

第2回BMS共同研究計画書 (ver. 1)

共同研究世話人：羽倉昌志、島田弘康、中嶋 圃、須井 哉、北本幸子

2002年1月17日

タイトル：ヒトS9を用いるAmes試験

目的：化学物質の変異原性・発癌性の潜在的风险をスクリーニング的に検出するために酵素誘導したラット肝S9を用いる意義は極めて大きいと思われる。しかしながら、化学物質の変異原性・発癌性のヒトに対するリスク評価をより正確に行う一つの手がかりとして、ヒトS9を用いる方法も合理的と考えられる。以前はヒトS9を含むヒト材料が一般的には入手しにくい状況であったが、最近、やや高価であるものの比較的容易に入手可能となってきた。一方、代謝の研究では欧米では今や日常的にヒトミクロソームが利用されているが、ヒトS9の変異原性・発癌性研究への利用は欧米でさえ極めて低く、利用できるデータは未だ乏しい。こうした現状を考え合わせると、ヒトS9を用いる変異原性試験の基礎的データを収集することは、ヒトに対する変異原性・発癌性のより正確なリスク評価を行う上で貴重な基礎的データを得ることにつながると考えられる。ヒトS9の利用は環境中に存在する化学物質のヒトに対するリスクの評価に有効のみならず、人類に有用な化学物質を開発する際に特殊なラットS9のみを用いた評価では捨てざるを得ないものを救うための重要なデータとなることが期待される。ヒトS9を用いる試験の有用性を明確に示すには、ある程度まとまった数の化合物についてのアッセイデータが必要になってくるとと思われる。この目的を達成するためにはBMSでの共同研究が極めて有効であると考えられ、既に25の参加機関からなる第1回共同研究を実施し、今年の6月1日には、BMS定例会（東京）での中間報告、10月22日に行われた第8回国際環境変異原学会（静岡）でその最終結果を報告した。第2回BMS共同研究では、Ames試験の簡便性を活かし、変異原性試験におけるヒトS9の有用性に関する実験データをさらに収集することを目的とする。

計画：本共同研究では、薬物代謝酵素が豊富に存在し、大量調製が可能な肝のS9を用いる。ヒトの薬物代謝酵素活性には個人差があることが知られている。そこで、2種類のヒト肝S9、即ち、十数人のdonorの肝をpoolして調製したpooled S9と、強い変異原性と高い酵素活性を示したdonor肝から調製したS9を用いて、それぞれ、平均的感受性をもつヒトに対する変異原性リスク、感受性の高いヒトに対する変異原性リスクを評価できると考えた(2000年日本環境変異原学会で羽倉ら発表、現在投稿中)。

第1回共同研究では、強い変異原性と高い酵素活性を示すdonor肝として、Lot. HLS-014を使用した。しかし、この肝の保有量が減ってきたため、2番目に強い変異原性と高い酵素

活性を示すと推定される donor 肝 Lot. HLS-059 を使ってアッセイする。 その理由は、HLS-059 の S9 存在下で 5 種類の変異原についてアッセイしたところ、2 化合物については HLS-014 より少し弱い変異原性を示したものの、他の 3 化合物については HLS-014 と匹敵する変異原性を示すというデータからです。しかし、P450 酵素活性及び酵素量は、分子種によって HLS-014 と HLS-059 ではかなり異なっていました。 HLS-014 と HLS-059 による変異原性を比較したデータもあと 1 化合物 (P450 3A4 で主に代謝活性化される Aflatoxin B1) だけ収集する。

