

厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)  
令和元年度 総括研究報告書

加熱式たばこによる健康危機発生を回避するための非臨床安全性評価に関する基礎的研究  
(19FA1015)

加熱式たばこの *in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性評価

研究代表者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野

研究要旨：バクテリアを用いて、紙巻及び加熱式タバコの遺伝毒性について検討した。TA1535 を用いた Ames 試験では、今回試験したいずれの条件下でも、変異原性は観察されなかった。その理由として、本研究条件下での煙捕集法では多環芳香族炭化水素などの化学物質の濃度が低すぎたのではないかと考えられる。また、NGS を用いたグローバルな変異解析についても実施してみたが、今回の条件下では、コントロールに比べ紙巻タバコ、IQOS 共に変異頻度の明らかな上昇は観察されなかった。理由として、+/- S9 mix 存在下におけるコントロールの変異頻度(MF)が通常よりも高くなっており、グローバル変異解析を行うのに最適な条件でないことが推測できた。一方、変異シグネチャーの解析から、3種類のシグネチャーが抽出された。これらシグネチャーは、既存のヒトデータベースに掲載されている、たばこ由来のシグネチャー(SBS4)との類似性は見られなかったものの、紙巻/加熱式たばこ曝露グループでは、コントロール(背景)由来のシグネチャーに加えて、噛みたばこに関する変異シグネチャーが観察された。今後は、最適な条件下で再試験を行うと共に、*in vivo* の遺伝毒性試験も実施する予定である。

研究協力者:

佐藤春菜 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野  
実験補助員

しないなどの情報から、現在では多くの喫煙者が利用している。しかしながら、これらの情報は加熱式たばこメーカーにより出されているものであることから、加熱式たばこによるヒト健康影響についての懸念は未だ払拭されていない。

A. 研究目的

加熱式タバコ(製品名 IQOS, Ploom TECH, glo など)は2014年以降に日本国内に導入され、従来の紙巻きタバコとは異なり、有害性成分が低減化していることに加え、副流煙が発生

さらに、これら加熱式タバコは市場に出て間もないため、ヒトを対象とした発がん性を含む健康影響に関する疫学的な評価が困難で

あり、現在のところ3課題が厚生労働省・AMEDにより実施されているが、いずれも加熱式たばこ煙の成分分析や暴露マーカーの探索などについて検討しているものであって、加熱式たばこの直接的な有害性を評価する研究ではない。加熱式たばこの直接的な有害性を評価する研究としては、前述の通り製造メーカーが独自に行ったものがあるのみであることから、これら加熱式たばこの直接的な有害性を中立的な立場で評価することが必要である。さらに、本研究は、衆議院・参議院において為された健康増進法の一部を改正する法律案に対する付帯決議（指定たばこによる受動喫煙が人の健康に及ぼす影響に関する調査研究を一層推進し、可能な限り早期に結論を得ること）に貢献する有用な情報を提供できるものであり、喫緊に取り組むべき重要な課題である。

このような背景から、本研究では、加熱式たばこの*in vivo*遺伝毒性の評価を行い、ヒト健康影響に対する化学的なエビデンスを得ることを目的とした。

## B. 研究方法

### ■ 紙巻タバコ及び加熱式タバコ煙の捕集

2019年10月28日に開催した班会議兼情報交換会において、タバコ煙の捕集方法を議論した結果、喫煙条件はカナダ強制喫煙条件[CIR]で捕集は蒸気相成分と粒子相成分の両方を捕集でき、かつ、将来的に動物実験に供することも考慮して、PBSにインピンジャーにて捕集することとした。また、捕集は研究協力者の国立保健医療科学院：稲葉洋平博士にご協力いただいた。まずは、試験法の確立のため、標準紙巻きたばこ(3R4F)及びIQOSを2本、5本分を30 mLのPBSに捕集した。蒸気層成分の揮発

を避けるため、捕集後速やかに凍結し、ドライアイスを入れて国立がん研究センター研究所まで送付いただいた。受領後、サンプルは直ちに-80℃で使用直前まで保管した。

### ■ バクテリアを用いた生存率の観察と遺伝毒性試験

代謝活性化酵素(S9mix)存在および非存在下でのAmes試験菌株(*Salmonella typhimurium* TA1535)に対する変異原性およびSurvivalについて検討した。

