

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
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

令和2年度 総括研究報告書

研究代表者 戸塚 ゆ加里

令和3（2021）年 5月

作成上の留意事項

分担研究報告書がある場合は、「総括・分担研究報告書」と表記すること。

目 次

I. 総括研究報告	
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	
戸塚 ゆ加里	----- 12
(資料) 研究成果に関する図表	----- 18
II. 分担研究報告	
1. 加熱式たばこの <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 遺伝毒性評価	----- 20
戸塚 ゆ加里	
2. 加熱式たばこの <i>in vivo</i> 一般毒性評価	----- 26
中江 大	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 29

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2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: *gpt delta* マウスを用いて、紙巻(3R4F)及び加熱式(IQOS)タバコの *in vivo* 遺伝毒性について検討した。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇($P < 0.05$)が観察されたものの、3R4Fの変異頻度は予想よりもはるかに低いものであった。その理由として、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十分に観察されなかったのではないかと考えられる。今後、フィルター捕集サンプルを用いて、再度 *in vivo* 遺伝毒性について検討する必要があると考えた。

一方、変異スペクトル解析の結果、IQOS_10本の曝露群において、GC>AT変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。紙巻タバコ中に含まれる有害化学物質の多くはG>Tが主な変異パターンであることが知られており、NGSによる変異シグネチャー解析でもタバコ由来のシグネチャーであるSBS4はGC>TAに多くの変異が観察されている。今回解析したIQOSによる変異コロニー数は少なく、結論には至らないが、誘発する変異スペクトルの違いが観察されたことから紙巻タバコとは異なる有害物質がヒト健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、更にサンプル数を追加して解析する必要があると思われる。

研究分担者:

中江 大 東京農業大学応用生物科学部
食品安全健康学科 教授

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、有害成分が低減化していることに加え、副流煙が発生しな

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* 一般毒性および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

昨年度と同様に、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。標準紙巻きたばこ(3R4F)及びIQOSを10本及び20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、ドライアイスを含め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°Cで使用直前まで保管した。

■ 実験動物への投与

【遺伝毒性試験】

10週齢の雌性 *gpt delta* マウスにタバコ煙捕集溶液を個体あたり 0.1 mL の用量で週 2 回気管内投与を合計 13 回(6.5 週間) 投与を行なった(図 1)。投与の内訳を以下に示す。Group 1: 溶媒 (PBS) コントロール、Group 2: 紙巻たばこ(3R4F_10 本分)、Group 3: IQOS_10 本分、Group 4: IQOS_20 本分。最終投与 24 時間後にマウスを屠殺・解剖し、肺を摘出した。摘出した肺は重量を測定した後、左右に切り分け、右肺は病理組織診断のために共同研究者(東京農大・中江 大教授)に送付した。残りの左肺は遺伝毒性試験(*gpt assay*)に使用するため直ちに凍結保存した。

【一般毒性試験】

雌性C57BL/6J系マウス(10週齢)の気管内に、紙巻および加熱式タバコ捕集液を週1回・計13回投与した。投与グループの内訳は、第1群:コントロール(PBS), N=14, 第2群:紙巻タバコ(20本), N=13, 第3群:IQOS(5本), N=13, 第4群:IQOS(10本), N=12, 第5群:IQOS(20本), N=14とした。最終投与24時間後にマウスを屠殺・解剖し、肺を摘出した。摘出した肺は重量を測定した後、左右に切り分け、右肺は病理組織診断に、残りの左肺は炎症など毒性変化の背景機構に関与すると考えられる炎症系遺伝子の発現解析に使用するため直ちに凍結保存した。さらに、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid (BALF))を採取し、細胞学的および分子生物学的手法で炎症関連マーカーなどについて解析した。

■ *gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験

コントロールおよびAAを曝露したマウスからDNAを抽出し、*in vitro*パッケージングによってトランスジーンλ EG10をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組替え酵素発現してい

る大腸菌YG6020株に感染させると、λ EG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含むM9寒天培地に播いて37°Cで培養すると、プラスミド上の*gpt*遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異頻度を算出した。

■ 上記試験における変異スペクトルの解析

上記試験で得られた変異コロニーをPCR法で増幅し、*gpt*遺伝子を直接シーケンス解析を行い、変異スペクトルの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、3Rの原則に則り、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

■ *gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験

紙巻および加熱式タバコ煙捕集溶液を反復気管内投与した*gpt* deltaマウス肺から抽出したゲノムDNAを用い、インビトロパッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。その結果を図2に示す。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇

が観察された($P < 0.05$)。しかしながら、IQOS(20本)の投与群ではコントロール群の約1.5倍程度の上昇にとどまり、変異頻度の用量依存的な増加は観察されなかった。

■ 上記試験における変異スペクトルの解析

上記の変異原性試験で得られた変異コロニーをダイレクトシーケンス法により誘発された変異スペクトルの解析を行った。その結果を表1に示す。コントロールと3R4F曝露群に差は見られなかったが、IQOS_10本の曝露群においては、GC > AT変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。

■ 一般毒性試験

先ず、雌性C57BL/6J系マウス(10週齢)の気管内に、紙巻および加熱式タバコ捕集液を週1回・計13回投与した。投与グループの内訳は、第1群:コントロール(PBS), N=14, 第2群:紙巻タバコ(20本), N=13, 第3群: IQOS(5本), N=13, 第4群: IQOS(10本), N=12, 第5群: IQOS(20本), N=14とした。本実験条件下での紙巻および加熱式タバコ捕集液投与群においては、体重抑制などを観察しなかった。最終投与から24時間後には、上記の臓器を採取し解析を実施した。肺の病理組織学的観察においては、陽性対照群(第2群)およびIQOS投与群(第3~5群)の一部のマウスに、肺泡マクロファージ・気管支周囲炎症細胞・血管周囲炎症細胞の浸潤を散発的に認めたが、第3~5群の変化に用量相関性がみられなかった。これらは、陰性対照群(第1群)に観察されなかったため、被験物質投与に関係した変化である可能性を否定できないが、毒性学的意義が低いものと評価した。肺組織を用いた遺伝子発現解析では、炎症関連遺伝子としてTNF- α の発現を解析したが、第3群で発現上昇を示したものの、

