

令和7年度 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)  
分担研究報告書

曝露・炎症マーカー等を組み合わせた加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響を  
評価するための研究

DNA 損傷分析

分担研究者 戸塚 ゆ加里 星薬科大学・衛生化学・教授

**研究要旨:**加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料(口腔内細胞)を用い、簡便に DNA 損傷(遺伝毒性)を評価する手法について検討を行った。ヒト胎児腎細胞およびマウス肝正常細胞に、メタンスルホン酸エチル(EMS)およびベンゾ[a]ピレン(B[a]P, Rat S9 mix 併用)を24時間曝露し、 $\gamma$ -H2AX および Phospho-ATR/Chk1 の発現を解析した。その結果、 $\gamma$ -H2AX 蛍光免疫染色では、EMS 曝露群では核内に明瞭なドット状の foci が認められ、DNA 二重鎖切断の発生が視覚的に確認された。核あたりの平均 foci 数は、ヒト胎児腎細胞で対照群の3に対し21、マウス肝正常細胞でも対照群の3に対し12に増加し、いずれもEMS曝露により統計学的に有意な増加を示した。さらに、本手法は画像解析ソフトを用いた自動解析により、foci の形成を客観的に定量でき、信頼性が高く迅速な評価が可能となる。また、ウェスタンブロッティングによる解析では、EMS および代謝活性化系(S9 mix)を併用したB[a]Pの両物質において、Phospho-ATR (Ser428)およびPhospho-Chk1 (Ser345)の発現が認められた。特にEMS曝露下では、Phospho-Chk1 のバンド強度が濃度依存的に増強しており、直接・間接変異原の双方に対して有効な基盤技術となり得る。以上のことより、本評価系はDNA損傷を「損傷部位の可視化とfociの定量」および「細胞内シグナル伝達の活性化解析」の両面から評価できることが示唆された。今後は口腔内細胞等の生体試料へと適用を拡大し、喫煙環境によるDNA損傷性を定量的に評価することで、生活習慣病やがんの予防に貢献する実用的なスクリーニング系としての確立を目指す。

**A. 研究目的**

これまで、紙巻たばこについては受動喫煙による健康影響が明らかになっているが、加熱式たばこについては主流煙にニコチンや発がん性物質が含まれていることは明らかであるものの、現時点では受動喫煙による長期的な健康影響を予測することは難しい状況である。このような状況を踏まえ、健康増進法の改正において、加熱式たばこによる受動喫煙がヒトの健康に影響を及ぼす調査研究を一層推進し、可能な限り早期に結論を得るよう附帯決議がなされた。そのため、疾患が認められていない喫煙者・受動喫煙者からの分析法開発・調査研究に利用可能な侵襲のない生体試料をもとに有効なバイオマーカー分析手法の開発を探索する必要がある。

ある。また、加熱式たばこ喫煙者の曝露以外の炎症、臨床、影響(酸化ストレス、DNA付加体など)に関する評価に有効なバイオマーカーの抽出を行う必要がある。そこで本研究では、ヒト胎児腎細胞およびマウス肝正常細胞を用いて $\gamma$ -H2AX および Phospho- ATR/Chk1 を指標としたDNA損傷応答評価について検討した。

## B. 研究方法

加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的として、喫煙者・受動喫煙者の生体試料(口腔内細胞)を用い、簡便に遺伝毒性について評価する手法の開発を試みた。ヒト胎児腎細胞およびマウス肝正常細胞を用い、化学物質曝露による DNA 損傷応答について評価した。曝露物質には、直接変異原であるメタンスルホン酸エチル (EMS)、および代謝活性化を要する間接変異原であるベンゾ[a]ピレン (B[a]P) を使用した。なお、B[a]P 曝露にはラット肝臓抽出物 (Rat S9 mix, 75  $\mu$ g/mL) を添加した。曝露は各細胞に対し 24 時間行った後、以下の解析に供した。

