

令和6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)を評価する手法として小核試験について検討を行った。マウス正常肝臓由来の細胞に被験物質として小核試験において陽性対照物質であるメタンスルホン酸エチル(EMS)を 0、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 24 時間曝露し、ギムザ染色を行った後、顕微鏡下で細胞を計数し、小核保有細胞数から小核出現頻度を算出した。その結果、コントロールと比較し EMS を曝露することにより、小核出現頻度の上昇が認められた。また、細胞計数に適している細胞数を検討するため、異なる細胞数でスライド標本を作成したところ、細胞数が少ない場合は、スライドに滴下した細胞溶液が広がってしまい顕微鏡下での計数に時間を要するが、 5×10^5 個以上の細胞数を用いることで迅速に計数できた。小核試験は、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の両方を検出することができる試験法であり、遺伝毒性解析の手法として比較的簡便である。さらに、文献調査により複数の論文において口腔内細胞を用いた喫煙による有害性評価として小核試験が用いられていることから、本研究課題においても有効な手法になると考えている。また、出現する小核の大きさが染色体異常の違いで異なり、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来の小核は比較的大きく、DNA 損傷により生じる構造異常由来の小核は小さいことがわかっており、小核の大きさの程度も評価することで、遺伝毒性メカニズムが明らかにできる可能性もある。一方、小核試験以外の評価手法として、文献検索より核異形の評価、DNA メチル化の変化、DNA 付加体解析、 γH2AX アッセイなども考えており、迅速かつ簡便に解析可能な方法で生体試料の解析を実施したいと考えている。

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。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、これまでの研究結果を参考に、口腔内細胞を用いた加熱式たばこ曝露マーカーとなる DNA 損傷(遺伝毒性)の解析手法について検討する。

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ている。昨年度の文献調査より、喫煙による有害性評価を口腔内細胞を用いた小核試験で実施している論文をいくつか確認したことから、今年度は、当研究室での小核試験手法の確立を実施した。

マウス正常肝臓由来の細胞を 24well plate に播種し培養を行った後、被験物質として小核試験において陽性対照物質であるメタンスルホン酸エチル(EMS)を 0、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 24 時間曝露した。被験物質を除去し、細胞を PBS で洗浄後、0.25%トリプシンでシングルセルにして回収した細胞を用いてスライド標本を作製した。標本の作成は、回収した細胞に予め 37 度に温めておいた 0.075M 塩化カリウム溶液を 1mL 加え、37 度で 3 分間のインキュベートを行うことで低張処理を行った。続いて 3mL の固定液(メタノール:酢酸=3:1)を加えて穏やかに混合し、細胞を半固定した。この細胞溶液を遠心分離後、上清を除去し新しい固定液(メタノール:酢酸=99:1) 3mL を加え細胞を完全に固定した。この細胞溶液を遠心分離後、上清を除去し少量の固定液(メタノール:酢酸=99:1)に再懸濁してスライドガラス上に全量を滴下し乾燥させた。作成した標本は、ギムザ染色を行い顕微鏡下で細胞を観察し、各濃度あたり 2,000 個の細胞を計数し、小核を有する細胞の出現頻度で評価を行った。また、観察に適している細胞数を検討するため、異なる細胞数でスライド標本作成ならびに染色を行い顕微鏡下で観察を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

小核試験の結果、図 1 に示すように顕微鏡観察下で小核の出現を確認することができた。そして EMS 曝露による小核出現頻度は、表 1 に示すように EMS を曝露することで小核出現頻度の上昇が認められた。

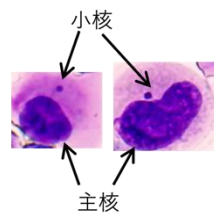


図1. EMS曝露により出現した小核

表1. EMS曝露による小核出現頻度

曝露濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	小核保有 細胞数 ¹⁾	小核出現頻度 (%)
0	14	0.70
125	24	1.20
250	28	1.40

1) 2000細胞あたりの小核出現数

また、異なる細胞数でスライド標本作製し、ギム

ザ染色後に観察した画像を図 2 に示す。細胞数が少ないと、スライドに滴下した細胞溶液が広がってしまい顕微鏡下での計数に時間を要するため、 5×10^5 個や 1×10^6 個の細胞を用いて標本作成を行うことで迅速に計数できることがわかった。