他の群間に明確な差を認めず、また、ばらつきも大きかった。BALFにおいては、TNF- α ・IFN- γ ・IL2・IL4・IL6・IL10・IL17A濃度を測定したが、群間に明確な差を認めず、ばらつきも大きかった。また、肺以外の観察臓器においては、投与の影響を示唆する明らかな組織学的変化を認めなかった。

次いで、気管内投与によるgpt deltaマウスにおけるin vivo遺伝毒性試験に由来する採取材料を用いては、加熱式たばこ対照の紙巻きたばこにより誘発される一般毒性について、上記のC57BL/6J系マウスの試験と同様に解析した。実験系は、雌gpt deltaマウス(10週齢)の気管内に、紙巻および加熱式タバコ捕集液を週2回・計13回投与した。投与グループの内訳は、第1群:コントロール(PBS), N=5, 第2群:紙巻タバコ(10本), N=5, 第3群:IQOS(10本), N=5, 第4群:IQOS(20本), N=5とした。本実験条件下での紙巻および加熱式タバコ捕集液投与群における体重抑制などは観察されなかった。最終投与から24時間後には、上記の臓器を採取し解析を実施した。肺の相対重量は、紙巻タバコ群でコントロールに比べ有意に増加し、IQOS投与群でも増加傾向が観察されたが統計学的に有意な変化でなかった。肺の組織学的解析においては、陰性対照群(第1群)と陽性対照群(第2群)の一部のマウスに、肺泡マクロファージ・血管周囲炎症細胞の浸潤を散発的に認めたが、程度も軽微なものが多く、また、IQOS投与群(第3・4群)に観察しなかった。肺組織を用いた遺伝子発現解析では、炎症関連遺伝子としてTNF- α の発現を解析したが、ばらつきが大きく、群間に明確な差を認めなかった。BALFにおいては、TNF- α ・IFN- γ ・IL2・IL4・IL6・IL10・IL17A濃度を測定したが、群間に明確な差を認めず、ばらつきも大きかった。また、肺以外の観察臓器において、投与の影響を示唆する明らかな組織学的変化は認め

られなかった。

D. 考察

【遺伝毒性試験】

gpt delta マウスを用いて、紙巻及び加熱式タバコの *in vivo* 遺伝毒性について検討した。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇が観察された(P<0.05)ものの、3R4Fの変異頻度は予想よりもはるかに低いものであった。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十分に観察されなかったのではないかと考えられる。ちなみに3R4F(5本分)およびIQOS(20本分)の変異原性の確認のため、これらの主流煙をフィルターに捕集しメタノールで抽出後にDMSOに溶解してAmes assayを行った結果、コントロールと比較して3R4Fでは約7倍、IQOSでは2倍の復帰変異コロニー数が観察された。今後、これら捕集サンプルを用いて、再度 *in vivo* 遺伝毒性について検討する必要があると考えた。

また、IQOS(20本)の投与群ではコントロール群の約1.5倍程度の上昇にとどまり、変異頻度の用量依存的な増加は観察されなかった。分担研究者の中江による報告によると、今回投与したいずれのタバコ煙捕集溶液の反復気管内投与による実験動物肺に対する毒性的な所見は観察されなかったとのことから、IQOS高用量群での宿主側のダメージによる影響とは考えにくい。さらに今回使用したサンプル中のIQOS煙成分の定量的な評価は実施しておらず、有害性化学物質の濃度が低すぎ、IQOS(10本)と同程度の変異原性しか観察されなかった可能性が考えられる。今後はフィルター捕集により同様な試験を実施することに加え、IQOS化学

成分の定量的な評価についても実施することが望ましいと考えた。

一方、変異スペクトル解析の結果、IQOS_10本の曝露群において、GC > AT 変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。紙巻タバコ中に含まれる有害化学物質の多くはG>Tが主な変異パターンであることが知られており、NGSによる変異シグネチャー解析でもタバコ由来のシグネチャーであるSBS4はGC>TAに多くの変異が観察されている。今回解析したIQOSによる変異コロニー数は少なく、結論はだせないが、誘発する変異スペクトルの違いが観察されたことから紙巻タバコとは異なる有害物質がヒト健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、更に解析サンプル数を追加する必要があると思われる。

【一般毒性試験】

C57BL/6J系マウスの試験においては、陽性対照群(第2群)およびIQOS投与群に投与の影響を示唆する毒性学的情報が得られなかったものと判断した。また、実験系においては、陽性対照群(第2群)およびIQOS投与群に投与の影響を示唆する毒性学的情報が得られなかったものと判断した。

上記の原因としては、投与した捕集液の濃度自体が低かったことにも関連していると考えられ、より高濃度での曝露条件において精査する必要があるものと考えられた。

E. 結論

gpt delta マウスを用いて、紙巻及び加熱式タバコの *in vivo* 遺伝毒性について検討した。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇が観察された($P < 0.05$)ものの、3R4Fの変異頻度は予想よりもはるかに低いものであった。これは、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十分に観察されなかったのではないかと考えられる。ちなみに3R4F(5本分)およびIQOS(20本分)の変異原性の確認のため、これらの主流煙をフィルターに捕集しメタノールで抽出後にDMSOに溶解してAmes assayを行った結果、コントロールと比較して3R4Fでは約7倍、IQOSでは2倍の復帰変異コロニー数が観察された。今後、これら捕集サンプルを用いて、再度 *in vivo* 遺伝毒性について検討する必要があると考えた。