### 1. $\gamma$ -H2AX 解析 (蛍光免疫染色)

DNA 二重鎖切断を評価するため、以下の手順で  $\gamma$ -H2AX の蛍光免疫染色を実施した。

- ・曝露条件: EMS (2mM)
- ・固定・透過化: 4% PFA で固定後、ヒト胎児腎細胞は 0.3% Triton X-100 を含むブロッキング液で、マウス肝正常細胞は 0.1% Triton X-100/PBS を用いて透過化処理を行った。
- ・抗体反応: 一次抗体に Anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Rabbit mAb (#9718, 1:200) を使用し、二次抗体には Alexa 647 標識抗体 (1:200) を用いた。
- ・核染色: DAPI (1  $\mu$ g/mL)
- ・観察: オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800) を用いて核内の  $\gamma$ -H2AX foci を観察した。

### 2. Phospho-ATR/Chk1 発現解析 (ウェスタンブロットティング)

DNA 損傷チェックポイント制御の活性化を確認するため、ヒト胎児腎細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットティングを実施した。

- ・曝露条件: EMS (1, 2, 4, 5 mM) および B[a]P (1, 5, 10  $\mu$ g/mL, S9 mix 併用)
- ・標的タンパク質: Phospho-ATR (Ser428)、Phospho-Chk1 (Ser345)

(倫理面への配慮)

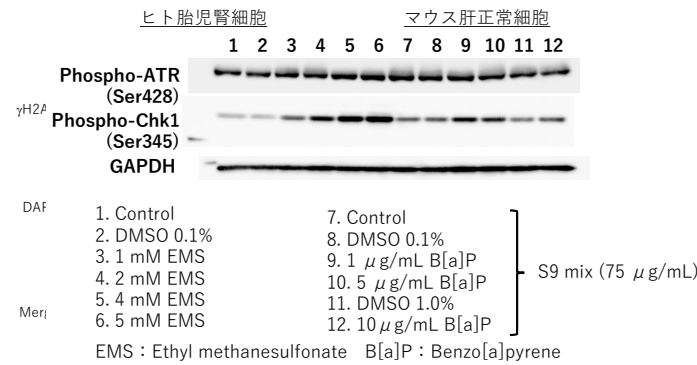


図3. ウェスタンブロットティングによる Phospho-ATR (Ser428) および Phospho-Chk1 (Ser345) の発現解析

該  
当なし。

## C. 研究結果

### 1. $\gamma$ -H2AX 蛍光免疫染色による DNA 二重鎖切断の評価

蛍光顕微鏡による観察の結果、図 1 に示すように EMS 曝露群において核内に明瞭なドット状

の  $\gamma$ -H2A  
foci が  
認めら  
れ、  
DNA 二  
重鎖切  
断の発  
生が視  
覚的に  
確認で  
きた。

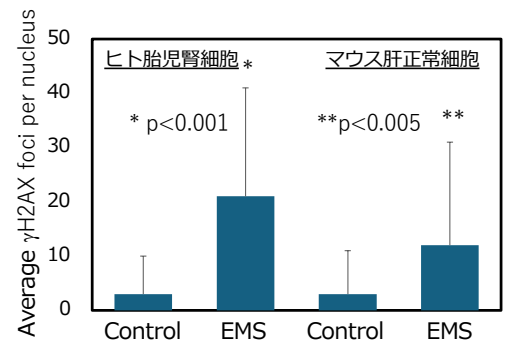


図2. 核あたりの平均  $\gamma$ -H2AX フォーカス数

核当たりの平均 foci 数を算出したところ、図 2 に示すようにヒト胎児腎細胞では、対照群の 3 に対し EMS 曝露群で 21 と顕著な増加を示した ( $p<0.001$ )。また、マウス肝正常細胞においても、対照群の 3 に対し EMS 曝露群では 12 に達し、統計学的に有意な増加が認められた ( $p<0.005$ )。以上の結果から、本解析法を用いることで、初期の DNA 損傷を検出できることが確認された。

