

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：27501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19654

研究課題名（和文）胎児期加熱式たばこ曝露が胎児に与える影響と出生後に生じる影響の推定

研究課題名（英文）Effects of prenatal Tobacco Heating Products exposure on the fetus and estimating the effects occurring after birth

研究代表者

吉田 成一（Yoshida, Seiichi）

大分県立看護科学大学・看護学部・准教授

研究者番号：40360060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,300,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠中の加熱式たばこの使用により出生雄性マウスの生殖機能が悪化したことから、胎児期に何らかの影響が生じていることが考えられる。そこで、妊娠マウスに加熱式たばこを曝露し雄性胎児の性分化、胎児発達などへの影響が生じるかについて検討した。加熱式たばこの胎児期曝露により、胎齢14.5日目の雄性胎児重量が対照群と比較して低下すること、胎齢11.5日目でsry（性分化関連遺伝子の一つ）の一過性の発現誘導が生じるが、その誘導が遅延することを明らかにした。これらのことから、加熱式たばこの胎児期曝露は雄性胎児の発育遅延と性分化の遅延を惹起し、出生後に生じる雄性生殖機能の悪化の一端であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠中の紙たばこの喫煙は胎児に悪影響をもたらすことは明らかにされているが、比較的风险が小さいと認識されている加熱式たばこによる影響は不明であった。妊娠マウスに加熱式たばこを曝露し、胎児への影響を評価したところ、胎児の発育が遅延すること、雄性胎児の性分化が遅延することなど、加熱式たばこの曝露が胎児へ悪影響を示すことを明らかにした。このことは、妊婦が紙たばこではなく加熱式たばこを利用したとしても胎児および出生する子どもに悪影響が生じることを示しており、妊娠中はいかなる状態のたばこであっても使用しない必要性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：Prenatal exposure to tobacco heating products (THPs) aggravates reproductive function in male offspring mice. Prenatal exposure to THPs may have some impact on the male fetuses. Therefore, we investigated whether exposing pregnant mice to heated tobacco would result in effects on the sexual differentiation and fetal development of male fetuses. Prenatal exposure to THPs reduced male fetal weight at PND 14.5 compared to the control group. Moreover, exposure to THPs delayed the induction of sry expression, which is one of the genes related to sexual differentiation. These findings suggest that prenatal exposure to THPs induces delayed male fetal growth and delayed sexual differentiation, contributing to impaired male reproductive function observed postnatally.

研究分野：衛生化学・公衆衛生

キーワード：加熱式たばこ 胎児期曝露 性分化 マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の健康志向の高まりにより、燃焼式たばこから非燃焼式たばこへ切り替える使用者が増えている。表に示すように2種の非燃焼式たばこ(電子たばこと加熱式たばこ)の健康影響に関する論文数を比較すると加熱式たばこの研究が極めて少ないことがわかる。これは、海外では電子たばこが普及しており、加熱式たばこの使用者が少ないことに起因していると言える。一方、日本において利用者が急増している加熱式たばこによる健康影響に関する研究は、たばこ会社によるものがほとんどであり、影響解明が進んでおらず、使用者が多い日本でこそ必要な研究であると言える。加熱式たばこによる健康影響のうち呼吸器系、循環器系への影響等、能動喫煙に関する研究は一定程度行われている。しかし、妊娠中に曝露し、胎児や出生後への影響に関する研究は進んでおらず、影響を明らかにする必要がある(燃焼式たばこの総論文数の4.7%が胎児期曝露に関する論文になる一方、加熱式たばこではわずか6報、0.9%である上に、内容として健康影響に関する原著論文に該当するものは申請者が報告している1報のみである)。申請者は、加熱式たばこの胎児期曝露による影響評価を行い、出生後の雄性生殖機能に影響が生じることを明らかにした(Yoshida, Biol Pharm Bull, 2020)。胎児期曝露により、出生後に影響が生じると言うことは、胎児の発育に直接あるいは間接的(例えば胎盤機能や母体ホルモン環境など)に影響が生じたことになる。

そこで、加熱式たばこの胎児期曝露を行い、胎児への影響を評価することで出生後の雄性生殖機能で生じた影響発生メカニズムを解明することができる。また、加熱式たばこの胎児期曝露により胎児に生じる変化の解析により、既に申請者等が明らかにした健康影響以外にも生じた変化に起因する現時点で全く着手されていない健康影響について推定が可能となる。

