

Ames試験陽性のフォローアップに関するTK遺伝子突然変異試験の有用性の検討：MMS共同研究の報告

安井学¹, 鶴飼明子¹, 福田隆之², 馬庭二郎³, 山本春菜⁴, 今村匡志⁵, 藤島沙織⁶, 大谷尚子⁷, 成見香瑞範⁸, 松崎香織⁹, 岡田祐樹¹⁰, 中川宗洋¹¹, 上田摩弥¹², 小川久美子¹³, 本間正充¹

¹国衛研 変異遺伝部, ²ボゾリサーチセンター, ³アストラゼネカ, ⁴日本たばこ産業, ⁵イナリサーチ, ⁶CERI, ⁷アステラス製薬, ⁸ヤクルト本社, ⁹中外製薬, ¹⁰帝人ファーマ, ¹¹LSIメディエンス, ¹²安評センター, ¹³国衛研 病理部

要旨

Ames試験陽性にも関わらず発がん性試験陰性の化学物質では、代謝の違いなど、細菌と哺乳類の生物学的な違いが試験結果に影響している可能性が高い。そのため、Ames試験のフォローアップとして、ヒト細胞を用いる変異原性試験が有用と考えられる。ヒトリンパ芽球細胞TK6を用いる変異原性試験は、その標準法が確立されている。そこで本共同研究では、Ames試験が陽性、かつ齧歯類の発がん性試験が陰性である複数の化合物について、TK6細胞を用いたチミンキナーゼ遺伝子突然変異試験（TKアッセイ）を実施した。Ames試験陽性物質に対して、フォローアップ試験としての有用性について検討した。

