

令和6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

加熱式たばこなど新たなたばこ製品の成分分析と生体影響研究を組み合わせた能動喫煙・受動喫煙の健康影響評価

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 星薬科大学・薬学部・教授

**研究要旨：**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用い、雄性 C57BL/6J マウスに対して、中期曝露（4週間）の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性について ecNGS により評価するために NGS のためのライブラリ調製と NGS 解析の条件検討を行った。ecNGS には、エラー率が体細胞変異率より 2 桁低い(10 億部位当たり 5 部位未満のエラー)NanoSeq を採用し、ライブラリの収量は real-time PCR を用いて測定した。Air-control 群を用いて ecNGS を実施した結果、オリジナルのプロトコルではライブラリ収量が不十分で、NGS に必要な量を確保することができなかった。しかし、アダプターおよびライゲーション酵素の添加量を増やすことで収量は改善された。さらに、NGS によって取得したデータ量を増加させた結果、NGS による解析可能な塩基数は約  $1.7 \times 10^9$  から  $3.7 \times 10^9$  に増加し、これに伴い検出された変異数も約 40 から 90 に増加した。今後は、今回確立した方法を用いて、IQOS による変異原性を検討する予定である。

**研究協力者：**

長谷川晋也 星薬科大学・衛生化学教室  
石ヶ守 里加子 星薬科大学・衛生化学教室

**A. 研究目的**

加熱式たばこ製品は、改正健康増進法において「指定たばこ」という位置付けとなっており、紙巻たばこと比較して販売の歴史が浅いことから、現時点の科学的知見は、加熱式たばこの能動喫煙・受動喫煙による将来的な健康影響が未解明な点も多く、更なる科学的根拠の蓄積が必要とされている。

研究代表者の所属する国立保健医療科学院は、これまでに WHO-CC 指定協力研究センターとして、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 11 and 13; 電子たばこ、加

熱式たばこ製品分析法)。この国際標準化された分析法を使用して、日本国内で販売されている加熱式たばこ製品群の成分分析を行い、学術論文においても発表している (Chem. Res. Toxicol. 2018, 31, 7, 585-593、Chem. Res. Toxicol. 2020, 33, 2, 576-583)。本研究では、これまでの研究成果 (分析法、実験装置) 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、①加熱式たばこ製品の主流煙の成分分析および喫煙行動による健康影響評価を行う。また、②受動喫煙の健康影響評価 (副流煙・受動喫煙環境調査と動物曝露実験) を行う。最終的に本研究によって開発された健康影響の評価手法に従って、加熱式たばこなど新たなたばこ製品の評価を実施し、受動喫煙防止のための施策に活用する (総合評価)。また、加熱式たばこ製品、加熱式たばこ互換機、電子たばこは、今後も新製品が継続的に開発、販売されていくことが見込まれるため、最新の市場状況を反

映した本研究の科学的知見の蓄積を生かしてたばこ対策の政策立案を行っていく。

上記検討項目のうち、本分担研究では、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用い、雄性 C57BL/6J マウスに対して、中期曝露（4週間）の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性について error-corrected NGS (ecNGS) により評価するために、NGS のためのライブラリー調製と NGS 解析の条件検討を行った。

曝露実験は1回10本で1日に2回、週5日曝露を4週間継続する条件で実施し、累計で IQOS 400 本に相当する曝露量とした。大きな筒状のフォルダーを扇形の5区画に分割した装置を用い、C57BL/6J マウスを非拘束下で曝露した。また、コントロール動物は IQOS 曝露と同様にマウスを同じ筒状フォルダー内に入れ、曝露装置を用いて空気のみを曝露をおこなった (Air-control 群)。最終曝露から4日目にマウスを解剖し、両群の肺を採取し凍結した。

(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。

### 【Experiment 1】

Air Control 群のマウスから摘出した肺組織を分画後に凍結し保存した。凍結した組織から NanoSeq に供するライブラリー調製を行うために、DNeasy® Blood & Tissue Kit を用いて total DNA を抽出した。抽出の際の凍結組織の破碎方法について、ドライアイス凍結下による金槌を用いた物理的破碎と、鋏によるミンスについて検討した。得られた DNA のクオリティは、TapeStation により評価した。評価は、genome DNA (gDNA) のサイズ分布に基づき、その分解度を数値化した DNA Integrity Number (DIN) 値により評価した。DIN 値は、gDNA の分解進行度を、1.0～10.0 の範囲で示す指標であり、高値の方が DNA のクオリティが高い。

### 【Experiment 2】

抽出した gDNA を用いて、NanoSeq のためのライブラリー調製を行った。調製に関しては、Abascal

F. et al., Nature 593 (7859):405-410 (2021) に報告された手法を基に実施した。また、調製したライブラリーの濃度は、Illumina 社シーケンサー用の Kapa Library Quantification Kit を用いて測定した。NanoSeq による解析は、Illumina 社シーケンサーを用いて実施し、得られたデータの解析には NanoSeq 専用のソースコード (<https://github.com/cancerit/NanoSeq>) を使用した。

