

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

総合研究報告書

研究代表者 戸塚 ゆ加里

令和3（2021）年 5月

目 次

I. 総合総括研究報告

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 | ----- | 10 |
| (資料) 研究成果に関する図表 | ----- | 22 |

II. 分担研究総合報告書

1. 加熱式たばこの*in vitro* および*in vivo* 遺伝毒性評価 ----- 26
戸塚 ゆ加里

2. 加熱式たばこの*in vivo*一般毒性評価 ----- 36
中江 大

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41

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)
総合総括研究報告書

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・がんモデル開発部門

研究要旨：1年目の成果として、動物実験開始に先立ち、加熱式たばこの安全性に関する情報を収集した。その結果、加熱式たばこの主流煙・副流煙には、有害物質が存在することが判明した、また、加熱式たばこは、ヒトに肺疾患を誘発し、その原因に重金属やビタミンE 酢酸塩が関与する可能性が示された。以上の結果から、加熱式たばこは必ずしも安全であると言えず、本研究を含む各種の解析により精確なリスク評価を行い、その結果に基づき、科学的根拠をもった適切なリスク管理を行う必要があることが示された。また、バクテリアを用いて、紙巻(3R4F)及び加熱式(IQOS)タバコの *in vitro* 遺伝毒性について検討した。本研究ではインピンジャーを用いてPBS 30mLにタバコ煙を捕集した。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。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。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た。

2年目の成果として、*gpt delta* マウスを用いて、1年目の捕集方法と同様の条件下で捕集した3R4F及びIQOS煙サンプルの *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。1年目と同様に、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 SBS 4 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。

また、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、加熱式タバコ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。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

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タバコメーカーにより出されているものであることから、加熱式タバコ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る間もないため、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、いずれも加熱式タバコ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、加熱式タバコの直

接的な有害性を評価する研究ではない。加熱式タバコ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、これら加熱式タバコ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（指定タバコ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、加熱式タバコの *in vitro* および *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

■ 文献調査による加熱式たばこの安全性に関する情報収集

第1年度は、動物実験の開始に先立ち、文献調査などにより、加熱式たばこの安全性に関する情報を収集した。

■ 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、5、10、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°C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 μ L、DMSO 300 μ L、S9 mixまたは0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μ L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 μ L添加し、37°C、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、①Ames試験、②Survival、③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。

① Ames 試験

上記反応液700 μ L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°C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。

② Survival

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

③ 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°C、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シーケンズ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。

■ 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

■ 文献調査による加熱式たばこの安全性に関する情報収集

第1年度の結果として、加熱式たばこの主流煙中で、たばこ特異的ニトロソアミン、多環芳香族炭化水素、アンモニア、一酸化炭素など有害物質の含有量は、紙巻たばこの場合に比べて少量である。しかし、それは、量的に少ないということであって、存在しないというわけでない。さらに、それらの中には、変異原性物質であって、毒性・発がん性に閾値を求めることができないものが含まれている。また、一酸化炭素や多環芳香族炭化水素であるアセナフテンについては、加熱式たばこの主流煙の含有量の方がむしろ多いという報告もある。主流煙のニコチンや粉塵の含有量は、多くの報告において加熱式

たばこ紙巻たばこで同等であるとされている。揮発性化合物については、多くが加熱式たばこの場合に少量であるが、アクロレイン、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドなどについては紙巻たばこ同等であると報告されている。一方、加熱式たばこの副流煙については、ニコチン、ホルムアルデヒド、粉塵が含まれていることが明らかになっている。

米国を中心とする地域では、加熱式たばこの主流煙による製品使用関連肺傷害(EVALI)と呼ばれる疾患が報告されている。EVALIの患者は、呼吸困難および咳嗽を主症状とし、画像診断で両側の肺胞性陰影を観察し、低酸素血症を伴う。EVALIについては、精力的な研究が行われており、その原因として、テトラヒドロカンナビノールやビタミンE酢酸塩の関与が有力視されている。また、EVALIに関しては、喘息などの基礎疾患があると発生数や重症度が高まると報告されている。加熱式たばこがヒトの疾患リスクに及ぼす影響については、疫学的研究が為されている。それらによれば、加熱式たばこの使用は、がんおよび非がん病変のリスクを高めるとされている。の報告がある。それには、前述の有害化学物質やEVALIが関与しているが、それ以外に、加熱式たばこが発生させるエアロゾル中の重金属の影響が大きいとされている。関係する重金属としては、主にクロム・ニッケル、従にカドミウム・鉛・マンガン・砒素などが挙げられている。