加熱式たばこ等による健康影響に関する論文数と総論文数に占める割合

	総論文数	発がん	呼吸器系	循環器系	雄性生殖系	胎児期曝露影響
燃焼式たばこ	77,941 (100%)	16,263 (20.9%)	6,531 (8.4%)	2,427 (3.1%)	462 (0.6%)	3,636 (4.7%)
電子たばこ	9,664 (100%)	1,707 (17.7%)	723 (7.5%)	206 (2.1%)	37 (0.4%)	317 (3.3%)
加熱式たばこ	703 (100%)	127 (18.1%)	67 (9.5%)	25 (3.6%)	1 (0.1%)	6 (0.9%)

PubMedでヒットする論文数(総説、メタアナリシス論文を除外)  
(各たばこに関する論文に対するそれぞれの健康影響指標に関する論文の割合: %)  
検索日: 2021年9月1日 吉田, 室内環境, 2021より改変

### 2. 研究の目的

燃焼式たばこにより生じる健康影響については解明が進んでいるが、近年、使用者が増加している加熱式たばこによる健康影響については不明な点が多い。加熱式たばこの出生前曝露は、雄の子孫の性的成熟を遅らせたり、燃焼式たばこの煙よりも雄の精巣機能に悪影響を及ぼしたりすることを示唆する知見を得ている。DOHaD仮説によると、次世代の健康は、胎児期に大部分が決まるものであるとされている。そこで、本研究では胎児期に加熱式たばこの曝露を行い、胎児にどのような影響が生じるか解析することで、出生後に生じる雄性生殖機能への影響発生機序の解明を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 使用した加熱式たばこ

加熱式たばこは、IQOS 3 MULTI(ヒートスティック: マルボロ レギュラー)を使用した。

#### 3-2. 使用動物

動物はICR系妊娠マウスを15匹、日本クレア株式会社(東京)から購入し、妊娠6日目で導入した。マウスをコントロール群、IQOS・2回曝露群(2IQOS群)、IQOS・7回曝露群(7IQOS群)に分け、1群5匹とし、妊娠14.5日目まで飼育した。飼料は日本クレア社CE-2型固形飼料を給餌し、飼料や水は自由摂取とした。飼育は大分県立看護科学大学の実験動物施設の利用手引きに従い飼育した。また、これとは別にICR系マウス妊娠マウスを10匹、日本クレア株式会社(東京)から購入し、妊娠6日目で導入した。マウスをコントロール群(11.5・コントロール群)、IQOS・1回曝露群(11.5・IQOS群)に分け、1群5匹とし、妊娠11.5日目まで飼育した。

#### 3-3. 母獣への曝露

たばこ煙の供給方法は、ヒートスティックを装着したIQOSをたばこ煙発生装置に接続し、シリジポンプにて吸引し、チャンパー内のマウスに供給した。たばこ煙発生条件はHCI法を用い、吸煙量55ml、吸煙時間2秒、吸煙間隔30秒、希釈濃度10.0%とし、容量6.5Lのチャンパーに気化蒸気を導入し、1回あたり20分間の吸入曝露を行った。2IQOS群は妊娠7、13日目に

計2回、7IQOS群は妊娠7、8、9、10、11、12、13日目に計7回曝露を行った。11.5・IQOS群は妊娠7日目に1回曝露を行った。

### 3-4. 胎児・胎盤の摘出

マウスは妊娠14.5または11.5日目にハロタン麻酔下で体重を測定し、心採血により脱血屠殺した。妊娠マウスから全ての胎児・胎盤を摘出し、それぞれ重量を測定した。胎児の性別判定用として、胎児の上肢1~2mmを切り取り、96穴マイクロプレートに入れて-80で保存した。病理解析用として、1~4匹目の胎児をマイルドホルム3mlで保存した。遺伝子発現解析用として、5匹目以降の胎児はRNAlater1.5ml (Ambion社)に入れて-20で保存した。

### 3-5. 胎児性別判定

カネカ簡易DNA抽出キット Version 2 (Kaneka)を用い、3-4.で採取した胎児の上肢からDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型としてsry遺伝子の有無にて性別を判定した。