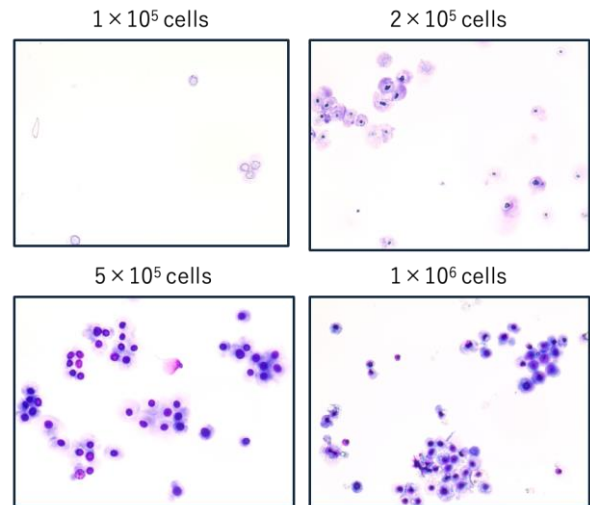


図2. 異なる細胞数で標本作成しギムザ染色した時の顕微鏡画像

D. 考察

小核出現頻度を算出したところ、EMS 曝露によりコントロールと比較し小核出現頻度の上昇が認められ、小核試験による遺伝毒性評価が可能であることが示唆された。小核試験は、染色体異常により出現する細胞質内の主核とは異なる小核を観察する試験法であり、遺伝毒性解析の手法として比較的簡便であることから、本研究課題においても有効な手法の 1 つになると考えている。また、出現する小核の大きさは染色体異常の違いで異なり、紡錘糸異常により生じる異数性異常由来の小核は比較的大きく、DNA 損傷により生じる構造異常由来の小核は小さいことが分かっていることから、小核出現の有無の他に小核の大きさの程度を評価することで、遺伝毒性メカニズムが明らかにできる可能性もある。また、昨年度の文献調査により複数の論文で喫煙による有害性評価を口腔内細胞を用いた小核試験で実施していることから、小核試験による遺伝毒性評価は有効な方法であるといえる。また、それらの論文のなかで Tadin A. et al., (Journal of Xenobiotics, 2024) は小核以外に核異形なども観察し、nuclear bud、binucleated cells、karyorrhexis、karyolysis、condensed chromatin、pyknosis が非喫煙者と比較して加熱式タバコにおいて有意に異なることを明らかにしている。そのほかに、マロンジアルデヒドやエピゲノム変化である DNA メチル化の変化を指標としている報告もある。そして、紙巻タバコの喫煙に相関する DNA 付加体の存在も明らかになっている。一方、迅速かつ簡便な DNA 損傷解析としてヒストン H2AX のリン酸化(γH2AX)をマーカーとした評価法もある。これらのことより、小核試験以外にも本研究課題において利用できる簡便な解析手法

を検討する必要があると考える。

E. 結論

DNA 損傷分析(遺伝毒性)に用いる方法として小核試験を想定し、マウス正常肝臓由来の細胞に陽性対照物質である EMS を曝露し検討を行った。その結果、EMS 曝露により小核の出現を確認することができ、コントロールと比較し小核出現頻度が上昇していることも認められた。また、スライド標本作成時の細胞数は、 5×10^5 個以上の細胞数を用いると計数が迅速に行うことができるとわかった。また、文献調査により複数の論文で喫煙による有害性評価を小核試験で実施していることから、本研究課題の評価手法として小核試験を用いることは有効であると考えている。一方、小核試験以外の評価法として、文献検索より核異形の評価、DNA メチル化の変化、DNA 付加体解析、 γ H2AX アッセイなどを考えており、これらの評価法についても検討し迅速かつ簡便に解析できる方法で評価したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.*, 2024, 25.
2. 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.* 2024 Oct;899:503821.
3. 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.* 2024;49(10):425-434.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里、DNA 付加体研究の過去・現在・未来 東京、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 1 日
2. Yukari Totsuka, New Horizons Of DNA Adductome For Exploring Environmental Causes Of Cancer, 札幌、第 42 回札幌国際がんシンポジウム、2024 年 6 月 6-8 日
3. Yukari Totsuka, Landscape of mutational signatures observed in laboratory animal tumors induced by various carcinogens, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, 京都、2024 年 6 月 28-30 日
4. 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 回日本癌学会総会、福岡、2024 年 9 月 19-21 日

5. 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、東京、2024 年 10 月 25-26 日
6. 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、Web 開催、環境エピゲノミクス研究会 (EEG) 2024 春季ネットシンポジウム、2024 年 11 月 9 日
7. 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、福岡、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27-29 日
8. 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、岡山、2024 年 12 月 6 日
9. 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曝露によりマウス肺に誘導される遺伝毒性、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
10. 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性を解明する、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
11. 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トナノマテリアルの毒性評価、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
12. 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、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
13. 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、岡山、第 53 回日本環境変異原ゲノム学会、2024 年 12 月 7-8 日
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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ドラッグ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

18. 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、福岡、第145年会日本薬学会、2025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。