## 2. ウェスタンブロッティングによる Phospho-ATR/Chk1 発現解析

ウェスタンブロッティングの結果、図 3 に示すように直接変異原である EMS (1~5 mM) の曝露、および代謝活性化系 (S9 mix) を併用した間接変異原ベンゾ[a]ピレン (B[a]P, 1~10 µg/mL) の曝露において、いずれの物質でも Phospho-ATR (Ser428) および Phospho-Chk1 (Ser345) の発現が確認された。特に EMS 曝露においては、Phospho-Chk1 (Ser345) のバンド強度が濃度依存的に増強していた。

## D. 考察

ゲノムの初期損傷を捉える指標として  $\gamma$ -H2AX 解析を実施した。 $\gamma$ -H2AX は DNA 二重鎖切断の直後に損傷部位へ集積する。今回の検討により、蛍光顕微鏡下において  $\gamma$ -H2AX foci を明瞭なシグナルとして識別できることが確認でき、画像解析技術を用いることで、解析を自動化・客観化できる可能性も示唆され、多検体を迅速に処理する必要がある生体試料スクリーニングにおいても大きな利点となると考える。さらに、DNA 損傷から修復への細胞内シグナル伝達の活性化を評価するため、ウェスタンブロッティングによる Phospho-ATR/Chk1 発現解析を実施した結果、ATR およびその下流因子である Chk1 双方のリン酸化が確認された。特に EMS 曝露下においては、Phospho-Chk1 の発現量に用量相関的な応答が得られたことは、ATR を介した DNA 損傷チェックポイントシグナルが効率的に増幅され、細胞が鋭敏に応答していることを示唆している。このことから、本評価系が損傷の有無を判定するだけでなく、曝露の程度を定量的に反映し得るバイオマーカーとしても機能することが示唆された。同様に、代謝活性化系 (S9 mix) を要する B[a]P に対しても陽性応答が得られた。以上のことから、本研究で検討した評価法は DNA 損傷に対して有効な指標であると考えている。

## E. 結論

本研究では、喫煙者および受動喫煙者の生体試料 (口腔内細胞等) を用いた簡便な遺伝毒性評価手法の開発を視野に入れ、DNA 損傷応答を指標とした評価系の有用性について検討を行った。ヒト胎児腎細胞およびマウス肝正常細胞を用いて  $\gamma$ -H2AX および Phospho-ATR/Chk1 発現を解析した結果、DNA 損傷を「損傷部位の可視化と foci の定量」および「細胞内シグナル伝達の活性化解析」という、2 つのアプローチで多角的に捉えることが可能となった。本手法は、迅速、簡便かつ定量的に遺伝毒性を評価できる基盤技術となり得ることが示された。今後は、本研究で確立した評価基盤をベースとして、実際の口腔内細胞などの生体試料への適用最適化を進める。これらを通じて、喫煙者および受動喫煙者の健康リスクを科学的根拠に基づいて迅速に判定できる実用的なスクリーニング系の確立を目指していきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Betsuyaku Y, Motohashi M, Sassa A, Takamura-Enya T, Totsuka Y. Analysis of Novel DNA Adducts Derived from Acetaldehyde. *Biomolecules*. 2025;15(6):878.
2. Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y. Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ*. 2025;48(1):2.

### 2. 学会発表

1. 戸塚 ゆ加里、正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性評価法の開発、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月2-4日
2. 小畑 悠樹、上原 正太郎、樋口 裕一郎、