### 3-6. 遺伝子発現の解析

1母獣あたり雄性胎児3匹を無作為に抽出し、DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析あるいは定量的遺伝子発現解析を行った。

### 3-7. 統計処理

胎児数、胎児・胎盤重量、性比の統計処理はKyPlot Ver5を用い、Dunnettの多重比較による有意差検定を行った。妊娠率は<sup>2</sup>検定を行った。危険率が5%以下をもって有意とした。

## 4. 研究成果

### 4-1. 母獣妊娠率、胎児数、性比、胎児・胎盤重量への影響

IQOS曝露による母獣妊娠率、胎児数、性比への影響を検討した結果、妊娠率、胎児数、性比において有意な変動は認められなかった。

IQOS曝露による胎児の重量への影響を検討した結果、2IQOS群の雄性胎児重量がコントロール群と比較して23.2%有意に低下した( $p < 0.05$ )。7IQOS群の雄性胎児及び雌性胎児では有意な変動は認められなかった(表1)。また、胎盤重量への影響も認められなかった。

表1 IQOS曝露による母獣胎児への影響

	Control群	2IQOS群	7IQOS群
妊娠率	4/5	5/5	5/5
胎児数	57	77	73
雄胎児数	27	36	32
雌胎児数	30	41	41
性比	0.49	0.47	0.44
胎児重量			
雄胎児重量	296.5 ± 11.8	227.8 ± 44.2*	320.7 ± 49.6
雌胎児重量	286.0 ± 28.0	222.3 ± 52.3	311.3 ± 44.1

Data: Mean ± SD, \* $p < 0.05$  vs Control群

### 4-2. 遺伝子発現への影響

IQOSの胎児期曝露による雄性胎児の遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイにより解析した。全解析遺伝子56,372のうち、変動が認められた遺伝子の数は2IQOS、7IQOS群でそれぞれ誘導1,765(3.1%)、1,811(3.2%)、抑制433(0.8%)、469(0.8%)であった(表2)。

表2 IQOS曝露による胎児遺伝子発現への影響

	2IQOS群	7IQOS群
発現誘導	1,765	1,811
発現抑制	433	469

全解析遺伝子数: 56,372

誘導: 発現量がコントロール群の2倍以上になった遺伝子

抑制: 発現量がコントロール群の1/2以下になった遺伝子

### 4-3. 性分化関連遺伝子

全解析遺伝子のうち、性分化関連遺伝子は484であり2IQOS、7IQOS群でそれぞれ誘導6(1.2%)、5(1.0%)、抑制1(0.2%)、3(0.6%)であった。特に発現量の変動が大きかったものはBcl2l11で5.16(2IQOS群)、Esr1で4.77(2IQOS群)であった。また、sryの発現誘導(2IQOS群)、Tex11の発現誘導(7IQOS群)、抑制(2IQOS群)も認められた。

### 4-4. 胎齢11.5日における胎児・胎盤重量への影響

IQOS曝露による影響は認められなかった。

### 4-5. 胎齢11.5日における性分化関連遺伝子発現への影響

IQOS曝露による胎児性分化に関連する因子であるsry遺伝子の発現を解析したところ、11.5・コントロール群と比較すると、11.5・IQOS群の発現量はおよそ40%に低下していることが認められた。

以上より、胎児期に加熱式たばこの一種であるIQOSの曝露を受けると、雄性胎児の発育が遅延し、さらに、雄性性分化関連遺伝子の発現変動推移から性分化の遅延が生じることを示唆する知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Higuchi Sachi, Yoshida Seiichi, Minematsu Takeo, Hatano Yutaka, Notsu Akifumi, Ichinose Takamichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Comparison of the Effects of Bathing and the Dry Technique on the Skin Condition of Early Neonates: A Prospective Observational Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Dermatology	6. 最初と最後の頁 256 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5021/ad.22.098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 成一
2. 発表標題 加熱式たばこの曝露による雄性マウス生殖系への影響
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 成一
2. 発表標題 加熱式たばこの胎児期曝露による雄性胎児への影響
3. 学会等名 第68回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

妊娠中の加熱式たばこの使用が生まれた子どもの雄性生殖系に与える影響  
<https://www.oita-nhs.ac.jp/site/daigakuanai/5632.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------