研究目的

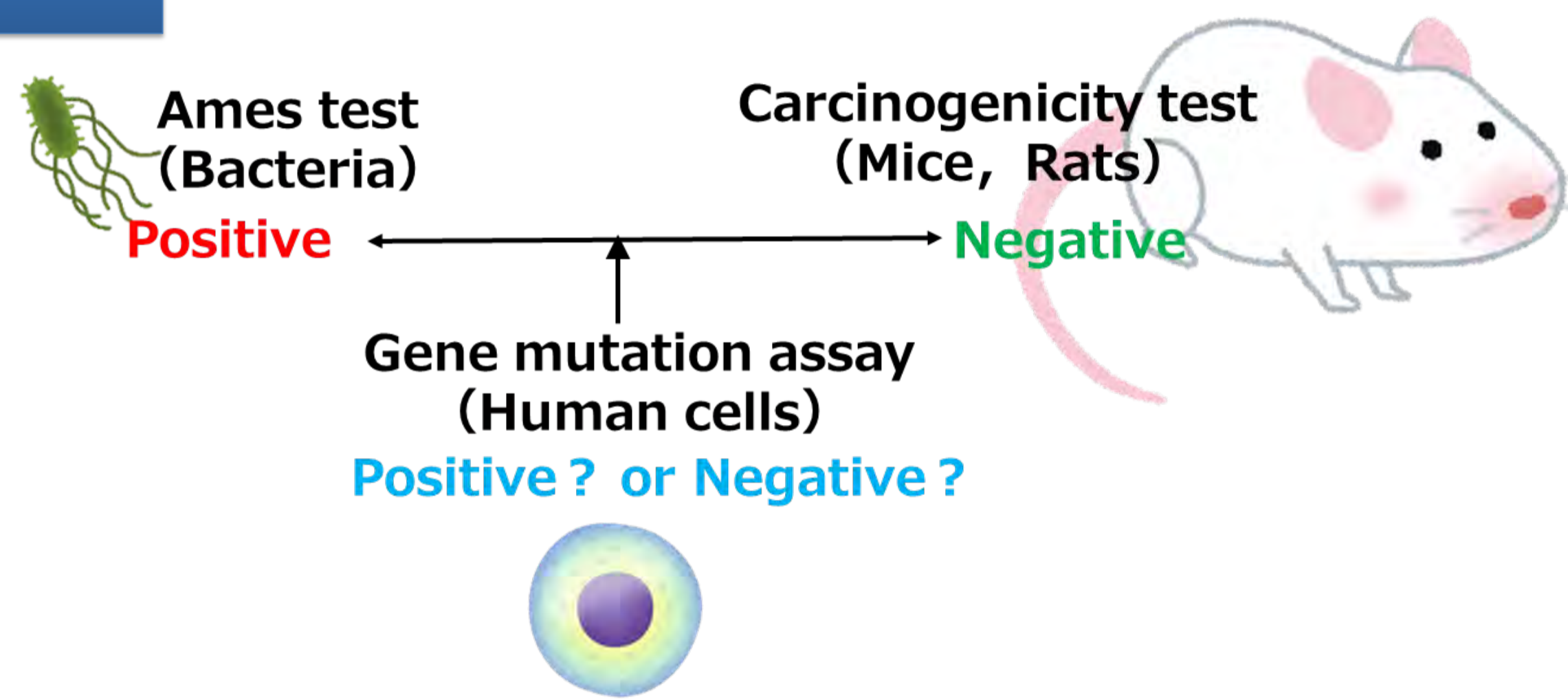


Fig.1 遺伝子変異-発がん性試験の比較（Ames菌株 vs 齧歯類 vs 培養細胞）

Ames試験陽性で発がん性試験陰性の化合物に対して、ヒト培養細胞でも変異原性を示すか？

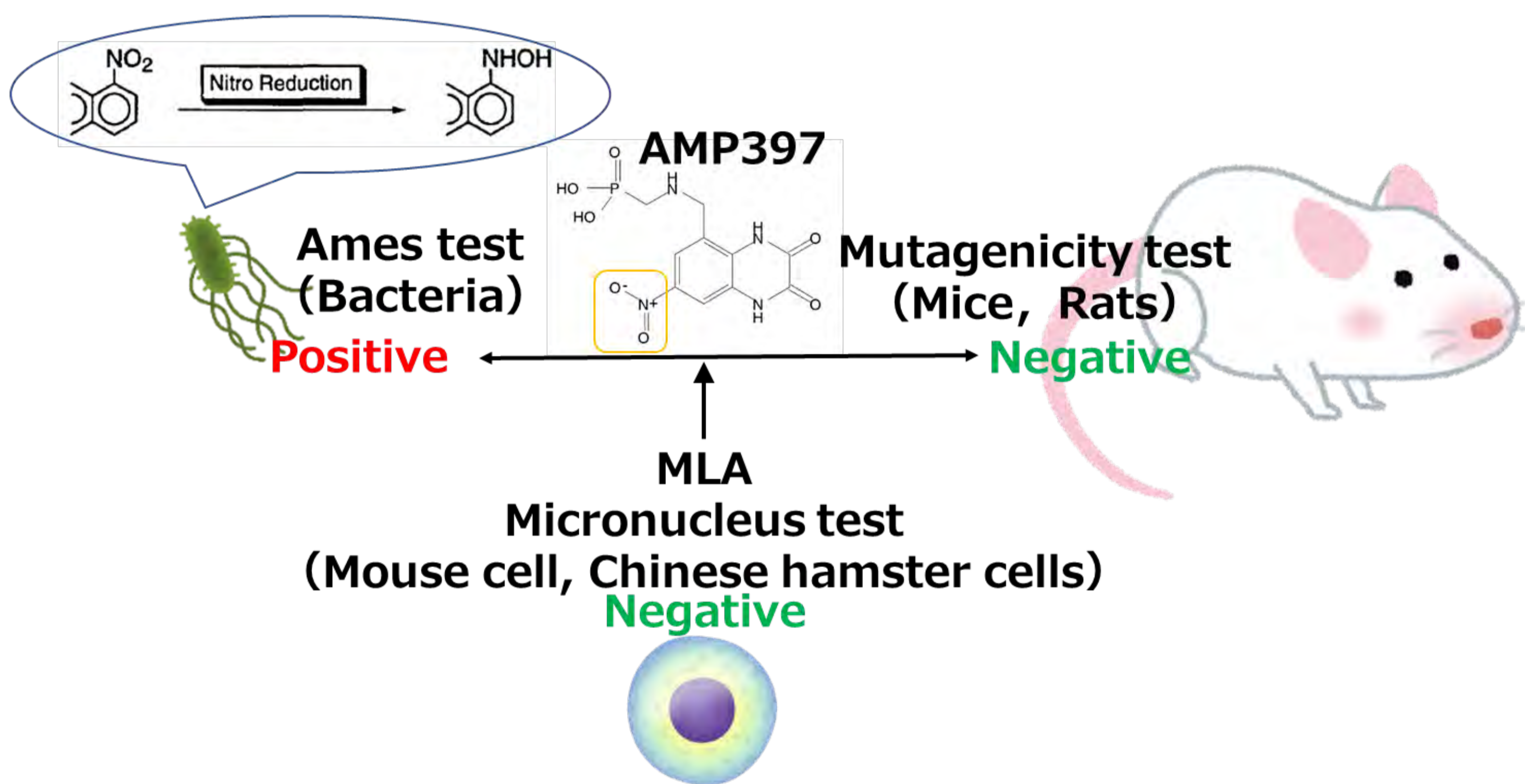


Fig.2 バクテリア特異的な反応でAmes試験だけ陽性になる場合
AMP397は、バクテリア特異的なニトリリダクターゼ活性により、Ames試験だけで陽性になるケースが報告されている(Suter et al., *Mutat. Res.* 518, 181-194 (2002))。