一方、変異スペクトル解析の結果、IQOS_10本の曝露群において、GC > AT 変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。紙巻タバコ中に含まれる有害化学物質の多くはG>Tが主な変異パターンであることが知られており、NGSによる変異シグネチャー解析でもタバコ由来のシグネチャーであるSBS4はGC>TAに多くの変異が観察されている。今回解析したIQOSによる変異コロニー数は少なく、結論はだせないが、誘発する変異スペクトルの違いが観察されたことから紙巻タバコとは異なる有害物質がヒト健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、更に解析サンプル数を追加する必要があると思われる。

一般毒性の評価を目的として実施した上記の *in vivo* 試験においては、いずれも紙巻および加熱式タバコ捕集液の気管内投与による明らかな変化が得られなかった。本年度の成果は、加熱式たばこのリスク評価に関する今後の研究・施策の基礎的な情報として活用する。

F. 研究発表

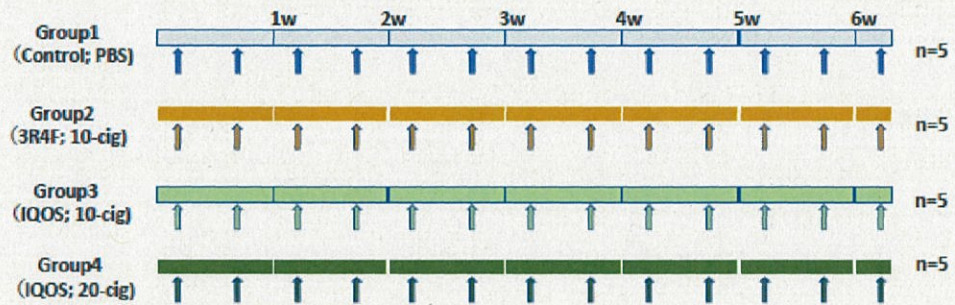
1. 論文発表

1. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L,

- Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE., Kurane I. (2021) U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77.
2. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.
 3. Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. (2020) Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 96, 180-187.
 4. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2020) Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 33, 1907-1914.
 5. Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. (2020) Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42, 16.
 6. 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. (2020) Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 41, 368-376.
2. 学会発表
 1. 戸塚ゆ加里 NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム (2020年6月 Web開催)
 2. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会 (2020年9月 Web開催)
 3. 戸塚ゆ加里 Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第79回癌学会 (2020年10月、広島)
 4. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要因を解明する 第2回三陸包括的緩和医療研究会 (2020年10月 Web開催)
 5. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第49回環境変異原学会 (2020年9月、静岡)
 6. 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 第37回日本毒性病理学会 (2021年1月、Web開催)
 7. 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 第12回JBFシンポジウム (2021年3月、Web開催)
- G. 知的財産権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

図1 実験プロトコール

実験プロトコール：in vivo 遺伝毒性試験



使用動物：*gpt delta* マウス、メス、10 週齢
 投与方法：気管内投与（100 μ L/個体、週2回投与）
 解剖：13回目投与後24時間後
 被験物質：紙巻タバコ(3R4F)および加熱式タバコ(IQOS)主流煙捕集溶液(PBS)
 溶媒対照：PBS

