

令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金  
(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* マウスおよび C57BL/6J マウスを用いて、IQOS 主流煙捕集液の反復気管内投与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)らが開発した方法で加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを PBS に捕集した液を、*gpt delta* マウスおよび C57BL/6J マウスに、1 匹あたり 100 $\mu$ Lx 40 回の気管内投与を行なったのち、屠殺解剖を行なった。抽出した *gpt delta* マウス肺より抽出した gDNA の *gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、Control 群と比べて紙巻きたばこ(3R4F)群、IQOS 群 の変異頻度はそれぞれ 1.3 倍、2.0 倍と上昇傾向にあった。変異スペクトルの解析を行なったところ、control と比較して 3R4F および IQOS 曝露群に共通して A:T $\rightarrow$ C:G、G:C $\rightarrow$ T:A 変異が増加した。さらに、IQOS 曝露群では G:C $\rightarrow$ C:G 変異の増加も観察された。

C57BL/6J マウス肺より抽出した gDNA を用いて、気管内投与による DNA 付加体の網羅的解析を行なったところ、control 群と 3R4F 群、IQOS 群の 3 つにクラスタリングができた。IQOS のクラスタリングに寄与する付加体を見出した。今後、この付加体の構造を検討するとともに、IQOS の遺伝毒性のメカニズムの解明を目指していく。

**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(改正案)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いないことも多く、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、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

研究代表者(稲葉)らが開発した方法で加熱式たばこから発生する主流煙エアロゾルを PBS に捕集した液を、*gpt delta* マウスおよび C57BL/6J マウスに 1 匹あたり 100 $\mu$ Lx 40 回の反復気管内投与を行なったのち、屠殺解剖を行なった。摘出した肺より gDNA を抽出し、常法に則って、*gpt* mutation assay および DNA 付加体の網羅的解析を行なった。

(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図1に示す。control 及び 3R4F 群、IQOS 群に観察された変異頻度はそれぞれ  $4.95 \times 10^{(-6)} \pm 2.80 \times 10^{(-6)}$ 、 $6.50 \times 10^{(-6)} \pm 3.48 \times 10^{(-6)}$ 、 $9.96 \times 10^{(-6)} \pm 3.01 \times 10^{(-6)}$  となり、曝露

により変異頻度が上昇した。変異スペクトルの解析を行なったところ、control と比較して 3R4F および IQOS 曝露群に共通して A:T $\rightarrow$ C:G、G:C $\rightarrow$ T:A 変異が増加した。さらに、IQOS 曝露群では G:C $\rightarrow$ C:G 変異の増加も観察された。(図2)

DNA 付加体網羅的解析 (アダクトーム解析)

C57BL/6J マウス肺より抽出した gDNA を用いて、気管内投与による DNA 付加体の網羅的解析を行なったところ、control 群と 3R4F 群、IQOS 群の 3 つにクラスタリングができた (図3)。IQOS のクラスタリングに寄与する付加体として、Adduct 337 [m/z 566.3029 $\rightarrow$ 450.1196] と Adduct 1434 [m/z 363.1571 $\rightarrow$ 246.9960] を見出した (図4、5)。

## D. 考察

IQOS 群および 3R4F 群ともに control 群と比較して *gpt* 遺伝子における変異頻度が上昇したが、IQOS 群の方が 3R4F 群よりも 1.5 倍ほど高くなった。これは、3R4F では主流煙中の変異を誘発する化学物質が脂溶性のものが多く、PBS に溶解せず捕集できなかつたためと考えられた。このことより、主流煙 PBS 捕集液による検討のみでは IQOS 主流煙の生体への影響を明らかにするには不十分であり、主流煙を実際に吸入曝露させる実験と併せて評価する必要があると考えられる。

## E. 結論

*gpt delta* マウスを用いて、IQOS 主流煙 PBS 捕集液の気管内投与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、Control 群と比べて紙巻きたばこ (3R4F) 群、IQOS 群 の変異頻度はそれぞれ 1.3 倍、2.0 倍と上昇傾向にあった。3R4F 群と比べて IQOS 群の変異頻度のほう

が高値であったのは、3R4F 主流煙中の変異原物質の多くが脂溶性であり、PBS で捕集できなかった為と考えられた。このことより、主流煙 PBS 捕集液による検討のみでは IQOS 主流煙の生体への影響を明らかにするには不十分であり、主流煙を実際に吸入曝露させる実験と併せて評価する必要があると考えられる。

DNA アダクトーム解析において見出したクラスタリングに寄与する DNA 付加体を同定し、変異スペクトルのデータと併せて評価することにより、IQOS 主流煙の変異毒性の詳細な検討を行っていく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2022) Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of o-toluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2022 Sep 19;35(9):1625-1630.
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15.