## C. 研究結果

### 【Experiment 1】

抽出した gDNA の結果を図1に示す。金槌による破碎より (図 1A)、ミンスによる組織破壊の方が DIN 値が高く (図 1B)、DNA クオリティへの影響が少ないことが明らかとなった。

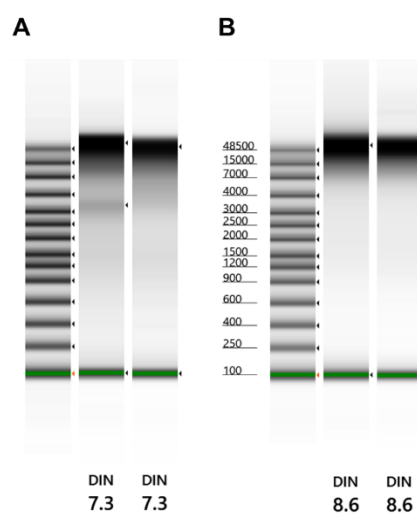


図1 TapeStation による DNA のクオリティチェック

### 【Experiment 2】

Abascal F. らによるプロトコルに基づきライブラリー調製を行った結果、オリジナルのプロトコルではライブラリー濃度が検出限界付近 (約 1 pM) にとどまり、シーケンス解析に必要な量のライブラリーを得ることができなかった。そこで、調製過程におけるアダプターの使用量を検討した結果、ライブラリー濃度が約 300 pM まで増加し、シーケンス解析に必要な十分量のライブラリーを確保することが可能となった。

次に、Air Control マウスの肺組織から得られたゲノム DNA について変異シグネチャー解析を実施した。その結果、約  $1.7 \times 10^9$  塩基あたり 40 個の変異数が検出されたが、図2A に示すように、特徴的な変異シグネチャーのパターンを得るには変異数が十分ではなかった。そこで、解析するデータ量を増加させたところ、 $3.7 \times 10^9$  塩基あたり 90 程度の変異が検出された (図2B)。

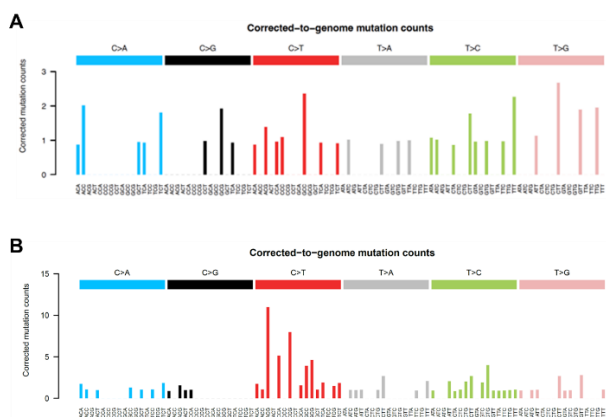


図2 Air Control マウスの変異シグネチャー解析

今後は、今回確立した方法を用いて、IQOS による変異原性を検討する予定である。

#### D. 考察

マウス肺組織からの gDNA の抽出方法を検討した結果、ミンスによる組織破碎の方が DNA のクオリティが高いことが明らかとなった。衝撃によって細胞を圧縮破碎する方法では、核内 DNA にも物理的な損傷が加わり、DNA のクオリティに悪影響を及ぼす可能性が示唆された。さらに、マウス組織を用いたライブラリー調製は、オルガノイドや培養細胞を用いたライブラリー調製に比べて効率が低く、調製条件の最適化が必要であることが明らかとなった。

シーケンス解析による変異数の解析においても、マウス肺組織における検出変異数は、肝臓組織、オルガノイド、ならびに細胞株に比べて少なく、このため解析にはより多くのデータ量が必要となる可能性が示唆された。シーケンス解析による変異数の解析においても、マウス肺組織における検出変異数は、肝臓組織、オルガノイド、ならびに細胞株に比べて少なく、このため解析にはより多くのデータ量が必要となる可能性が示唆された。今後、IQOS 曝露による変異シグネチャーおよび体細胞変異数への影響について検討を進める予定である。

#### E. 結論

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用い、雄性 C57BL/6J マウスに対して、中期曝露（4週間）の条件で主流煙エアロゾルを曝露し、肺の遺伝毒性について ecNGS により評価するために NGS のためのライブラリー調製と NGS 解析の条件検討を行った。

