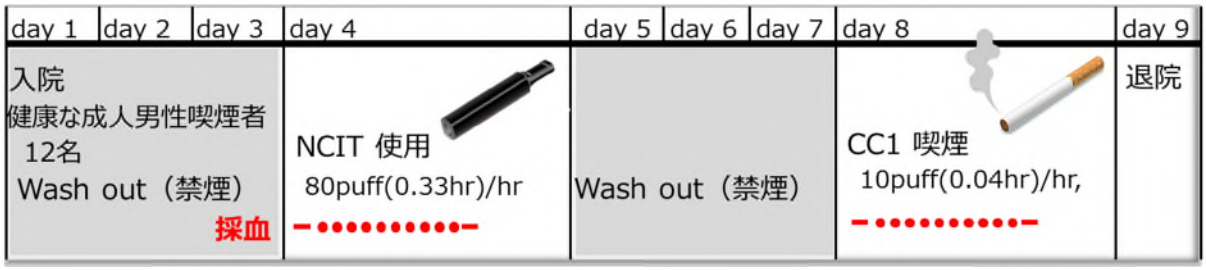

Fig. 2 試験デザイン

被験者は喫煙者から構成され、入院から 3 日間禁煙した後、調査日 4 日目に NCIT を使用（1 時間毎に 1 本を 80 回吸引、計 12 本）、その後 3 日間再び禁煙し、調査日 4 日目に CC1 を喫煙（1 時間毎に 1 本を 10 回吸引、計 12 本）した。各試験たばこの使用開始直前に採血を実施、加えて 1 本目と 12 本目に頻回採血を実施した。

試験参加者は、試験内容の説明を受け書面同意したのちに、スクリーニングにて健康状態の確認を受け、医師により試験参加が可能と判断された成人男性喫煙者 12 名が被験者として試験に組み込まれた。

体内の Nicotine および代謝物の Wash out を目的に、被験者の試験実施医療機関に入所後 4 日目の NCIT 使用開始時までの間と、4 日目の NCIT 使用終了後 8 日目の CC1 喫煙開始前までの間を禁煙とした。4 日目の NCIT および 8 日目の CC1 の調査日いずれも、被験者に各日の試験たばこを 1 時間に 1 本、合計 12 本使用させ、血中 Nicotine 濃度のトラフ値を観察するために各本数の試験たばこ使用開始直前に採血を実施した。

加えて、試験たばこ 1 本使用時の血中 Nicotine 濃度の推移を観察するために、血中 Nicotine 濃度が Wash out された 1 本目の使用時ならびに血中 Nicotine 濃度が定常状態となると想定された 12 本目の使用時に頻回採血を実施した(NCIT : 使用開始から 9.75 (40 回吸引時) 、20、25、30、40 および 50 分経過時、CC1 : 使用開始から 2.5、5、10、20、30、および 45 分経過時) 。

なお NCIT については、日本たばこ産業株式会社による、機械で吸引し Nicotine 発生量を調査した予備試験により、CC1 と比べ Nicotine 生成量が数分の一であることが観察されたため、被験者の Nicotine の吸入量を同程度に揃えるため、NCIT の吸引回数を多く設定した。CC1 は 1 本につき 10 回の吸引を、また NCIT については 80 回の吸引を、それぞれ 15 秒間隔で実施させた。NCIT 使用時には、被験者の吸引容量を記録するため、NCIT に puff profiler (CReSSmicro™、Plowshare/Borgwaldt-KC 社製) を装着し吸引を行った。

本試験で予定された全ての調査が終了後、9 日目に医師により被験者の健康状態に問題が無いことが確認され、試験責任医師により退院が判断された。

3. 対象被験者

本試験では、健康な成人喫煙者であるアジア系日本人男性を対照として、目標被験者数を 12 名とした。スクリーニング前において喫煙期間が 1 年間以上、かつ、市販紙巻たばこを 1 日 12 本以上日常的に喫煙しており、年齢が 21 歳以上 40 歳未満、Body mass index (BMI) が 18.5 以上 25.0 未満で、スクリーニングにおける診察ならびにバイタルサイン、臨床検査などの各検査に基づき医師により健康状態が良好であると判断されたものを試験への組み入れ対象とした。

4. 倫理的配慮

本試験は、「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理的原則 (2008 年 10 月改訂) を遵守し、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (厚生省令第 28 号、平成 9 年 3 月 27 日付) 」、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令 (厚生労働省令第 24 号、平成 20 年 2 月 29 日付) 」に準拠して実施した。また本試験の実施にあたっては、試験実施医療機関の試験審査委員会において承認を得た。

5. Nicotine の口腔内吸入量の推定

CC1 と NCIT いずれも、製品を使用する際の様態（1 日喫煙本数や喫煙時の吸引容量、吸引頻度など）は、製品の特性や使用者によって異なっている可能性がある。このため、製品より発生する Nicotine の量が増減しうることから、臨床試験の被験者が摂取する Nicotine の量をあらかじめ定め正確に管理することは困難であるため、摂取量の代替指標として、試験たばこ毎に Nicotine の口腔内吸入量を推定した。推定にあたっては、CC1 については、喫煙後の紙巻たばこフィルターに残留する Nicotine 量ら、実際の摂取量を推定する方法に関する報告 [12] を参考した。まず、吸引容量、吸引時間、吸引間隔、吸い殻長の各パラメータを変動させ、機械により再現喫煙を実施した際の、紙巻たばこ煙中 Nicotine 量と紙巻たばこフィルターに残留する Nicotine 量との関係式を得た。つぎに、この関係式に基づき、各被験者の CC1 使用後の吸い殻に残留した Nicotine 量分析値より、各被験者が吸引した Nicotine 量を推定した。

NCIT については紙巻たばこと異なり、Nicotine が残留するために十分な量のフィルターを使用していないため、CC 1 とは異なる方法で Nicotine の口腔内吸入量を推定した。NCIT 使用時の Nicotine 発生量に影響し得るパラメータとして、環境温度ならびに吸引容量に注目し、各パラメータを変動させ機械により再現吸引を実施した際の Nicotine 発生量から、重回帰分析により関係式を得た（Table 1、Fig. 3）。この関係式に、各被験者が NCIT を使用した際の吸引容量ならびに環境温度を外挿し、各被験者の Nicotine 口腔内吸入量を推定した。

Table 1　NCIT の機械再現吸引時 Nicotine 発生量に対する重回帰分析結果

説明変数		偏回帰係数	標準誤差	*t* value	*p* value
Intercept	β_0	−640.82	45.29	−14.1	<.0001
Vol	β_1	0.0412	0.00121	34.04	<.0001
$(Vol-8114.29)^2$	β_2	-6.60×10^{-7}	2.69×10^{-7}	−2.45	0.023
Temp	β_3	26.55	1.85	14.37	<.0001
(Vol−8114.29) * (Temp−23.75)	β_4	0.00292	0.000276	10.58	<.0001
$(Vol-8114.29)^2$ * (Temp−23.75)	β_5	-1.18×10^{-7}	6.15×10^{-8}	−1.91	0.069

Vol: 80 回吸引時の総吸引容量（ml）. *Temp*: 吸引時の室温（°C）.
寄与率（R^2）= 0.987 (自由度調整済 R^2=0.984)

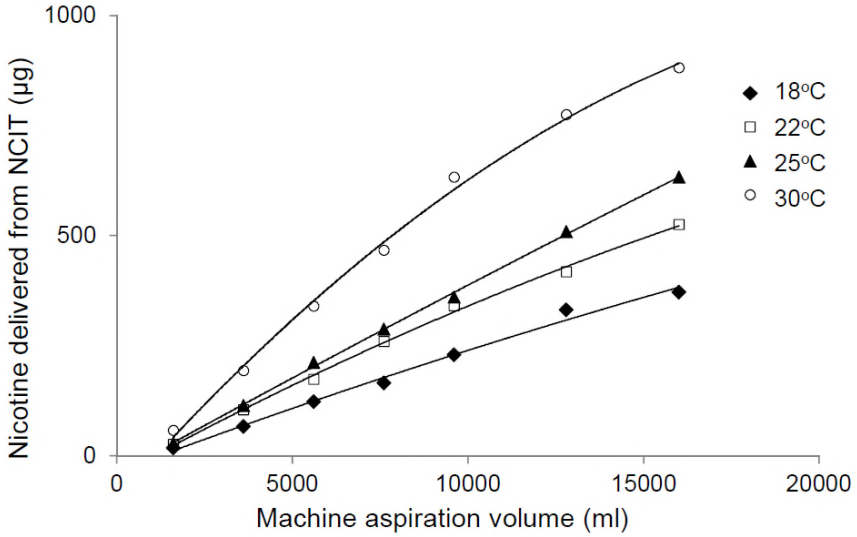

Fig. 3 NCIT 機械再現吸引時の Nicotine 生成量

室温を 4 水準、各室温での吸引容量を 7 水準設定し、Nicotine の吸引量を測定。各プロットは 80 回吸引（1,500–16,000 ml）の積算値を示す。近似曲線は、重回帰分析により求めた。

6. Nicotine の体内動態パラメータの算出

Nicotine の体内動態パラメータ算出のため、EDTA-2Na 入り採血管に採取した被験者の血液試料を、4℃、10 分間、3000rpm にて遠心分離することで血漿を回収し、分析に供した。Nicotine の血漿中濃度は、三菱化学メディエンス株式会社にて、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置（1100 system、Agilent/ TSQ Quantum Discovery MAX、Thermo Fisher Scientific Inc.）により測定された。

Nicotine の血中動態パラメータとして、血中への吸収速度の指標である最高血漿中濃度（C_{max}）と最高血中濃度到達時間（t_{max}）を、各試験たばこ 1 本目と 12 本目使用時の Nicotine 血中濃度推移より算出した。また、吸収量の指標として、血漿中濃度-時間曲線下面積（area under the plasma nicotine concentration vs. time curve、AUC）のうち、試験たばこ 1 本使用時の血漿中への Nicotine 移行総量を示す $AUC_{0-\infty}$ と同値となる、定常時 AUC (AUC_{11-12}) を、対数線形台形法により求めた。さらに、代謝消失速度の指標である消失半減期（Elimination half-life、$t_{1/2}$）を、血漿中 Nicotine の消失相と考えられる 11hr から 24hr の対数濃度-時間曲線に対する非線形反復最小二乗解析により算出した。

全ての血中動態パラメータは、WinNonlin (Ver. 6.2.1、Pharsight Corporation) を用い、ノンコンパートメントモデルにて解析した。

7. 安全性評価

医師による診察、臨床検査値、バイタルサインおよび安静時 12 誘導心電図により有害事象を調査した。

8. 統計解析手法

全ての統計解析は、SAS for Windows (version 9.2、SAS Institute) を用いて実施した。NCIT と CC1 使用時の各パラメータの差の検定にあたっては、C_{max}、AUC_{11-12} および $t_{1/2}$ については Paired t 検定を、t_{max} については Wilcoxon の符号付順位和検定を実施し、統計的有意性は $p < 0.05$ と定義した。

第二項　結果

1．被験者の背景情報

24 名が試験参加に同意し、そのうち、試験責任医師のスクリーニングよって、試験参加が可能と判断された 12 名が被験者として組み入れられ、全員が試験を完遂した。被験者の平均年齢は 28.6 歳（range: 21−38）、1 日喫煙本数平均は 17.5 本（range: 13−40）、喫煙歴は 8.6 年（range:1−18）、BMI は平均で 20.8 kg/m^2 (range: 19.1−23.5) であり、被験者背景に特筆すべき偏りは認められなかった。

2．Nicotine の口腔内吸入量の推定

Nicotine の血中動態パラメータを算出するためには、被験者の Nicotine の摂取量を把握する必要がある。そこで、CC1 と NCIT を使用した際の Nicotine の口腔内吸入量の推移について、CC1 はフィルターに残存する Nicotine 量から推定し、NCIT は機械の再現吸引による Nicotine 発生量から推定した（詳細は、第一項 5.に記載した方法を参照）（Fig. 4）。その結果、NCIT と CC1 使用時の Nicotine の口腔内吸入量はそれぞれ、1 本目が 0.34 ± 0.10 mg [NCIT]と 0.42 ± 0.14 mg [CC1]、12 本目が 0.33 ± 0.12 mg [NCIT]と 0.38 ± 0.11 mg [CC1]、12 本合計で 3.85 ± 1.37 mg [NCIT]と 4.94 ± 0.79 mg [CC1]と推定され、試験たばこ間の Nicotine の口腔内吸入量に大きな違いは生じなかったものと考えられた。

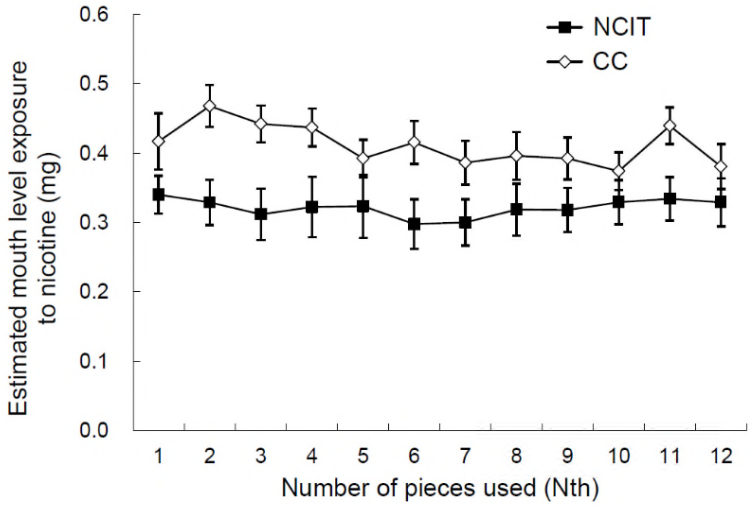

Fig. 4　被験者による Nicotine の口腔内吸入量推定値

各プロットは、本数毎の Nicotine 口腔内吸入量推定値（被験者毎の推定値の平均 ± 標準誤差）を示す。1 本あたり NCIT は 80 回を、CC1 は 10 回を吸引した。

