

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3年度 分担研究報告書

加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と受動喫煙による健康影響の研究

加熱式たばこの *in vivo* 遺伝毒性評価

研究代表者 戸塚 ゆ加里 日本大学薬学部・環境衛生学・教授

研究要旨： *gpt delta* マウスを用いて、IQOS の吸入暴露による肺を対象とした *in vivo* 遺伝毒性について検討した。研究代表者(稲葉)らが開発した加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する装置を使用して、6 週齢の雄性 *gpt delta* マウスに 1 日あたり 1 時間(IQOS 5 本分) x 2 回 x 5 日間の条件で吸入曝露を行なったのち、屠殺解剖を行なった。*gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、コントロール(非暴露群)及び IQOS 暴露群に観察された変異頻度に差が認められなかったことから、今回の暴露濃度が低すぎ、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た。今後、吸入曝露実験における曝露量(IQOS の本数や曝露の回数)を検討していく必要があると考えている。

研究協力者：

小宮雅美 国立がん研究センター研究所 がんモデル開発部門 特任研究員

A. 研究目的

健康増進法(改正)において、国は受動喫煙の防止に関する施策の策定に必要な調査研究を推進するように努めることとされている。加熱式たばこについては、紙巻たばこと比較して販売からの歴史が浅いことから、現時点の科学的知見では、加熱式たばこの受動喫煙による将来的な健康影響をまだ分かってないことも多く、更なる科学的根拠の蓄積が必要とされている。

研究代表者が所属する国立保健医療科学院は、紙巻たばこで蓄積した成分分析の技術的知識(ノウハウ)をもとに新たな技術を開発してきており、2014 年には WHO-CC 指定協力研究センターに認定され、さらに、WHO-TobLabNet(たばこ研究室ネットワーク)に参画し、常に新しい技術開発に関する情報交換・国際標準化された分析法の開発を行ってきた(WHO TobLabNet SOP 8 and

9)。また、動物曝露用の加熱式たばこ喫煙装置の開発(図 2)、特許出願(特願 2020-1753517)を行い、その曝露量を分析し、現在は論文投稿中である。

一方、申請者は令和 1 年～2 年度の厚生労働省生活習慣病・難治性疾患等総合研究事業において、マウス気管内投与モデルを用い、加熱式たばこの一般・遺伝毒性評価の検討を行ってきた。(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(19FA1501))本研究では、これまでの研究成果を基盤として、加熱式たばこ等の新たなたばこ製品について、動物実験により曝露マーカー、毒性試験について調べ、加熱式たばこおよび新たなたばこ製品についての毒性評価およびその手法を検討する。

B. 研究方法

先行研究において研究代表者(稲葉)らが開発した加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを高い効率で動物に曝露する装置を使用して、加熱式たばこの遺伝毒性実験を

行う。

6週齢の雄性 *gpt delta* マウスに1日あたり1時間 (IQOS 5本分) x 2回 x 5日間の条件で吸入曝露を行なったのち、屠殺解剖を行なった。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本研究の分担研究者 (東京農大・中江/美谷島教授) 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。非曝露群 5匹 吸入曝露群 3匹の肺より gDNA を抽出し、常法に則って、*gpt mutation assay* を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立保健医療科学院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

標的遺伝子である *gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果を表1に示す。コントロール (非曝露群) 及びIQOS曝露群に観察された変異頻度はそれぞれ、 7.28 ± 4.68 , 6.99 ± 1.15 と両群間で差が認められなかった。

D. 考察

曝露群と非曝露群において変異頻度の差が認められなかったのは、曝露量が少なかったことが原因だと考える。

これまでに、厚労省科研費 (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

(19FA1501)) の一環で、紙巻およびIQOS 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 を用いて、*gpt* 遺伝子における変異頻度の解析を行った。その結果、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 ($P < 0.05$)。このことから、来

年度以降の吸入曝露実験における曝露量 (IQOSの本数や曝露の回数) を検討していく必要があると考えている。

E. 結論

gpt delta マウスを用いて、IQOSの吸入曝露による肺を対象とした *in vivo* 遺伝毒性について検討した。*gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、コントロール (非曝露群) 及びIQOS曝露群に観察された変異頻度に差が認められなかったことから、今回の曝露濃度が低すぎ、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た。今後、吸入曝露実験における曝露量 (IQOSの本数や曝露の回数) を検討していく必要があると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. (2022) Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing *Escherichia coli*, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer. *In Vivo*. Mar-Apr;36(2): 628-634.
2. Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y., (2021) Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids, *Front Genet*. Nov 18;12: 768781.
3. Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. (2021) Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. *In Vivo*. 35(4):2107-2114.

4. Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2021) o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 34(3):912-919.
5. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. Cancer Sci., 112, 7-15.

3. その他
なし

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第81回分析化学討論会 (2021年5月 Web開催)
2. 戸塚ゆ加里 DNA付加体の網羅的解析手法 (DNAアダクトーム) の現状と将来展望 第144回日本薬理学会関東支部会 (2021年6月 Web開催)
3. 戸塚ゆ加里 Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development 第80回癌学会 (2021年10月、横浜)
4. 戸塚ゆ加里 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価 第50回 環境変異原学会 (2021年11月、横須賀)
5. 戸塚ゆ加里 ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する 第95回 日本薬理学会 (2022年3月、福岡)
6. 戸塚ゆ加里 ナノマテリアルに特化した新規in vitro生体模倣評価系の開発 日本薬理学会 第142年会 (2022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

資料 研究成果に関する図表

表1 iQOSの吸入暴露により誘発される変異スペクトル解析結果

| Treatment | Mouse ID | Number of colonies | | MF ($\times 10^{-6}$) | Average MF ($\times 10^{-6}$) |
|-----------|----------|--------------------|-----------|----------------------------|------------------------------------|
| | | Mutant | Total | | |
| Control | 1 | 3 | 697,500 | 4.30 | - |
| | 2 | 4 | 567,000 | 7.05 | - |
| | 3 | 2 | 784,000 | 2.55 | - |
| | 4 | 7 | 909,000 | 7.70 | - |
| | 5 | 8 | 541,500 | 14.80 | - |
| | Total | 24 | 3,498,000 | - | 7.28 \pm 4.68 |
| iQOS | 1 | 6 | 811,500 | 7.39 | - |
| | 2 | 5 | 879,000 | 5.69 | - |
| | 3 | 6 | 762,000 | 7.87 | - |
| | Total | 17 | 2,452,500 | - | 6.99 \pm 1.15 |