

ヒトS9を用いるAmes試験の共同研究 - 総括及び進捗状況 -

エーザイ(株) 開発安全性研究部

羽倉 昌志
HAKURA ATSUSHI

第29回微生物変異原性試験研究会BMS定例会
(2002年11月26日)

遺伝毒性試験ガイドライン (抜粋)

3) 試験法

...

代謝活性化系の存在下及び非存在下について試験を行う。

代謝活性化の存在下で行う試験には、適切な薬物代謝酵素誘導剤 (例えば、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンとの併用など) で処理したげっ歯類 (通常ラット) 肝ホモジネート9000 x g 上清画分 (S9) に補酵素などを加えたS9 mixを用いる。...

注) ... また、ハムスターやマウスの肝S9の方がラットよりも代謝活性化が適切な場合 (例えばフェナセチンやハロゲン化合物類など) がある。...

Hazard (有害性) あるいは潜在的な遺伝毒性リスクを検出 確認するのが目的

ヒトS9を用いる共同研究の進行状況及び今後の計画

第1回Ames試験共同研究(BMS) : 共同研究参加費用 (S9や投稿費等)を3万円徴収

- 2000年10月 :共同研究参加機関を確認し,最終計画書を完成
- 2000年11月13日 :第26回BMS研究会で進行状況説明
- 2000年12月中旬 :S9の各研究機関への送付
- 2000年3月末 :データ収集ほぼ完了
- 2001年6月1日 :第27回BMS研究会で中間発表
- 2001年10月22日 :第8回ICEM (静岡)で発表
- 現在 論文執筆中

第2回Ames試験共同研究(BMS) :共同研究参加費用 (S9や投稿費等)を4万円徴収

- 2002年1月 :共同研究参加機関を確認し,最終計画書を完成
- 2002年3月上旬 :S9の各研究機関への送付
- 2002年6月上旬 :データ収集ほぼ完了
- 2002年6月21日 :第28回BMS研究会で中間発表
- 2002年11月28日 :環境変異原学会第31回大会で発表予定

第2回ヒト培養細胞共同研究(MMS) :共同研究参加費用 (S9費等)を5万円徴収

- 2002年6月中旬 :共同研究参加機関を確認し,最終計画書を完成
- 2002年7月 :S9の各研究機関への送付
- 2003年3月下旬 :データ収集の目処?
- 2003年 環境変異原学会第32回大会で発表予定

第1回ヒトS9を用いるAmes試験の共同研究

60種の発癌・変異原物質の各種肝S9存在下でのAmes試験

(酵素誘導ラット vs 高酵素活性ヒト vs 平均的ヒト)

実験方法

【アッセイ化合物】

60種の発癌・変異原物質 (ARCで議論された発癌物質が中心)

【使用菌株】

TA100、TA98 あるいは YG7108 (アルキル化剤高感受性株)

【使用 S9】S9 mix 中の S9 濃度は 10% で、添加した S9 タンパク量は全て 1 mg/plate に統一。

(1) Pooled human liver S9 (lot. HLSP) :

HAB 協議会で保有していた 18 種類の donor 肝の中で、15 種類のヒト肝を pool して調製した S9

(2) Human liver S9 (lot. HLS-014) :

HAB 協議会で保有していた 18 種類の donor 肝の中で、最も強い変異原性を示した (高い酵素活性を有していた) donor から調製した S9 (Ref. A. Hakura *et al.*, Regul. Toxicol. Pharm., (in press))

(3) Induced Rat liver S9 (lot. 00102708) :

Phenobarbital 及び 5,6-Benzoflavone で酵素誘導したラット肝 S9 (オリエンタル酵母)

ヒトS9を用いるAmes試験第1回共同研究

(日本環境変異原学会・微生物変異原性試験研究会会員とHAB協議会との共同研究)

共同研究世話人：羽倉昌志、島田弘康、中嶋 圓、須井 哉、北本幸子

共同研究協力者：【HAB協議会】佐藤哲男、鈴木 聡

共同研究参加者：

| 氏名1 | 氏名2 | 氏名3 | 氏名4 | 氏名5 | 所属機関 |
|-----------|--------------|-------|-------|-------|----------------------|
| 1 羽倉昌志* | 澤田繁樹 | 杉原忠一 | 堀 雄二 | 内田加奈子 | エーザイ(株) |
| 2 橋本典子* | 守永太賀彦 | | | | 環境バイリス研究所 |
| 3 小林一男* | 高島佳代子 | 沖野ゆかり | 小沢重成 | | キッセイ薬品工業(株) |
| 4 加藤幸彦 | 安藤福久枝* | 小林孝子 | | | キャノン(株) |
| 5 井上晴貴* | Golam Sarwar | 高野睦美 | | | (株)実医研 |
| 6 中嶋 圓 | 田中 仁* | 春田由美江 | | | (財)食品農医薬品安全性評価センター |
| 7 須井 哉* | 米屋 浩子 | 原 巧 | | | (財)食品薬品安全センター |
| 8 西郷和彦 | 鳥越直彦* | | | | (株)新日本科学 |
| 9 北本幸子* | 太田美佳 | | | | 住友化学工業(株) |
| 10 三浦美樹* | 五十嵐美由紀 | 伊東 悟 | 中山志保 | 林崎弥生 | 第一製薬(株) |
| 11 橋本清弘* | 大澤浩一 | | | | 大正製薬(株) |
| 12 片見 誠* | 神本敏弘 | | | | (株)ツムラ |
| 13 土子郁子* | | | | | 東洋インキ製造(株) |
| 14 吉田知佳子* | 殿山晴美 | 荒木春美 | | | 富山化学工業(株) |
| 15 斉藤優子* | | | | | 日研化学(株) |
| 16 小川いづみ | 久保田理恵* | | | | 日産化学工業(株) |
| 17 金代由樹子 | 高橋美津子 | 松下佳代 | 佐藤秀隆* | | (財)日本食品分析センター |
| 18 山下康弘* | 田村英之 | | | | 日本新薬(株) |
| 19 佐竹聖人* | | | | | 日本バイエルアグロケム(株) |
| 20 小島肇夫* | | | | | 日本メナード化粧品(株) |
| 21 中村真人* | | | | | (社団)日本油料検定協会総合分析センター |
| 22 藤田正晴* | 柳川昌子 | 曾我ふじ子 | | | 富士写真フイルム(株) |
| 23 坂田 武* | 犬童正臣 | | | | (株)富士バイオメディックス |
| 24 大崎利隆* | | | | | ホーユー(株) |
| 25 晴佐久 満* | 山本康人 | | | | ライオン(株) |