正常(非誘導)ラット S9 存在下での試験も行う。 その理由は、単純にヒトとの種差が比較できる点と発ガン性試験の結果とも考察が可能になる点です。

ヒト S9 については、S9 の依存性の試験も追加する。 年末、エーザイで 9 化合物 (Mutation Res., 438, 29-36 中で試験した化合物の中から選択) について、pooled ヒト S9、誘導ラット、正常ラットの S9 濃度を 1, 3, 10, 30% と変えて試験した結果 (データ整理中) pooled ヒト S9 については、高濃度 S9 ほど変異原性が強くなったが、10% 以上で頭打ちであった。ちなみに、正常ラット、誘導ラットになるにしたがって、高濃度ほど変異原性が弱くなるものが存在した。具体的には、2-Aminoanthracene や 6-aminochrysene。芳香族アミンにその傾向があるようです。いずれにしても、酵素誘導ラットとヒトとの変異原性の差を比較するためなら、通常の 10% 濃度で比較すればよいと思いますが、ヒト S9 を用いて化合物の変異原性を評価するには、通常の 10% に加えて、30% 濃度も必要と思われました。したがって、今回実施する ヒト S9 mix 中の S9 濃度は (1, 3, 10, 30%) がいい と思います。1% 濃度は余裕のある機関で結構です。

今回アッセイする化合物は、芳香族アミン類を中心にしてデータの補完・補強が行えるよう選択した (別表参照)。芳香族アミン類を中心にした理由は、第一回共同研究で得られた最大の成果の一つが、調べた 75% の化合物についてヒトの方が酵素誘導ラットより変異原性が弱くなったが、残りの 25% の化合物は、逆にヒトの方が酵素誘導ラットより変異原性が強くなり、しかもその多くは、芳香族アミンであったことによる。芳香族アミンはヒトに対する発癌性が最も疑われているものの一群であり、産業化学物質、合成中間体、環境化学物質としても身近な存在である。第一回共同研究では、どちらかというヒトの方が弱くなることをアピールにしていたが、今度は、ヒトの方が感度よく検出できる化合物があることをアピールしたい。ヒトのみ陽性となるものが見つかればおもしろいかも知れない。第一回共同研究の結果から、酵素誘導ラット S9、ヒト S9 に対する感受性は、芳香族アミンの中でも化学構造に依存するようと思われる。すなわち、1 員環及び 4 員環以上の構造は、ラット S9 > ヒト S9。2 員環及び 3 員環構造は、ヒト S9 > ラット S9、焼き焦げ成分のようなヘテロの 3 員環芳香族アミンはラット S9 > ヒト S9 のように見える。このように一口に芳香族ア

ミンといっても酵素誘導ラットS9、ヒトS9に対する感受性は異なり、このあたりをもっと詳細に検討できるよう化合物を選択した。

【試験系の概略まとめ】

		S9 mix中のS9濃度(%)	補足
-S9 mix	cofactors	0	
+S9 mix	酵素誘導ラットS9	10	
	正常(非誘導)ラットS9	10	
	ヒト(lot. HLS-059)	(1), 3, 10, 30	(1)は余裕のある機関
	ヒト(lot. HLS-014)	10	Aflatoxin B1のみ
	ヒト(pooled)	(1), 3, 10, 30	(1)は余裕のある機関

上記の試験条件は原則であり、S9の量やマンパワーなど余裕がある場合、条件を追加して試験されるのも歓迎いたします。例えば、酵素誘導ラットも濃度を変えて、数用量試験をするなどです。

配送S9予定数

	予試験分(本)	本試験分(本)
酵素誘導ラットS9	1	1
正常(非誘導)ラットS9	1	1
ヒト(lot. HLS-059)	1	2
ヒト(lot. HLS-014)	0	1
ヒト(pooled)	1	2

全S9はHAB協議会の霊長類機能研究所からまとめて発送していただく予定。

アッセイ化合物：

別表参照。正常ラットとの比較やヒトS9の濃度を変えた試験も行うので、1検体のみアッセイする。なお、1化合物のアッセイは、複数の研究機関で行うのではなく、1研究機関のみで行う。この共同研究の目的は精度管理ではなく、しかも、参加する各研究機関はAmes試験のそれなりの実績・経験を有していると考えられるので、各研究機関の出されるデータは、十分信用に足るものと思われる。研究機関内である程度の復帰変異数の（絶対値の）差があるにしても、各研究機関内で得られた結果の比較は十分可能である。