### 2. 学会発表

1. Yukari Totsuka Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development 12th AACR-JCA Joint Conference (2022年12月、マウイ-ハワイ、米国)
2. 戸塚ゆ加里, 小宮雅美, 永井桃子, 加藤護, 松田知成 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35回 発癌病理研究会 (2022年11月、

- 新潟)
3. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木 周五、魏民、鰐渕 英機、戸塚 ゆ加里 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析 第51回 環境変異原学会 (2022年11月、広島)
  4. 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川悠子、梶村春彦、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺賢二、川西優喜 DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリバクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価 第51回 環境変異原学会 (2022年11月、広島)
  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1回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会 (2022年11月、東京)
  6. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、松田知成、加藤護 Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development 第81回癌学会 (2022年9月、横浜)
  7. 小宮雅美、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里 Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues 第81回癌学会 (2022年9月、横浜)
  8. 帯金明日香、小宮雅美、鈴木 周五、魏民、鰐渕 英機、戸塚 ゆ加里 Comprehensive analysis of DNA adducts formed from candidate chemicals for occupational bladder cancer 第81回癌学会 (2022年9月、横浜)
  9. Yukari Totsuka New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer 13th ICEM (2022年8月オタワ・カナダ)
  10. Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and heterodimerization of monocyclic aromatic amines 13th ICEM (2022年8月オタワ・カナダ)
  11. 小宮 雅美、鈴木 周五、魏民、鰐渕 英機、戸塚 ゆ加里 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析 第29回日本がん予防学術大会 (2022年 7月 京都)
  12. 小林 琢磨、豊田 武士、吉岡 泰淳、岸本 真治、松下 幸平、赤根 弘敏、小川 久美子、渡辺 賢二、高村 岳樹、戸塚 ゆ加里、若林 敬二、三好 規之 細胞毒性を有する o-Toluidine と o-Anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する 第29回日本がん予防学術大会 (2022年 7月 京都)
  13. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによる化学物質の遺伝毒性評価の現状と将来展望 第49回日本毒性学会 (2022年6月札幌)
  14. 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)
  15. 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)
  16. 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）	Web開催)
17. 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)	G. 知的財産権の取得状況 1. 特許取得
18. 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)	なし  2. 実用新案登録 なし
19. 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 日本薬学会 第142年会 (2022年3月、	3. その他 なし