Experiment 1 では、肺組織からの gDNA の抽出に際し、組織の破碎方法を検討した結果、より物理的衝撃の少ない鉋によるミンスが DNA のクオリティを高く保つ抽出法であることが明らかになった。

ecNGS には、エラー率が体細胞変異率より 2 桁低い(10 億部位当たり 5 部位未満のエラー)NanoSeq を採用し、ライブラリーの収量は real-time PCR を用いて測定した。Air-control 群のサンプルを用いて ecNGS を実施した結果、オリジナルのプロトコルではライブラリー収量が不十分で、NGS に必要な量を確保することができなかった。しかし、アダプターおよびライゲーション酵素の添加量を増やすことでライブラリー収量は改善された。さらに、NGS によって取得したデータ量を増加させた結果、NGS による解析可能な塩基数は約  $1.7 \times 10^9$  塩基から  $3.7 \times 10^9$  に増加し、これに伴い検出された変異数も約 40 から 90 に増加した。今後は、今回確立した手法を用いて、IQOS による変異原性の評価を進める予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hasegawa S, Shoji Y, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, Mimaki S, Tsuchihara T, **Totsuka Y**. Whole genome sequencing analysis of model organisms elucidates the association between environmental factors and human cancer development. *Int J Mol Sci.* 25, 2024.
- Watanabe K, Komiya M, Obikane A, Miyazaki T, Ishino K, Ikegami K, Hashizume H, Ishitsuka Y, Fukui T, Gi M, Suzuki S, Wanibuchi H, **Totsuka Y**. Development of a genotoxicity/carcinogenicity assessment method by DNA adductome analysis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* Oct;899:503821. 2024.
- Imai T, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, **Totsuka Y**. Bridging toxicological properties of environmental chemicals between animals and humans using healthy organoid systems. *J Toxicol Sci.* 49(10):425-434, 2024.

##### 2. 学会発表

- 戸塚 ゆ加里**、マウス正常組織由来オルガノイドを用いた化学物質の遺伝毒性評価、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
- 宮崎 飛翔、藤岡 正喜、鰐淵 英機、美谷島 克宏、石ヶ守 里加子、加藤 孝一、**戸塚 ゆ加里**、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規毒性試験法の開発、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
- 渡部 浩平、下村 航平、安藤 彩花、佐藤 玲香、鈴木 千咲、武内 まどか、三好 規之、小林琢磨、**戸塚 ゆ加里**、加藤孝一、中嶋順一、二環芳香族アミンにおける遺伝毒性評価、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
- 本橋実奈、高村岳樹、佐々彰、加藤孝一、中嶋順一、**戸塚 ゆ加里**、アルコール発がんにおけるドライバーアダクトの探索と変異誘発メカニズムの解明、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
- 白鳥 修平、小宮 雅美、魏 民、鈴木 周五、

- 鰐淵 英機, Jiri ZAVADIL, 渡部 浩平, 戸塚ゆ加里, 職業性胆管がん原因物質であるハロゲン系炭化水素のドライバードラッグ探索、福岡、第145年会日本薬学会、2025年3月27-29日
6. 戸塚ゆ加里, 石ヶ守里加子、牛山明、稲葉洋平、美谷島克宏、煙山紀子. 加熱タバコ製品の吸入暴露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、第53回日本環境変異原ゲノム学会(2024年12月、岡山)
  7. 戸塚ゆ加里, 永井桃子、加藤護. 次世代シーケンサーにより環境要因とヒト発がんの関係を解明する、第53回日本環境変異原ゲノム学会(2024年12月、岡山)
  8. 石ヶ守里加子、柳澤萌、大野彰子、戸塚ゆ加里. マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドナノマテリアルの毒性評価、第53回日本環境変異原ゲノム学会(2024年12月、岡山)
  9. 長谷川晋也、Asmaa Elzawahry、永井桃子、加藤護、魏民、鈴木周五、鰐淵英機、松田知成、戸塚ゆ加里. N-ニトロソ胆汁酸抱合体の変異シグネチャーの解析、第53回日本環境変異原ゲノム学会(2024年12月、岡山)
  10. 渡部浩平、三好規之、戸塚ゆ加里. 二環芳香族アミンにおける変異スペクトル解析、第53回日本環境変異原ゲノム学会(2024年12月、岡山)
  11. 戸塚ゆ加里. オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第85回MMS秋の定例会(2024年12月、岡山)
  12. 戸塚ゆ加里. DNA付加体解析を基軸とした発がん要因およびメカニズムの解明、第47回日本分子生物学会年会(2024年11月、福岡)
  13. 戸塚ゆ加里. 環境要因によるDNA付加体とゲノム変異パターンを指標とした発がん要因の探

索、環境エピゲノミクス研究会 (EEG) 2024 秋季ネットシンポジウム (2024 年 11 月、Web 開催)

14. 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析を用いた発がん要因およびメカニズムの解明、アンチエイジング研究シンポジウム(2024年10月、文京区)
15. 戸塚ゆ加里、小宮雅美、煙山紀子、加藤護. Genotoxicity induced in mice lungs by inhalation exposure to heated tobacco products, 第83回日本癌学会学術総会(2024年9月、福岡)
16. Yukari Totsuka. Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, (2024年6月、京都)
17. Yukari Totsuka. New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 第42回札幌国際がんシンポジウム(2024年6月、札幌)
18. 戸塚ゆ加里. DNA付加体研究の過去・現在・未来、令和6年日本環境変異原ゲノム学会公開シンポジウム(2024年6月、港区)
- 19.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし

