

平成 30 度 厚生労働科学研究費（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：香料等の遺伝毒性・発がん性短・中期包括的試験法の開発と、その標準的安全性
評価法の確立に関する研究

分担研究課題名：Ames試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子変異試験の共同
研究組織の構築および実験プロトコル評価

分担研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック試験は負担が大きいと考えられる。少なくともその陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in vivo* 試験を避けることができる可能性がある。Ames 試験陽性の非発がん性物質を、ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験（チミジンキナーゼ遺伝子(TK)変異試験）でフォローアップし、ほ乳類細胞でも同様に変異原性を示すかどうかを検証すべきと考えられる。よって、本年度ではデータベースから抽出された Ames 試験陽性の非発がん性 10 物質について TK 変異試験を実施するために、共同研究組織を立ち上げ、その TK 変異試験のプロトコルの評価と共有化を行った。また、暫定的ではあるが、その試験結果の一部を報告する。共同研究組織で使用する実験プロトコルを共有化することによって、安定したデータが得られた。10 物質中 4 物質の暫定結果が得られ、その 4 物質中の 3 物質が陽性であった。その結果は、Ames 試験と一致率が高く、発がん性試験の結果とは一致しなかった。暫定的ではあるが、TK 変異試験が Ames 試験陽性のフォローアップ試験として十分かは不確実である。

キーワード:チミジンキナーゼ遺伝子変異試験、Ames 試験、フォローアップ試験

A . 研究目的

Ames 試験陽性の結果は、医薬品等の開発に大きな影響を与え、適切なフォローアップが必要となるが、*in vivo* トランスジェニック試験は負担が大きいと考えられる。少なくともその陽性反応がバクテリア特異的反応である場合、ヒトへの外挿性が低いことを証明し、無駄な *in vivo* 試験を避けることができる可能性がある。一方、Ames 試験と発がん性の特異性 (Specificity; Ames 試験陰性で発がん性陰性)は 80%程度で有り (Kirkland *et al.*, *Mutat Res* 584,

1-256 (2005))。これは Ames 試験陽性で発がん性陰性であるものは比較的少ないことを示している。それでも、バクテリア特異的な陽性反応であり、ヒトの発がんとは無関係なものは存在する。バクテリア特異的な陽性反応として、AMP397 で報告されるようなバクテリア特異的ニトロリダクターゼ反応がある (Suter *et al.*, *Mutat Res* 518, 181-194 (2002))。この酵素が Ames 試験の変異原性に強く関与する場合、他の遺伝毒性試験では陰性を示すことが多く、発がん性のリスクは低い。

実際に、Ames 試験陽性で発がん性陰性の物質にはニトロ芳香族や芳香族アミン類が多いことが知られている。しかしながら、ニトロ芳香族、芳香族アミン類の中には発がん性を示すものも多く存在している。このように、同じ Ames 試験陽性でありながら、何故発がん性の有無に違いがあるのかは不明である。つまり、Ames 試験陽性の非発がん性物質を、ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験（チミジンキナーゼ遺伝子(TK)変異試験）でフォローアップし、ほ乳類細胞でも同様に変異原性を示すかどうかを検証すべきと考えられる。よって、本年度ではデータベースから抽出された Ames 試験陽性の非発がん性物質のうち、10 物質について TK 変異試験を実施するために、共同研究組織を立ち上げ、その TK 変異試験のプロトコルの評価と共有化を行った。また、暫定的ではあるが、その試験結果の一部を報告する。

B．研究方法

1．共同研究組織の構築

Ames 試験陽性の非発がん性物質（10 物質；表 1 参照）が多数におよぶため、日本環境変異原学会の分科会である MMS 研究会で共同研究を提案した。キックオフ会議を行い、共同研究組織を立ち上げ、TK 変異試験を分担するために各施設で担当する物質を決定した。

表 1．非発がん性であるにも関わらず Ames 試験陽性の物質

No.	物質名	CAS No.
1.	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	140-49-8
2.	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3
3.	2,6-Diaminotoluene	823-40-5
4.	2,5-Diaminotoluene	95-70-5
5.	HC blue no.2	33229-34-4
6.	8-Hydroxyquinoline	148-24-3
7.	Iodoform	75-47-8
8.	4-nitroanthranilic acid	619-17-0

9.	1-Nitronaphthalene	86-57-7
10.	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9

2．TK 変異試験プロトコルの評価と共有化
共同研究で使用する TK 変異試験の実験プロトコルは、OECD ガイドライン TG-490（チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験）に基づくが、より実験施設間のデータばらつきを最小にするために、実験条件や操作方法をさらに確認・評価し、共同研究組織内で現実的に利用できる実験プロトコルを共有化した。

C．研究結果

1．共同研究組織

非発がん性であるにも関わらず Ames 試験陽性を示す 10 物質について、TK 変異試験でフォローアップ試験をする共同研究組織を構築した。製薬会社、総合化学メーカー、および CRO 会社など下記の計 10 社の参加が決定した。

- ・ボゾリサーチセンター
- ・日本たばこ産業
- ・イナリサーチ
- ・CERI
- ・アステラス製薬
- ・ヤクルト本社
- ・中外製薬
- ・帝人ファーマ
- ・LSI メディエンス
- ・安評センター

2．本共同研究で使用する TK 変異試験プロトコル

共同研究組織内の実験プロトコルは、おもに各共同研究施設の SOP で実施してよいが、少なくとも次の実験操作について確認し、共有化した。

2 - 1．細胞と培養

TK6 細胞を購入する際は、JCRB 細胞バンク

より購入する。細胞は、10% 馬血清 (JRH Bioscience; ロット#16J196 を用いる) 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (メーカー問わず) を含む RPMI 培地 (メーカー問わず) で培養する (37 度、5% CO₂)。

2 - 2 . 被験物質の処理方法

被験物質の処理は、表 2 に示した方法を参考にして実施する。細胞液の濃度や容量は適宜変更して構わないが、処理する細胞数は 2×10^7 cells とする。被験物質を注射用水 (メーカー問わず) あるいは DMSO (メーカー問わず) で溶解後、S9mix (オリエンタル酵母工業(株)) の存在下、あるいは非存在下 (150 mM KCl) において、対数増殖期にある TK6 細胞に暴露し、4 時間培養する。処理中の振とう・非振とうは、結果への影響が少ないため施設の自由とする。

用量設定試験は、陰性対照と被験物質は 1 系列で行い、陽性対照は実施しない。本試験は、陰性対照は 2 系列、被験物質は 1 系列で行う。陽性対照物質は、表 3 に示したように、代謝活性化条件ではシクロホスファミド (CP)、非代謝活性化条件ではメタンサルホン酸メチル (MMS) の製品と製造ロットを使用する。

被験物質の処理後、遠心分離し、上清を除去後、無血清培地で細胞を洗浄する。遠心分離の条件は、例えば 1000 rpm、5 分間で実施する。再度、その細胞懸濁液を遠心分離し、上清を除去後、10% 血清を含む培地 50 ml で細胞を分散させ細胞濃度を測定する。その 50 ml (濃度約 4×10^5 cells/ml) の処理細胞は、37 度、5% CO₂ で培養を開始し、TK 変異試験に用いる。それとは別に、平板効率 Cloning Efficiency (CE) を計算するため (式 1)、約 1.6 cell/ウェルの濃度で 96 ウェルマイクロプレートで 2 週間培養する。

表 2 . 被験物質の処理例

細胞液(約 4×10^6 cells/mL)	5 mL
RPMI-0 (無血清培地)	3.3 mL

S9 mix あるいは 150 mM KCl	1.5 mL
被験液	0.2 mL
処理容量	10 mL

表 3 . 陽性対照物質の情報

非代謝活性化	名称：メタンサルホン酸メチル(MMS) ロット番号：M0369 製造元：東京化成工業株式会社 製品コード：M0369
代謝活性化	名称：シクロホスファミド水合物(CP) ロット番号：PTR2478 製造元：和光純薬工業株式会社 販売コード：030-12953

2 - 3 . 細胞相対生存率の測定

細胞のコロニー形成率である CE は、ポアソン分布の式に従い、式 1 を用いて算出する。EW は、コロニーを含まないウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル当たりの平均細胞数 (N = 1.6 で実施) である。

$$CE = -\ln(EW / TW) / N \quad \dots (式 1)$$

また、暴露処理中の細胞毒性が強い場合など、細胞数消失があるため、次の計算式 (式 2) で CE を補正する。“処理終了時の細胞数” は、前述の「2 - 2 . 被験物質の処理方法」において処理終了時の遠心分離後に得られた細胞数である。“処理開始時の細胞数” は、 2×10^7 cells (表 2) である。

$$\text{補正 CE} = CE \times \text{処理終了時の細胞数} / \text{処理開始時の細胞数} \quad \dots (式 2)$$

