

令和5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：**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 *gpt delta* 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インビトロパッケージング法により評価した。1度目の曝露実験は *iQOS* を1回5本で1日に1回、週5日曝露を4週間継続した（累計 *iQOS* 100本相当）。この時に使用した曝露方法は *gpt delta* マウスを夏目製作所から購入した筒状フォルダー内に固定（拘束）し、4分岐で曝露を実施し、最終曝露から4日目にマウスを解剖し、肺における変異原性の解析を *gpt assay* により検出した。コントロール動物は *iQOS* 曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定し、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（*Air-control* 群）。その結果、*Air-control* 群、*iQOS* 群に検出された変異頻度は殆ど変わらないことがわかった。2度目の曝露実験では、*iQOS* の本数を前回より増やし、1回10本で1日に2回、週5日曝露を4週間継続した（累計 *iQOS* 400本相当）。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを扇形の5区画に分けて曝露した。コントロール動物は *iQOS* 曝露と同様にマウスを5区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（*Air-control* 群）。その結果、有意差はつかないものの、*iQOS* 曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

**研究協力者：**

小宮雅美 日本大学薬学部・環境衛生学

**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、分担研究者は令和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））

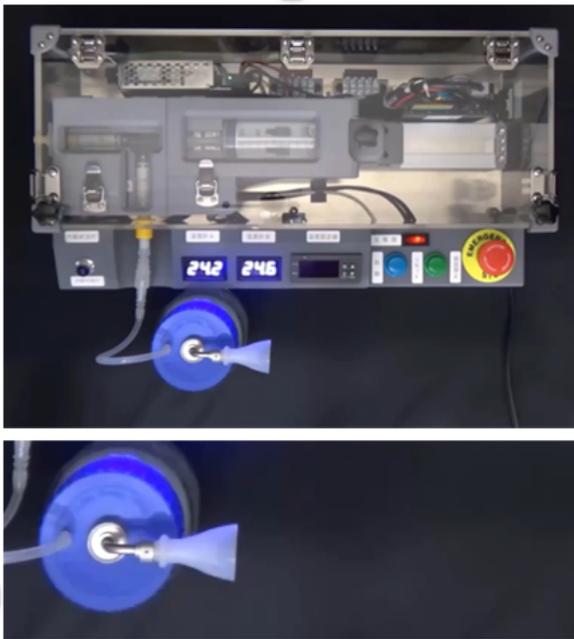
本研究では、これまでの研究成果を基盤として、加熱式たばこ等の新たなたばこ製品について、動物実験により曝露マーカー、毒性試験について調べ、加熱式たばこおよび新たなたばこ製品についての毒性評価およびその手法を検討する。

**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（図1）を用い、雄性 *gpt delta* 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インビトロパ

パッケージング法により評価した。

図1 曝露装置



#### 【Experiment 1】

1度目の曝露実験はiQOSを1回5本で1日に1回、週5日曝露を4週間継続した（累計iQOS 100本相当）。この時に使用した曝露方法は *gpt* delta マウスを夏目製作所から購入した筒状フォルダー内に固定（拘束）し、4分岐で曝露を実施した（図2）。

図2 使用した保定機



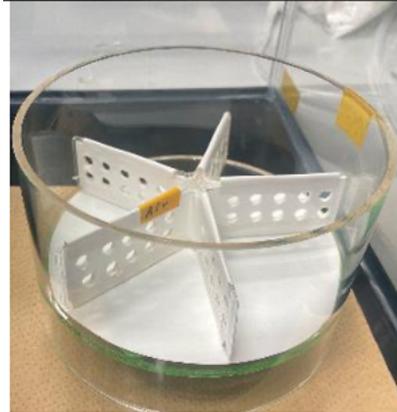
最終曝露から4日目にマウスを解剖し、摘出した肺よりgDNAを抽出し、常法に則って、*gpt* mutation assayを実施した。コントロール動物はiQOS曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定し、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（Air-control群）。

#### 【Experiment 2】

2度目の曝露実験では、iQOSの本数を前回より増やし、1回10本で1日に2回、週5日曝露を4週間継続した（累計iQOS 400本相当）。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを

扇形の5区画に分けて曝露した（図3）。コントロール動物はiQOS曝露と同様にマウスを5区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（Air-control群）。

図3 大きな筒状のフォルダーを用いた無拘束曝露装置



（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

#### 【Experiment 1】

iQOS及び空気を曝露した後に摘出した肺から抽出したgDNAを用い、*gpt* 遺伝子における変異頻度を解析した結果、変異頻度はAir-control群では平均  $5.25 \times 10^{-6}$ 、iQOS群では平均  $3.73 \times 10^{-6}$  と両グループ間で殆ど変わらないことがわかった。