■ バクテリアを用いた生存率の観察と遺伝毒性試験

① 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。

② Survival

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。

③ 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。

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ひ、次に、各々の変異スペクトルの内訳を変異箇所の前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。

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、-5cig、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は嘔みタバ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。

■ *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。

■ 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グエ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。

■ 実験動物を用いた加熱式タバこの一般毒性試験

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。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、加熱式タバコ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、程度も軽微なものも多く、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

【文献調査】

第1年度について、冒頭に述べたように、加熱式タバコは、従来の紙巻きタバコ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という情報が流布されているが、文献調査を行ったところ、そのような情報が正しくないことが明らかとなった。加熱式タバコの主流煙に含まれ

る有害物質は、紙巻タバコの場合より少量であることが多い。しかし、中には同等かむしろ多量である場合もあり、いずれにしても、それらの化学物質の性質上、毒性・発がん性を無視または過度に軽視すべきでない。さらに、副流煙は存在し、その中にも量的な多寡はともかく有害物質が含まれているのは事実である。これらの報告には加熱式タバコの種類や測定条件など様々な影響要因があり、相互に異なる知見も発表されているので、加熱式タバコの安全性を評価するに当たってはそうした状況に鑑みて慎重に検討することが必要である。その意味で、本研究の重要性は、高まったものと考えられる。

また、EVALIの存在は、加熱式タバコの使用が実際にヒトの肺疾患を誘発することを示すものである。EVALIについては、今後、その詳細な実態を解析し、また、日本の状況を調査し、加熱式タバコのリスク評価に反映する必要がある。また、喘息などEVALIの高リスク群が存在することは、加熱式タバコのリスク評価、さらにリスク管理において考慮する必要がある。

第1年度の文献調査の結果、加熱式タバコの毒性、また、それによるヒト疾患リスクへの悪影響が評価および管理すべき事象であることが明らかとなったが、その詳細については様々な角度からのさらなる解析が必要である。中でも当該毒性の原因または増悪因子となる物質に関する調査と解析はきわめて重要であり、その意味でエアロゾル中の重金属がヒトの疾患リスクの増大因子であると判明したことは注目に値する。

【*in vitro* 試験】

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、紙巻タバコ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。

【*in vivo* 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。

また、C57BL/6J 系マウスの一般毒性試験においては、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。

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

文献調査の結果、加熱式たばこの安全性は、ヒトの健康の維持・増進を図る厚生労働行政において、重要な要素であることが判明した。したがって、当該安全性については、中立公正で科学的なリスク評価に基づき、適切にリスク管理し、それらに関するリスクコミュニケーションを担保する必要がある。

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、噛みたばこに関係する変異シグネチャーが観察されることがわかった。

次に、*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、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。

以上の成果は、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. 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, Matsushita 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- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020, Feb – Mar;850–851:503148.
 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.
 7. 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.
 8. 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.
 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. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7–15.
 11. 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. 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 (石家庄、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— 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 Prevention, 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
 11. 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)
 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 がん予防学術大会 (2020年9月 Web 開催)
 13. 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)
 14. 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)

15. 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)
16. 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)
17. 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)
18. 中江 大. 化学物質リスク評価の最前線.
第 9 回レギュラトリーサイエンス学会学術大
会 (2019 年 9 月 7 日, 東京都千代田区).

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)
分担研究総合報告書

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・がんモデル開発部門

研究要旨: 1年目の成果として、バクテリアを用いて、紙巻(3R4F)及び加熱式(IQOS)タバコの *in vitro* 遺伝毒性について検討した。本研究ではインピンジャーを用いてPBS 30mLにタバコ煙を捕集した。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。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。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た。