3. Nicotine の血漿中濃度推移と血中動態パラメータの比較

2.のように、試験たばこ間で、Nicotine の口腔内吸入量に大きな違いが認められなかったため、各試験たばこ使用時の Nicotine の血漿中濃度推移を評価した（Fig. 5）。まず、血漿中 Nicotine 濃度トラフ値（最低血中濃度=投与直前値）の推移を解析したところ、NCIT と CC1 いずれの使用時も、10 本目付近から血漿中 Nicotine 濃度が定常状態となっていることが観察された。

そこで、上記の結果をふまえ、血漿中に Nicotine が無い場合（1 本目）と、Nicotine 濃度が定常の状態（12 本目）の場合で、NCIT と CC1 使用時の血漿中 Nicotine 濃度の推移を解析したところ、いずれにおいても、CC1 喫煙時に比べ、NCIT 使用時には緩やかな血中 Nicotine 濃度上昇が観察され、CC1 使用時に比較して、NCIT 使用時の方が、t_{max} が長く、C_{max} は低いことが推察された。また、NCIT 使用時の AUC については、CC1 使用時の AUC を超えていないことが推察された。

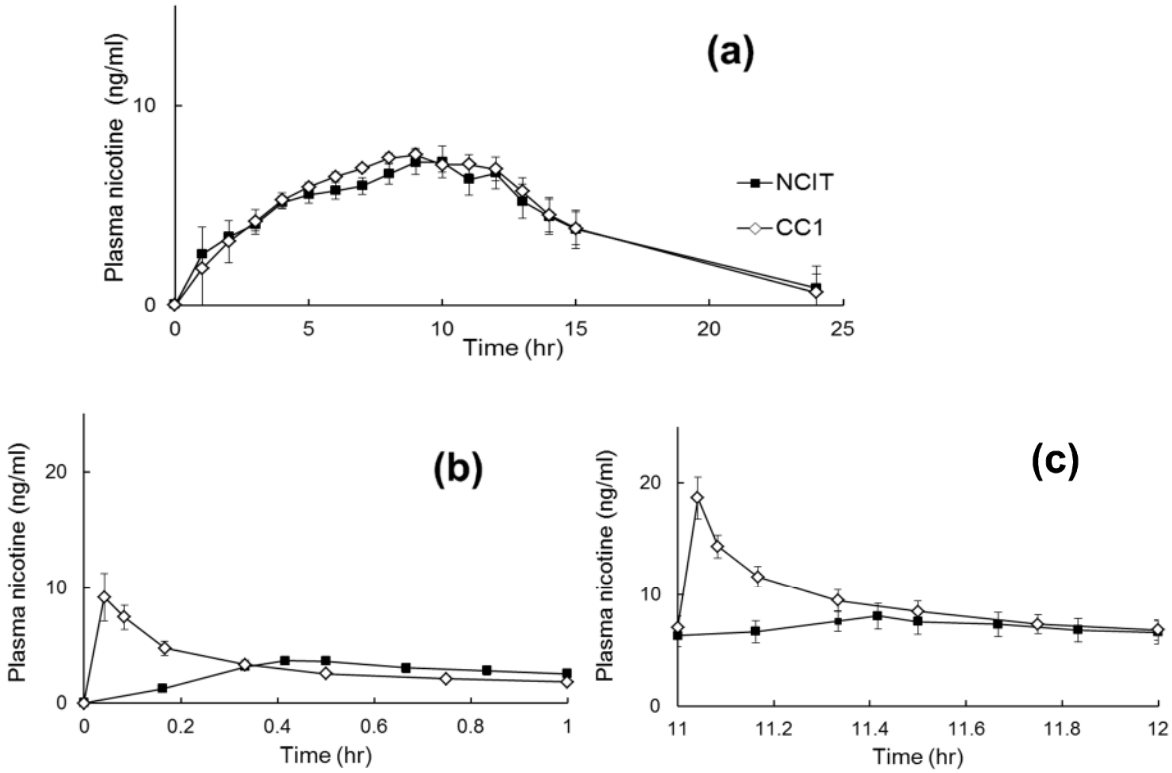

Fig. 5　血漿中 Nicotine 濃度の推移

(a) 試験たばこ使用直前の採血による血漿中 Nicotine 濃度トラフ値の 24 時間推移

(b) 試験たばこ 1 本目使用時（0-1hr）の推移　(c) 試験たばこ 12 本目使用時（11-12hr）の推移

そこで、実際に、各試験たばこ 1 本目と 12 本目使用時の Nicotine 血中濃度推移より、各試験たばこ使用時の Nicotine 血中動態パラメータを算出した（Table 2）。その結果、Fig. 5 で推察されたように、CC1 喫煙時の C_{max} (1 本目:10.2 ± 6.42 ng/ml、12 本目:19.1 ± 6.01 ng/ml) に比べ、NCIT 使用時の C_{max} (1 本目:3.92 ± 1.18 ng/ml、12 本目:8.23 ± 3.92 ng/ml) は低く、また CC1 喫煙時の t_{max} (1 本目: 0.042 hr、12 本目: 0.042 hr) と比べ、NCIT 使用時の t_{max} (1 本目:0.458 hr、12 本目:0.417 hr) は遅延し、NCIT 使用時の Nicotine の血中への吸収速度と最高血中濃度は、CC1 喫煙時を上回らないことが示された。

また、吸収量については、CC1 喫煙時の $AUC_{11\text{-}12}$ (9.28 ± 3.13 ng·h/ml) に比べ、NCIT 使用時の $AUC_{11\text{-}12}$ (7.12 ± 3.58 ng·h/ml) は低く、NCIT 使用時の Nicotine の血中へ吸収量は、CC1 喫煙時を上回らないことが示された。

今後、さらに多角的な検証が必要なものの、血中動態の観点からは、NCIT 使用時の Nicotine の摂取に伴う依存性や急性毒性に関する身体影響は、CC1 喫煙時を上回らないことが示唆された。

4．安全性評価

本試験期間を通じ、重篤な有害事象は観察されなかった。また、軽度な有害事象は 12 名中 3 名に、それぞれ 1 件ずつ、計 3 件発生し、試験責任医師による試験たばことの因果関係の判定はそれぞれ、「可能性あり」(尿中白血球増加)、「多分関連あり」(咽頭違和感)、「関連なし」(血中トリグリセリド増加) であった。

なお、いずれも試験継続中あるいは終了時に回復が確認されており、特に安全性に関して問題となる所見は認められなかった。

Table 2　NCIT および CC1 使用時の Nicotine 血中動態パラメータ算出結果

	NCIT		CC1	
Parameter	Mean† ± SD	range	Mean† ± SD	Range
Nicotine 口腔内吸入量 推定値 (mg)				
0–1 hr (1 本目)	0.34±0.10	0.20–0.50	0.42±0.14	0.18–0.69
11–12 hr (12 本目)	0.33±0.12	0.21–0.57	0.38±0.11	0.24–0.64
12 本合計	3.85±1.37*	2.24–6.51	4.94±0.79	3.46–6.25
C_{max} (ng/ml)				
0–1 hr (1 本目)	3.92±1.18*	2.34–6.73	10.2±6.42	2.07–25.4
11–12 hr (12 本目)	8.23±3.92*	4.74–18.5	19.1±6.01	8.79–29.7
t_{max} (hr)				
0–1 hr (1 本目)	0.458*	0.33–0.83	0.042	0.042–0.083
11–12 hr (12 本目)	0.417*	0.33–0.67	0.042	0.042–0.083
AUC (ng·h/ml)				
11–12 hr (12 本目)	7.12±3.58*	4.20–17.0	9.28±3.13	5.14–16.0
$t_{1/2}$ (hr)				
11–12 hr (12 本目)	3.82±1.09	2.28–6.13	3.50±1.29	2.24–7.15
Relative bioavailability ‡	0.92±0.32	0.54–1.64	1	

* Significant difference compared with CC smoking, $p < 0.05$, † t_{max}; median.

第三項　考察

本試験では、NCIT と CC1 使用時の Nicotine の血中動態をヒトの臨床試験で検証した。このように、NCIT といった燃焼/加熱を伴わずに吸引して使用する形態のたばこ製品について、使用時の Nicotine の血中動態を示した研究はなく、申請者は、NCIT 使用時の Nicotine の血中への吸収速度・最高血中濃度・吸収量が、紙巻たばこ喫煙時を上回らないことを先駆けて示した。

本結果の中で、CC1 と比べて NCIT 使用時に、t_{max} が遅延した一因としては、本試験条件において定めた各試験たばこ 1 本を使用する時間が、CC1 では約 2.3 分と短いのに対し、NCIT では約 20 分と長い点が考えられる。しかしながら、各試験たばこ 1

本目と 12 本目の最終 puff から t_{max} までの経過時間を比較しても、1 本目 (NCIT:約 8 分、CC1:約 1.3 分) も、12 本目 (NCIT:約 4.7 分、CC1:約 0.6 分) も CC1 喫煙時と比べ NCIT 使用時の t_{max} が遅延しており、試験たばこを使用する時間の違いだけでは、NCIT 使用時の t_{max} の遅延は説明がつかない。したがって、使用時間の違い以外の要因も考えられた。

この点、先行研究において、緒論でも示した snus のようなたばこ製品 (葉たばこを口腔に含んで使用するタイプ) や、Nicotine ガム製品においては、血漿中 Nicotine 濃度の上昇が、紙巻たばこよりも緩やかであることが示されている。これらの要因としては、snus や Nicotine ガム製品の Nicotine の吸収部位が口腔粘膜であり、紙巻たばこの Nicotine が吸収される肺よりも吸収が小さいことが指摘されている [13-15]。

また、吸引型の Nicotine 置換療法用医薬品である Nicotine Inhaler でも同様に、血漿中 Nicotine 濃度の上昇が、紙巻たばこよりも緩やかであることが示されている [16]。その要因としても、^{11}C-標識 Nicotine を用いてポジトロン放出断層撮影法 (Positron emission tomography、PET) で Nicotine の吸収性を観察したところ、吸引時の Nicotine の沈着部位が主に上気道 (紙巻たばこでは対照的に大半が肺に沈着 [17]) であることが示されており [18]、吸収部位が、Nicotine 血中動態プロファイルの理解に重要であることが考えられる。

これらの先行研究の結果と合わせて考えると、NCIT についても、CC1 と比べて、C_{max} は低いうえ、t_{max} は遅延しており、使用時の血漿中 Nicotine 濃度の上昇が緩やかであることから、Nicotine の吸収経路は紙巻たばことは異なり、Nicotine の吸収が相対的に緩やかな上気道や口腔が主たる吸収経路である可能性が考えられる。今後、本研究成果が基盤となって、そのメカニズムの解明に展開されることが期待される。

第二章　NCIT 使用時の HPHCs への曝露実態の解析

たばこ煙中の HPHCs の多くは、たばこ葉の燃焼に伴って発生する。そのため、燃焼を伴わないたばこ製品である NCIT は、HPHCs の曝露が大幅に低減されていることが期待される。その一方で、製品を使用する際の様態（1 日喫煙本数や喫煙時の吸引容量、吸引頻度など）は、製品の特性や使用者によって異なっている可能性があるため、NCIT を実際に使用した際の HPHCs の曝露量について、臨床試験で評価することが重要である。

そこで本章では、たばこに特徴的な物質である Nicotine に続き、健康リスクの主要因と考えられているたばこ煙中の HPHCs の曝露について、選定した曝露マーカーを指標とし、NCIT・CC1 使用者と非喫煙者間での比較を試みた。

第一項　材料および方法

1．試験たばこ

① 非燃焼吸引型たばこ NCIT

製品構造については Fig. 1.に示した。なお本試験では、1 か月にわたる被験者の連続使用への負担軽減を考慮し、ミントフレーバーを適用した市販品を使用した。

② 紙巻たばこ CC1

NCIT から発生する成分が極めて少ないことから、発生成分量の差を出来るだけ小さくするために、市販紙巻たばこの中で、国際標準化機構（ISO）が定める方法 [9] で測定され、製品個装に表示されたタールおよび Nicotine の値が最も低い製品（Tar:1.0mg、Nicotine:0.1mg）のうち、日本市場で代表的な銘柄とした。

2．試験デザイン

NCIT を使用した際の HPHCs の曝露量について、紙巻たばこ使用時を対照とし評価するため、喫煙者からなる 2 群を、また、生活環境などたばこ製品使用以外からの各

成分への曝露をベースラインとして把握するため、非喫煙者（non-smoker、NS） 群を設定し、計 3 群で構成された試験デザインとした（Fig. 6）。また、被験者のたばこ以外の外的要因を可能な限り揃えるために、全期間入院型の臨床試験を実施した。

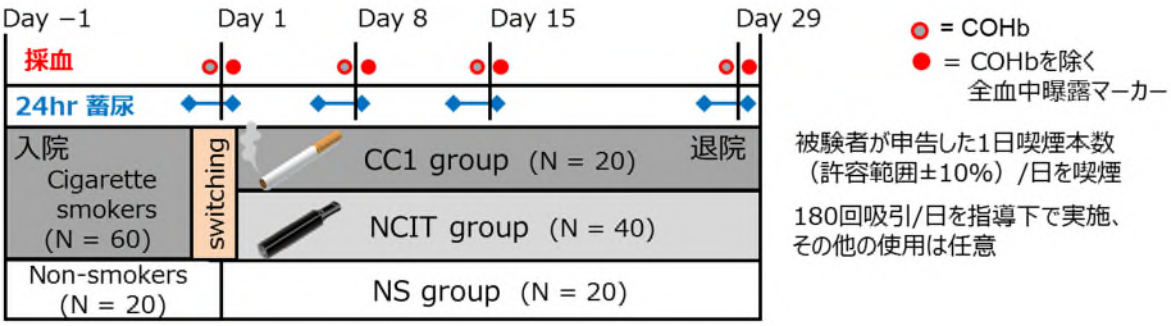

Fig. 6　試験デザイン

被験者のうち喫煙者は、day -1 と day0 の 2 日間に普段喫煙する紙巻たばこ（ISO Tar 1mg）を喫煙し、day1 に NCIT 群または CC1 群の何れかに無作為に割り付けられた。被験者のうち非喫煙者は自動的に NS 群へ割り付けられ、試験期間を通じたばこを使用しなかった。

試験参加者は、試験内容の説明を受け書面同意したのちに、スクリーニングにて健康状態の確認を受け、医師により試験参加が可能と判断された成人男性喫煙者 60 名および成人男性非喫煙者 20 名が被験者として試験に組み込まれた。

被験者のうち喫煙者は、試験実施医療機関へ入院後 2 日間、各被験者が日常喫煙する紙巻たばこを、専用に設置された喫煙室内で、通常喫煙する本数の±10%の範囲で喫煙した。その後、CC1 群または NCIT 群のいずれかに無作為に割り付けられ、以降 28 日間にわたり、割り付けられた試験たばこのみを NCIT および CC1 それぞれ専用に設置された別の喫煙室内で使用した。CC1 群においては、被験者が通常喫煙する本数の±10%の範囲で CC1 を喫煙した。NCIT 群においては、1 日当たり 2 本の NCIT を用い、試験実施医療機関スタッフの指導下で 180 回の吸引を実施、それ以上の使用は任意とした。NS 群においては、試験期間を通じいずれのたばこ製品も用いなかった。

全ての被験者は、喫煙者の 2 群が NCIT または CC1 の使用を開始した 1 日目、8 日目、15 日目および 29 日目の試験たばこを使用する前に採血を実施した（COHb は半減期が 1~4 時間 [19] であることを考慮し、各 1 日前の夕刻、喫煙直後に採血を実施）。

また、採血実施までの 24 時間における蓄尿を尿試料として採取した。

本試験で予定された全ての調査が終了後、入院 31 日目に、医師により被験者の健康状態に問題が無いことが確認され、試験責任医師により退院が判断された。

3．対象被験者

本試験では、健康な成人喫煙者であるアジア系日本人男性を対照として、目標被験者数を喫煙者 48 名以上、非喫煙者 16 名以上の計 64 名以上とした。スクリーニング前において喫煙期間が 1 年間以上、かつ、市販紙巻たばこを 1 日 12 本以上日常的に喫煙しており、年齢が 21 歳以上 50 歳未満、BMI が 18.5 以上 25.0 未満で、スクリーニングにおける診察ならびにバイタルサイン、臨床検査などの各検査に基づき医師により健康状態が良好であると判断されたものを試験への組み入れ対象とした。また、喫煙者については、喫煙期間が 1 年間以上であり、かつスクリーニング日における血清中コチニン濃度が、非喫煙者の上限として報告[20]されている 14 ng/ml 以上であることを、非喫煙者については 14 ng/ml 未満であることを併せて確認した。

4．倫理的配慮

本試験は、「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理的原則（2008 年 10 月改訂）を遵守し、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（厚生省令第 28 号、平成 9 年 3 月 27 日付）」、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令（厚生労働省令第 24 号、平成 20 年 2 月 29 日付）」に準拠して実施した。また本試験の実施にあたっては、試験実施医療機関の試験審査委員会において承認を得た。

5．たばこ煙成分曝露マーカーの選定および評価方法

評価指標として、各国公衆衛生当局より示されている、紙巻たばこ煙中の HPHCs を中心に、先行研究により喫煙特異性および可逆性があると報告されており[19,21]、分析法が確立された曝露マーカーを選定した。Nicotine を含む 10 種のたばこ煙成分およびたばこ煙中の変異原性物質に対応する、血中および尿中曝露マーカー20 種を対象とした（Table 3）。

Table 3　評価対象とした曝露マーカー

たばこ煙成分	曝露マーカー	Matrix
Nicotine	Plasma cotinine	Blood
	molar sum of nicotine, cotinine, trans-3-hydroxycotinine, nicotine-N-glucuronide, cotinine-N-glucuronide, and trans-3-hydroxycotinine-O-glucuronide (Nicotine equivalents)	Urine
CO	Carboxyhemoglobin (COHb)	Blood
Benzene	S-phenylmercapturic acid (S-PMA) 、trans, trans-muconic acid (TMA)	Urine
1,3-Butadiene	monohydroxybutenylmercapturic acid (MHBMA) 、dihydroxybutenylmercapturic acid (DHBMA)	Urine
hydrogen cyanide (HCN)	Thiocyanate (SCN)	Blood
Acrolein	3-hydroxypropylmercapturic acid (3-HPMA)	Urine
Crotonaldehyde	3-hydroxy-1-methylpropyl-mercapturic acid (HMPMA)	Urine
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and glucuronide (Total NNAL)	Urine
Pyrene	1-hydroxypyrene (1-OHP)	Urine
4-aminobiphenyl (4-ABP)	4-ABP	Urine
変異原物質	Urine mutagenicity	Urine

尿変異原性を除く全ての曝露マーカーは、三菱化学メディエンス株式会社にて測定された。尿中の曝露マーカーおよび血漿中 Nicotine は、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置（LC-MS/MS）により測定された [21]。血中の COHb 濃度はシアンメトヘモグロビン法 [22] によって、また血漿中チオシアネート濃度は分光光度分析 [23] により、いずれもマイクロプレートリーダーを用い測定された。

24 時間蓄尿試料の尿変異原性については、Labstat International 社にて測定された。

6. 製品使用状況の調査方法

CC1 群の喫煙本数は、被験者の喫煙時に試験実施医療機関スタッフが立会い、記録された。NCIT 群の吸引回数については、180 回までを puff profiler（CReSSmicro™、Plowshare/Borgwaldt-KC 社製）により記録し、以降の回数を所定の記録用紙に自ら申告させる方法とした。

7．安全性評価

医師による診察、臨床検査値、バイタルサインおよび安静時 12 誘導心電図により、有害事象を調査した。

8．統計解析手法

全ての統計解析は、SAS for Windows (version 9.2、SAS Institute) を用いて実施した。NCIT 群と CC1 群の各曝露マーカー値の差の検定にあたっては、多くの曝露マーカーで等分散性と正規性が確認されなかったため、各群の中央値に対し、ノンパラメトリックな検定である Wilcoxon の順位和検定を実施し、統計的有意性は $p<0.05$ (両側) とした。

第二項　結果

1．被験者の背景情報

喫煙者 97 名と非喫煙者 44 名が試験参加に同意を示し、そのうち、試験責任医師のスクリーニングによって、試験参加が可能と判断された喫煙者 60 名と非喫煙者 (NS) 20 名が被験者として組み入れられた。さらに喫煙者は、NCIT 群：40 名と CC1 群：20 名になるように、無作為に割り付けられた。なお、被験者のうちの NS 群の 2 名が、試験期間中に臨床的に問題となる偶発症 (結腸憩室炎と腸炎) を発現したため、中止基準にしたがって、試験を中止した。他の被験者については、全員が試験を完遂した。被験者の平均年齢、1 日喫煙本数平均、喫煙歴、BMI を Table 4 に示す。いずれの項目も、被験者群間で特筆すべき偏りは認められなかった。

2．製品使用状況の調査

試験期間中において、各試験たばこの使用量の変動を把握するため、NCIT 群の吸引回数と、CC1 群の喫煙本数をそれぞれ記録した。その結果、Fig. 7 に示すように、両群ともに、試験期間中の使用量に、大きな変動は認められないことを確認した。

Table 4　被験者群ごとの背景情報

	被験者群		
	NCIT	CC1	NS
被験者数 (n)			
解析対象数 (組み入れ数)	40 (40)	20 (20)	18 (20)
年齢 (歳)			
Mean ± SD	28.3 ± 6.12	28.6 ± 7.07	32.1 ± 4.55
Range	21-43	21-49	22-39
Body mass index (kg/m^2)			
Mean ± SD	20.7 ± 1.75	20.9 ± 1.33	21.6 ± 1.81
Range	18.5-24.6	19.0-24.1	18.8-24.9
喫煙経験年数 (year)			
Mean ± SD	8.20 ± 6.12	8.10 ± 7.17	-
Range	1-23	1-29	
1 日当たり喫煙本数 (本)			
Mean ± SD	21.0 ± 2.24	21.1 ± 2.61	-
Range	20-30	20-30	

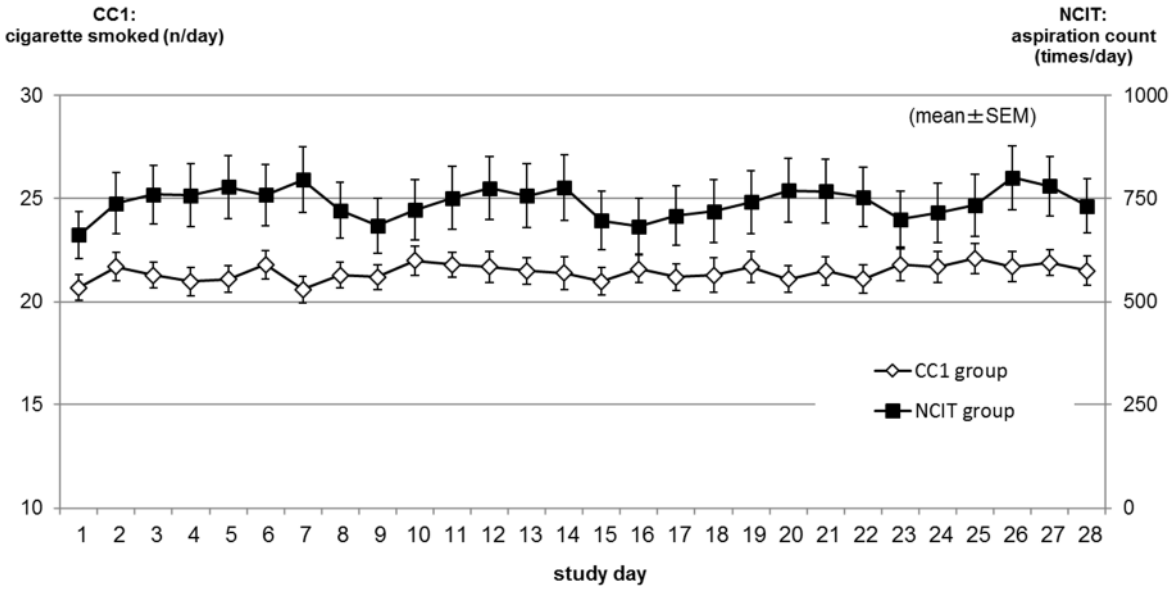

Fig. 7　被験者の試験たばこ使用状況

各プロットは、CC1 の 1 日当たり喫煙本数 (左軸) および NCIT の総吸引回数 (右軸) を示す。

3．各試験たばこを機械吸引した際の HPHCs 量の比較解析

各試験たばこからの HPHCs 量を比較するため、CC1 と NCIT をそれぞれ機械吸引し、Nicotine と、タールをはじめ 10 種の HPHCs を定量した（Table 5）。なお、機械での吸引に際し、CC1 については、国際標準化機構（ISO）が定める方法（吸引容量 35 ml を 2 秒間かけ、1 分間当たり 1 回吸引）[9] で吸引した。また、NCIT については、製品の使用実態に関する知見がないため、紙巻たばこより、大きな吸引容量を定めるカナダ保健省の方法（吸引容量 55 ml を 2 秒間かけ、1 分間当たり 2 回吸引）[24] にしたがって吸引した。吸引回数については、ヒトの活動時間を 16 時間と仮定し、30 秒ごとに 1 回吸引した場合の 1 日当たり総吸引回数を 1920 回として計算した。定量解析の結果、CC1 群では、Crotonaldehyde 以外の成分が全て検出されたのに対し、NCIT 群では、Nicotine は検出され、その他の成分では検出限界未満であった。このことから、10 種の HPHCs は、CC1 群に比べて、NCIT 群で低値であり、その曝露は大幅に低減していることが推察された。

Table 5　試験たばこ機械吸引時の Tar、Nicotine および HPHCs の測定結果

Cigarette smoke constituents		NCIT	CC1
		1920 回吸引計	1 本当
Tar	mg	n.d.	1.0
Nicotine	mg	1.1	0.1
CO	mg	n.d. (0.064)	1.6
NNK	ng	n.d. (4.93)	6.14
Acrolein	μg	n.d. (1.992)	5.12
Crotonaldehyde	μg	n.d. (3.138)	n.d. (0.718)
1,3-Butadiene	μg	n.d. (1.32)	5.60
Benzene	μg	n.d. (0.263)	3.85
HCN	μg	n.d. (0.221)	3.56
Benzo(a)pyrene	ng	n.d. (0.03)	1.98
4-ABP	ng	n.d. (0.124)	0.321

NCIT：吸引容量 55 ml を 2 秒間かけ、1 分間当たり 2 回吸引

CC1：吸引容量 35 ml を 2 秒間かけ、1 分間当たり 1 回吸引

n.d.：定量下限未満。カッコ内の数値は定量下限値を示す。なお、NCIT の Tar については、粒子状物質の捕集に用いたガラス繊維フィルターの重量が増加しなかったことを示す。

4. 各試験たばこ使用時の曝露マーカーの変動解析

各試験たばこをヒトが使用した際の HPHCs への曝露実態を明らかにするため、各被験者群における 10 種の曝露マーカーの変動を臨床試験で評価し、その推移を解析した (Table 6、Fig. 8) 。解析にあたって、「1. 被験者の背景情報」で記載した中止症例 (NS 群における 2 名の被験者) のデータは、解析対象から除外した。また、NCIT 群の被験者のうち 1 名について、調査日 8 日目の 24 時間蓄尿に、試験実施計画書からの逸脱 (被験者の失念による排尿 2 回分の不採取) が発生したことから、本被験者の調査日 8 日目のデータも解析対象から除外した。