使用S9：

- (1) ヒトpooled S9 (HAB協議会から)
- (2) HAB協議会で保有している donor肝の中で、高い酵素活性と強い変異原性を示した donor肝から調製したS9 (Lot. HLS-059 : HAB協議会から)
- (3) HAB協議会で保有している donor肝の中で、高い酵素活性と強い変異原性を示した donorから調製した肝S9 (Lot. HLS-014 : HAB協議会から。このロットは第1回共同研究で使用した。Aflatoxin B1のみ)

- (4) Phenobarbital及び5,6-benzoflavoneで酵素誘導した雄SDラット肝S9 (以下、**酵素誘導ラットS9**と略。以前にアッセイした条件となるべく、合わせるためにオリエンタル酵母工業から同一ロットを購入)
- (5) **正常 (非誘導) 雄SDラット肝S9** (以下、**正常ラットS9**と略、HAB協議会から)

上記5種類のS9のうち、(1), (2), (4), (5)の4種類を用いてアッセイするのを基本とし、Aflatoxin B1のみ、全5種類のS9を用いてアッセイする。S9 mix非存在下 (cofactors溶液存在下) も行う。

S9 mix中のS9濃度については、酵素誘導ラットと正常ラットは10% (0.5 mL S9 mix中に0.05 mLのS9を含有) とする。2種類のヒトS9については、(1), 3, 10, 30%とする。1%は余裕のある機関で行う。 ヒトS9蛋白濃度はラットS9蛋白濃度と同じ約21 mg/mLに調製されたものが送付される予定。

S9 mixは、S9とcofactors (Cofactor-I[®], オリエンタル酵母工業) を以下の割合で混ぜたものを使用する。Cofactorsの濃度は一定ではないものの、十分 (過剰) 量の補酵素が入っているので、ほとんど結果には影響ないと考えられる。

S9 mix中のS9濃度 :	1%	3%	10%	30%
S9 : Cofactors	1 : 99	3 : 97	10 : 90	30 : 70

なお、ヒトS9はHAB協議会から本共同研究用として特別価格で購入する。

(注) HAB協議会 : HAB(Human & Animal Bridge)協議会は1994年に大学、企業の研究者有志により非営利機関の学術団体として設立され、同年、米国政府公認の非営利機関であるNDRI (National Disease Research Interchange)と国際協定を結んでいる。1996年から通産省の許可を得てヒト組織を入手しており、その一部は大学や製薬企業の研究者へ研究目的のために実費供給している。ヒトS9の調製はHAB協議会霊長類機能研究所で行われる。霊長類機能研究所所長 : 佐藤哲男先生 (千葉大学名誉教授、IUTOX副会長) 実務担当 : 鈴木 聡さん、〒270-1402 千葉県印旛郡白井町平塚2802-1, TEL: 047-492-5281, FAX: 047-492-5289, e-mail: tissue-hab@syd.odn.ne.jp

使用菌株 :

1菌株について調べる。TA100を優先するが、TA98の方が明らかに感受性が高い場合は、TA98を用いる。単環の芳香族アミンはTA98の方が感受性が高いかもしれません。9-

AminoacridineはTA1537を用いる。使う菌株は、文献的に調べても、予試験の時に調べてもよい。

使用陽性対照物質：

メーカーの指定は特にしない。使用する菌株に対応する陽性対照物質についてのみ実施する。TA1537を用いる場合(9-Aminoacridine)は、TA100でBPを用いてS9の保証を行う。予試験はプレート1枚(single)で、本試験はプレート2枚(duplicate)で行う。

菌株	S9 mix 非存在下	酵素誘導 ラット	正常ラット	ヒト pooled	ヒト(lot. HLS-059)	ヒト(lot. HLS-014)
TA100	AF2 (0.01 µg/plate)			BP (27 µg/plate)		
TA98	AF2 (0.1 µg/plate)			BP (27 µg/plate)		

(略) AF2; 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, BP; benzo[a]pyrene.