2年目の成果として、*gpt delta* マウスを用いて、1年目の捕集方法と同様の条件で捕集した3R4F及びIQOS煙サンプルの *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。1年目と同様に、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タバコメーカーにより出されているものであることから、加熱式タバコ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、いずれも加熱式タバコ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、加熱式タバコの直接的な有害性を評価する研究ではない。加熱式タバコ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、これら加熱式タバコ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（指定タバコ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、加熱式タバコの*in vitro*および*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、標準紙巻きタバコ(3R4F)及びIQOSを2、5、10、20本分を30 mLのPBSに捕集した。蒸気相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°C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 μ L、DMSO 300 μ L、S9 mixまたは0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μ L加え、この溶液に被験物質（紙巻タバコ、またはIQOS煙捕集液）を1000 μ L添加し、37°C、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、①Ames試験、②Survival、③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。

④ Ames 試験

上記反応液700 μ L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°C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。

⑤ Survival

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

⑥ NGSによるグローバル変異解析

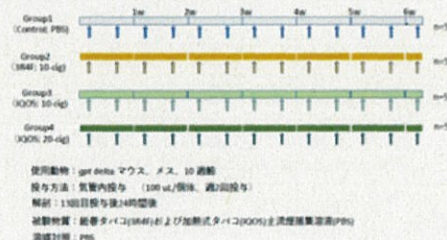
上記反応溶液1 mLを取り、2X NB培地1 mLを添加し、37°C、一晩培養した。培養液を遠心分離して集菌し、Cell lysis溶液にて細胞を溶解後、フェノール/クロロホルム法にてバクテリアのゲノムDNAの抽出を行った。次にNGSシーケンス試薬を用いてライブラリーの調整を行い、NovaSeqにより全ゲノム解析を行った。得られたデータはCLC work flowにより参照ゲノム配列 (*Salmonella typhimurium* ゲノム) にマッピングし、変異の検出を行った。

■ 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

■ バクテリアを用いた生存率の観察と遺伝毒性試験

④ 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 |

⑤ Survival

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。

表2 バクテリアの生存率(Survival%)の結果

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

⑥ 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

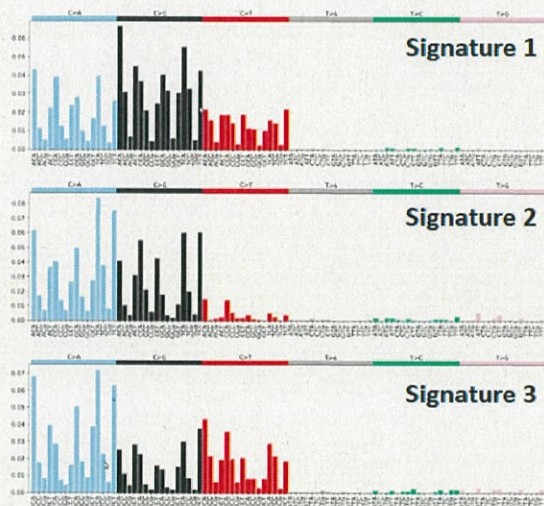
| | | IQOS-S9 | | | IQOS-S9 | | |
|------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | Cont. | 2cig1 | 5cig1 | Cont. | 2cig1 | 5cig1 |
| 変異数 | SNV | 1166 | 516 | 615 | 513 | 908 | 707 |
| | MNV | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | Deletion | 78 | 40 | 45 | 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 | 1.0656E-06 | 1.4807E-06 | 1.1184E-06 | 6.6979E-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を含んだ周辺配列により96パターンに分類したものの(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2 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