まず、ベースライン期 (入院後 2 日間：被験者のうち喫煙者 (CC1 群・NCIT 群) は、各自が日常喫煙する紙巻たばこを喫煙) における曝露マーカーの値は、全ての曝露マーカーにおいて、NCIT 群・CC1 群の値が NS 群より高く、NCIT 群と CC1 群の間に特筆すべき違いは観察されなかった (Table 6、Fig. 8) 。

次に、各群の曝露マーカーの変動推移を比較解析するため、ベースライン期と 29 日目の曝露マーカー量をそれぞれ比較した。その結果、CC1 群と NS 群においては、全ての曝露マーカーの推移について、大きな変動は観察されなかった。その一方で、NCIT 群においては、調査日 1 日目に被験者が紙巻たばこから NCIT へ切り替えたところ、調査日 8 日目で既に、調査した全ての曝露マーカー量が低下していた。さらに、調査日 29 日目には、CC1 群と比べて NCIT 群で、全ての曝露マーカーが有意に低下し、Nicotine と NNK（Nitrosoamine の 1 種） に対応する曝露マーカー以外では、NS 群と同程度であることが観察された。したがって、NCIT を使用することによって、10 種の HPHCs への曝露は、非喫煙者群と同程度にまで低下していることが推察された。

5. 安全性評価

本試験において、有害事象は 8 名に対して 9 件発現し、そのうち、1 件 (結腸憩室炎、中等度) については、重篤と判断されたものの、該当被験者が NS 群であったことから、試験たばことの因果関係はないと判断された。なお、その他の重篤でない有害事象については、試験たばことの因果関係について、「多分関連あり」 (血中クレアチンホスホキナーゼ増加、軽度、非重篤) が 1 件、「多分関連なし」 (下痢、軽度、非重篤) が 1 件、「関連なし」が 7 件であった。いずれも試験終了時あるいは追跡調査におい

て回復が確認されており、特に安全性に関して問題となる所見は認められなかった。

Table 6　曝露マーカーの被験者群ごとの要約統計量

Cigarette smoke constituents	Biomarker	Study day							
		day 1		day 8		day 15		day 29	
		Mean ± SD	Median (IQR)	Mean ± SD	Median (IQR)	Mean ± SD	Median (IQR)	Mean ± SD	Median (IQR)
Nicotine	Plasma cotinine (ng/ml)								
	CC1 (n=20)	200 ± 115	168 (103-274)	186 ± 98.6	172 (107-242)	204 ± 108	181 (133-262)	218 ± 102	227 (161-278)
	NCIT (n=40)	173 ± 103	133 (105-268)	24.9 ± 21.5	18.4 (8.2-34)	23.1 ± 23.5	12.1 (4.8-34.1)	26.2 ± 33.7	10.2 (4.6-37.2)*
	NS (n=18)	0.25 ± 0.0	0.25 (0.25-0.25)	0.25 ± 0.0	0.25 (0.25-0.25)	0.25 ± 0.0	0.25 (0.25-0.25)	0.25 ± 0.0	0.25 (0.25-0.25)
Nicotine	NEs (mg/24h)								
	CC1	12.8 ± 7.87	11.9 (7.9-13.7)	11.9 ± 7.36	10.0 (7.5-13.3)	13.3 ± 8.52	11.3 (8.9-14.3)	12.5 ± 8.18	10.4 (7.8-13.2)
	NCIT†	12.0 ± 6.49	10.5 (7.6-17.3)	1.49 ± 1.36	1.0 (0.53-2.0)	1.64 ± 1.9	0.83 (0.33-2.4)	1.51 ± 1.81	0.68 (0.26-2.1)*
	NS	0.009 ± 0.008	0.007 (0.004-0.010)	0.007 ± 0.011	0.004 (0.003-0.006)	0.006 ± 0.008	0.004 (0.003-0.006)	0.007 ± 0.012	0.004 (0.003-0.005)
CO	COHb (%)‡								
	CC1	5.61 ± 2.61	5.06 (4.15-6.74)	5.50 ± 1.87	5.06 (4.12-6.83)	5.61 ± 1.79	5.58 (4.38-6.28)	5.54 ± 1.67	5.16 (4.45-6.72)
	NCIT	4.75 ± 1.66	4.93 (3.72-5.77)	2.11 ± 0.72	2.14 (1.52-2.60)	2.20 ± 0.69	2.32 (1.80-2.72)	2.04 ± 0.73	1.94 (1.55-2.51)*
	NS	2.12 ± 0.95	2.39 (1.43-2.84)	2.25 ± 0.73	2.16 (1.67-2.80)	1.81 ± 0.47	1.69 (1.58-2.03)	1.74 ± 0.61	1.72 (1.24-2.11)
NNK	total NNAL (ng/24h)								
	CC1	187 ± 100	178 (119-219)	170 ± 90.9	155 (100-212)	161 ± 77.3	160 (93.3-218)	151 ± 78.4	142 (80.8-204)
	NCIT†	157 ± 63.5	155 (118-199)	60.5 ± 25.5	60.8 (43.6-79.2)	41.0 ± 21.1	38.6 (24.8-53.0)	24.2 ± 19.8	19.4 (13.4-24.3)*
	NS	3.40 ± 3.62	2.32 (1.32-3.58)	2.39 ± 3.03	1.60 (0.63-2.66)	1.68 ± 1.48	1.43 (0.54-2.22)	0.99 ± 0.85	0.56 (0.48-1.17)
Acrolein	3-HPMA (mg/24h)								
	CC1	3.97 ± 2.45	3.00 (2.36-4.62)	3.23 ± 1.23	3.08 (2.26-3.67)	3.64 ± 2.48	2.89 (2.25-3.50)	2.85 ± 2.19	2.45 (1.86-2.75)
	NCIT†	3.35 ± 1.62	2.92 (2.22-4.24)	0.81 ± 0.30	0.81 (0.62-0.94)	0.79 ± 0.38	0.72 (0.48-0.97)	0.67 ± 0.29	0.66 (0.43-0.82)*
	NS	0.95 ± 0.22	0.93 (0.82-1.12)	0.96 ± 0.30	0.93 (0.80-1.03)	0.80 ± 0.31	0.76 (0.62-1.06)	0.66 ± 0.20	0.69 (0.48-0.82)
Crotonaldehyde	HMPMA (μg/24h)								
	CC1	1616 ± 793	1394 (1061-2200)	1622 ± 792	1388 (1094-1791)	1630 ± 873	1509 (1138-1832)	1575 ± 850	1212 (934-2115)
	NCIT†	1503 ± 684	1504 (936-2002)	244 ± 79.4	243 (188-285)	213 ± 65.8	211 (158-258)	191 ± 81.7	185 (128-228)*
	NS	257 ± 58.1	246 (215-308)	242 ± 63.0	238 (216-292)	226 ± 60.5	229 (184-250)	198 ± 75.0	178 (144-232)
1,3-Butadiene	MHBMA (μg/24h)								
	CC1	7.15 ± 8.41	3.85 (1.63-8.57)	4.58 ± 5.39	2.66 (1.38-5.09)	6.77 ± 7.04	3.88 (1.32-9.62)	5.73 ± 6.55	3.22 (1.89-6.19)
	NCIT†	9.16 ± 10.6	4.57 (1.60-12.5)	0.32 ± 0.21	0.25 (0.22-0.33)	0.70 ± 0.87	0.42 (0.24-0.68)	0.44 ± 0.64	0.26 (0.18-0.38)*
	NS	0.85 ± 1.11	0.45 (0.31-0.76)	0.35 ± 0.18	0.31 (0.22-0.43)	0.46 ± 0.23	0.38 (0.33-0.51)	0.84 ± 1.34	0.26 (0.20-0.50)
1,3-Butadiene	DHBMA (μg/24h)								
	CC1	496 ± 144	474 (393-561)	451 ± 107	442 (376-501)	486 ± 140	459 (407-523)	403 ± 177	382 (322-459)
	NCIT†	458 ± 128	441 (357-536)	281 ± 82.4	288 (217-326)	305 ± 65.6	305 (257-338)	288 ± 85.7	290 (216-349)*
	NS	346 ± 87.8	344 (287-405)	358 ± 94.2	342 (280-441)	329 ± 63.6	340 (280-357)	304 ± 89.5	290 (240-367)

Table 6　曝露マーカーの被験者群ごとの要約統計量（続き）

Cigarette smoke constituents	Biomarker	Study day							
		day 1		day 8		day 15		day 29	
		Mean ± SD	Median (IQR)	Mean ± SD	Median (IQR)	Mean ± SD	Median (IQR)	Mean ± SD	Median (IQR)
Benzene	TMA (μg/24h)								
	CC1	155 ± 68.8	138 (100-191)	130 ± 46.7	129 (94.1-163)	147 ± 54.0	143 (113-165)	161 ± 82.3	156 (117-200)
	NCIT†	123 ± 54.0	109 (89.8-160)	39.5 ± 15.3	36.9 (28.6-51.8)	47.1 ± 18.8	44.8 (36.6-54.5)	72.6 ± 49.9	54.1 (38.3-92.3)*
	NS	49.0 ± 25.1	43.2 (30.1-59.6)	53.9 ± 24.0	48.9 (35-68.8)	49.9 ± 20.2	45.9 (34.5-64.6)	77.4 ± 38.9	66.7 (52-99.7)
Benzene	*S*-PMA (ng/24h)								
	CC1	420 ± 276	383 (238-514)	496 ± 273	427 (292-620)	501 ± 286	526 (274-607)	491 ± 312	432 (351-543)
	NCIT†	445 ± 238	430 (245-614)	156 ± 104	117 (93.7-183)	180 ± 113	133 (82.7-272)	203 ± 118	194 (111-264)*
	NS	156 ± 90.7	140 (101-181)	190 ± 98.8	162 (118-263)	238 ± 165	197 (128-288)	231 ± 161	160 (117-255)
Pyrene	1-OHP (ng/24h)								
	CC1	346 ± 178	349 (247-412)	340 ± 134	318 (234-439)	309 ± 97.5	291 (259-372)	264 ± 119	230 (194-309)
	NCIT†	321 ± 170	265 (226-407)	130 ± 61.2	119 (82.4-173)	133 ± 75.1	128 (77.9-153)	61.2 ± 32.5	55.5 (41.4-73.5)*
	NS	129 ± 63.9	108 (81.8-176)	123 ± 53.2	113 (86.5-152)	122 ± 58.0	101 (73.8-167)	70.1 ± 23.4	71.3 (61.2-79.9)
4-ABP	4-ABP (ng/24h)								
	CC1	11.0 ± 7.37	8.28 (6.63-12.8)	8.89 ± 6.17	8.37 (4.40-11.8)	9.21 ± 4.81	9.65 (5.25-13.1)	7.74 ± 4.49	7.80 (3.89-10.8)
	NCIT†	9.30 ± 5.29	8.96 (5.66-11.6)	1.15 ± 0.52	1.10 (0.92-1.26)	1.22 ± 0.65	1.03 (0.82-1.36)	1.02 ± 0.54	0.89 (0.73-1.13)*
	NS	1.43 ± 1.39	1.13 (0.80-1.41)	1.19 ± 0.48	1.17 (1.02-1.28)	1.11 ± 0.45	1.02 (0.86-1.26)	1.02 ± 0.49	0.98 (0.75-1.13)
HCN	SCN (μmol/l)								
	CC1	75.4 ± 34.1	71.1 (52.5-92.0)	70.7 ± 27.6	63.7 (52.8-82.6)	73.7 ± 28.1	69.1 (55.2-86.2)	74.6 ± 28.5	69.1 (53.5-89.3)
	NCIT	68.9 ± 25.4	67.3 (51.9-84.4)	46.4 ± 14.7	44.4 (36.0-55.5)	39.3 ± 9.24	37.8 (32.3-43.7)	31.2 ± 7.01	29.5 (27.3-35.1)*
	NS	29.7 ± 6.52	28.5 (24.7-32.1)	26.0 ± 8.67	27.6 (23.9-29.3)	28.5 ± 7.19	28.0 (26.8-29.6)	26.7 ± 6.35	26.2 (25.0-27.9)
Mutagen	mutagenicity (revertants/24h)†								
	CC1	34459	22522	16142	14939	19134	15112	15679	13522
	NCIT†	24292	21574	5531	5005	6823	4406	5519	4449
	NS	10479	8054	5752	3668	4768	2933	6830	4040

