

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℃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 組換え酵素発現してい

る大腸菌YG6020株に感染させると、λEG10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

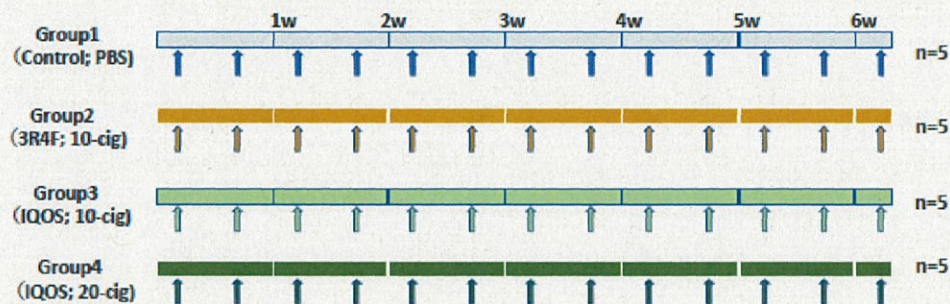
1. 論文発表

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

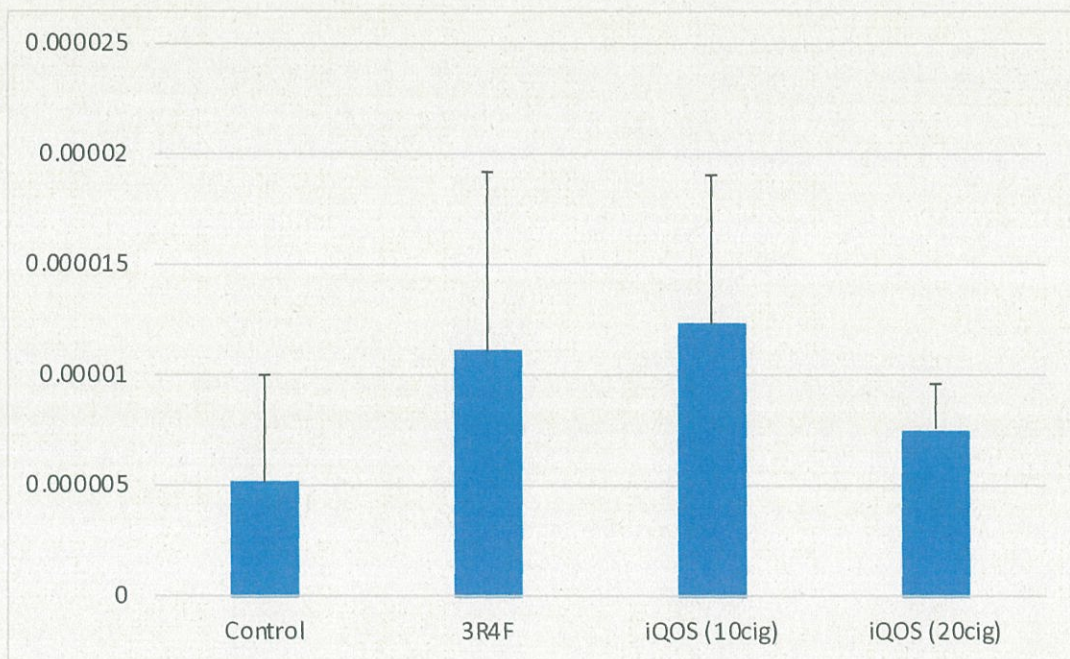


表1 紙巻および加熱式タバコ煙捕集溶液により誘発される変異スペクトル解析結果

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	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