図2 肺における*gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験の結果

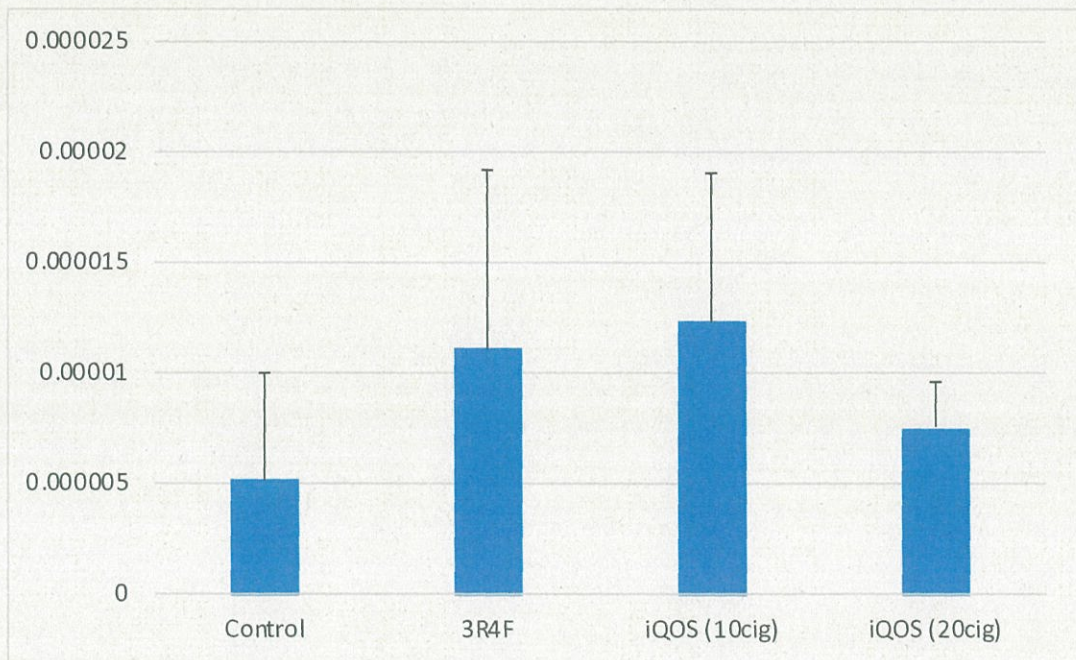


表1 紙巻および加熱式タバコ煙捕集溶液により誘発される変異スペクトル解析結果

Type of mutation	Control		3R4F			QOS (10 cig)		
	Number of mutants (%)	Specific mutation frequency	Number of mutants (%)	Specific mutation frequency	P value	Number of mutants (%)	Specific mutation frequency	P value
Transition								
GC>AT	5 (38.4)	1.98059E-06	8 (36.4)	3.93314E-06	0.22	9 (53)	6.57895E-06	0.022
AT>GC	2 (15.4)	7.92236E-07	1 (4.5)	4.91642E-07	0.694	2 (11.8)	1.46199E-06	0.534
Transversion								
GC>TA	2 (15.4)	7.92236E-07	4 (18.2)	1.96657E-06	0.277	2 (11.8)	1.46199E-06	0.534
GC>CG	2 (15.4)	7.92236E-07	2 (9.1)	9.83284E-07	0.829	0 (0)	0	0.298
AT>TA	0 (0)	0	2 (9.1)	9.83284E-07	0.115	1 (5.8)	7.30994E-07	0.174
AT>CG	2 (15)	7.92236E-07	3 (13.4)	1.47493E-06	0.489	0 (0)	0	0.298
Insertion								
Insertion	0 (0)	0	1 (4.5)	4.91642E-07	0.265	1 (5.8)	7.30994E-07	0.174
Deletion								
Deletion	0 (0)	0	1 (4.5)	4.91642E-07	0.265	2 (11.8)	1.46199E-06	0.055
Total	13 (100)	5.14953E-06	22 (100)	1.08161E-05	0.03	17 (100)	1.24269E-05	0.014

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2年度 分担研究報告書

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: *gpt delta* マウスを用いて、紙巻(3R4F)及び加熱式(IQOS)タバコの *in vivo* 遺伝毒性について検討した。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇($P < 0.05$)が観察されたものの、3R4Fの変異頻度は予想よりもはるかに低いものであった。その理由として、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十分に観察されなかったのではないかと考えられる。今後、フィルター捕集サンプルを用いて、再度 *in vivo* 遺伝毒性について検討する必要があると考えた。

一方、変異スペクトル解析の結果、IQOS_10本の曝露群において、GC > AT 変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。紙巻タバコ中に含まれる有害化学物質の多くはG>Tが主な変異パターンであることが知られており、NGSによる変異シグネチャー解析でもタバコ由来のシグネチャーであるSBS4はGC>TAに多くの変異が観察されている。今回解析したIQOSによる変異コロニー数は少なく、結論には至らないが、誘発する変異スペクトルの違いが観察されたことから紙巻タバコとは異なる有害物質がヒト健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、更にサンプル数を追加して解析する必要があると思われる。

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。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

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

昨年度と同様に、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。標準紙巻きたばこ(3R4F)及びIQOSを10本及び20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、ドライアイスを含め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°Cで使用直前まで保管した。

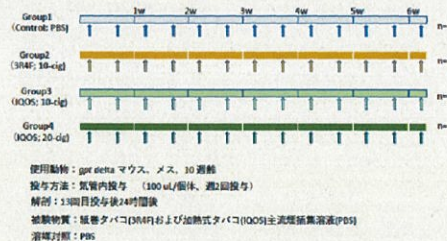
■ 実験動物への投与

10週齢の雌性*gpt delta* マウスにタバコ煙捕集溶液を個体あたり0.1 mLの用量

で週2回気管内投与を合計13回(6.5週間)投与を行なった(図1)。投与の内訳を以下に示す。Group 1: 溶媒(PBS)コントロール、Group 2: 紙巻たばこ(3R4F_10本分)、Group 3: IQOS_10本分、Group 4: IQOS_20本分。最終投与24時間後にマウスを屠殺・解剖し、肺を摘出した。摘出した肺は重量を測定した後、左右に切り分け、右肺は病理組織診断のために共同研究者(東京農大・中江 大教授)に送付した。残りの左肺は遺伝毒性試験(*gpt assay*)に使用するため直ちに凍結保存した。

図1 実験プロトコール

実験プロトコール: *in vivo* 遺伝毒性試験



■ *gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験

コントロールおよびAAを曝露したマウスからDNAを抽出し、*in vitro*パッケージングによってトランスジーンλ EG10をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組替え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、λ EG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組替え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含むM9寒天培地に播いて37°Cで培養すると、プラスミド上の*gpt*遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天

培地に播いて生じたコロニー数から、感染フェージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異頻度を算出した。

■ 上記試験における変異スペクトルの解析

上記試験で得られた変異コロニーをPCR法で増幅し、*gpt*遺伝子を直接シーケンス解析を行い、変異スペクトルの解析を行った。

(倫理面への配慮)

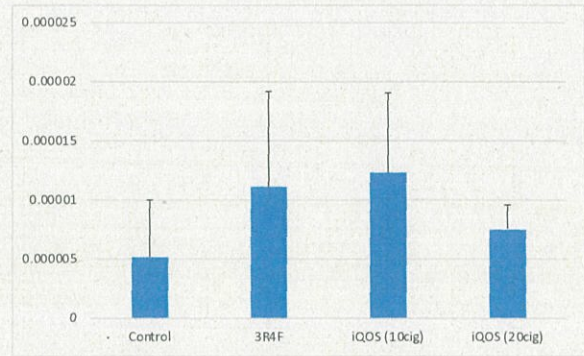
本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、3Rの原則に則り、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

■ *gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験

紙巻および加熱式タバコ煙捕集溶液を反復気管内投与した*gpt* deltaマウス肺から抽出したゲノムDNAを用い、インビトロパッケージング法により標的遺伝子をプラスミドとして回収し、*gpt*変異解析用の試験菌株に感染させて変異頻度の解析を行った。その結果を図1に示す。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇が観察された(P<0.05)。しかしながら、IQOS(20本)の投与群ではコントロール群の約1.5倍程度の上昇にとどまり、変異頻度の用量依存的な増加は観察されなかった。

図2 肺における*gpt*遺伝子を指標とした変異原性試験の結果



■ 上記試験における変異スペクトルの解析

上記の変異原性試験で得られた変異コロニーをダイレクトシーケンス法により誘発された変異スペクトルの解析を行った。その結果を表1に示す。コントロールと3R4F曝露群に差は見られなかったが、IQOS_10本の曝露群においては、GC > AT変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。

