

Enhanced Ames Testの陽性対照物質に対する 媒体添加量の影響

-Enhanced Ames Test (EAT) データ紹介-

2024. 7. 12 BMS研究会



メディフォード株式会社
藤本 透

Enhanced Ames Test (EAT)とは？

- European Medicines Agency (EMA)より2023年7月7日に発出
- 通常のAmes試験では検出しにくいニトロソアミン類の検出を目的とする
- OECD No. 471を強化した試験デザイン
 - 試験菌株：TA100, TA1535, TA98, TA1537, WP2 *uvrA*/pKM101
 - プレインキュベーション：30分
 - S9: ラット及びハムスターの2種使用，濃度30%
 - 陽性対照物質：2種のニトロソアミン類を使用，以下が例示されている
 - N-Nitrosodimethylamine (NDMA)
 - 1-Cyclopentyl-4-nitrosopiperazine (CPNP)
 - An NDSRI (ニトロソアミン原薬関連不純物)

EAT requirements	Conditions used in EAT	Comments
Strains: (e.g. <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 and <i>E. coli</i> WP2 uvrA (pKM101))		
Preincubation method, 30 min		
S9 rat (30%) hamster (30%)		
Solvent used and volume ¹ (μL) (a)		
Volume of preincubation mix (μL) (b)		
Solvent concentration in preincubation (% v/v) ¹		
Concentrations tested (μg/plate)		
Nitrosamine positive control 1 (μg/plate), including solvent concentration (% v/v) ^{2, 3}		
NDSRI positive control 2 (μg/plate), including solvent concentration (% v/v) ^{2, 3}		
Non-nitrosamine positive controls ^{2,4}		
Negative controls ²		
Result (positive/negative)		
¹ When an organic solvent is used, the lowest possible volume should be included in the preincubation mixture with justification to indicate that the volume of solvent does not interfere with metabolic activation of the N-nitrosamine. The organic solvent concentration (% v/v) should be calculated by dividing the applied solvent volume containing the test substance in the preincubation mix by the total volume of the preincubation mix i.e. (a/b)*100 e.g. if the test substance is applied in 100 μL organic solvent and the total preincubation mix volume is 700 μL, the solvent concentration is 14.3% (v/v)		
² Concurrent controls		
³ Solvent used for test substance and positive control should ideally be the same or justified if not.		
⁴ Positive control reference substance(s) e.g. as suggested by OECD 471 for assays employing a metabolic activation system.		

- 陽性対照の2種類目はNDSRIを適用する（ように見える）
- 有機溶媒を使用する場合，溶媒量がニトロソアミンの代謝活性化を阻害しないこと
- 被験物質と陽性対照の媒体は同じものを使用することが理想

課題1. 陽性対照物質の選択

■ 陽性対照の2種類目はNDSRIを適用する（ように見える）

The choice of the N-nitrosamine positive controls needs to be justified based on the anticipated metabolism of the N-nitrosamine and the cytochrome P450 enzymes most likely involved.

ニトロソアミン陽性対照は予想されるニトロソアミン（被験物質）の代謝と最も関与しそうな *cytochrome P450* 酵素に基づいて選択を正当化する。

- 被験物質/NDSRIのCYP経路の同定
- 媒体の検討
- 用量の検討
- 背景データ
- （おそらく）高額

⇒試験ごとに被験物質に応じた陽性対照を選択することは難しい
-NDMAとCPNPの選択が現実的では。

課題2. 有機溶媒の影響

- 有機溶媒を使用する場合、溶媒量がニトロソアミンの代謝活性化を阻害しないこと
- 被験物質と陽性対照の媒体は同じものを使用することが理想

When an organic solvent is used, the lowest possible volume should be included in the preincubation mixture with justification to indicate that the volume of solvent does not interfere with metabolic activation of the Nitrosamine.

有機溶媒を使用する場合は、その溶媒量がニトロソアミンの代謝活性化を妨げないことを示す正当な理由とともに、可能な限り少量の溶媒をプレインキュベーション混合物に含めるべきである。

⇒ニトロソアミンの活性を妨げない溶媒量とは？

⇒陽性対照は注射用水だけではなく、有機溶媒を媒体とした背景データが必要？

ニトロソアミン陽性対照の有機溶媒量の検証

■有機溶媒を媒体とし、ニトロソアミン陽性対照をEAT条件で処理した場合のコロニー出現数の比較

■有機溶媒を通常の添加量と10 μL添加に下げた場合の影響比較

-注射用水を媒体とした場合のコロニー数を基準とする

-添加量を減らす場合，調製濃度を上げて同用量とする

- 10 μL添加の場合は5000 μg/plateを達成するために500 mg/mLで調製する必要がある＝溶解性の問題

媒体種類	通常の添加量	今回の検討量
注射用水	100 μL (14.3 v/v%)	-
DMSO	100 μL (14.3 v/v%)	10 μL (1.6 v/v%)
アセトン	50 μL (7.7 v/v%)	
エタノール	50 μL (7.7 v/v%)	
アセトニトリル	20 μL (3.2 v/v%)	