#### 【Experiment 2】

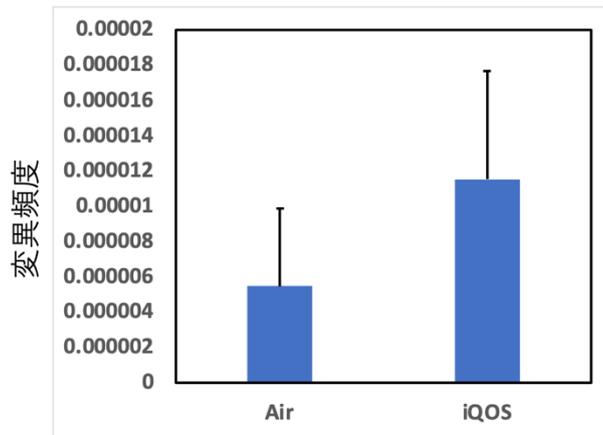
Experiment 1と同様に肺における変異頻度を *gpt* 遺伝子を指標に解析した。その結果を表1及び図4に示す。

表1 *gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験結果

Treatment	Mouse ID	Number of colonies		MF (x10 <sup>-5</sup> )	Average MF (x10 <sup>-5</sup> )
		Mutant	Total		
Air control	2	3	285,000	1.05	-
	3	2	447,000	0.45	-
	4	1	147,000	0.68	-
	5	0	727,500	0.00	-
	Total	6	1,606,500	-	0.54 ± 0.44
iQOS	1	4	228,000	1.75	-
	2	3	220,500	1.36	-
	3	3	189,000	1.58	-
	4	4	516,000	0.78	-
	5	1	358,500	0.28	-
	Total	15	2,452,500	-	1.15 ± 0.61

\*Air control-1は titer が取れず途中で解析を断念

図4 *gpt* 遺伝子を指標とした変異原性試験結果



その結果、iQOS 曝露群の平均変異頻度は Air control 群の約 2 倍となり、有意差はつかないものの、iQOS 曝露群で変異頻度の増加傾向が観察された。

*gpt* 遺伝子に変異を持つクローンのダイレクトPCRによる変異スペクトル解析を実施した結果を表2及び図5に示す。

表2-1 変異スペクトル解析(数)

#	Aircontrol	iQOS(400)	control*
GC>AT	1	4	7
AT>GC	0	1	2
GC>TA	2	2	8
GC>CG	0	0	0
AT>TA	0	1	0
AT>CG	1	1	2
Insertion	0	2	1
Deletion	0	1	4
others	0	1	0
Total	4	13	24

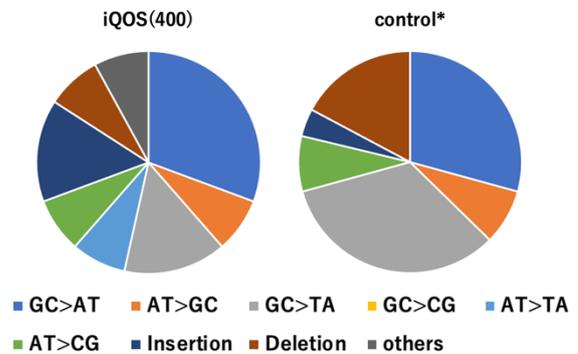
表2-2 変異

## スペクトル解析(%)

%	Aircontrol	iQOS(400)	control*
GC>AT	25	31	29
AT>GC	0	8	8
GC>TA	50	15	33
GC>CG	0	0	0
AT>TA	0	8	0
AT>CG	25	8	8
Insertion	0	15	4
Deletion	0	8	17
others	0	8	0
Total	100	100	100

\*control は historical data (Totsuka Y. et al., Particle and Fibre Toxicology, 2009, 6:23)

図5 変異スペクトル解析の比較



本研究での Air control の解析数が少ないので、historical data (Totsuka Y. et al., Particle and Fibre Toxicology, 2009, 6:23)と比較して図5に示した。iQOS 曝露群で得られたクローン数も少なく、はっきりとしたことは言えないが、コントロールと比較し、挿入変異が増えている傾向が観察された。

現在、同組織由来 DNA を用いて、全ゲノム解析による体細胞変異の網羅的解析を実施している。この結果と合わせて、iQOS 特異的な変異スペクトルの同定を実施する予定である。

## D. 考察

iQOS の吸入曝露による肺の遺伝毒性について検討した。Experiment 1 では iQOS 及び Air control 群で変異頻度に差は見られなかったが、Experiment 2 では有意差はつかないものの iQOS 曝露群で Air control 群の約 2 倍の変異頻度が観察されることがわかった。また、その変異スペクトル解析結果も control 群(historical data)とは異なるパターンを示しており、iQOS 曝露により遺伝毒性に何らかの影響を及ぼしていることが推測された。Experiment 1 と 2 では、使用している iQOS の総量が異なり、Experiment 2 の方が 4 倍多くなって