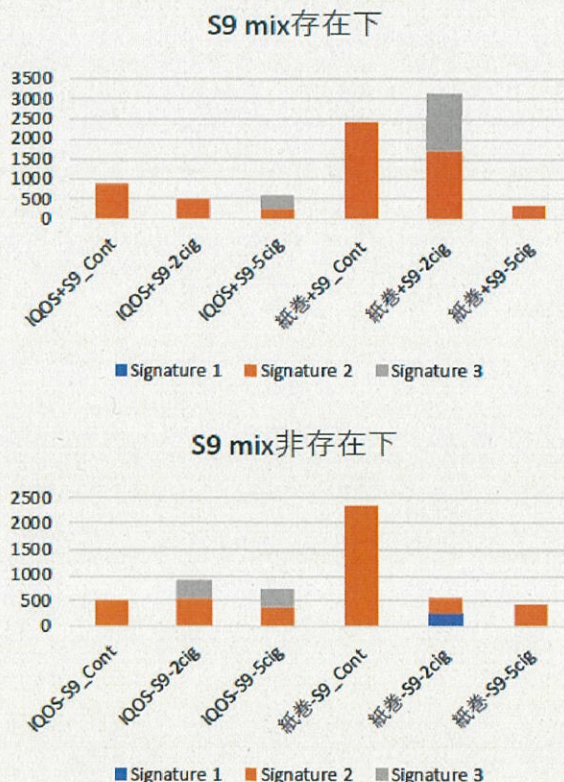


グループ毎の変異シグネチャー分布の内訳を図2に示す。Signature 2はコントロールグループに共通しており、このことからこのシグネチャーは背景に存在するシグネチャーであると考えられる。一方、S9 mix存在下でのIQOS-5cig, 紙巻-2cig, S9 mix非存在下でのIQOS-2cig, -5cig, 紙巻-2cigでは、背景由来のシグネチャーに加え、Signature 3およびSignature 1が観察された。これらシグネチャーは、紙巻および加熱式タバコ捕集溶液曝露に由来するものと考えられた。

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

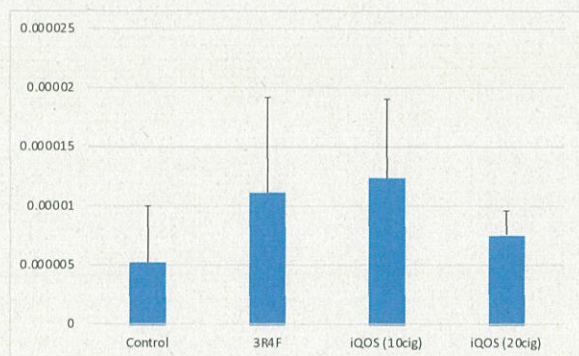
していた。これに加え、Signature 3は嘔みたばこの習慣がある症例から得られた腫瘍に観察される変異シグネチャーと類似していた。

図3 グループ毎の変異シグネチャー分布



■ *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4 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4 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) | 1.94059E-06 | 8 (0.4) | 3.93314E-06 | 0.22 | 9 (0.5) | 6.57895E-06 | 0.022 |
| AT>GC | 2 (0.5) | 7.92238E-07 | 1 (4.5) | 4.91842E-07 | 0.694 | 2 (11.8) | 1.46199E-06 | 0.534 |
| Transversion | | | | | | | | |
| GC>TA | 2 (0.5) | 7.92238E-07 | 4 (18.2) | 1.96467E-06 | 0.277 | 2 (11.8) | 1.46199E-06 | 0.534 |
| GC>CG | 2 (0.5) | 7.92238E-07 | 2 (9.1) | 9.83204E-07 | 0.829 | 0 (0) | 0 | 0.298 |
| AT>TA | 0 (0) | 0 | 2 (9.1) | 9.83204E-07 | 0.115 | 1 (5.8) | 7.30994E-07 | 0.174 |
| AT>CG | 2 (0.5) | 7.92238E-07 | 3 (13.4) | 1.47493E-06 | 0.489 | 0 (0) | 0 | 0.298 |
| Insertion | | | | | | | | |
| 0 (0) | 0 | 1 (4.5) | 4.91842E-07 | 0.265 | 1 (5.8) | 7.30994E-07 | 0.174 | |
| Deletion | | | | | | | | |
| 0 (0) | 0 | 1 (4.5) | 4.91842E-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) | 1.24289E-05 | 0.014 |

D. 考察

【in vitro 試験】

細菌を用いて、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、紙巻タバコ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、紙巻タバコ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。細菌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、タバコ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/加熱式タバコ曝露グループでは、コントロール(背景)由来のシグネチャーに加えて、喫みタバコ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。

【in vivo 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

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。

次に、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

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. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2019 Jun 20.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2020, Feb - Mar;850-851:503148.
17. 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.
18. 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.