2.0 mLのエッペンドルフチューブに前培養したTA1535培養液200 µL、DMSO 300 µL、S9 mixまたは0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 µL加え、この溶液に被験物質（紙巻たばこ、またはIQOS煙捕集液）を1000 µL添加し、37℃、20分間インキュベートした。コントロール溶媒にはPBSを用いた。インキュベート終了後、下記の方法に従い、Ames試験、Survival、次世代シーケンサーによるグローバル変異解析を行った。

#### Ames 試験

上記反応液700 µLにトップアガー2.5 mLを添加し、最少グルコース寒天平板培地に重層し、固まったら上下逆さまにして37℃で48時間培養する。結果の判定は寒天培地に生えたコロニーをカウントする。

#### Survival

上記反応液を一部取り、10<sup>4</sup>倍に希釈して100 µLをNB plateにスプレッドした。37℃で一晩培養した後、コロニーをカウントした。

#### NGSによるグローバル変異解析

上記反応溶液1 mLを取り、2X NB培地1 mLを添加し、37℃、一晩培養した。培養液を遠心分離して集菌し、Cell lysis溶液にて細胞を溶解後、フェノール/クロロホルム法にてバクテリアのゲノムDNAの抽出を行った。次にNGSシーケンス試薬を用いてライブラリーの調整を行い、NovaSeqにより全ゲノム解析を行った。得られたデータはCLC work flowにより参照ゲノム配列 (*Salmonella typhimurium* ゲノム) にマッピングし、変異の検出を行った。

バクテリアの生存率(Survival%)は溶媒コントロールと比べ、S9mix存在下で77%(2本分)、69%(5本分)、S9mix非存在下で70%(2本分)、46%(5本分)と、いずれもタバコの本数依存的に細菌生存率が低下する結果となった。

(倫理面への配慮)

本年度は、情報収集を行ったので、倫理的な問題が存在しない。

表2 バクテリアの生存率(Survival%)の結果

Survival%		紙巻タバコ IQOS	
		紙巻タバコ	IQOS
S9 mix存在下	Control	100	100
	2本	71.4	75.8
	5本	69	81.6
S9 mix非存在下	Control	100	100
	2本	53.8	69.4
	5本	15.9	55

C. 研究結果

■ バクテリアを用いた生存率の観察と遺伝毒性試験

Ames 試験

Ames試験による遺伝毒性の結果を表1に示す。Ames試験での遺伝毒性陽性の判定は、コントロールの2倍以上の復帰変異コロニー数が観察された場合である。今回、試験した全ての条件において変異原性は観察されなかった。

表1 Ames試験の結果

Ames test		紙巻タバコ		IQOS	
		Revertants	Fold induction	Revertants	Fold induction
S9 mix存在下	Control	23	1	17	1
	2本	19	0.85	20	1.18
	5本	22	0.96	19	1.12
S9 mix非存在下	Control	17	1	15	1
	2本	18	1	18	1.16
	5本	14	0.8	18	1.16

NGSによるグローバル変異解析

NGSによるグローバル変異解析の結果を表3に示す。今回、+/- S9 mix存在下におけるコントロールの変異頻度(MF)がいずれも高く $10^{-6}$ オーダーとなっており、グローバル変異解析を行うのに最適な条件でないことが推測できる。(通常では $10^{-7}$ オーダー) こういった背景から、今回、紙巻タバコ、IQOS共に変異頻度の明らかな上昇は観察されていない。

