

## 遺伝毒性評価へのヒト S9 の応用

羽倉昌志（エーザイ（株）薬理安全性研究所）

医薬品・食品添加物など生活を豊かにしてくれる産業化学物質から普段口にする食品，さらには大気・水質に存在する環境汚染物質まで多岐に渡り，我々は多くの化学物質に暴露されて生活している。これらの化学物質のヒトに対するリスクをできる限り正確に評価することは，人類が将来に渡って健康的な生活を送るために極めて大切なことである。安全性評価に関する項目は色々あるが，本講演では遺伝毒性について考えてみたい。遺伝毒性とは遺伝子突然変異や染色体異常を含む遺伝子 DNA に対する包括的な障害性（毒性）を意味する。この遺伝毒性は癌あるいは次世代の催奇形性・遺伝病の誘発につながる可能性がある。遺伝毒性の評価法は様々であるが，中でもサルモネラ菌を用いる Ames 試験は，簡便性，迅速性，経済性に優れているために特によく用いられている。化学物質による遺伝毒性はそれ自身ではなく，薬物代謝酵素によって代謝活性化されることによって発現するケースが多い。そのため，Ames 試験等の遺伝毒性試験では Hazard（有害性）あるいは潜在的风险を検出・確認する目的のため，化学物質の遺伝毒性を感度よく検出できるように薬物代謝酵素を誘導したラット肝 S9 (9000 x g 上清画分) が通常用いられている。しかし，種々の薬物代謝酵素の発現量に種差があることは既知の事実であり，酵素誘導ラット S9 による化合物の代謝がヒトでの代謝と異なる場合も多いと考えられる。したがって，ヒトに対する遺伝毒性のリスク評価を行うには，酵素誘導ラット S9 を用いる現状の方法に加え，代謝的観点からヒト S9 を遺伝毒性試験へ適用することは大きな価値があると考えられる。現在，ヒトミクロソームを用いる代謝研究は数多く行われているものの，ヒト S9 の遺伝毒性研究への利用は意外にも最近まで利用可能なデータが乏しいのが実情であった。この理由として，最近まではヒト S9 を含むヒト資源が一般的には入手しにくい状況であったことが挙げられる。

こうしたことから，我々はヒト S9 を用いる遺伝毒性試験の基礎的なデータの収集を 1997 年から HAB 協議会と開始し，昨年には日本環境変異原学会・微生物変異原性試験研究会に所属する 25 機関と HAB 協議会との共同研究も行った。これらの研究内容はマスコミにも取り上げられ，我々の研究結果では議論されていない内容が一部混在していたものの，安全性評価に関する社会的関心の高さの再認識と，こうした研究にヒト資源を有効利用することへの国民の理解に僅かながらも貢献できたのではないとか感じている。

本講演では，ヒト肝 S9 を用いる遺伝毒性試験，特に Ames 試験について現在までに得られた知見及び考察について報告したい。主な結論及び考察は以下のよう

- (1) HAB 協議会 , In Vitro Technologies, XenoTech の独立した 3 研究機関でドナー肝をプールして調製されたヒト肝 S9 を用いて変異原物質の Ames 試験を行った結果 , 変異原性の強さはほぼ一致していた。このことから , ドナー肝の摘出から搬送 , S9 調製までの過程における S9 の酵素活性の安定性に関する技術的問題点は特にないと考えられる。
- (2) ヒト肝 S9 を Ames 試験に用いた時 , 以前は雑菌の混入と陰性対照の復帰変異コロニー数の増加が認められた場合が時にあった。この問題点は従来の S9 調製法の簡単な改良 ( 遠心操作を 1 回追加し , 脂肪の徹底除去を行うこと ) によって解決できた。
- (3) 酵素活性が高いドナーから得たヒト肝 S9 (lot HLS-014) , 概ね平均的酵素活性を示す 3 人のドナーから得たヒト肝 S9 (lot HLS-003, HLS-008, HLS-012) , 比較として Phenobarbital 及び 5,6-Benzoflavone で酵素誘導したラット肝 S9 及び通常 (非処理) のラット肝 S9 を 1 mg protein/plate で , 典型的変異原物質 12 種類の Ames 試験を行った。これら S9 による変異原性の強さを比較すると , 75% (= 9/12) の化合物については , 酵素誘導ラット HLS-014 通常ラット HLS-003 , HLS-008 , HLS-012 の順であった。一方 , 他の化合物 (一部の芳香族アミンやニトロソアミン) の変異原性の強さは , HLS-003 , HLS-008 , HLS-012 , HLS-014 通常ラット 酵素誘導ラットの順であった。
- (4) 18 人のドナーから得られたヒト肝 S9 を用いて Ames 試験を行った結果 , 変異原性には大きな個人差が認められ , 化学構造によってその差に違いがあった。
- (5) 酵素活性が高いドナー肝のヒト S9 (lot HLS-014) , 15 人のドナー肝をプールして調製したヒト肝 S9 , 比較として Phenobarbital 及び 5,6-Benzoflavone で酵素誘導したラット肝 S9 を 1 mg protein/plate で , 約 60 種の発癌・変異原物質の Ames 試験を行った。その結果 , これら 3 種類の S9 による変異原性の強さを比較すると , 75% の化合物は薬物代謝酵素を誘導したラットの方がヒトよりも強かったが (例 ; 一部の芳香族炭化水素やヘテロサイクリックアミン) , 25% は逆にヒトの方が強い場合 (例 ; 一部の芳香族アミンやニトロソアミン) があった。
- (6) ドナー肝をプールして調製したヒト S9 は , 変異原物質に平均的感受性をもつヒトに対する変異原性のリスク評価を行うのに有用である。さらに , 酵素活性の高いドナー肝を用いて , 変異原物質に感受性の高いヒトに対するリスク評価を併せ行うことにより , 変異原物質に対する感受性の個人差を推測できる可能性がある。

- (7) 各ヒト肝 S9 中に含まれている P450 の分子種特異的酵素活性と変異原性の強さは必ずしも相関しなかった。この理由として、変異原物質の代謝活性化には複数の P450 分子種が関与し得る複雑な反応であることや、代謝活性化と同時に解毒代謝も進行していることが考えられる。このことは種々の薬物代謝酵素を含む混合系として、S9 を用いるリスク評価の有用性を示唆している。
- (8) ヒト肝 S9 と酵素誘導ラット肝 S9 による変異原性の強さの差は、ヒト肝 S9 が酵素誘導ラット肝 S9 に比べて S9 蛋白等量当たりの Total P450 量が少ないこと（量的な差）と Total P450 等量当たりでの変異原性の強さの違い（質的な差）の両者に起因すると考えられる。
- (9) ヒト肝 S9 は Ames 試験だけでなくマウスリンフォーマ試験においても有用であったことから、哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験にも適用可能である。

以上の結果から、代謝活性化系として酵素誘導ラット肝 S9 の使用は感度と簡便さから遺伝毒性試験を行う際の第一選択になるものの、ヒトへの暴露量が多い化学物質、暴露人口の多い化学物質等については、補完的にヒト S9 を用いる評価も重要であると考えられる。現状の遺伝毒性試験では高感度な試験系を用いる Hazard の確認、すなわち定性的リスク評価が主な目的であると思われる。しかし、より定量的で、かつ試験系の差（例えば、酵素誘導ラットとヒトの種差）を考慮したリスク評価系を構築することが重要であると考えられる。ヒトの個体（個人）差や in vitro から in vivo への外挿等今後検討する課題はまだ多いものの、化学物質の遺伝毒性評価に S9 を含むヒト由来資源を用いることは有力な手段であると期待される。