19. 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.
 20. 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.
 21. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.
 22. 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. 学会発表
19. Totsuka Y, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS(東京、2019年11月)
 20. 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)
 21. 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)
 22. 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)
 23. 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)
 24. Totsuka Y, How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)
 25. 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— MMS 定例会(京都、2019年6月)
 26. 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)
 27. 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 Prevention*,

- AACR meeting, 2019/7/22-24
28. 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
29. 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)
30. 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)
31. 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)
32. 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)
33. 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)
34. 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)
35. 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)
分担研究総合研究報告書

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。第1年度は、動物実験開始に先立ち、加熱式たばこの安全性に関する情報を収集した。その結果、加熱式たばこの主流煙・副流煙には、有害物質が存在することが判明した。また、加熱式たばこは、ヒトに肺疾患を誘発し、その原因に重金属やビタミンE酢酸塩が関与する可能性が示された。以上の結果から、加熱式たばこは必ずしも安全であると言えず、本研究を含む各種の解析により精確なリスク評価を行い、その結果に基づき、科学的根拠をもった適切なリスク管理を行う必要があることが示された。第2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。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科学部食品安全健康学科
助教

A. 研究目的

加熱式タバコは、2014年以降に日本国内に導入され、従来の紙巻きタバコ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、加熱式タバコによるヒト健康影響についての懸念は払拭されていないが、これまで加熱式タバコ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、加熱式タバコこのリスクは、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「指定タバコ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タバコこのリスク評価・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タバコ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タバコ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

第1年度は、動物実験の開始に先立ち、文献

調査などにより、加熱式タバコの安全性に関する情報を収集した。

第2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、加熱式タバコおよび対照の紙巻きタバコ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・膀胱などタバコ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)

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

第I年度の結果として、加熱式タバコの主流煙中で、タバコ特異的ニトロソアミン、多環芳香族炭化水素、アンモニア、一酸化炭素など有害物質の含有量は、紙巻きタバコの場合に比べて少量である。しかし、それは、量的に少ないということであって、存在しないというわけでない。さらに、それらの中には、変異原性物質であって、毒性・発がん性に閾値を求めることができないものが含まれている。また、一酸化炭素や多環芳香族炭化水素であるアセナフテンについては、加熱式タバコの主流煙の含有量の方がむしろ多いという報告もある。主流煙のニコチンや粉塵の含有量は、多くの報告において加熱式

たばこと紙巻たばこで同等であるとされている。揮発性化合物については、多くが加熱式たばこの場合に少量であるが、アクロレイン、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒドなどについては紙巻たばこ同等であると報告されている。一方、加熱式たばこの副流煙については、ニコチン、ホルムアルデヒド、粉塵が含まれていることが明らかになっている。

米国を中心とする地域では、加熱式たばこの主流煙による製品使用関連肺傷害(EVALI)と呼ばれる疾患が報告されている。ECALIの患者は、呼吸困難および咳嗽を主症状とし、画像診断で両側の肺胞性陰影を観察し、低酸素血症を伴う。EVALIについては、精力的な研究が行われており、その原因として、テトラヒドロカンナビノールやビタミンE酢酸塩の関与が有力視されている。また、EVALIに関しては、喘息などの基礎疾患があると発生数や重症度が高まると報告されている。

加熱式たばこがヒトの疾患リスクに及ぼす影響については、疫学的研究が為されている。それらによれば、加熱式たばこの使用は、がんおよび非がん病変のリスクを高めるとされている。の報告がある。それには、前述の有害化学物質やEVALIが関与しているが、それ以外に、加熱式たばこが発生させるエアロゾル中の重金属の影響が大きいとされている。関係する重金属としては、主にクロム・ニッケル、従にカドミウム・鉛・マンガン・砒素などが挙げられている。

第2年度の結果として、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、肺胞マクロファージ・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したが、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、肺胞マクロファージ・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

第 1 年度について、冒頭に述べたように、加熱式たばこは、従来の紙巻きタバコ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という情報が流布されているが、文献調査を行ったところ、そのような情報が正しくないことが明らかとなった。加熱式たばこの主流煙に含まれる有害物質は、紙巻たばこの場合より少量であることが多い。しかし、中には同等かむしろ多量である場合もあり、いずれにしても、それらの化学物質の性質上、毒性・発がん性を無視または過度に軽視すべきでない。さらに、副流煙は存在し、その中にも量的な多寡はともかく有害物質が含まれているのは事実である。これらの報告には加熱式たばこの種類や測定条件など様々な影響要因があり、相互に異なる知見も発表されているので、加熱式たばこの安全性を評価するに当たってはそうした状況に鑑みて慎重に検討することが必要である。その意味で、本研究の重要性は、高まったものと考えられる。