* day 29 (COHb は day 28) において、NCIT 群と CC1 群の差が統計的有意。 $p < 0.05$。

‡ COHb 測定用の採血は day 0、7、14、および 28 の夕刻に実施。

† day 8 の尿試料測定は 39 名分のデータに基づく。

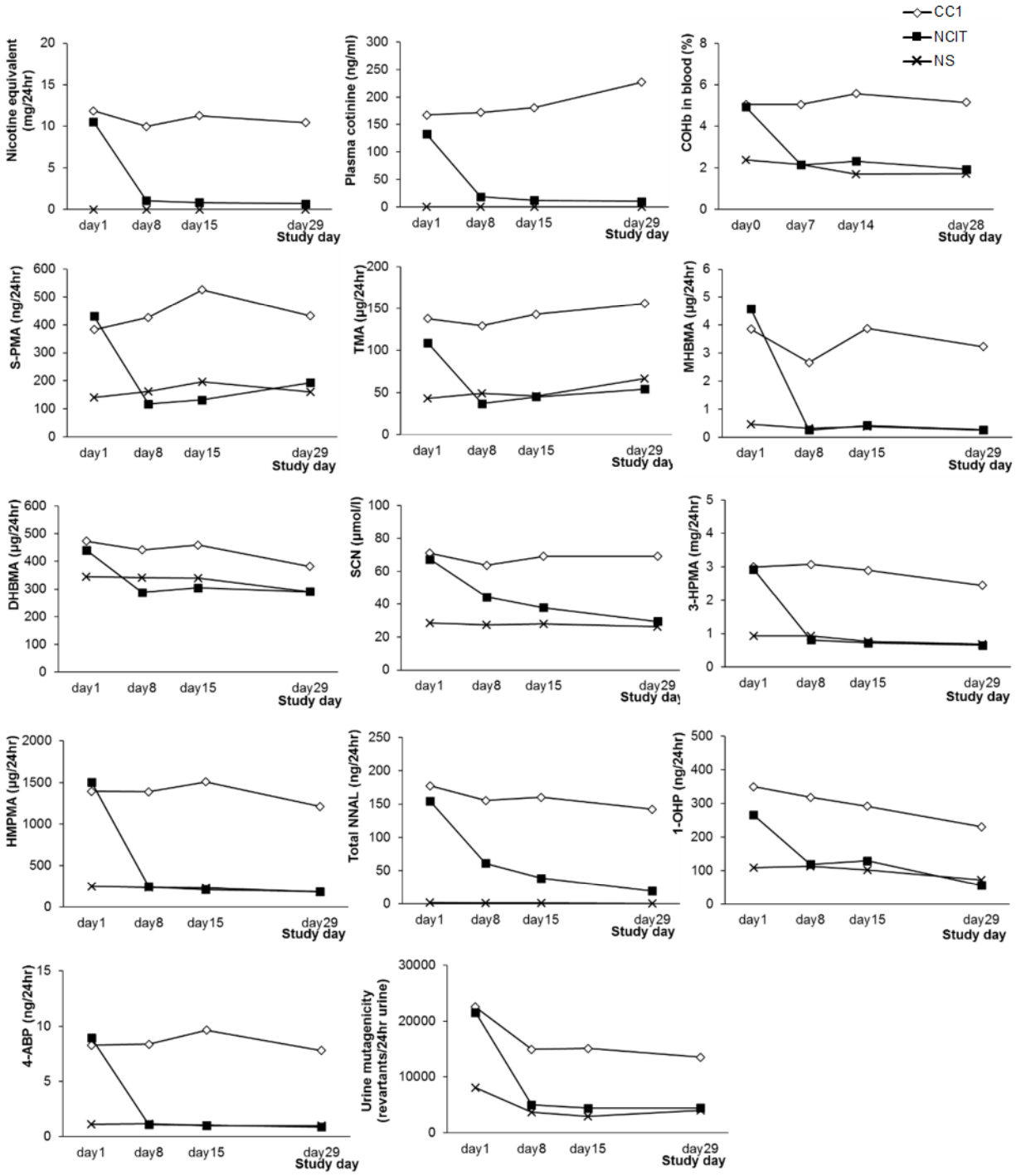

Fig. 8　曝露マーカーレベルの推移

多くの曝露マーカーで等分散性と正規性が確認されなかったため、グラフは全て中央値で表示した。CC1 群と NCIT 群の全ての被験者は、ベースラインとして、day -1、0 の 2 日間、各被験者が日常喫煙する紙巻たばこを、専用に設置された喫煙室内で、通常喫煙する本数の±10%の範囲で喫煙した。COHb の採血は day 0、7、14、28 の 16 時以降に実施した。

第三項　考察

本試験では、機械吸引条件下で、CC1 に比べて HPHCs 量の低減が観察された NCIT を対象とし、臨床試験にて、NCIT を使用した際の曝露マーカーの変動を CC1 群と NS 群と比較解析した。その結果、NCIT 群における各種曝露マーカー量は、ベースライン期には CC1 群と同等で、高値を示したものの、調査日 8 日目までに大きく低下し、調査日 29 日目には、Nicotine と、Nitrosoamine の 1 種である NNK に対する曝露マーカーを除き、NS 群と同程度にまで低下することが観察された。したがって、NCIT を利用することで、HPHCs への曝露が非喫煙者と同程度まで低くなることが示唆された。

本試験結果において、まず、Nicotine に対する曝露マーカー（Cotinine と Nicotine equivalents）が、調査日 29 日目までに NS 群のレベルまで下がらなかった要因としては、NCIT 自体が Nicotine を含む葉たばこ由来成分の摂取を期待した製品であるため、その継続的な利用によって Nicotine が確かに摂取されることを臨床試験で証明されたものと考えられる。また、NNK に対する曝露マーカー（total NNAL）が、調査日 29 日目までに NS 群のレベルまで下がらなかった要因としては、NNK の代謝物である NNAL が、相対的に長い半減期（α 相:1–4 日、β 相:10–45 日）を有しており [25,26]、本試験で設定した 28 日間では、被験者の体内からの消失に至らなかった可能性が考えられた。

さらに、たばこ製品を使用しない NS 群においても、各種曝露マーカーの値がゼロではないことは、興味深い知見である。これは、たばこからの曝露ではないことから、食事などの環境要因から曝露されていることが示唆される。これらの知見から、たばこ煙成分の曝露を臨床試験で検証する際には、その対照として、NS 群の設定が必須であり、食事などの要因が入ってきても、たばこ煙成分の曝露状況を把握できる試験デザインが重要であることが示された。以上、本研究成果が基盤となって、今後さらに精密な臨床試験がデザインされ、有用な成果の収集が期待される。

第三章　NCIT 使用による生体影響評価：動脈硬化関連マーカーの変動解析

第一章と第二章で申請者は、1) NCIT を使用することによって、主成分である Nicotine の吸収速度・最高血中濃度・吸収量は、CC1 喫煙時を上回らず、Nicotine による依存性や急性毒性が紙巻たばこより低い可能性や、2) たばこ煙中の HPHCs への曝露量は、CC1 の喫煙に比較して大幅に低減し、非喫煙群と同程度であることを示してきた。しかしながら、緒論で提案した通り、社会と共生し得るたばことしての究極の理想は、「HPHCs を発生させない」ことに加え、「生体への悪影響が無い」ことを示すことが重要である。その点、米国 Institute of Medicine も、レポート「Clearing the Smoke」において、「疾病および疾病リスクの指標として評価するためには、疾病のメカニズムを正確に反映するバイオマーカーを開発しなくてはならない」と勧告している [27]。そのため、バイオマーカーを介した生体影響評価法の確立が求められてはいるものの、現在までに、科学的なコンセンサスが得られた手法は開発されていない。

そこで本章では、喫煙による HPHCs への曝露と、生体影響を橋渡しする評価法の構築を目指し、疾病メカニズムに関する先行研究を参考に、NCIT 使用時のバイオマーカーの変動をパイロット的に調査した。

第一項　材料および方法

1．試験デザイン

動脈硬化発症メカニズムに関連すると考えられるバイオマーカーの、NCIT を使用した際の変動について、紙巻たばこ使用時を対照とし評価するため、また生活環境など、たばこ製品使用以外からの要因による変動をバックグラウンドとして把握するため、喫煙者からなる２群と非喫煙者（non-smoker、NS）群の計３群によるデザインにて、全期間入院型の臨床試験を実施した（Fig. 9）。

なお、第二章で報告した曝露マーカー変動調査試験（試験 1）における、生体影響を評価するバイオマーカーの変動解析では、対象としたバイオマーカーにおいて CC1 群と比べ特筆すべき変動は観察されなかった。この原因として、喫煙者群と非喫煙者群の

ベースライン値に差が認められないマーカーが散見されたこと、またこれらバイオマーカーは食事や運動、生活環境などの影響を受けやすいことが知られており、試験 1 において観察対象とした被験者数では、紙巻たばこから NCIT へ切り替え、たばこ煙中の HPHCs の曝露が低減したことによる、生体影響に関連するバイオマーカーの変動を観察できなかった可能性が考えられる。そこで本研究では、バイオマーカー変動の統計的検出力を向上させるため、試験 1 および、当該試験と類似の試験デザインで NCIT を用い実施された他の臨床試験（試験 2）の計 2 試験のデータを統合し、健康な成人男性喫煙者 124 名および非喫煙者 52 名を対象に解析した。

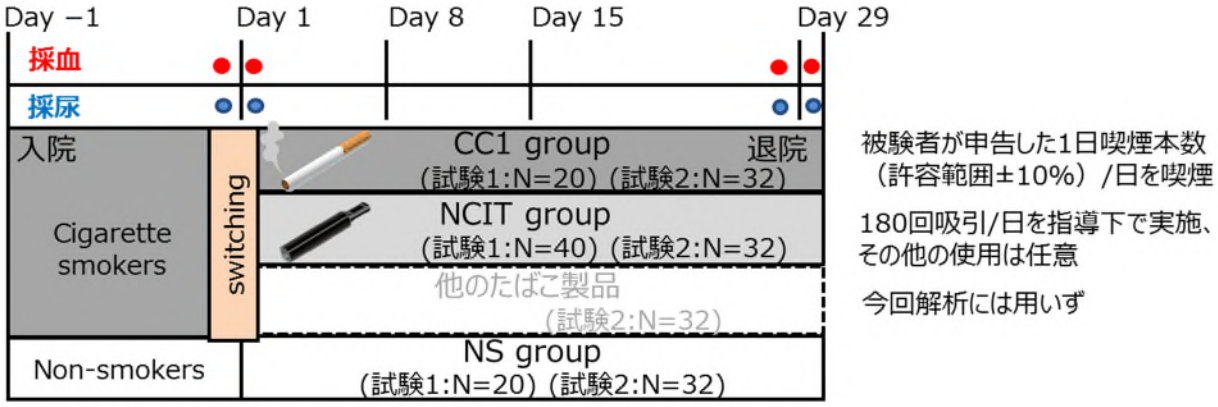

Fig. 9　試験デザイン

試験 1 および試験 2 いずれも、被験者のうち喫煙者は、day -1 と day 0 の 2 日間に普段喫煙する紙巻たばこ（ISO Tar 1mg）を喫煙し、day 1 に NCIT 群または CC1 群（これに加え、試験 2 については他のたばこ製品群）の何れかに、無作為に割り付けられた。
非喫煙者は自動的に NS 群へ割り付けられ、試験期間を通じたばこを使用しなかった。

試験 1 の試験デザインについては、第二章 第一項に記載した。

試験 2 の試験デザインについて、試験参加者は、試験内容の説明を受け書面同意したのちに、スクリーニングにて健康状態の確認を受け、医師により試験参加が可能と判断された成人男性喫煙者 96 名および成人男性非喫煙者 32 名が被験者として試験に組み込まれた。被験者のうち喫煙者は、試験実施医療機関へ入院後 2 日間、各被験者が日常喫煙する紙巻たばこを、専用に設置された喫煙室内で、通常喫煙する本数の±10%の範囲で喫煙した。その後、CC1 群、NCIT 群または他のたばこ製品群のいずれかに無作為に割り付けられ、以降 28 日間にわたり、割り付けられた試験たばこのみを試験たばこ

毎にそれぞれ専用に設置された別の喫煙室内で使用した。CC1 群においては、被験者が通常喫煙する本数の±10%の範囲で CC1 を喫煙した。NCIT 群においては、1 日当たり 2 本の NCIT を用い、180 回の吸引を試験実施医療機関スタッフの指導下で実施、それ以上の使用は任意とした。NS 群においては、試験期間を通じいずれのたばこ製品も用いなかった。試験 2 においては、試験実施医療機関の入院中に予定された全ての調査が終了後、入院 31 日目（調査日 29 日目）に、試験責任医師による、被験者の健康状態に問題が無いことの確認を経て、続いて NCIT 群を除く 3 群の被験者に、約 1 か月間の来院型追跡調査を実施したが、試験 1 においては相当する調査を実施していないため、試験 2 における試験実施医療機関入院時のデータのみを本研究の解析に用いることとした。

試験 1、試験 2 の全ての被験者は、喫煙者の 2 群が NCIT または CC1 の使用を開始する前日、開始 1 日目、調査日 28 日目および 29 日目の試験たばこを使用する前に、採血および採尿をそれぞれ実施した。

2. 試験たばこ

① 非燃焼吸引型たばこ NCIT

製品構造については Fig. 1.に示した。試験 1 ではミントフレーバーを適用した市販品を、試験 2 ではミントタイプではないフレーバーを適用した市販品を、それぞれ使用した。

② 紙巻たばこ CC1

試験 1、試験 2 のいずれも、市販紙巻たばこの中で、国際標準化機構（ISO）が定める方法[9]にて測定され、製品個装に表示されたタールおよびニコチンの値が最も低い製品（Tar 1.0mg、Nicotine 0.1mg）のうち、日本市場で代表的な銘柄とした。

3. 対象被験者

試験 1、試験 2 のいずれも、健康な成人喫煙者であるアジア系日本人男性を対照とした。スクリーニング前において喫煙期間が 1 年間以上、かつ、市販紙巻たばこを 1

日 12 本以上日常的に喫煙しており、年齢が 21 歳以上 50 歳未満、BMI が 18.5 以上 25.0 未満で、スクリーニングにおける診察ならびにバイタルサイン、臨床検査などの各検査に基づき医師により健康状態が良好であると判断されたものを試験への組み入れ対象とした。また喫煙者については、喫煙期間が 1 年間以上であり、かつスクリーニング日における血清中コチニン濃度が、非喫煙者の上限として報告[20]されている 14 ng/ml 以上であることを、非喫煙者については 14ng/ml 未満であることを併せて確認した。

4．倫理的配慮

試験 1 と試験 2 のいずれも、「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理的原則（2008 年 10 月改訂）を遵守し、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（厚生省令第 28 号、平成 9 年 3 月 27 日付）」、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令の一部を改正する省令（厚生労働省令第 24 号、平成 20 年 2 月 29 日付）」に準拠して実施した。また本試験の実施にあたっては、試験実施医療機関の試験審査委員会において承認を得た。