試験方法：

- 37、20分間のpre-incubationを併用するAmes試験を行う。
- S9 mix非存在下(cofactors)でのアッセイも行う。S9 mix存在下でのアッセイは、既に記載した4種類あるいは5種類(Aflatoxin B1をアッセイするときのみ)のS9を用いる。S9 mix中のS9濃度については、酵素誘導ラットと正常ラットは10% (0.5 mL S9 mix中に0.05 mLのS9を含有)とする。2種類のヒトS9については、(1), 3, 10, 30%とする。1%は余裕のある機関で行う
- アッセイは予試験と本試験を行う。予試験はプレート1枚(single)で、文献等を参考にしながら用量間隔を広めにとり(用量が既にわかっている時はあえて広めに設定する必要はない)本試験で最適の用量でアッセイできるようにする。本試験はプレート2枚(duplicate)で、陰性対照を除く4-6用量でdose-response curveが得られるようにする。陽性の場合、最高用量で復帰変異数が頭打ち、あるいは減少する用量をなるべく含み、陰性の場合、細胞毒性が観察される用量を含むようにする。用量間隔は公比(あるいは公差)とし、2~3を基本にする。
- 最高用量は、原則として細胞毒性が認められる用量とし、ガイドラインにしばられる必要はない。復帰変異コロニー数の増加が全く見られず、結晶析出がない場合でも、ガイドライン上の5 mg/plateよりもさらに高用量(10から20 mg/plate前後が一応のメド)についてもアッセイする方が望ましい。特に5 mg/plateで復帰変異数が陰性対照に比べて上昇傾向であれば、さらに高用量を含む範囲で試験を行う。
- 原則、全てのアッセイ化合物及び陽性対照物質はDMSOで検体溶液を調製し、陰性対照物質はDMSOとする。

試験手順及び注意事項:

実験条件は可能な範囲で統一したい。なお、試験結果に影響をほとんど与えないと考えられる点は、それぞれの研究機関で既に実施されている方法に従えばいいこととする。以下に、統一したい試験実施条件を記載する。

- 菌培養液の調製：最も研究機関同士で異なっていて、しかも結果に影響する可能性のある事項と思われる。菌のstockから液体栄養培地へ接種する方法には、凍結保存菌を融解した菌懸濁液の一定量を培養液へ接種する方法と、マスタープレートのコロニーを白金耳などで釣ってくる方法がある（凍結保存菌懸濁液の一定量を培養液へ接種する方法を推薦）。培養容器（フラスコ、L字管）、培養shaking法、培養時間もまちまちと思われる。菌の接種条件、使用機器、培養条件等により培養時間は異なるが、試験には初期の定常状態のステージにある菌を使う。菌の増殖が定常状態になったら、あまり長時間培養し続けるのは避ける。
- 初期の定常状態にある菌の培養液は、被験物質と処理するまで室温に放置する。ただし、あまり長時間にならないようにする（約2時間以内に使用）。
- S9及びS9 mixは酵素の失活を最大限抑えるために、必ず冷えた状態（氷付け）にする。
- 検体との処理条件は、S9 mix 0.5 mLに検体溶液0.1 mLを入れて攪拌する。次に0.1 mLの菌懸濁液を添加した後、攪拌し、37℃、20分間 pre-incubation（約120 strokes/min）する。Pre-incubation終了後、2 mLの0.05 mM histidine/0.05 mM biotin入りsoft agarを添加し攪拌して最少栄養培地に重層する。
- 反応前とpre-incubation後からsoft agarを加えるまでの試験管は氷水中につけてもつけなくてもかまわない。ただし、氷水中につけない場合は、速やかに処理する。また、氷水中で冷やした場合、攪拌時は必ず、試験管をペーパータオル等でよく水等を拭いてバクテリアなどのcontaminationを引き起こさないように注意する。
- Soft agarを試験管にいれてプレートに重層し終わり、soft agarが固まったら、比較的速やかに（5-10分以内位）incubatorへ入れる。
- 最少栄養培地は、市販（例えば、クリメディアAM-N培地（オリエンタル酵母工業）のものでも、自家製でもかまわない。
- コロニー観察のための培養期間は約48時間とする。
- コロニー数の観察は、肉眼でもコロニーカウンターのいずれでもかまわない。
- S9 mix（**10%のS9濃度**）0.5 mLと2 mLのsoft agarを加えて混和し、最少栄養培地にまいてS9の無菌性をチェックする（各S9についてプレート1枚）。