方法

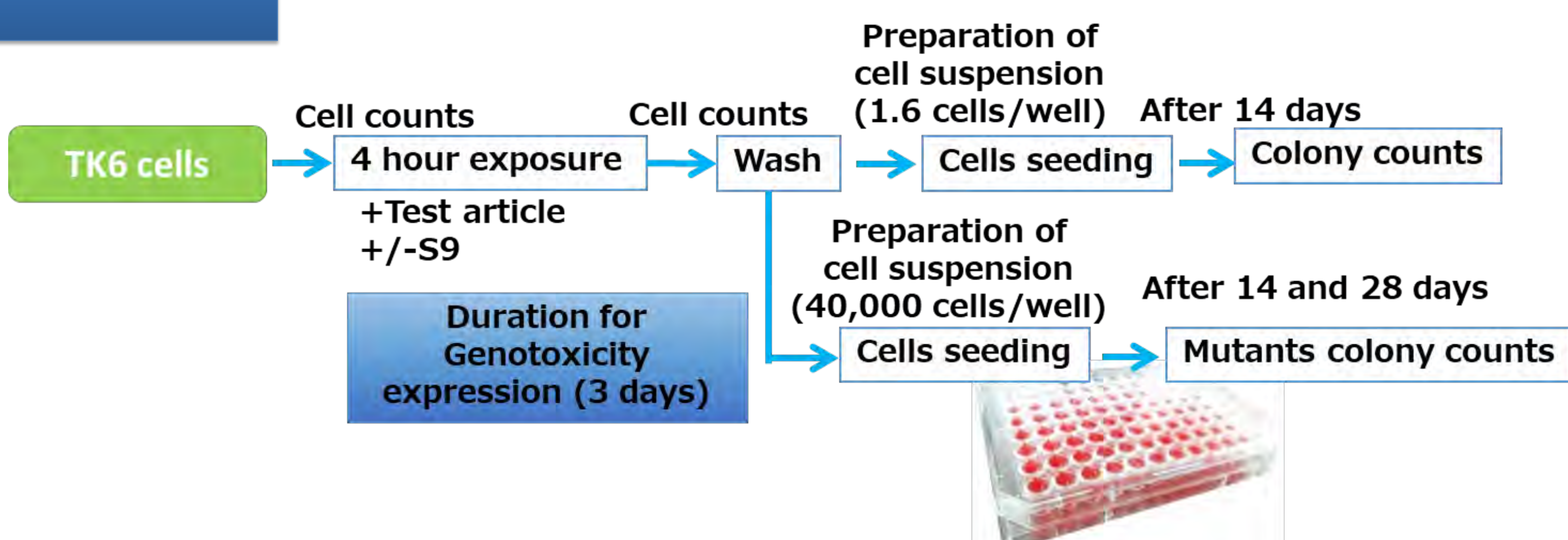


Fig.3 ヒトリンパ芽球細胞TK6を用いるTKアッセイの概要
OECD TG490を参考に、用量設定試験、本試験の順に実施した。処理細胞数は 20×10^6 細胞、処理時間は4および24時間で行った。TKアッセイ本試験の陰性対照は2系列、被験物質は1系列で実施した。形質発現期間は3日間とした。統計解析には大森法(Omori et al., *Mutat. Res.* 517, 199-208 (2002))を用いた。

Table 1 共同研究における試験実施施設および被験物質

No	共同研究者名	実施施設名	被験物質名 (Ames試験-陽性, かつ齧歯類発がん性試験-陰性)	CAS No.
1	今村 匡志	イナリサーチ	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	140-49-8
2	橋爪 恒夫 山本 春菜 濫谷 香里	日本たばこ産業	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6959-47-3
3	成見 香瑞範 藤石 洋平 岡田 恵美子	ヤクルト本社	2,6-Diaminotoluene	823-40-5
4	藤島 沙織	CERI	2,5-Diaminotoluene	95-70-5
5	山本 美佳 大谷 尚子	アステラス製薬	HC blue no.2 [AKA ethanol, 2,2'-((4-(2-hydroxyethylamino)-3-nitrophenyl)imino)di-]	33229-34-4
6	福田 隆之 中村 真生 西村 諒一	ボゾリサーチ センター	8-Hydroxyquinoline [AKA 8-quinolinil]	148-24-3
7	上田 摩弥	安評センター	Iodoform [AKA methane, triiodo-]	75-47-8
8	三島 雅之 松崎 香織 竹入 章 田中 健司	中外製薬	4-nitroanthranilic acid	619-17-0
9	岡田 祐樹 木本 崇文 中川 宗洋 濱田 修一 梶原 昭彦	帝人ファーマ	1-Nitronaphthalene	86-57-7
10		LSIメディエンス	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9

研究結果

Table 2 TKアッセイの結果

No.	被験物質名 Ames試験-陽性の条件	構造	短時間処理 (-S9 mix)	短時間処理 (+S9 mix)	連続処理
1	4-(Chloroacetyl)-acetanilide TA1537の±S9で陽性		陰性	陰性	陰性
2	2-(Chloromethyl)pyridine HCl TA100の±S9で陽性		陽性	陽性	-
3	2,6-Diaminotoluene TA100, TA97, TA98の+S9で陽性		実験中	実験中	実験中
4	2,5-Diaminotoluene TA98, TA1538の+S9で陽性		実験中	実験中	実験中
5	HC blue no.2 TA98の-S9で陽性		陰性	陰性	陽性
6	8-Hydroxyquinoline TA100, TA97の+S9で陽性		実験中	実験中	実験中
7	Iodoform TA100, TA1535, TA1537の+S9, TA98の±S9で陽性		実験中	実験中	実験中
8	4-nitroanthranilic acid TA100, TA1535の±S9で陽性		陰性	陰性	陽性
9	1-Nitronaphthalene TA98, TA100の+S9で陽性		陰性	陰性	実験中
10	4-Nitro-o-phenylenediamine WP2以外の株の±S9で陽性		陽性	陰性	陽性

結論

- ◆ 全ての結果はまだ得られていないが（10物質中5物質）、TKアッセイの結果は、5物質中4物質が陽性で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アッセイがAmes試験陽性のフォローアップ試験として十分かは不確定である。
- ◆ 今後、予定した全ての化合物を評価し、更にコメントアッセイ、γH2AXなどのデータも収集し、本実験データを詳細に分析したい。

謝辞

* 研究助成
・厚労科研費 (H30-食品-一般-003)

(2019年1月作成；禁転載)