5．生体影響を評価するバイオマーカーの選定および評価方法

紙巻たばこの喫煙は、肺がん、虚血性心疾患、慢性閉塞性肺疾患など多くの疾病リスクを伴うことが明らかとなっている[4]。なかでも虚血性心疾患の原因となる動脈硬化と喫煙との関連については多くの報告がなされており、内皮機能、コレステロール代謝および血小板機能の変化や、酸化ストレス、炎症の誘導が挙げられている[28,29]。これら動脈硬化発症メカニズムとの関連に加え、喫煙者と非喫煙者の値に差があること（喫煙特異性）、および、喫煙者が禁煙した場合に非喫煙者の方向へ改善すること（短期変動性、可逆性）が報告されているものを中心に、生体影響を評価するバイオマーカー15 種（Table 7）を選定した。選定したバイオマーカーは、動脈硬化発症プロセスの進展を反映すると考えられる、炎症（hs-CRP、FIB）、血小板活性化・凝固（11-DHTXB2）、血管内皮機能（sICAM-1）に関するマーカーに加え、動脈硬化のリスク因子であると考えられる、活性酸素と抗酸化物質の不均衡による酸化ストレスの増大（8-epi-PGF2α、8-OhdG、MDA ,T-Bil）、内皮損傷やその活性化を惹起する脂質代謝異常（LDL-C、HDL-

C、TC）および糖代謝の異常（GLU、HbA1C）に関連するマーカーである。これらを対象に、本研究においてこれまでに、紙巻たばこ喫煙時と比べ、使用者の HPHCs への曝露が大幅に低減することが示された NCIT 使用時の各バイオマーカーの変動を、CC1 喫煙時を対照として調査した。

Table 7 評価対象としたバイオマーカー

生体影響	生体指標	Matrix
酸化ストレス	8-iso-prostaglandin F2α（8-epi-PGF2α）	Urine
	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)	Urine
	malondialdehyde (MDA)	Urine
炎症	high sensitive-C reactive protein (hs-CRP)	Blood
	fibrinogen (FIB)	Blood
血栓・凝固	11-dehydrothromboxane B2 (11-DHTXB2)	Urine
血管内皮凝固	soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1)	Blood
脂質代謝	LDL-cholesterol (LDL-C)	Blood
	HDL-cholesterol (HDL-C)	Blood
	total cholesterol (TC)	Blood
糖代謝	glucose　(GLU)	Blood
	HbA1c	Blood
抗酸化容量	total bilirubin (T-Bil)	Blood
血液学的指標	red blood cell (RBC)	Blood
	white blood cell (WBC)	Blood

評価対象とした全てのバイオマーカーは、LSI メディエンス株式会社にて測定された。血液学的指標（WBC、RBC）および臨床検査項目（HbA1c、hs-CRP、FIB、GLU、HDL-Cho、LDL-Cho、T-Cho、T-Bil）については確立された分析方法にて測定された。MDA については高速液体クロマトグラフィーにより、また Urine 8-epi-PGF2a、8-OHdG、11-DHTXB2、plasma sICAM-1 についてはマイクロプレート酵素免疫分析法によりそれぞれ測定された。

6. 製品使用状況の調査方法

試験 1、試験 2 ともに、CC1 群の喫煙本数は、被験者の喫煙時に立会いする試験実施医療機関スタッフにより記録された。NCIT 群の吸引回数については、180 回までを puff profiler (CReSSmicro™、Plowshare/Borgwaldt-KC 社製）により記録し、以降

の回数を所定の記録用紙に自ら申告させる方法とした。

7．安全性評価

医師による診察、臨床検査値、バイタルサインおよび安静時 12 誘導心電図により有害事象を調査した。

8．統計解析手法

全ての統計解析は、SAS for Windows (version 9.2、SAS Institute) を用いて実施した。統計的検出力を高めるために、類似の試験デザイン試験 1 および試験 2 のうちの、1 か月入院のデータを統合し解析した。各群における試験たばこ使用開始前日および開始 1 日目のバイオマーカー値の平均をベースライン値とした。NCIT 群と CC1 群との差の有意性解析にあたっては、調査日 28 日目および 29 日目の平均を目的変数とし、試験、被験者群、試験と被験者群の交互作用およびベースライン値を説明変数とした共分散分析 (analysis of covariance、ANCOVA) にて解析した。なお、試験と被験者群の交互作用が有意でない場合、モデルから試験と被験者群の交互作用を除いた。

第二項 結果

1．被験者の背景情報

試験の参加に同意したもののうち、試験責任医師のスクリーニングによって、試験参加が可能と判断された 233 名が試験に組み込まれ、そのうち試験を完遂した喫煙者 124 名 (NCIT 群・CC1 群) と、非喫煙者 (NS 群) 50 名のデータを解析対象とした。

被験者の平均年齢、1 日喫煙本数平均、喫煙歴、BMI を Table 8 に示す。BMI については、NS 群と比べて、喫煙者 (SM) 集団の方がわずかに低い傾向を示したものの、その他のいずれの項目も含めて、被験者群間で特筆すべき偏りは認められなかった。

2．製品使用状況の調査

試験 1 の製品使用状況の調査結果については、第二章 Fig. 7 に示した。

試験 2 においても、NCIT 使用者の吸引回数と CC1 喫煙者の喫煙本数をそれぞれ記録し、両群とも、試験期間を通じて使用量に大きな変動は認められないことを確認し

た（Fig. 10）。

Table 8　被験者群ごとの背景情報の要約統計量

	被験者群			
	SM (all)	NCIT	CC1	NS
被験者数（n）				
解析対象数（組み入れ数）	124 (124)	72 (72)	52 (52)	50 (52)
年齢（歳）				
Mean ± SD	28.7±5.98	28.4±5.69	29.0±6.40	29.9±5.26
Range	21-49	21-44	21-49	21-40
Body mass index (kg/m^2)				
Mean ± SD	21.0±1.70	20.9±1.68	21.2±1.72	21.9±1.85
Range	18.5-24.9	18.5-24.9	18.5-24.9	18.6-24.9
喫煙経験年数（year）				
Mean ± SD	8.27±5.98	8.11±5.58	8.48±6.54	-
Range	1-29	1-23	1-29	
1 日当たり喫煙本数（本）				
Mean ± SD	20.9±2.37	20.7±1.88	21.3±2.90	-
Range	20-30	20-30	20-30	

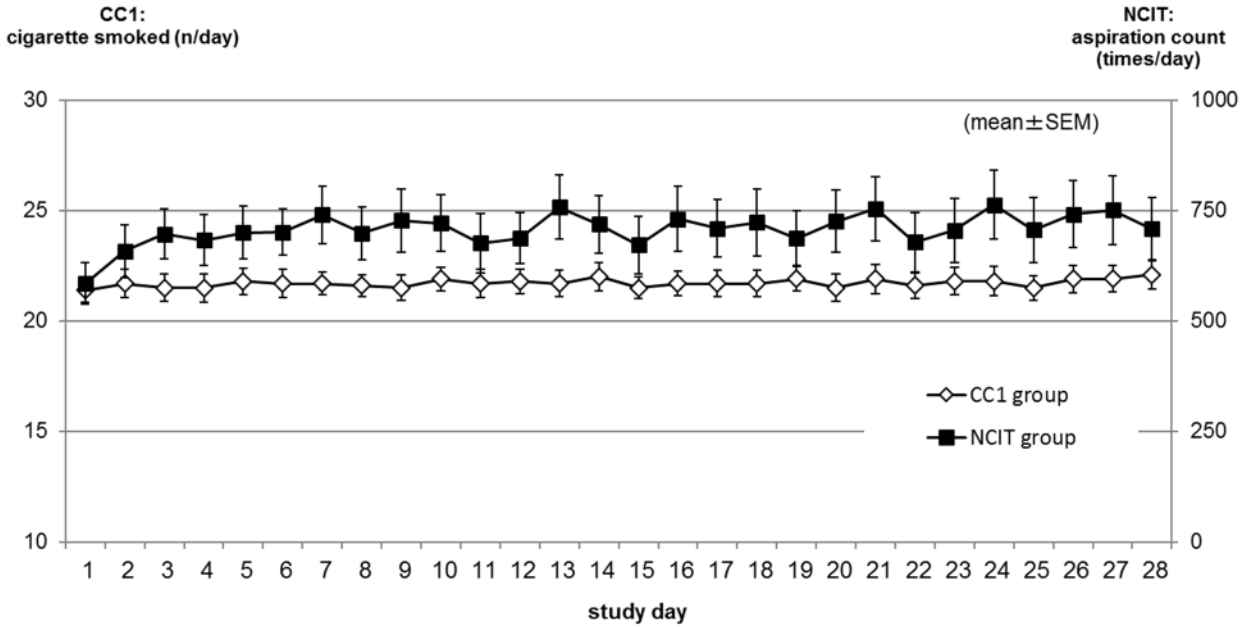

Fig. 10　被験者の試験たばこ使用状況（試験２）

各プロットは、CC1 の 1 日当たり喫煙本数（左軸）および NCIT の総吸引回数（右軸）を示す。

3．各試験たばこを使用した際の動脈硬化関連マーカーの変動解析

各試験たばこをヒトが使用した際の生体影響を評価する一環として、喫煙との関連が多く報告されている動脈硬化に着目し、各試験たばこ使用時の 15 種類の関連因子の変動を臨床試験で評価し、その推移を解析した。

まず、第二章での臨床試験と同様に、ベースライン期（入院後 2 日間：被験者のうち喫煙者（SM）集団は、各自が日常喫煙する紙巻たばこを喫煙）における動脈硬化関連マーカーを解析したところ、RBC・WBC・8-epi-PGF2α・8-OHdG・MDA・11-DHTXB2・TC・GLU は、喫煙者（SM）集団と NS 群で統計学的に有意な差が認められ（Table 9）、本試験と概ね同程度の被験者規模で実施された先行研究 [30-34] で報告されている結果と同様であったことから、確からしい知見を収集できていることが示唆された。

次に、CC1 群と NCIT 群の動脈硬化関連マーカーの変動推移を比較解析するため、各群の調査日 28 日目と 29 日目のマーカー値平均を算出し、差の有意性について解析した結果、測定した 15 種のうち 6 種の生体指標（8-epi-PGF2α、MDA、11-DHTXB2、T-Bil、LDL-C、TC）について、CC1 群と比べ NCIT 群の値に有意な差が認められた（Table 10、Fig. 11）。このうち、8-epi-PGF2α（酸化ストレス）、MDA (酸化ストレス）、11-DHTXB2 (血栓・凝固）の 3 種については、NS 群と同方向へのマーカー値低下が観察され、喫煙者が NCIT へ切替えることにより、動脈硬化に関連する生体指標値を改善する可能性が示された。また、T-Bil（抗酸化容量）については、NS 群と異なって、NCIT の使用による上昇傾向が観察された。その要因は不明であるものの、先行研究においても非喫煙者の方が喫煙者に比較して高値を示しており、少なくとも、T-Bil の増加傾向は、生体リスクには繋がらないものと考えられた。最後に、LDL-C (脂質代謝）、TC (脂質代謝）について、NCIT 群では、CC1 群と比べて減少の程度が低かったものの、NS 群に近づく方向の変化であるうえ、NS 群より低い値であったため、生体リスクに繋がる変動とは考えられなかった。

Table 9　喫煙者（SM）集団と NS 群のベースライン期における動脈硬化関連マーカー値の要約統計量

	Biomarker	Study day Baseline (day 0/1) Mean [SE]	P value[#1] NCIT vs CC1
Hematology	RBC (10^4/μl)		
	SM (n=124)	466 [2.9]	0.0373
	NS (n=50)	477 [4.1]	
	WBC (/μl)		
	SM	6021 [118]	<0.0001
	NS	4892 [152]	
Oxidative stress	urine 8-epi-PGF2α (pg/mg·Cr)		
	SM	321.67 [8.06]	<0.0001
	NS	236.63 [11.05]	
	urine 8-OHdG (ng/mg·Cr)		
	SM	6.80 [0.18]	0.0002
	NS	5.55 [0.32]	
	urine MDA (μmol/g·Cr)		
	SM	1.26 [0.04]	0.0011
	NS	1.06 [0.06]	
Antioxidant capacity	Total bilirubin (mg/dl)		
	SM	0.890 [0.03]	0.8473
	NS	0.883 [0.03]	
Inflammation	hs-CRP (mg/dl)		
	SM	0.016 [0.09]	0.4225[#2]
	NS	0.039 [0.01]	
Inflammation/ Endothelial dysfunction	FIB (mg/dl)		
	SM	240 [3.8]	0.6740
	NS	245 [7.6]	
Platelet activation/ Coagulation	urine 11-Dehydrothromboxane B2 (ng/g·Cr)		
	SM	3700 [91]	<0.0001
	NS	3002 [96]	
Endothelial function/ Coagulation	sICAM-1 (ng/ml)		
	SM	419 [8.8]	0.3235
	NS	407 [15.6]	
Lipid metabolism	LDL-C (mg/dl)		
	SM	98.7 [2.3]	0.1002
	NS	106.3 [3.2]	
	HDL-C (mg/dl)		
	SM	52.0 [1.1]	0.0512
	NS	55.9 [1.5]	
	TC (mg/dl)		
	SM	166.5 [2.4]	0.0174
	NS	177.6 [3.3]	
Glucose metabolism	Glucose (mg/dl)		
	SM	90.4 [0.43]	0.0030
	NS	92.8 [0.62]	
	HbA1c (%)		
	SM	4.70 [0.02]	0.4436
	NS	4.72 [0.04]	