変異原性の評価方法及び基準: いわゆる2倍法

以下の基準が満たされた場合、変異原性が陽性であると判断する。

- (1) 最大復帰変異数が陰性対照の2倍以上に増加する。
- (2) 復帰変異数の増加に用量相関性が認められる。

(3) 本試験と用量設定試験で結果の再現性が認められる。

陰性：復帰変異数の増加がない場合。

疑陽性(equivocal)：陽性とも陰性とも判断できない場合。

実験に際して注意すること(ヒトS9を用いることに伴うbiohazardに関して)：

WHO (World Health Organization)実験室バイオセーフティ指針(WHOの作成したマニュアルを国立感染症研究所の職員が翻訳した本、販売元：バイオメディカルサイエンス研究会、TEL： 03-3200-6752、FAX： 03-3200-5206)によれば、ヒトS9を用いる変異原性試験の実施は、通常の細菌を用いる実験室の基準であるP1レベルで可能と考えられる。HAB協議会から供給されるヒトS9は、すべて臓器移植のために脳死者から提供されたものの中から、種々の医学的理由により移植不適合と判定されたものを合法的に研究目的に使用が許可され、NDRI (National Disease Research Interchange：前述)から供給されたものである。したがって、既知のいくつかのウイルス(肝炎ウイルス関連抗原、B型肝炎表現抗原、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトT細胞リンパ性ウイルスIII型、サイトメガロウイルス)についてはチェックされており、特に問題のない肝からS9は調製されている。しかし、未知のウイルスがないとも限らないので、共同研究では、ヒトS9の液状飛散の可能性が高いstep(S9の入ったバイアル開封時、S9 mix調製時、S9 mix分注時、pre-incubation後のsoft agarを添加、混和してplateにまく時)の実施の際には、可能であれば、P2レベルに相当する安全キャビネット内での操作を推薦する。なお、実験中はメガネ、マスク、手袋、実験着の着用は必ず行い、使用済みの実験器具類は全てオートクレーブ処理あるいは焼却を行う。オートクレーブできない器具類は、消毒用エタノール等でよく拭いておく。

共同研究の進行計画：

2002年1月：決定した共同研究参加機関を確認し、参加研究機関内で最終プロトコルを完成。

2002年2月上旬：S9の各研究機関への送付。

2002年5月末：データ収集完了

2002年6月：BMS定例会で進行状況説明

2002年11月下旬：日本環境変異原学会で発表

2003年3月：投稿

共同研究参加予定費用：

試験に使用する全てのS9(2種類のヒトS9及び2種類のラットS9)の金額代約3万円と投稿関係(別刷料、英文校閲料、投稿料等)及び事務費で約1万円を合計した4万円を共同研究参加費用として共同研究開始時に徴収する予定です。なお、この費用の名目(例、試薬代

など)は、各参加機関に事務処理上、都合のいいように作成しますので、その旨をお知らせ下さい。また、参加費用は経理上の都合のよいときで結構です。S9以外の材料費は各研究機関でご負担下さい。

連絡先：

エーザイ(株) 薬理安全性研究所 川島安全性研究部

羽倉 昌志 (Hakura Atsushi)

〒 501-6195 岐阜県羽島郡川島町竹早町1

TEL: 058689-4726 (直通), FAX: 058689-5292, E-mail: a-hakura@hhc.eisai.co.jp

以上