また、EVALI の存在は、加熱式たばこの使用が実際にヒトの肺疾患を誘発することを示すものである。EVALI については、今後、その詳細な実態を解析し、また、日本の状況を調査し、加熱式たばこのリスク評価に反映する必要がある。また、喘息など EVALI の高リスク群が存在することは、加熱式たばこのリスク評価、さらにリスク管理において考慮する必要がある。

第 1 年度の文献調査の結果、加熱式たばこの毒性、また、それによるヒト疾患リスクへの悪影響が評価および管理すべき事象であることが明らかとなったが、その詳細については様々な角度からのさらなる解析が必要である。中でも当該毒性の原因または増悪因子となる物質に関する調査と解析はきわめて重要であり、その意味でエアロゾル中の重金属がヒトの疾患リスクの増大因子であると判明したことは注目に値する。

第 2 年度の結果より、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

第 1 年度の文献調査の結果、加熱式たばこの安全性は、ヒトの健康の維持・増進を図る厚生労働行政において、重要な要素であることが判明した。したがって、当該安全性については、中立公正で科学的なリスク評価に基づき、適切にリスク管理し、それらに関するリスクコミュニケーションを担保する必要がある。

第 2 年度の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。

以上の成果は、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

- (1) 中江 大. 化学物質リスク評価の最前線.
第9回レギュラトリーサイエンス学会学術大会(2019年9月7日, 東京都千代田区).

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

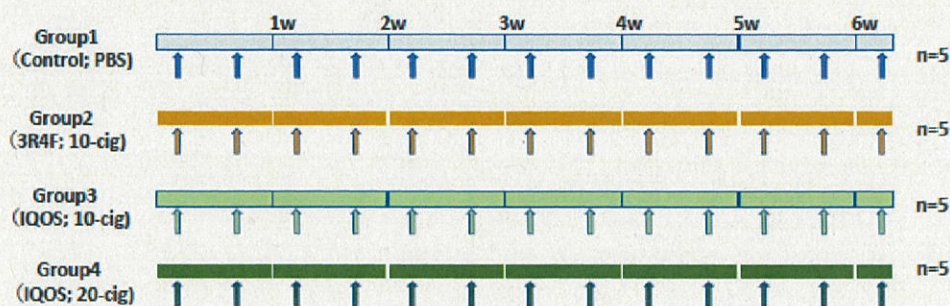
| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|-----------------------------------|------|---------|------|
| Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tian M, Moir L, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nambu A, Puthucheary O, Suwanpimolkul G, Jantarabekkul W, Paitoonpong 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, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. | Comprehensive analysis of DNA adductome (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 Urinary Bladder Cancer 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 |
| Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yuzo T, Fukushima S, Wagnibuchi H. | Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. | Mutagenesis. | 34 | S279-287. | 2019 |
| Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Katoto 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. | 32 | 1515-1527. | 2019 |

| | | | | | |
|---|--|----------------------|-----------------|----------------|-------------|
| <p>Dertinger SD, Totsuka Y, Bielantent Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). s JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL</p> | <p>High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT).</p> | <p>Mutation Res.</p> | <p>Nov;847</p> | <p>403022.</p> | <p>2019</p> |
| <p>Totsuka Y, Wakabayashi K.</p> | <p>Biological significance of aminophenyl-β-carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β-carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review.</p> | <p>Mutation Res.</p> | <p>850-851:</p> | <p>503148.</p> | <p>2020</p> |

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 ul/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 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

情

図3 グループ毎の変異シグネチャー分布

き

図4 肺におけるgpt遺伝子を指標とした変異原性試験の結果

の

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 |

表2 バクテリアの生存率(Survival%)の結果

| Survival% | | 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 |

表3 NGSによるグローバル変異解析の結果

| | | 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 | 1.0656E-06 | 1.4807E-06 | 1.1184E-06 | 6.6979E-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

表4 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 | DOS (10 cig) | | |
|------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------|-----------------------|-----------------------------|---------|
| | Number of mutants (%) | Specific mutation frequency | Number of mutants (%) | Specific mutation frequency | | 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 | 0 (0) | 0 | 1 (4.5) | 4.91642E-07 | 0.265 | 1 (5.8) | 7.30994E-07 | 0.174 |
| 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 |