#1 共分散分析（ANCOVA）により Day 28/29 バイオマーカー値の差の有意性を解析

#2 hs-CRP は、ANCOVA において正規性が認められなかったため、自然対数変換を適用

Table 10　CC1 群、NCIT 群、NS 群のベースライン期および day 28/29 における動脈硬化関連マーカー値の要約統計量

	Biomarker	Study day		
		Baseline (day 0/1)	day 28/29	P value[#1]
		Mean [SE]	Mean [SE]	NCIT vs CC1
Hematology	RBC (10^4/μl)			
	CC1 (n=52)	467 [4.7]	471 [3.9]	0.2714
	NCIT (n=72)	465 [3.8]	467 [3.5]	
	NS (n=50)	477 [4.1]	475 [3.9]	
	WBC (/μl)			
	CC1	6002 [211.21]	5683 [162.84]	0.8389
	NCIT	6035 [136.55]	5651 [118.72]	
	NS	4892 [151.91]	4976 [133.52]	
Oxidative stress	urine 8-epi-PGF2α (pg/mg·Cr)			
	CC1	326.56 [11.60]	299.57 [11.25]	0.0484
	NCIT	318.13 [11.12]	272.40 [8.67]	
	NS	236.63 [11.05]	230.76 [7.56]	
	urine 8-OHdG (ng/mg·Cr)			
	CC1	6.56 [0.26]	6.15 [0.29]	0.4914
	NCIT	6.97 [0.25]	6.09 [0.21]	
	NS	5.55 [0.32]	5.38 [0.30]	
	urine MDA (μmol/g·Cr)			
	CC1	1.39 [0.08]	1.18 [0.06]	0.0369
	NCIT	1.17 [0.04]	0.95 [0.04]	
	NS	1.06 [0.06]	0.96 [0.05]	
Antioxidant capacity	Total bilirubin (mg/dl)			
	CC1	0.917 [0.04]	0.898 [0.04]	0.0375
	NCIT	0.870 [0.04]	0.942 [0.03]	
	NS	0.883 [0.03]	0.868 [0.03]	
Inflammation	hs-CRP (mg/dl)			
	CC1	0.030 [0.01]	0.016 [0.13]	0.2118[#2]
	NCIT	0.033 [0.01]	0.020 [0.13]	
	NS	0.039 [0.01]	0.030 [0.00]	
Inflammation/ Endothelial dysfunction	FIB (mg/dl)			
	CC1	248 [6.3]	240 [5.5]	0.9695
	NCIT	234 [4.5]	231 [4.1]	
	NS	245 [7.6]	230 [5.1]	
Platelet activation/ Coagulation	urine 11-Dehydrothromboxane B2 (ng/g·Cr)			
	CC1	3540 [131]	3978 [167]	<0.0001
	NCIT	3816 [124]	3570 [99]	
	NS	3002 [96]	3252 [109]	
Endothelial function/ Coagulation	sICAM-1 (ng/ml)			
	CC1	414 [13.1]	407 [12.2]	0.2332
	NCIT	423 [12.0]	404 [9.9]	
	NS	407 [16.0]	380 [13.8]	

Table 10　動脈硬化関連マーカー値の要約統計量（続き）

	Biomarker	Study day		
		Baseline (day 0/1) Mean [SE]	day 28/29 Mean [SE]	P value#1 NCIT vs CC1
Lipid metabolism	LDL-C (mg/dl)			
	CC1	99 [3.7]	90 [3.1]	0.0286
	NCIT	99 [2.9]	95 [2.5]	
	NS	106 [3.2]	102 [2.9]	
	HDL-C (mg/dl)			
	CC1	54 [1.8]	49 [1.4]	0.4293
	NCIT	51 [1.3]	49 [1.2]	
	NS	56 [1.5]	51 [1.3]	
	TC (mg/dl)			
	CC1	168 [4.1]	154 [3.3]	0.011
	NCIT	166 [3.0]	160 [2.7]	
	NS	178 [3.3]	168 [3.2]	
Glucose metabolism	Glucose (mg/dl)			
	CC1	89.8 [0.7]	87.3 [0.7]	0.932
	NCIT	90.8 [0.5]	87.9 [0.5]	
	NS	92.8 [0.6]	88.9 [0.7]	
	HbA1c (%)			
	CC1	4.72 [0.04]	4.62 [0.03]	0.1611
	NCIT	4.68 [0.02]	4.62 [0.02]	
	NS	4.72 [0.04]	4.65 [0.04]	

#1 共分散分析（ANCOVA）により Day 28/29 バイオマーカー値の差の有意性を解析

#2 hs-CRP は、ANCOVA において正規性が認められなかったため、自然対数変換を適用

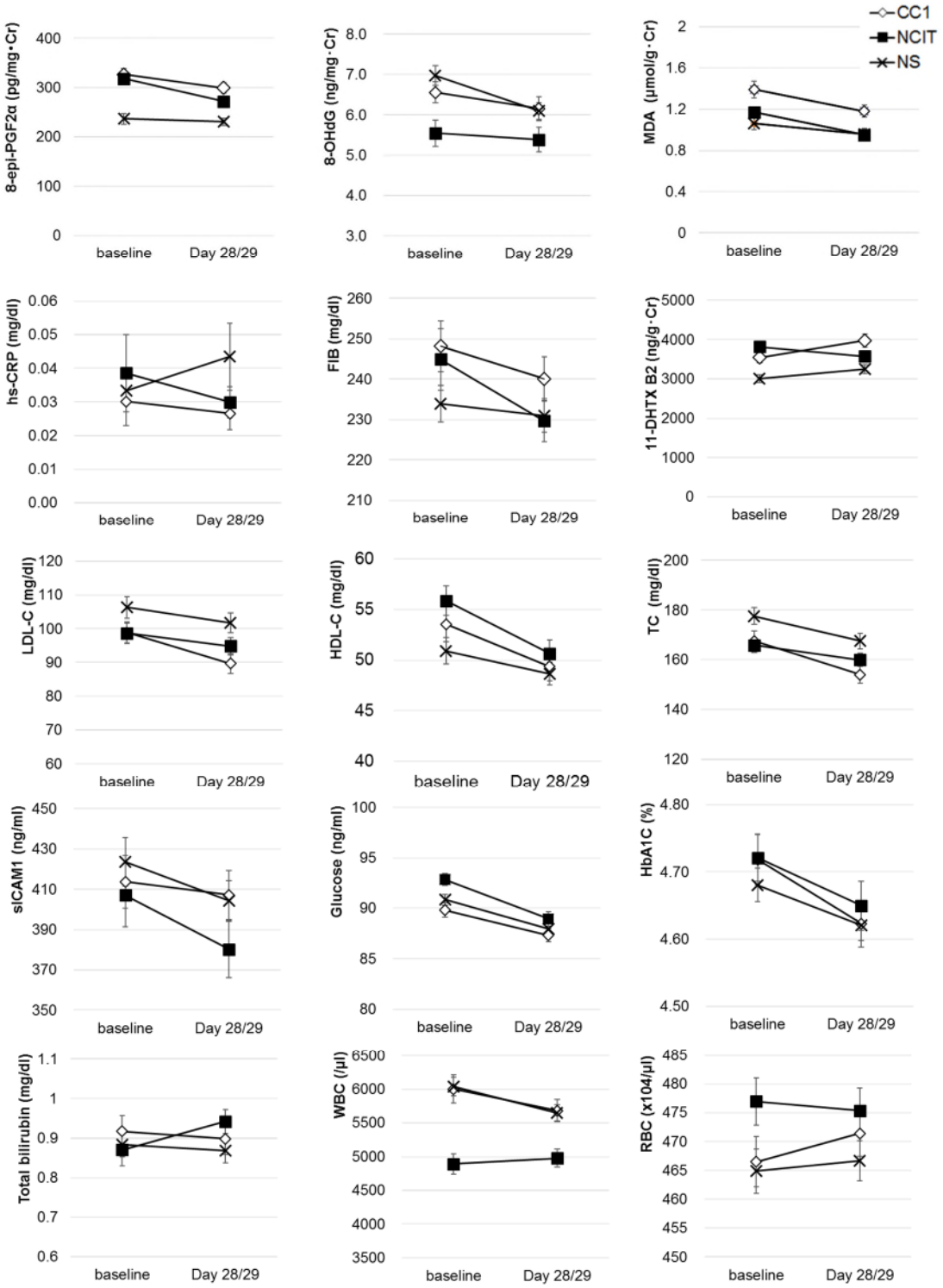

Fig. 11　NCIT と CC1 使用時の動脈硬化関連マーカーの変動解析

Baseline（day0/1）および day28/29 の各 2 日間におけるバイオマーカー値の平均（±標準誤差）を示した。CC1 群と NCIT 群の全ての被験者は、day -1、0 の 2 日間、各被験者が日常喫煙する紙巻たばこを、通常喫煙する本数の±10%の範囲で喫煙した。

4．安全性評価

試験 1 については、第二章 第二項 5.に詳細を記した。

試験 2 においては、被験者 128 名に対して 42 件で有害事象（アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）増加：10 件、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）増加：4 件、咽頭痛：2 件など）が発現したものの、試験責任医師により、42 件全ての有害事象が「非重篤」と判断された。また、42 件の有害事象のうち、追跡調査を含めて、37 件の回復が確認された。さらに、残りの 3 件は「軽快」であり、2 件は「未回復」と判断されたものの、これら 5 件の有害事象について、1 件は試験たばことの因果関係に「関連なし」、4 件は「多分関連なし」と判断されたため、特に、安全性に関して問題となる所見は認められなかった。以上のことから、本試験における安全性については、特に問題は無かったと考えられる。

第三項 考察

本研究では、HPHCs への曝露の低減が、生体リスクに与える影響を臨床試験で明らかにするため、NCIT を使用した際の動脈硬化関連マーカーの変動を CC1 群と比較解析した。

まず、本研究で解析した 15 種のバイオマーカーのうち、7 種のマーカーにおいて、喫煙者（SM）群と非喫煙者（NS）群で統計学的に有意な差は認められなかった。この 7 種のマーカーのうち、hs-CRP、FIB、sICAM-1、LDL-C、HDL-C では、先行研究[32-35]（喫煙者と非喫煙者の群間で有意な差があることが報告）と一致しなかった。この要因はさらなる解析が必要ではあるものの、被験者数の設定が、生体指標の変動を適切に観察するためには不足していた可能性に加え、例えば、LDL-C、HDL-C などの脂質代謝関連マーカーについては、食事や飲酒、身体活動量が影響を与えている可能性が考えられる。実際、これらのマーカーについて、先行研究[33]（被験者の背景因子（年齢、性別、BMI、人種、1 日喫煙本数など）との連関解析）で、喫煙による影響以上に、年齢や BMI による影響を受ける可能性があることが報告されている。したがって、本研究成果が基盤となって今後、生体指標に影響を与える背景因子（被験者の背景情報や生活習慣など）を予め把握・理解し、被験者の選定基準や被験者数へ適切に反映させることが重要と考えられた。

また、8-epi-PGF2α（酸化ストレス）、MDA (酸化ストレス）、11-DHTXB2 (血栓・凝固）の 3 種マーカー値の低下に関して、先行研究でも同様の結果が報告されている。例えば、MDA については、紙巻たばこ喫煙者が、エアロゾル化した Nicotine 溶液を吸引する電子たばこへ切替えると、28 日後に有意に低下したことが報告されている [36]。また、11-DHTXB2 については、紙巻たばこ喫煙者が禁煙後 2 週間程度で有意に低下したことが報告されている [37,38]。したがって、本研究の試験期間（28 日間）と考え合わせても、たばこ煙成分への曝露が少ない NCIT への切替えによって、MDA と 11-DHTXB2 が有意に低下したものと考えられる。また、変動の意義として、8-epi-PGF2α と MDA は、酸化ストレスの指標（細胞膜を構成する不飽和脂肪酸が、活性酵素種による修飾で生成）として知られ [39-41]、11-DHTXB2 は、血栓・凝固などに関連（血小板凝集因子として知られる thromboxane A2 が、生体内で代謝された thromboxane B2 の水酸化体）しているため、NCIT へ切替えることにより、酸化ストレスや血管内皮傷害の改善が期待される。

T-Bil については、Bilirubin 自体が抗酸化物質として知られ、循環器疾患や心筋梗塞、メタボリックシンドロームと負の相関があることが報告 [42,43] されていることに加え、T-Bil は喫煙者に比較して非喫煙者で高い値を示すことが報告されていること [33,44] から、今後、さらなる解析が求められるものの、少なくとも、本研究で観察された T-Bil の増加傾向は、生体リスクに繋がる変動とは考えられなかった。

LDL-C と TC については、脂質関連因子であり、動脈硬化の観点からは低値であることが好ましいマーカーである [45]。CC1 群に比較して高値とはなったものの、NS 群と比べると低値であり、臨床上も正常範囲であることから、生体リスクに繋がらないものと考えられた。また、これらの変動の要因としては、LDL-C と TC が食生活に影響を受けやすいマーカーであり、例えば、喫煙者が CC1 から NCIT へ切り替えたことで、味覚が変化した結果、食欲が増進したことなども考えられる。これらの考察をふまえると、新たなたばこ製品について、生体指標への影響を臨床試験で評価する際には、試験期間中の被験者のたばこの切替えによる食欲や食生活の変化などついても、アンケートなどで追跡することが重要と考えられた。

今後、本知見が基盤となって、生体指標変動に関与する、たばこ以外の因子についての理解が進展し、これらの因子を把握する調査項目を導入するなどにより、今後さらに

精密な臨床試験がデザインされ、有用な成果の収集が期待される。

総括

申請者らは、社会と共生しうる理想のたばことして、「①HPHCs を発生せず、生体への悪影響が無いうえで、②使用者に嗜好品として受容されるたばこ」を提案し、①の「HPHCs を発生せず、生体への悪影響が無い」ことを達成するにあたって、燃焼を伴わず、②の「使用者に嗜好品として受容されるたばこ」であるために、紙巻たばこの喫煙所作や味香りを再現することが合理的と考え、非燃焼吸引型たばこ：NCIT を開発した。本博士論文では、上記をふまえた NCIT の有用性を評価すべく、たばこ煙中の主要な成分である Nicotine の体内動態や、HPHCs への曝露実態を、ヒト臨床試験により解析した。さらに、NCIT を使用することで、生体に与える影響を評価すべく、喫煙と動脈硬化との関係に着目して、その関連マーカーの変動を解析した。その結果、NCIT は、Nicotine や HPHCs への曝露を低減し、動脈硬化に関連する生体指標の一部を改善する可能性を示し、紙巻たばこが抱える課題の解決に向けた戦略として、「燃焼を伴わないこと」の有用性を明らかにした。