表3 NGSによるグローバル変異解析の結果

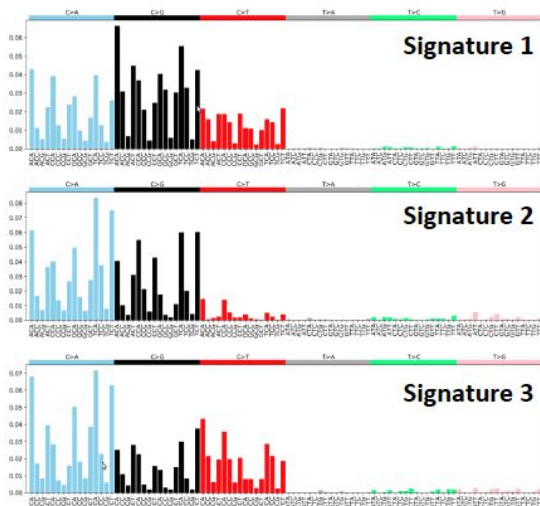
Survival

		IQOS+S9			IQOS-S9		
		Cont.	2cig1	5cig1	Cont.	2cig1	5cig1
変異数	SNV	1166	516	615	513	908	707
	MNV	2	0	0	0	1	0
	Deletion	78	40	45	54	41	55
	Insertion	29	16	12	22	23	18
	total	881588240	316244467	574724294	566311119	781006824	696465915
変異頻度	MF_SNV	1.3226E-06	1.6316E-06	1.0701E-06	9.0586E-07	1.1626E-06	1.0151E-06
	MF_MNV	2.2686E-09	0	0	0	1.2804E-09	0
	MF_Deletion	8.8477E-08	1.2648E-07	7.8298E-08	9.5354E-08	5.2496E-08	7.897E-08
	MF_Insertion	3.2895E-08	5.0594E-08	2.088E-08	3.8848E-08	2.9449E-08	2.5845E-08
	MF_total	1.4463E-06	1.8087E-06	1.1693E-06	1.0401E-06	1.2458E-06	1.1199E-06
		紙巻タバコ+S9			紙巻タバコ-S9		
		Cont.	2cig	5cig	Cont.	2cig	5cig
変異数	SNV	2426	2692	319	2359	545	441
	MNV	1	2	0	0	1	0
	Deletion	200	374	53	309	265	71
	Insertion	69	118	16	77	76	18
	total	1847754352	2526351537	215439064	2109300721	813689588	295119454
変異頻度	MF_SNV	1.3129E-06	1.0650E-06	1.4807E-06	1.1184E-06	6.5979E-07	1.4943E-06
	MF_MNV	5.412E-10	7.9166E-10	0	0	1.229E-09	0
	MF_Deletion	1.0824E-07	1.4804E-07	2.4601E-07	1.4649E-07	3.2568E-07	2.4058E-07
	MF_Insertion	3.7343E-08	4.6708E-08	7.4267E-08	3.6505E-08	9.3402E-08	6.0992E-08
	MF_total	1.4591E-06	1.2611E-06	1.801E-06	1.3014E-06	1.0901E-06	1.7959E-06

SNV: Single nucleotide variant, MNV: Multiple nucleotides variant, MF: Mutation frequency

変異の数的な変化は見られなかったものの、質的な変化があるかもしれないと思い、次に、各々の変異スペクトルの内訳を変異箇所の前後を含んだ周辺配列により96パターンに分類したもの(変異シグネチャー)を抽出した。その結果、3種類の変異シグネチャーが同定され (Signature 1~3、図1)、これら変異シグネチャーはいずれもC A/G/T変異が多く観察され、T A/C/G変異はほとんど観察されていない。

図1 紙巻および加熱式タバコ捕集溶液曝露サンプルより抽出された変異シグネチャー

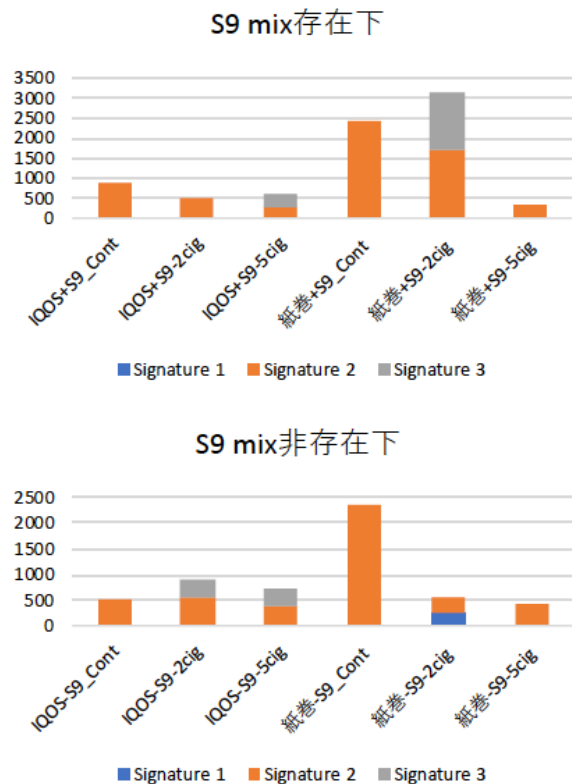


グループ毎の変異シグネチャー分布の

内訳を図2に示す。Signature 2はコントロールグループに共通しており、このことからこのシグネチャーは背景に存在するシグネチャーであると考えられる。一方、S9 mix存在下でのIQOS-5cig、紙巻-2cig、S9 mix非存在下でのIQOS-2cig、紙巻-2cigでは、背景由来のシグネチャーに加え、Signature 3およびSignature 1が観察された。これらシグネチャーは、紙巻および加熱式タバコ捕集溶液曝露に由来するものと考えられた。