TK 変異試験では、細胞生存率を調べるために、処理直後に細胞を播く CE0 播種、および処理してから 3 日後に細胞を播く CE3 播種がある。被験物質で処理された直後の細胞相対生存率 RS0 (%) は、CE0 から算出され、次の式 3 で

計算する。陰性対照（注射用水）の生存率を 100 % と定義する。なお、細胞毒性がある場合、RS0 = 20 ~ 10% の用量を最高用量として設定する。

なお、RS0 = 20 ~ 10% で細胞毒性が強い、あるいは再現性が低い等で試験続行が困難な場合は、後述する RTG = 20 ~ 10% となる用量を最高用量として TK 変異試験を実施してもよい。

$$RS0 (\%) = \text{処理培養の補正 CE0} / \text{溶媒対照の補正 CE0} \times 100 \quad \dots (式 3)$$

2 - 4 .TK 変異試験、および細胞毒性指標 RSG と RTG) の測定

前述の細胞相対生存率 RS0 の他に、被験物質処理による細胞毒性の指標として、式 4 に示す Relative Suspension Growth (RSG) と Relative Total Growth (RTG) を算出する。被験物質を処理後、細胞を 3 日間培養する。その際に、浮遊細胞増殖比 1 (SG1) は、0 日目から 1 日目の増殖比 (1 日目の細胞濃度 / 0 日目の細胞濃度) で、浮遊細胞増殖比 2 (SG2) は 1 日目から 2 日目の増殖比 (2 日目の細胞濃度 / 1 日目の細胞濃度) である。RSG は無処理 / 溶媒対照に対する処理培養の総 SG (SG1 × SG2 × SG3) である (式 4)。

RTG は、式 5 で示したように、RSG と RS3 (式 3 と類似) の積で算出する。

$$RSG = [SG1(\text{処理}) \times SG2(\text{処理}) \times SG3(\text{処理})] / [SG1(\text{対照}) \times SG2(\text{対照}) \times SG3(\text{対照})] \quad \dots (式 4)$$

$$RTG (\%) = RSG \times \%RS3 \quad \dots (式 5)$$

$$RS3 (\%) = \text{処理培養の CE3} / \text{溶媒対照の CE3} \times 100 \quad \dots (式 6)$$

培養 3 日目では、平板効率を求めるための CE3 プレート (CE0 と同様に細胞の CE3 播種を

行う) と突然変異体検出用の Mutant Frequency (MF) プレートを作成する。MF プレートは、TFT 試薬 3 µg/ml の存在下で、1 ウェルあたり 40,000 細胞になるように 96 ウェルマイクロプレートに播種する。

生育したコロニーを含むウェルは、培地の色が赤色から黄色に明らかに変わるため、その色調変化でコロニーの有無 (EW) をカウントする。CE0 と CE3 プレート、および TFT を含む MF プレートは細胞播種してから 14 日後にコロニーを観察する。培地に色調変化のあったウェルのコロニーを NG 変異コロニー (Normally Growing Mutant Colonies) としてカウントする。また、その MF プレートの各ウェルに 30 µg/mL TFT 試薬を 25 µL ずつ再添加し、さらに 14 日間培養する。細胞播種してから計 28 日後、先と同様に培地の色調変化によって生育コロニーを観察し、それを SG 変異コロニー (Slowly Growing Mutant Colonies) としてカウントする。

MF プレートの突然変異コロニーは、ポアソン分布に従い、式 7 を用いて算出する。EW は、コロニーを含まないウェル数であり、TW は総ウェル数である。N は、1 ウェル当たりの平均細胞数 (本実験では N = 40,000) である。

MF は、下記のように総遺伝子突然変異頻度 (T-MF)、NG コロニーの遺伝子突然変異頻度 (N-MF)、SG コロニーの遺伝子突然変異頻度 (S-MF) の 3 つを算出できる。

$$MF = [-\ln (EW / TW) / N] / \text{処理培養の CE3} \quad \dots (式 7)$$

$N-MF; EW_N = 192 - A$
 $TW_N = 192$
 $S-MF; EW_S = (192 - A) - B$
 $TW_S = 192 - A$
 $T-MF; EW_T = 192 - (A + B)$
 $TW_T = 192$
 (192 個のウェルのうち 14 日後の観察で NG コロニーを含むウェルが A 個、28 日後の観察時に SG コロニーのみを含むウェルが B 個出現したとする)