*：各機関の連絡担当者

第2回ヒトS9を用いるAmes試験の共同研究

目的

- (1) 強い変異原性を示す (酵素活性の高い) ヒトS9による変異原性の強さの差を比較する。HLS-014 (第1回共同研究) vs **HLS-059** (第2回共同研究)
- (2) 変異原性のS9濃度依存性 (ヒトS9を試験に用いるときの最適濃度) を調べる。10% (第1回共同研究) vs **(1), 3, 10, 30%** (第2回共同研究)
- (3) **より多くの芳香族アミン類**のヒト及びラットS9存在下での変異原性を調べる。
- (4) 酵素誘導ラット vs **正常(非処理)ラット** vs 強い変異原性を示す (高い酵素活性をもつ) ヒトドナー vs ヒト(pooled)の各S9存在下での化学物質の変異原性の強さを比較する。

第2回ヒトS9を用いるAmes試験共同研究参加者

共同研究世話人 羽倉昌志, 島田弘康, 中嶋 圓, 須井 哉, 北本幸子

共同研究機関 (ヒトS9供給) HAB協議会 (佐藤哲男, 鈴木 聡)

共同研究参加機関 (* 連絡者)

| 氏名1 | 氏名2 | 氏名3 | 氏名4 | 所属機関 |
|-----------|--------------|---------|--------|------------------------|
| 1 羽倉昌志* | | | | エーザイ(株) 開発安全性研究部 |
| 2 酒井美雪* | 藤本裕子 | 米野雅晴* | | 小野薬品工業(株) 福井安全性研究所 |
| 3 橋本典子* | 守永太賀彦 | | | (株) 環境バイリス研究所 |
| 4 小林一男* | 高島佳代子 | 寺島ゆかり | 安江香里 | キッセイ薬品工業(株) 安全性研究所 |
| 5 井上晴貴* | Golam Sarwar | 霞 晶弘 | | (株) 実医研 |
| 6 中嶋 圓 | 田中 仁* | 仲村渠 奈美子 | 春田 由美江 | (財) 食品農医薬品安全性評価センター |
| 7 須井 哉* | 大山徳子 | 原 巧 | | (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 |
| 8 西郷和彦* | 鳥越直彦 | | | (株) 新日本科学 |
| 9 北本幸子* | | | | 住友化学工業(株) 生物環境科学研究所 |
| 10 橋本清弘* | 大澤浩一 | | | 大正製薬(株) 医薬研究所 |
| 11 林崎弥生* | 伊東 悟 | | | 第一製薬(株) 安全性研究所 |
| 12 土子郁子* | | | | 東洋インキ製造(株) 開発研究所 |
| 13 小川いづみ | 久保田理恵* | | | 日産化学工業(株) 生物科学研究所 |
| 14 田村英之* | | | | 日本新薬(株) 安全性研究部 |
| 15 佐竹聖人* | | | | 日本バイエルアグロケム(株) 結城中央研究所 |
| 16 小島肇夫* | | | | 日本メナート化粧品(株) 総合研究所 |
| 17 中村真人* | 祝原 修 | 堤 稚香子 | | (社) 日本油料検定協会 総合分析センター |
| 18 大崎利隆* | | | | ホーユー(株) 総合研究所 |
| 19 晴佐久 満* | 山本康人 | | | ライオン(株) 安全性評価センター |

ヒトS9を用いる変異原性試験 (総括)

スクリーニングの目的

酵素誘導ラット肝S9

ヒトに対する影響をより探る目的

ヒト肝S9

変異原性に大きな差
(酵素誘導という特殊
要因と種差による)が
化合物に依存して存在

変異原性に大きな個人差が
化合物に依存して存在

酵素活性の高いヒトサー肝S9

HLS-014 or HLS-059等

ヒト(pooled)肝S9

変異原性はS9濃度依存性 :10% 酵素誘導ラットS9と比較を行う目的
30% ;ヒトでは陰性であることを示す目的

変異原性の大きな差の要因 :薬物代謝酵素の量と質 (組成)

観察するEndpointによる差はありそう → 第2回ヒト細胞MMS共同研究発足

日本環境変異原学会2002年度スローガン :国際化とヒト化への挑戦