各シグネチャーと既存のヒト腫瘍由来の変異シグネチャー (COSMIC; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>) データベースとの類似度分析の結果から、Signature 2および3は酸化ストレス由来の変異シグネチャーと類似していた。これに加え、Signature 3は嘔みたばこの習慣がある症例から得られた腫瘍に観察される変異シグネチャーと類似していた。

図2 グループ毎の変異シグネチャー分布



ある。

#### D. 考察

バクテリアを用いて、紙巻及び加熱式タバコの遺伝毒性について検討した。TA1535 を用いた Ames 試験では、今回試験したいずれの条件下でも、変異原性は観察されなかった。通常、紙巻たばこの変異原性を調べる際には、フィルターにタール成分を吸着させた後、有機溶媒で抽出してサンプルとする。しかし今回は、インピンジャーを用いて PBS 30mL に補修したことにより、多環芳香族炭化水素などの化学物質の濃度が低すぎ、紙巻たばこ煙の捕集溶液でも変異原性が観察されなかったのではないかと考えられる。

また、NGS を用いたグローバルな変異解析についても実施してみたが、今回の条件下では、コントロールに比べ紙巻タバコ、IQOS 共に変異頻度の明らかな上昇は観察されなかった。今回、+/- S9 mix 存在下におけるコントロールの変異頻度(MF)が通常よりも高くなっており、グローバル変異解析を行うのに最適な条件でないことが推測できた。その理由としては、Survival のデータからもわかるように、紙巻および IQOS 曝露後の増殖が悪く、NGS 解析用のサンプリングの際の培養時間を通常よりも長く設定したことによると考えた。バクテリアは自然突然変異が入りやすく、細胞増殖時間をもっと短く設定して解析し直す必要があることがわかった。

一方、変異シグネチャーの解析から、3種類のシグネチャーが抽出された。これらシグネチャーは、既存のヒトデータベースに掲載されている、たばこ由来のシグネチャー(SBS4)との類似性は見られなかったものの、紙巻/加熱式たばこ曝露グループでは、コントロール(背景)由来のシグネチャーに加えて、噛みたばこに関する変異シグネチャーが観察されることがわかった。

今後は、最適な条件下で再試験を行うと共に、in vivo の遺伝毒性試験も実施する予定で

#### E. 結論

バクテリアを用いて、紙巻及び加熱式タバコの遺伝毒性について検討した。TA1535 を用いた Ames 試験および NGS を用いたグローバルな変異解析では、今回試験したいずれの条件下でも、顕著な変異原性は観察されなかった。

一方、変異シグネチャーの解析から、3種類のシグネチャー(Signature 1~3)が抽出された。これらシグネチャーは、既存のヒトデータベースに掲載されている、たばこ由来のシグネチャー(SBS4)との類似性は見られなかったものの、紙巻/加熱式たばこ曝露グループでは、コントロール(背景)由来のシグネチャーに加えて、噛みたばこに関する変異シグネチャーが観察されることがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2019 Jun 20.
2. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 2019 Sep 20; 34 (3): 279-287.
3. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y,

- Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*. 2019 Aug 19; 32 (8): 1515-1527.
4. Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res*. 2019 Nov;847:403022.
  5. Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- $\beta$ -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of  $\beta$ -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020, Feb - Mar;850-851:503148.
2. 学会発表
1. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS(東京、2019年11月)
  2. Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y., Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS(東京、2019年11月)
  3. Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y, Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS(東京、2019年11月)
  4. Totsuka Y, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム。(京都、2019年9月)
  5. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Practice of Cancer Prevention and Control(石家荘、2019年7月)
  6. Totsuka Y, How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)
  7. 戸塚ゆ加里 ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向 JRC 会議に参加してー MMS 定例会(京都、2019年6月)
  8. 戸塚ゆ加里 発がん性評価法としての DNA アダクトーム解析の展望 日本毒性学会シンポジウム(徳島、2019年6月)
  9. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Yutong He, Haruna Sato, Tomonari Matsuda, Yoshitaka Matsushima, Mamoru Kato, Asmaa Elzawahry, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Baoen Shan, Hitoshi Nakagama, Environmental Carcinogenesis: Potential Pathway to Cancer Privention, AACR meeting, 2019/7/22-24
  10. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, Yukari Totsuka, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato, Asmaa Elzawahry,

Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Hitoshi  
Nakagama, the 47th Meeting of the  
European Environmental Mutagenesis and  
Genomics Society, 2019/5/19-23

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得