2 - 5 . 統計解析方法

TK 変異試験の本試験は、陰性対照を 2 系列、被験物質を 1 系列で行うため、大森法(Omori *et al.*, *Mutat Res* 517, 199-208 (2002))を用いる。

3 . 進捗状況

途中段階であるが、上の実験プロトコールを使用して TK 変異試験した暫定的な結果(10 物質中 4 つ)を表 4 に示した。4-(Chloroacetyl)-acetanilide は陰性であったが、残りの 3 物質(2-(Chloromethyl)pyridine HCl、HC blue no.2、4-nitroanthranilic acid)は、陽性であった。その他の物質は、実験中である。

表 4 . Ames 試験陽性の非発がん性物質に対する TK 変異試験(暫定結果)*

No.	物質名	短時間処理		長時間処理
		-S9	+S9	
1.	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	陰性	陰性	陰性
2.	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	陽性	陽性	未実施
3.	2,6-Diaminotoluene	-	-	-
4.	2,5-Diaminotoluene	-	-	-
5.	HC blue no.2	陰性	陰性	陽性
6.	8-Hydroxyquinoline	-	-	-
7.	Iodoform	-	-	-

8.	4-nitroanthranilic acid	陰性	陰性	陽性
9.	1-Nitronaphthalene	陰性	陰性	-
10.	4-Nitro-o-phenylene diamine	-	-	-

*表中の” - ”は実験中であることを示す

D . 考 察

データベースから得られた非発がん性であるにも関わらず Ames 試験陽性の物質は、実際には 10 物質以上見つかったが、購入が不可能なこと、常温で気体であることなど、TK 変異試験を実施するのに困難な物質があったため、除外した。

TK 変異試験のヒストリカルデータについて、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部、およびヒストリカルデータを有する共同研究機関のデータを総合して、陽性対照群の T-MF 値の範囲を計算した。その結果、各陽性対照物質の T-MF 値は、非代謝活性化条件(4 時間処理)の MMS 処理(2.5 ~ 3 µg/ml)では 6 ~ 26 × 10⁻⁶ の範囲、そして、代謝活性化条件(4 時間処理)の CP 処理(2.5 ~ 3 µg/ml)では 7 ~ 22 × 10⁻⁶ の範囲、長時間処理の MMS 処理(2.5 ~ 3 µg/ml)では 13 ~ 52 × 10⁻⁶ の範囲であることが分かった。これら突然変異頻度の範囲値を利用して、共同研究で実施する TK 変異試験の成立条件として応用することにした。

TK 変異試験で陽性だった 3 物質(2-(Chloromethyl)pyridine HCl、HC blue no.2、4-nitroanthranilic acid)のうち、HC blue no.2 と 4-nitroanthranilic acid は、短時間処理(+/-S9mix)で陰性であったが、S9mix を添加しない長時間処理では陽性となった。つまり、4 時間処理では陰性だが、24 時間処理では陽性であり、その原因は現段階では不明である。おそらく長時間処理による酸化ストレス、あるいは被験物質の分解物による DNA 損傷の増加などが TK 遺伝子の変異頻度を上昇させた可能性が考えられた。

E. 結 論

TK 変異試験の詳細な実験条件や操作方法を共同研究組織内で評価し、実験プロトコルを共有化することによって、安定したデータが得られた。本共同研究において、10 物質中 4 物質の暫定結果が得られ、その 4 物質中の 3 物質が陽性であった。その結果は、Ames 試験と一致率が高く、発がん性試験の結果とは一致しなかった。暫定的ではあるが、TK 変異試験が Ames 試験陽性のフォローアップ試験として十分かは不確実である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 安井学, 鵜飼明子, 福田隆之, 馬庭二郎, 山

本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 小川久美子, 本間正充: Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験の有用性の検討: MMS 共同研究の報告. 日本環境変異原学会第 47 回大会 (2018.11.2)

2) 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之: Ames 試験陽性のフォローアップとしての TK6 細胞を用いた γ H2AX 評価系の有用性検討; MMS 共同研究オプション項目の報告. 日本環境変異原学会第 47 回大会 (2018.11.1)

H. 知的所有権の取得状況

なし