資料 研究成果に関する図表

図1 *gpt* 遺伝子における変異頻度

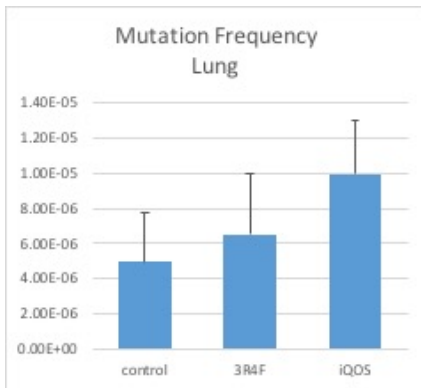


図2 *gpt* 遺伝子における変異のスペクトル解析

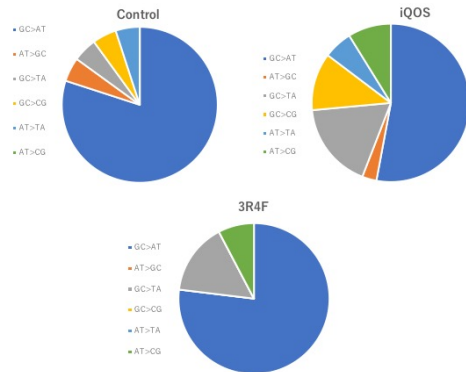


図3 DNA 付加体網羅的解析

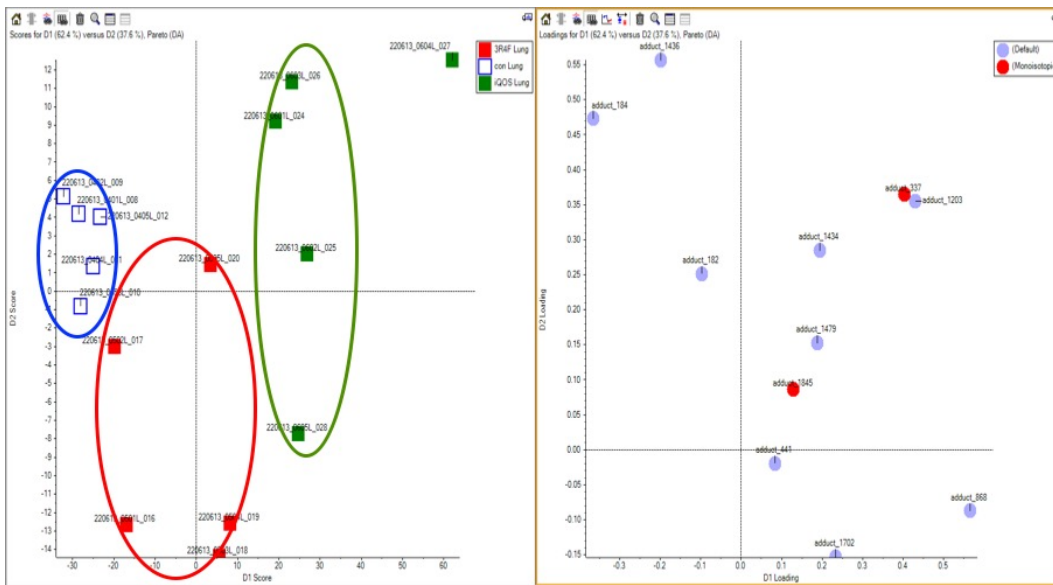


図4 主成分解析における IQOS 曝露群の特徴的なアダクト

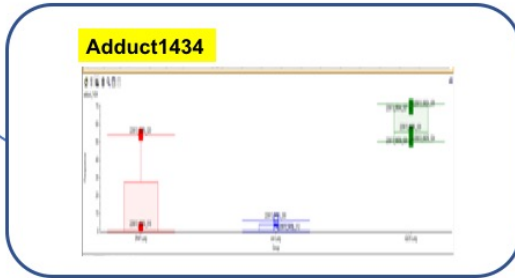
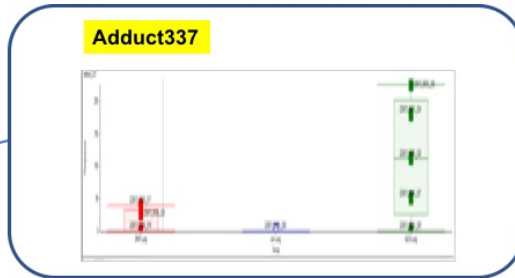
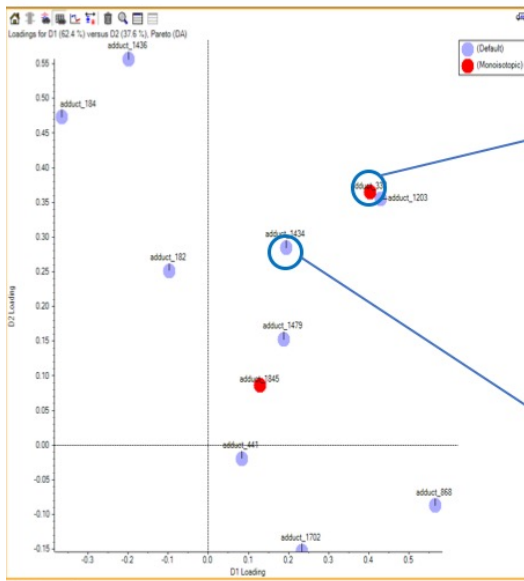
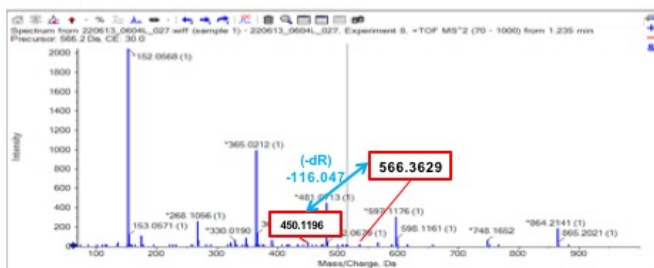


図5 付加体337および1434のフラグメンテーション解析

### Adduct337



### Adduct1434