- 戸塚 ゆ加里、末水 洋志、*In vitro*薬剤誘発性リン脂質症評価におけるHepaSH細胞の有用性、第52回日本毒性学会学術年会、沖縄、2025年7月2-4日
3. 宮崎 飛翔、石ヶ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規*in vitro* 毒性試験法の開発、第38回発癌病理研究会、千葉、2025年8月20-22日
  4. Yukari Totsuka<sup>1</sup>, Momoko Nagai<sup>2</sup>, Asmaa Elzawahari<sup>2</sup>, Rikako Ishigamori<sup>1</sup>, Shinya Hasegawa<sup>1</sup>, Mamoru Kato, Elucidating the Relationship between Environmental Factors and Human Cancer Development Using Next Generation Sequencers, EMGS2025, ニューヨーク、米国、2025年9月
  5. 戸塚 ゆ加里、環境発がん因子の解明に向けた変異シグネチャーとDNA付加体の解析、第32回日本がん予防学会総会、名古屋、2025年9月12,13日
  6. 小池 遥己、小高 和夫、渋谷 優空、関根航、茅野 朋子、松本 真理子、藤岡 正喜、鈴木 周五、魏 民、戸塚 ゆ加里、有機フッ素化合物(PFAS)の遺伝毒性評価、第32回日本がん予防学会総会、名古屋、2025年9月12,13日
  7. Yukari Totsuka, Comprehensive Insights into Environmental Carcinogenesis via DNA Adducts and Genome-wide Mutation Profiling、第84回日本癌学会総会、金沢、2025年9月25-27日
  8. 石ヶ守 里加子、大野 彰子、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの遺伝毒性評価、第84回日本癌学会総会、金沢、2025年9月25-27日
  9. 長谷川 晋也、吉田 健一、垣内 伸之、渡部 光一、川口 駿、小川 誠司、戸塚 ゆ加里、加熱タバコ製品の吸入曝露による遺伝毒性と変異スペクトラム、第84回日本癌学会総会、金沢、2025年9月25-27日
  10. Yukari Totsuka, Decoding Environmental Carcinogenesis for Cancer Prevention: Insights from DNA Adduct and Mutation Profiling, 2025 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea, ソウル、韓国 2025年10月
  11. 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とメカニズムの解明、第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、大阪、2025年10月
  12. 戸塚 ゆ加里、Screening for genotoxic compounds and study of carcinogenic mechanisms using next-generation sequencing (NGS) and adductome analysis、静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、学会賞受賞講演、2025年11月22,23日
  13. 宮崎 飛翔、石ヶ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡 正喜、加藤 孝一、美谷島 克宏、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規遺伝毒性試験法の開発、静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、2025年11月22,23日
  14. 石ヶ守 里加子、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トマテリアルの包括的毒性評価、静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、2025年11月22,23日
  15. 長谷川 晋也、石ヶ守 里加子、鈴木 周五、大野 麻理奈、吉田 健一、垣内 伸之、渡部 光一、川口 駿、小川 誠司、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎細胞株を用いたError-corrected NGS による化学物質の変異シグネチャー解析、静岡、第54回日本環境変異原ゲノム学会、2025年11月22, 23日
  16. 戸塚 ゆ加里、オルガノイド技術を用い

- た環境化学物質影響評価、日本学術会議主催学術フォーラム、東京、2025年12月
17. 戸塚 ゆ加里、ヒトへの外挿性を考慮した新規 *in vivo* 代替型遺伝毒性評価法の開発、大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
  18. 小畑 悠樹、上原 正太郎、樋口 裕一郎、戸塚 ゆ加里、末水 洋志、ヒト肝キメラマウスにおけるメトトレキサートの代謝および腎毒性、大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
  19. 宮崎 飛翔、石ヶ守 里加子、長谷川 晋也、藤岡 正喜、吉田 健一、大野 麻理奈、小川 誠司、垣内 伸之、川口 駿、渡部 光一、中馬 新一郎、加藤 孝一、美谷島 克宏、樋口 裕一郎、上原 正太郎、戸塚 ゆ加里、マウス肝臓由来オルガノイドを用いた新規 *in vitro* 遺伝毒性試験法の開発、大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
  20. 長谷川 晋也、石ヶ守 里加子、高橋 賢吾、遠藤 瑞葵、戸塚 ゆ加里、ヒト胎児腎細胞株を用いたDNA損傷を指標とした化学物質の変異原性の評価、大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日
  21. 今井 正彦、小川 心音、川西 なつき、中山 瑞穂、大島 正伸、戸塚 ゆ加里、大腸がんモデルオルガノイドを用いた化学物質のプロモーション活性評価法の構築、大阪、日本薬学会第146年会、2026年3月27-29日

## 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