上記の成果が基盤となり、NCIT を市販するに至ったものの、数年が経過した現在、喫煙者の受容を十分獲得するには至っておらず、その要因のひとつとしては、②使用者に嗜好品として受容されるたばこに必ずしもなりえていないことがあげられ、「紙巻たばこの喫煙所作や味香りを再現すること」の充実が必要不可欠である。今後、新たなたばこが嗜好品として成立するために必要な取り組みとして、NCIT のような「燃焼を伴わないこと」による HPHCs への曝露低減の戦略を維持しつつ、さらに、紙巻たばこの所作・形態を踏襲するのみならず、使用者への価値・満足の理解に基づく、味や香りを含む五感の追求を通じた製品受容性のさらなる改善が挙げられる。

さらに、本研究成果を基盤に、理想のたばこを追求するにあたっては、（1）「使用実態を反映した/中長期の影響を評価し得る試験系の確立と実行」が必要と考えられる。例えば、本研究においては、HPHCs の曝露マーカーと動脈硬化関連マーカーの追跡試験において、被験者間の試験たばこ以外の要因を排除することを目的に、約 1 か月間の入院環境下で試験を試みたものの、さらに長期間のたばこ製品使用による生体影響を解析する場合、被験者の心理的負担を考慮すると、入院型の試験デザインは現実的とは言えない。さらに、入院という普段とは異なる生活環境が、製品使用の様態や、生体指標

に与える影響についても考慮しなければならない。したがって、被験者の負担を軽減し、新たなたばこ製品の、実生活における数年単位の長期影響を把握するためには、例えば、被験者が普段の生活の中で新しいたばこ製品を使用し、定期来院により生体指標の変動を把握する方法や、市販後調査の一環としてコホートを追跡する疫学研究の導入など、被験者の心理的負担を最小限に抑えつつ、新しい形態のたばこ製品の使用者への影響を推定する確度を高める試験デザインが期待される。また、（２）「生体指標変動に関与する、たばこ以外の因子の理解と、調査への導入」も重要である。本試験では、LDL-C や TC などのマーカーで観察されたように、たばこの使用による生体リスクを調査するための生体指標は、ストレスや食事などの生活環境によっても変動することが報告されている。こうした生体指標を変動させる因子を適切に把握・理解するとともに、試験期間中の被験者のストレスや試験たばこへの満足やたばこの切替えによる食欲増進の有無など、バイオマーカーを変動させうる因子を追跡することで、新しい形態のたばこ製品使用の影響を的確に抽出することが期待される。さらに、（３）「新しい形態のたばこ製品が、社会全体に及ぼす影響の評価」も重要である。本研究において、解析対象とした「たばこ製品使用者個人の生体リスク」に加え、社会との共生を考えるうえでは、「社会全体におよぼす影響」を把握することも重要であり、特に、新しい形態のたばこ製品を、未成年者が使用しないことの担保は必須である。

以上、本博士論文の成果がもとになり、上述の取り組みによって、たばこの課題が解決され、「使用者・周囲への健康懸念を払拭し、使用者に嗜好品として受容されるたばこ」を具現化することで、更なる文化と社会の共生を実現できると期待する。

結論

本博士論文では、社会と共生しうる理想のたばこを目指し、申請者らが開発した新規形態の非燃焼吸引型たばこ製品：NCIT について、使用者へのたばこ成分の曝露と生体影響を明らかにすることを目的に、ヒト臨床試験を実施し、以下の有用な結論を得た。

1. NCIT を使用した際の Nicotine の血中動態を解析し、Nicotine の血中への吸収速度と曝露量は、紙巻たばこ喫煙時を上回らないことが示され、血中動態の観点からは、依存性と急性毒性が紙巻たばこよりも低いことが示唆された。
2. NCIT を使用した際の HPHCs の曝露実態について、CC1 群と NS 群と比較解析した結果、NCIT を使用することによって、HPHCs の曝露量は CC1 の喫煙と比較して低減し、調査日 28 日目において、多くの曝露マーカー値が NS 群と同程度になることを示した。
3. 動脈硬化に関連するマーカーの変動解析より、測定した 15 種のうち 3 種の生体指標について、NCIT 群のマーカー値は、調査日 28 日目において、紙巻たばこ喫煙者群と比べ有意な差をもってマーカー値の低下を示し、紙巻たばこ喫煙者が NCIT へ切替えることにより、動脈硬化に関連する生体指標値を改善する可能性が示された。

以上のように、非燃焼吸引型たばこ NCIT の使用は、Nicotine と HPHCs への曝露を低減させ、動脈硬化に関連する生体指標値を改善する可能性が明らかとなった。今後、これらの知見がもとになって、1) NCIT が使用者に与える健康リスクについての評価法の最適化や、2) 嗜好品として受容されるたばこの確立に向けた研究の進展が期待される。

上記をふまえて、本研究成果は、科学技術を活用することで、たばこが抱える諸問題を解決できる可能性を提示するものであり、これらの取り組みを推進することで、たばこが、文化や社会と共生できることを祈念している。

謝辞

本稿を終えるにあたり、指導教官を快く受け入れていただき、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野 教授の堤 康央先生に衷心より深甚なる感謝の意を表します。

本項へのご指導と貴重なご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 情報・計量薬学分野 教授の高木 達也先生、大阪大学大学院薬学研究科 応用環境生物学分野 教授の平田 收正先生に謹んで感謝の意を表します。

本稿をまとめるにあたり、作成が順調に進まぬ時にも、厳しくも温かい激励を頂き、終始熱心なご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 准教授の長野 一也先生に謹んで感謝の意を表します。

本稿の作成にあたり、温かいご指導と種々貴重なご助言を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野 特任講師の東阪 和馬先生、同助教の辻野 博文先生に心より御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂き、多大なご理解とご協力を頂きました、日本たばこ産業株式会社 たばこ事業本部 渉外企画室長の福地 淳一氏に御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂きました、岩田 邦男博士、坂口 周子博士、小野澤 正浩氏、二村 泰之氏、菊地 昭良氏、筧 あおい氏、南 直樹氏、結城 大博士をはじめ、これまで共に研究・議論した日本たばこ産業株式会社 たばこ事業本部の皆様に謹んで感謝致します。

最後に、常に温かく見守り支えてくれた家族に心より感謝いたします。

参考文献

1. 公益財団法人たばこ総合研究センター. たばこの辞典. 山愛書院; 2009.

2. 上野堅實. タバコの歴史. 大修館書店; 1998.

3. Rodgman A, Perfetti T. The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. In: CRC press; 2013.

4. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2004;83:1-1438.

5. Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians. *Nicotine without smoke - tobacco harm reduction.* Royal College of Physicians; 2016.

6. National Academies of Sciences Engineer and Medicine, Health and Medicine D, Board on Population Health and Public Health P, Committee on the Review of the Health Effects of Electronic Nicotine Delivery S. In: Eaton DL, Kwan LY, Stratton K, eds. *Public Health Consequences of E-Cigarettes.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2018.

7. Allan WG, Terry KS, Michael FM-S, Richard KR, Bonnie W. Principles of Addiction Medicine, Fourth Edition ,. In: American Society of Addiction Medicine (ASAM) ,; 2003.

8. Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry: Modified Risk Tobacco Product Applications. In:2012.

9. International Organization for Standardization. Routine analytical cigarette smoking machine,. In. *ISO3308,* 2000.

10. 宇山 研, 木村 祐樹, 二村 泰行, et al. 健康な日本人喫煙者を対象とした紙巻たばこ 1 本の喫煙によるニコチン及びその主要代謝物コチニンの pharmacokinetic パラメータの評価, 第 28 回日本臨床薬理学会年会. 臨床薬理. 2007;38(Suppl.):S287.

11. Feng S, Kapur S, Sarkar M, et al. Respiratory retention of nicotine and urinary

excretion of nicotine and its five major metabolites in adult male smokers. *Toxicol Lett.* 2007;173(2):101-106.

12. Shepperd CJ, Eldridge AC, Mariner DC, McEwan M, Errington G, Dixon M. A study to estimate and correlate cigarette smoke exposure in smokers in Germany as determined by filter analysis and biomarkers of exposure. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2009;55(1):97-109.

13. Digard H, Proctor C, Kulasekaran A, Malmqvist U, Richter A. Determination of nicotine absorption from multiple tobacco products and nicotine gum. *Nicotine Tob Res.* 2013;15(1):255-261.

14. Russell MA, Feyerabend C, Cole PV. Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum. *Br Med J.* 1976;1(6017):1043-1046.

15. Sobue S, Sekiguchi K, Kikkawa H, Akasaki M, Irie S. Comparison of nicotine pharmacokinetics in healthy Japanese male smokers following application of the transdermal nicotine patch and cigarette smoking. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(5):1068-1073.

16. Lunell E, Molander L, Ekberg K, Wahren J. Site of nicotine absorption from a vapour inhaler--comparison with cigarette smoking. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;55(10):737-741.

17. Lunell E, Bergstrom M, Antoni G, Langstrom B, Nordberg A. Nicotine deposition and body distribution from a nicotine inhaler and a cigarette studied with positron emission tomography. In: *Clin Pharmacol Ther.* Vol 59. United States1996:593-594.

18. Bergstrom M, Nordberg A, Lunell E, Antoni G, Langstrom B. Regional deposition of inhaled 11C-nicotine vapor in the human airway as visualized by positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther.* 1995;57(3):309-317.

19. Scherer G. Carboxyhemoglobin and thiocyanate as biomarkers of exposure to carbon monoxide and hydrogen cyanide in tobacco smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 2006;58(2-3):101-124.

20. Perez-Stable EJ, Marin G, Marin BV, Benowitz NL. Misclassification of smoking

status by self-reported cigarette consumption. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(1):53-57.

21. Sakaguchi C, Kakehi A, Minami N, Kikuchi A, Futamura Y. Exposure evaluation of adult male Japanese smokers switched to a heated cigarette in a controlled clinical setting. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014;69(3):338-347.

22. Okuzono H, Tamagawa S, Hattori S. [A spectrophotometric method for the determination of carboxyhemoglobin in blood, and some clinical reports (author's transl)]. *Rinsho Byori.* 1976;24(8):616-621.

23. Vesey CJ, McAllister H, Langford RM. A simple, rapid and sensitive semimicro method for the measurement of cyanide in blood. *Ann Clin Biochem.* 1999;36 (Pt 6):755-758.

24. Canada H. Determination of ''Tar'', Nicotine and Carbon Monoxide in Mainstream Tobacco Smoke-Official Method. (SOR- 2000-272),. In:1999.

25. Goniewicz ML, Havel CM, Peng MW, et al. Elimination kinetics of the tobacco-specific biomarker and lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(12):3421-3425.

26. Hecht SS, Carmella SG, Chen M, et al. Quantitation of urinary metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen after smoking cessation. *Cancer Res.* 1999;59(3):590-596.

27. Institute of Medicine Committee to Assess the Science Base for Tobacco Harm Reduction. In: Stratton K, Shetty P, Wallace R, Bondurant S, eds. *Clearing the Smoke: Assessing the Science Base for Tobacco Harm Reduction.* Washington (DC): National Academies Press (US).; 2001.

28. Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, et al. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Jama.* 1998;279(2):119-124.

29. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(10):1731-1737.

30. Harman SM, Liang L, Tsitouras PD, et al. Urinary excretion of three nucleic acid

oxidation adducts and isoprostane F(2)alpha measured by liquid chromatography-mass spectrometry in smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(10):1301-1309.

31. Garg N, Singh R, Dixit J, Jain A, Tewari V. Levels of lipid peroxides and antioxidants in smokers and nonsmokers. *J Periodontal Res.* 2006;41(5):405-410.

32. Calapai G, Caputi AP, Mannucci C, et al. A cross-sectional investigation of biomarkers of risk after a decade of smoking. *Inhal Toxicol.* 2009;21(13):1138-1143.

33. Frost-Pineda K, Liang Q, Liu J, et al. Biomarkers of potential harm among adult smokers and nonsmokers in the total exposure study. *Nicotine Tob Res.* 2011;13(3):182-193.

34. Ludicke F, Magnette J, Baker G, Weitkunat R. A Japanese cross-sectional multicentre study of biomarkers associated with cardiovascular disease in smokers and non-smokers. *Biomarkers.* 2015;20(6-7):411-421.

35. Ogden MW, Marano KM, Jones BA, Morgan WT, Stiles MF. Switching from usual brand cigarettes to a tobacco-heating cigarette or snus: Part 3. Biomarkers of biological effect. *Biomarkers.* 2015;20(6-7):404-410.

36. Ikonomidis I, Vlastos D, Kourea K, et al. Electronic Cigarette Smoking Increases Arterial Stiffness and Oxidative Stress to a Lesser Extent Than a Single Conventional Cigarette: An Acute and Chronic Study. In: *Circulation.* Vol 137. United States2018:303-306.

37. Rangemark C, Ciabattoni G, Wennmalm A. Excretion of thromboxane metabolites in healthy women after cessation of smoking. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(6):777-782.

38. Saareks V, Ylitalo P, Alanko J, Mucha I, Riutta A. Effects of smoking cessation and nicotine substitution on systemic eicosanoid production in man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001;363(5):556-561.

39. Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary

pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(6):L1067-1082.

40. Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(8):360-366.

41. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017;524:13-30.

42. Kimm H, Yun JE, Jo J, Jee SH. Low serum bilirubin level as an independent predictor of stroke incidence: a prospective study in Korean men and women. *Stroke.* 2009;40(11):3422-3427.

43. Lin LY, Kuo HK, Hwang JJ, et al. Serum bilirubin is inversely associated with insulin resistance and metabolic syndrome among children and adolescents. *Atherosclerosis.* 2009;203(2):563-568.

44. Van Hoydonck PG, Temme EH, Schouten EG. Serum bilirubin concentration in a Belgian population: the association with smoking status and type of cigarettes. *Int J Epidemiol.* 2001;30(6):1465-1472.

45. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 2001;104(10):1108-1113.