いることから、Experiment 1 では観察されなかった変異頻度の上昇が観察できたのではないかと考える。

変異スペクトルの解析から、iQOS 曝露群ではコントロールと比較し、挿入変異が増えている傾向が観察された。紙巻タバコでは PAH などの影響により G:C → T:A が顕著に増加することが知られているが、本研究結果においては、G:C → T:A 変異はコントロールとほぼ同程度であったことから、iQOS 特有の変異原物質が存在することが示唆される。現在、同組織由来 DNA を用いて、全ゲノム解析による体細胞変異の網羅的解析を実施している。この結果と合わせて、iQOS に特異的な変異原誘発メカニズムの解明やリスク評価のバイオマーカーなどの同定について検討する予定である。

## E. 結論

研究代表者（稲葉）らが開発した加熱式タバコ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 *gpt delta* 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インビトロパッケージング法により評価した。Experiment 1 では iQOS を 1 回 5 本で 1 日に 1 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 iQOS 100 本相当）。この時の曝露方法は *gpt delta* マウスを筒状フォルダー内に固定（拘束）し、4 分岐で曝露を実施した。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを筒状フォルダー内に固定し、曝露装置を用いて空気のみでの曝露をおこなった（Air-control 群）。その結果、Air-control 群、iQOS 群に検出された変異頻度は殆ど変わらなかった。Experiment 2 では、iQOS の本数を前回より増やし、1 回 10 本で 1 日に 2 回、週 5 日曝露を 4 週間継続した（累計 iQOS 400 本相当）。使用した曝露方法はマウスを拘束せず、大きな筒状のフォルダーを扇形の 5 区画に分けて曝露した。コントロール動物は iQOS 曝露と同様にマウスを 5 区画に分けた大きな筒状のフォルダーに入れ、曝露装置を用いて空気のみでの曝露とした（Air-control 群）。その結果、有意差はつかないものの、iQOS 曝露群で変異頻度がコントロールの約 2 倍に増加する傾向が観察された。さらに、変異スペクトルの解析から、iQOS 曝露群ではコントロールと比較し、挿入変異が増えている傾向が観察された。紙巻タバコでは PAH などの影響により G:C → T:A が顕著に増加することが知られているが、本研究結果においては、G:C → T:A 変異はコントロールとほぼ同程度であったことから、iQOS 特有の変異原物質が存在することが示唆される。現在、同組織由来 DNA を用いて、全ゲノム解析による体細胞変異の網羅的解析を実施している。この結果と合わせて、iQOS に特異的な変

異原誘発メカニズムの解明やリスク評価のバイオマーカーなどの同定について検討する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzuki S, Gi M, Komiya M, Obikane A, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kakehashi A, **Totsuka Y**, Wanibuchi H. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. *Biomolecules*. 14:36, 2024.

### 2. 学会発表

1. **戸塚ゆ加里** 生体を模倣した *in vitro* 遺伝毒性評価法 日本薬学会144年会（2024年3月、横浜）
2. **戸塚ゆ加里**. ナノマテリアルの遺伝毒性評価とそのメカニズムの解析、日本酸化ストレス学会（2023年12月、川崎）
3. **Totsuka Y**. Elucidation of driver adducts of cancer development using comprehensive analysis of DNA adducts, The 51st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (2023年11月、東京)
4. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆ加里**. 加熱式タバコの遺伝毒性評価、第52回環境変異原学会（2023年11月、福岡）
5. 石ヶ守里加子、澤田琉那、前嶋愛美、小宮雅美、大野彰子、**戸塚ゆ加里**. アドバンストナノマテリアルの *in vitro* 遺伝毒性評価、第52回環境変異原学会（2023年11月、福岡）
6. Kohei Watanabe, Yasuyo Shimoda, Masami Sakano, **Yukari Totsuka**, Koichi Kato, メチルアミン・ジクロロミン由来の大腸炎関連発がんメカニズムの解明、第52回環境変異原学会（2023年11月、福岡）
7. 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アダクト探索、第52回環境変異原学会（2023年11月、福岡）
8. 本橋実奈、別役雄毅、高村岳樹、小宮雅美、佐々彰、**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、第52回環境変異原学会（2023年11月、福岡）
9. **Yukari Totsuka**, Masami Komiya, Tomonari Matsuda, Mamoru Kato. Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, 第 82 回日本癌学会学術総会（2023 年 9 月、横浜）
10. **Totsuka Y**. Prospects for DNA adductomics analysis, 54th EMGS (2023年9月、シカゴ・米国)
11. 小宮雅美、広田航太郎、山口大雅、石ヶ守里加子、稲葉洋平、**戸塚ゆ加里**. 加熱式タバコの遺伝

毒性評価、がん予防学術大会2023（2023年9月、  
金沢）

12.

## 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