表1 紙巻および加熱式タバコ煙捕集溶液により誘発される変異スペクトル解析結果

Type of mutation	Control		3R4F		P value	IQOS (10 cig)		P value
	Number of mutants (%)	Specific mutation frequency	Number of mutants (%)	Specific mutation frequency		Number of mutants (%)	Specific mutation frequency	
Transition								
GC>AT	5 (0.4)	1.98059E-06	8 (0.6)	3.93314E-06	0.22	9 (0.3)	6.57895E-06	0.022
AT>GC	2 (0.5)	7.92233E-07	1 (4.5)	4.91942E-07	0.694	2 (11.8)	1.46199E-06	0.534
Transversion								
GC>TA	2 (0.5)	7.92233E-07	4 (16.2)	1.96657E-06	0.277	2 (11.8)	1.46199E-06	0.534
GC>CG	2 (0.5)	7.92233E-07	2 (9.1)	9.82284E-07	0.629	0 (0)	0	0.298
AT>TA	0 (0)	0	2 (9.1)	9.82284E-07	0.115	1 (5.8)	7.30994E-07	0.174
AT>CG	2 (0.5)	7.92233E-07	3 (13.4)	1.47493E-06	0.489	0 (0)	0	0.298
Insertion								
Insertion	0 (0)	0	1 (4.5)	4.91942E-07	0.265	1 (5.8)	7.30994E-07	0.174
Deletion								
Deletion	0 (0)	0	1 (4.5)	4.91942E-07	0.265	2 (11.8)	1.46199E-06	0.055
Total	13 (100)	5.14953E-06	22 (100)	1.08161E-05	0.03	17 (100)	1.24269E-05	0.014

D. 考察

gpt deltaマウスを用いて、紙巻及び加熱式タバコの*in vivo* 遺伝毒性について検討した。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇が観察された(P<0.05)ものの、3R4Fの変異頻度は予想よりもはるかに低いものであった。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十分に観察されなかったのではないかと考えられる。ちなみに3R4F(5本分)およびIQOS(20本分)の変異原性の確認のため、これらの主流煙をフィルターに捕集しメタノールで抽出後にDMSOに溶解してAmes assayを行った結果、コントロールと比較して3R4Fでは約7倍、IQOSでは2倍の復帰変異コロニー数が観察された。今後、これら捕集サンプルを用いて、再度*in vivo* 遺伝毒性について検討する必要があると考えた。

また、IQOS(20本)の投与群ではコントロール群の約1.5倍程度の上昇にとどまり、変異頻度の用量依存的な増加は観察されなかった。分担研究者の中江による報告によると、今回投与したいずれのタバコ煙捕集溶液の反復気管内投与による実験動物肺に対する毒性的な所見は観察されなかったとのことから、IQOS高用量群での宿主側のダメージによる影響とは考えにくい。さらに今回使用したサンプル中のIQOS煙成分の定量的な評価は実施しておらず、有害性化学物質の濃度が低すぎ、IQOS(10本)と同程度の変異原性しか観察されなかった可能性が考えられる。今後はフィルター捕集により同様な試験を実施することに加え、IQOS化学成分の定量的な評価についても実施することが望ましいと考えた。

一方、変異スペクトル解析の結果、IQOS_10本の曝露群において、GC>AT変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。紙巻タバコ中に含まれる有害化学物質の多くはG>Tが主な変異パターンであることが知られており、NGSによる変異シグネチャー解析でもタバコ由来のシグネチャーであるSBS4はGC>TAに多くの変異が観察されている。今回解析したIQOSによる変異コロニー数は少なく、結論はだせないが、誘発する変異スペクトルの違い

が観察されたことから紙巻タバコとは異なる有害物質がヒト健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、更に解析サンプル数を追加する必要があると思われる。

E. 結論

gpt delta マウスを用いて、紙巻及び加熱式タバコの*in vivo* 遺伝毒性について検討した。溶媒対照群と比べ、3R4F(10本)及びIQOS(10本)で約2倍程度の変異頻度の上昇が観察された($P<0.05$)ものの、3R4Fの変異頻度は予想よりもはるかに低いものであった。これは、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十分に観察されなかったのではないかと考えられる。ちなみに3R4F(5本分)およびIQOS(20本分)の変異原性の確認のため、これらの主流煙をフィルターに捕集しメタノールで抽出後にDMSOに溶解してAmes assayを行った結果、コントロールと比較して3R4Fでは約7倍、IQOSでは2倍の復帰変異コロニー数が観察された。今後、これら捕集サンプルを用いて、再度*in vivo* 遺伝毒性について検討する必要があると考えた。

一方、変異スペクトル解析の結果、IQOS_10本の曝露群において、GC>AT変異の有意な増加に加えて、欠失の増加傾向が認められた。紙巻タバコ中に含まれる有害化学物質の多くはG>Tが主な変異パターンであることが知られており、NGSによる変異シグネチャー解析でもタバコ由来のシグネチャーであるSBS4はGC>TAに多くの変異が観察されている。今回解析したIQOSによる変異コロニー数は少なく、結論はだせないが、誘発する変異スペクトルの違いが観察されたことから紙巻タバコとは異なる有害物質がヒト健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、更に解析サンプル数を追加する必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

7. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I. (2021) U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77.
8. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.
9. Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. (2020) Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 96, 180-187.
10. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2020) Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 33, 1907-1914.
11. Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. (2020) Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42, 16.
12. 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. (2020) Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 41, 368-376.

2. 学会発表

8. 戸塚ゆ加里 NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム (2020年6月 Web開催)
9. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会 (2020年9月 Web開催)
10. 戸塚ゆ加里 Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第79回癌学会 (2020年10月、広島)
11. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要因を解明する 第2回三陸包括的緩和医療研究会 (2020年10月 Web開催)
12. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第49回環境変異原学会 (2020年9月、静岡)
13. 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 第37回日本毒性病理学会 (2021年1月、Web開催)
14. 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 第12回JBFシンポジウム (2021年3月、Web開催)

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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)
分担研究報告書

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 vivo* 一般毒性評価

研究分担者 中江 大 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

研究要旨：本研究の目的は、動物を用いて加熱式たばこの一般毒性および遺伝毒性の評価を行い、科学的根拠に基づいた加熱式たばこの規制などによるヒト健康の維持・増進に資する基礎的情報を得ることである。その中で、本分担研究は、主に一般毒性について解析する。本年度は、気管内投与によるマウスの反復投与毒性試験（一般毒性試験）として、加熱式たばこおよび対照の紙巻きたばこからの検体を、雌性 C57BL/6J 系および *gpt delta* マウスの気管内に投与し、肺・消化管・肝・膀胱などたばこの標的臓器として知られるものを含む各種臓器について毒性病理学的に解析した。また、肺においては、炎症など毒性変化の背景機構に関与すると考えられる炎症系遺伝子の発現を解析した。さらに、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid (BALF)) を採取し、細胞学および分子生物学的手法で炎症関連マーカーなどについて解析した。その結果、いずれの試験においても紙巻および加熱式タバコ捕集液の気管内投与による明らかな変化が得られなかった。これについては、投与した捕集液の濃度自体が低かったことにも関連していると考えられ、より高濃度での曝露条件において精査する必要があるものと考えられた。

研究協力者:

美谷島 克宏 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科
准教授

煙山 紀子 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科
助教

加熱式タバコは、2014年以降に日本国内に導入され、従来の紙巻きたばこに比べて有害性成分が少なく、副流煙があまり発生しないなどの情報から、多くの喫煙者が利用している。しかし、これらの情報は、メーカーが発信しているものであり、必ずしも科学的信憑性が担保されていると言えない。それゆえ、加熱式たばこによ

A. 研究目的

るヒト健康影響についての懸念は払拭されていないが、これまで加熱式たばこの直接的な有害性を評価する研究はメーカーにより実施されたものがあるのみである。したがって、加熱式たばこのリスクは、中立的な立場で科学的に評価する必要がある。一方、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には「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」と明記されていて、厚生労働行政において加熱式たばこのリスク評価・管理は喫緊の課題となっている。

本研究の目的は、以上の背景に立脚し、動物を用いて加熱式たばこの一般毒性および遺伝毒性の評価を行い、科学的根拠に基づいた加熱式たばこの規制などによるヒト健康の維持・増進に資する基礎的情報を得ることである。その中で、本分担研究は、主に一般毒性について解析する。

B. 研究方法

本年度は、前年度の予備検討の結果および収集した情報に基づき、1年目で検討した項目に基づき *in vivo* 非臨床安全性試験を、気管内投与によるマウスの反復投与毒性試験（一般毒性試験）として実施した。試験は、前年度と同様に、加熱式たばこおよび対照の紙巻きたばこからの検体を準備し、雌性C57BL/6J系およびgpt deltaマウスの気管内に投与し、肺・消化管・肝・膀胱などたばこの標的臓器として知られるものを含む各種臓器について毒性病理学的に解析した。また、肺においては、炎症など毒性変化の背景機構に関与すると考えられる炎症系遺伝子の発現を解析した。さらに、気管支肺泡洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid (BALF)) を採取し、細胞学的および分子生物学的手法で炎症関連マーカーなどについて解析した。

(倫理面への配慮)

本年度の動物実験は、関係機関による倫理審査を受け、国内外の宣言・条約・法律・ガイドライン等に準拠して実施した。

C. 研究結果

先ず、雌性C57BL/6J系マウス(10週齢)の気管内に、紙巻および加熱式タバコ捕集液を週1回・計13回投与した。投与グループの内訳は、第1群:コントロール(PBS), N=14, 第2群:紙巻タバコ(20本), N=13, 第3群:IQOS(5本), N=13, 第4群:IQOS(10本), N=12, 第5群:IQOS(20本), N=14とした。本実験条件下での紙巻および加熱式タバコ捕集液投与群においては、体重抑制などを観察しなかった。最終投与から24時間後には、上記の臓器を採取し解析を実施した。肺の病理組織学的観察においては、陽性対照群(第2群)およびIQOS投与群(第3~5群)の一部のマウスに、肺泡マクロファージ・気管支周囲炎症細胞・血管周囲炎症細胞の浸潤を散発的に認めたが、第3~5群の変化に用量相関性がみられなかった。これらは、陰性対照群(第1群)に観察されなかったため、被験物質投与に関係した変化である可能性を否定できないが、毒性学的意義が低いものと評価した。肺組織を用いた遺伝子発現解析では、炎症関連遺伝子としてTNF- α の発現を解析したが、第3群で発現上昇を示したものの、他の群間に明確な差を認めず、また、ばらつきも大きかった。BALFにおいては、TNF- α ・IFN- γ ・IL2・IL4・IL6・IL10・IL17A濃度を測定したが、群間に明確な差を認めず、ばらつきも大きかった。また、肺以外の観察臓器においては、投与の影響を示唆する明らかな組織学的変化を認めなかった。

次いで、気管内投与によるgpt deltaマウスにおける *in vivo* 遺伝毒性試験に由来する採取材料を用いては、加熱式たばこと対照の紙巻きたばこにより誘発される一般毒性について、上記

の C57BL/6J 系マウスの試験と同様に解析した。実験系は、雌 gpt delta マウス(10 週齢)の気管内に、紙巻および加熱式タバコ捕集液を週 2 回・計 13 回投与した。投与グループの内訳は、第 1 群:コントロール(PBS), N=5, 第 2 群:紙巻タバコ(10 本), N=5, 第 3 群:IQOS(10 本), N=5, 第 4 群:IQOS(20 本), N=5 とした。本実験条件下での紙巻および加熱式タバコ捕集液投与群における体重抑制などは観察されなかった。最終投与から 24 時間後には、上記の臓器を採取し解析を実施した。肺の相対重量は、紙巻タバコ群でコントロールに比べ有意に増加し、IQOS 投与群でも増加傾向が観察されたが統計学的に有意な変化でなかった。肺の組織学的解析においては、陰性対照群(第 1 群)と陽性対照群(第 2 群)の一部のマウスに、肺泡マクロファージ・血管周囲炎症細胞の浸潤を散発的に認めたが、程度も軽微なものが多く、また、IQOS 投与群(第 3・4 群)に観察しなかった。肺組織を用いた遺伝子発現解析では、炎症関連遺伝子として TNF- α の発現を解析したが、ばらつきが大きく、群間に明確な差を認めなかった。BALF においては、TNF- α ・IFN- γ ・IL2・IL4・IL6・IL10・IL17A 濃度を測定したが、群間に明確な差を認めず、ばらつきも大きかった。また、肺以外の観察臓器において、投与の影響を示唆する明らかな組織学的変化は認められなかった。

D. 考察

以上の結果より、C57BL/6J 系マウスの試験においては、陽性対照群(第 2 群)および IQOS 投与群に投与の影響を示唆する毒性学的情報が得られなかったものと判断した。また、実験系においては、陽性対照群(第 2 群)および IQOS 投与群に投与の影響を示唆する毒性学的情報が得られなかったものと判断した。

上記の原因としては、投与した捕集液の濃度自体が低かったことにも関連していると考えられ、より高濃度での曝露条件において精査する必

要があるものと考えられた。

E. 結論

一般毒性の評価を目的として実施した上記の in vivo 試験においては、いずれも紙巻および加熱式タバコ捕集液の気管内投与による明らかな変化が得られなかった。本年度の成果は、加熱式たばこのリスク評価に関する今後の研究・施策の基礎的な情報として活用する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tian M, Moir L, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nambu A, Putscharen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I.	U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim	Virology	555,	71-77.	2021
Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci.	112,	7-15.	2021
Totsuka Y, Masako Y, Ono H, Nagai M, Kitamoto M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H.	Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci	96,	180-187	2020

Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol.	33,	1907-1914.	2020
Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T.	Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts.	Genes Environ.	42,	16	2020
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haenod 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.	41,	368-376.	2020

動物実験計画変更申請書

国立がん研究センター理事長 殿

実験担当者氏名	戸塚 ゆ加里
所属	発がん・予防研究分野(戸塚グループ)
連絡先	内線：/PHS：
申請者（実験責任者）氏名	今井 俊夫
所属	動物実験施設
連絡先	内線：/PHS：

共同実験者

所属	氏名	内線	教育訓練の受講歴	教育訓練の受講日
動物実験施設	打屋 尚章		有効期限切れ	2019/04/16
連携研究室（がん予防）	小宮 雅美		有効期限切れ	2019/04/16

【実験計画】

1. 研究課題

発がん要因の検索とリスク評価に関する研究

2. 支援を受けている研究費の名称

厚労科研費化学リスク研究事業、AMED、厚労科研費循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業

3. 申請課題に関する遺伝子組換え実験計画書の実験承認番号

遺伝子組み換え実験を含む（封じ込め施設で実験飼育する）

承認番号：A90M3-14, A340-18

4. 実験目的

ヒトのがん発生には環境要因による突然変異の誘発が深く関与している。しかしながら、DNAに突然変異を誘発する物質の本体はあまりよくわかっておらず、未だ同定されていない変異・がん原物質が環境中のみならず生体内にも数多く存在し、ヒト発がんに関与していることが予測される。本実験では、外因性および内因性の新しい変異・がん原物質を検索し、分離・同定するとともに、それらの生物活性を調べ、ヒト発がんへの関与およびそのメカニズムの解明を目的とする。また、化学物質に固有のゲノム情報を取得し、ヒト発がん要因の探索に応用する。さらに、新規変異・がん原物質の環境中の分布状況やヒト曝露量を評価するバイオマーカーの検索なども合わせて行ない、これら物質のヒト発がんにおけるリスク評価についても検討する。実験にあたっては、国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。このような実験を行うことで、これまで不明であったヒト発がん要因のいくつかの本体が明らかにされる。また、ヒト発がんへの関与を解明するための生物活性や作用機構などに関する基礎的研究資料も得られるとともに、それらのヒト発がんにおけるリスク評価に関する知見も得ることが出来る。

5. 実験予定期間

開始：2020/06/22

終了：2023/03/31

6. 実験動物を必要とする理由

代替手段がない

7. 実験項目と内容

項目 1

実験項目	トランスジェニックマウスおよびラットを用いた内因性および外因性変異原物質のin vivo変異原性試験		
実験概要と動物数算定根拠	種々の内因性および外因性変異原物質（微粒子等も含む）をトランスジェニックマウス及びラットに経口、経気道、腹腔内、皮下等のルートで投与し、投与数週間～数ヶ月後の肺、肝臓、腎臓等の臓器を摘出し、突然変異の誘発について調べる。 （一群10匹で3 dose x 2 pointで解剖すると一つの化合物あたり60匹となる。被検物質を3年間で6種類と見積もって合計360匹と計算した）また、著しい体重減少（数日以内に20%以上）、摂食障害等動物に著しい苦痛が生じる場合は実験を中止し、安楽死等の適切な処置をとる。		
実験内容	1:臓器等の材料採取,13:測定・観察		
苦痛軽減・排除法	安楽死（1） 麻酔薬の投与（13） 麻酔法：薬品名 イソフルランまたはネブタールとイソフルランの併用 投与方法：吸入および腹腔内投与 短期間の保定（13）		
実験のカテゴリー	D:脊椎動物を用い、かなりの、且つ回避できないストレス又は痛みを伴う実験 [変異原物質や微粒子等を投与し、動物はかなりの回避出来ないストレスと苦痛を伴うものと推測される。]		
実験終了後（安楽死）の処置	麻酔薬+放血 麻酔法：薬品名 イソフルラン 投与方法：吸入 頸椎脱臼		
使用動物 1			
動物種	マウス	微生物グレード	SPF
系統名	C57BL/6JmsSlc-Tg(gpt delta)	検疫・微生物学的クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び動物実験実施場所	飼育室9
規格	4～10週齢		
動物総数	360	導入方法	購入
使用動物 2			
動物種	ラット	微生物グレード	SPF
系統名	F344/NSlc-Tg(gpt delta)	検疫・微生物学的クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び動物実験実施場所	飼育室10
規格	4～10週齢		
動物総数	360	導入方法	購入
使用動物 3			
動物種	ラット	微生物グレード	SPF
系統名	Slc:WistarHannover/Rcc-Tg(gpt delta)	検疫・微生物学的クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び動物実験実施場所	飼育室10
規格	4～10週齢		
動物総数	360	導入方法	購入
拡散防止措置／バイオセーフティ	P1A		
項目 2			
実験項目	内因性および外因性変異原物質のin vivo遺伝毒性及び発がん性試験		

実験概要と動物数算定根拠	<p>種々の内因性および外因性変異原物質（微粒子等も含む）をマウスおよびラットに経口、経気道、腹腔内、皮下等のルートで投与し、投与数時間～数ヶ月後の肺、肝臓、骨髄、腎臓等の臓器を摘出し、小核、DNA損傷等の遺伝毒性誘発について調べる。発がん性の評価においては、標的臓器が不明の場合もあることから、全臓器を摘出し、肉眼的・病理組織学的な評価を行う。腫瘍病変が観察された場合は、その一部を凍結保存し、ゲノム・エピゲノム解析などに利用する。</p> <p>（遺伝毒性試験：一群10匹で3dose x 2~3 pointで解剖すると一つの化合物あたり60~90匹となる。被検物質を3年間で5種類と見積もって合計450匹と計算した。発がん性試験：一群15~30匹で3doseとすると一つの化合物あたり45~90匹となる。被検物質を3年間で3種類と見積もって合計270匹と計算した。）複数の動物種および系統を用いる理由として、項目1で用いるgpt deltaマウスのバックグラウンドはC57BL/6Jとなっており、新規変異原物質のin vivo変異原性試験と遺伝毒性試験、発がん性試験の結果を同系統で揃えて考察する場合に必要である。ICRマウスおよびF344、Wistarラットはこのような遺伝毒性・発がん性試験を行なうのに一般的に用いられる系統であるため選択した。また、糖尿病・肥満モデル動物であるGKラットを用いて、高血糖状態や肥満状態などが遺伝毒性や発がん性に及ぼす影響についても観察する。著しい体重減少（数日以内に20%以上）、摂食障害等動物に著しい苦痛が生じる場合は実験を中止し、安楽死等の適切な処置をとる。また、腫瘍体積が体重の10%を超える場合や削瘦・自発運動低下など一般状態の悪化がみられる場合などは直ちに実験を中止し、安楽死等の適切な処置をとる。</p>		
実験内容	1:臓器等の材料採取,3:発がん,13:測定・観察		
苦痛軽減・排除法	安楽死（1, 3） 麻酔薬の投与（13） 麻酔法：薬品名 イソフルランまたはネンブタールとイソフルランの併用 投与方法：吸入 短期間の保定（13）		
実験のカテゴリー	D:脊椎動物を用い、かなりの、且つ回避できないストレス又は痛みを伴う実験 変異原物質や微粒子等を投与し、動物はかなりの回避出来ないストレスと苦痛を伴うものと推測される。担がん状態になるため、不可避の耐え難い苦痛を伴うことが予測される。		
実験終了後（安楽死）の処置	麻酔薬+放血 麻酔法：薬品名 イソフルラン 投与方法：吸入 頸椎脱臼		
使用動物 1			
動物種	マウス	微生物グレード	SPF
系統名	C57BL/6J	検疫・微生物学的クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び動物実験実施場所	飼育室9
規格	4~10週齢		
動物総数	720	導入方法	購入
使用動物 2			
動物種	マウス	微生物グレード	SPF
系統名	ICR	検疫・微生物学的クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び動物実験実施場所	飼育室9
規格	4~10週齢		
動物総数	720	導入方法	購入
使用動物 3			
動物種	ラット	微生物グレード	SPF
系統名	F344/Jcl	検疫・微生物学的クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び動物実験実施場所	飼育室10
規格	4~10週齢		
動物総数	720	導入方法	購入
使用動物 4			

動物種	ラット	微生物グレード	SPF
系統名	Wistar	検疫・微生物学的 クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び 動物実験実施場所	飼育室10
規格	4～10週齢		
動物総数	720	導入方法	購入
使用動物 5			
動物種	ラット	微生物グレード	SPF
系統名	GK/Slc	検疫・微生物学的 クリーニング	検疫不要
性別	♀・♂	動物飼育室及び 動物実験実施場所	飼育室10
規格	4～10週齢		
動物総数	720	導入方法	購入
拡散防止措置／バ イオセーフティ	該当なし		

8. 実験担当者から管理室への飼育上の特記事項

発がん剤や微粒子を扱う場合は細心の注意を払って実験を行います。その際は動物実験支援施設に連絡をすると共に危険な汚染物に関しては実験者が処理を行いません。また、微粒子試料は全て液体として取り扱うことと、気管内や腹腔内に投与したこれらの微粒子は殆ど体外に排泄されないことから、これら微粒子の拡散は殆どないものと思われま。従いまして、実験動物に対しての取り扱い注意点は特になくとも考えられます。

9. 備考

共同実験者・実験責任者

実験者の退職、卒業および新規メンバー追加、実験担当者の所属異動などによる変更が必要になったため

2. 支援を受けている研究費の名称

研究費の採択により追加が必要になったため

5. 実験予定期間

研究費の継続・新規採択などにより研究の延長が必要になったため

10. 添付書類

No.	添付書類名
1	戸塚ゆ加里_20180326機関承認(A340-18).pdf
2	戸塚ゆ加里_20180326機関承認(A90M3-18).pdf