■各媒体のCYP阻害

DMSO： CYP2E1, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4

アセトン： CYP2E1

エタノール： CYP2E1, CYP2C9

アセトニトリル：比較的影響しにくい？

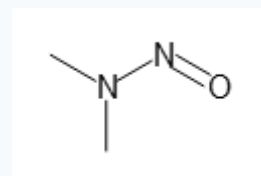
試験デザイン

■EATの試験デザインに準拠

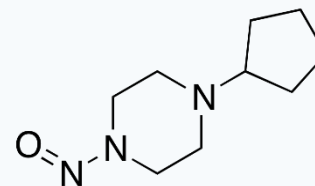
- 陽性対照としてNDMAおよびCPNPを使用
- TA100, TA1535, WP2uvrA/pKM101
- ラットおよびハムスターS9 (NDMA) , ラットS9 (CPNP)
- プレインキュベーション30分

Rat S9 mix			Hamster S9 mix		
TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101
NDMA 5000 µg/プレート		NDMA 1000 µg/プレート	NDMA 200 µg/プレート		
CPNP 100 µg/プレート		CPNP 5000 µg/プレート	-		

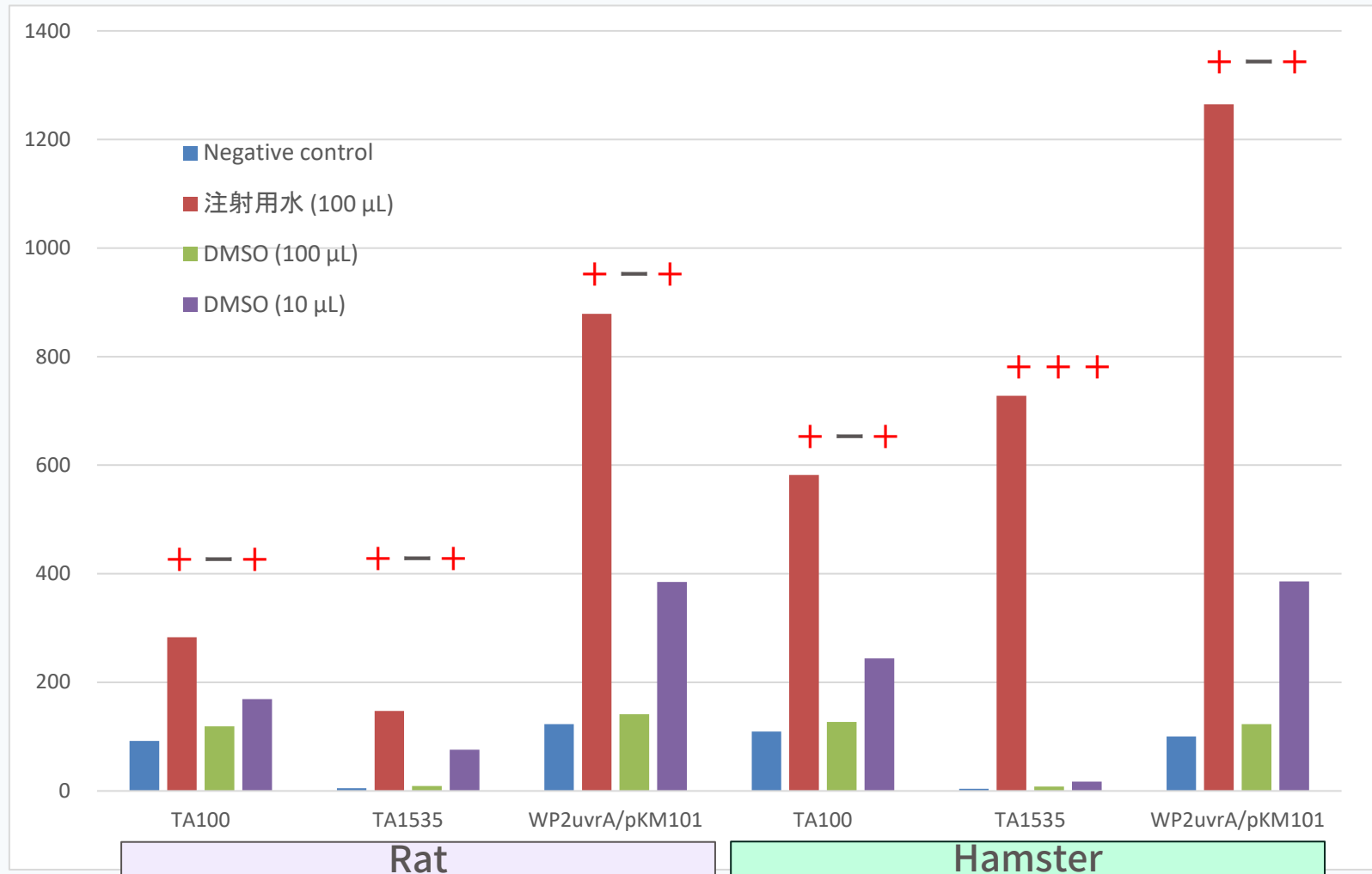
NDMA：富士フィルム和光純薬，Code No. 149-05882



CPNP：Toronto Research Chemicals，TRC-C213795

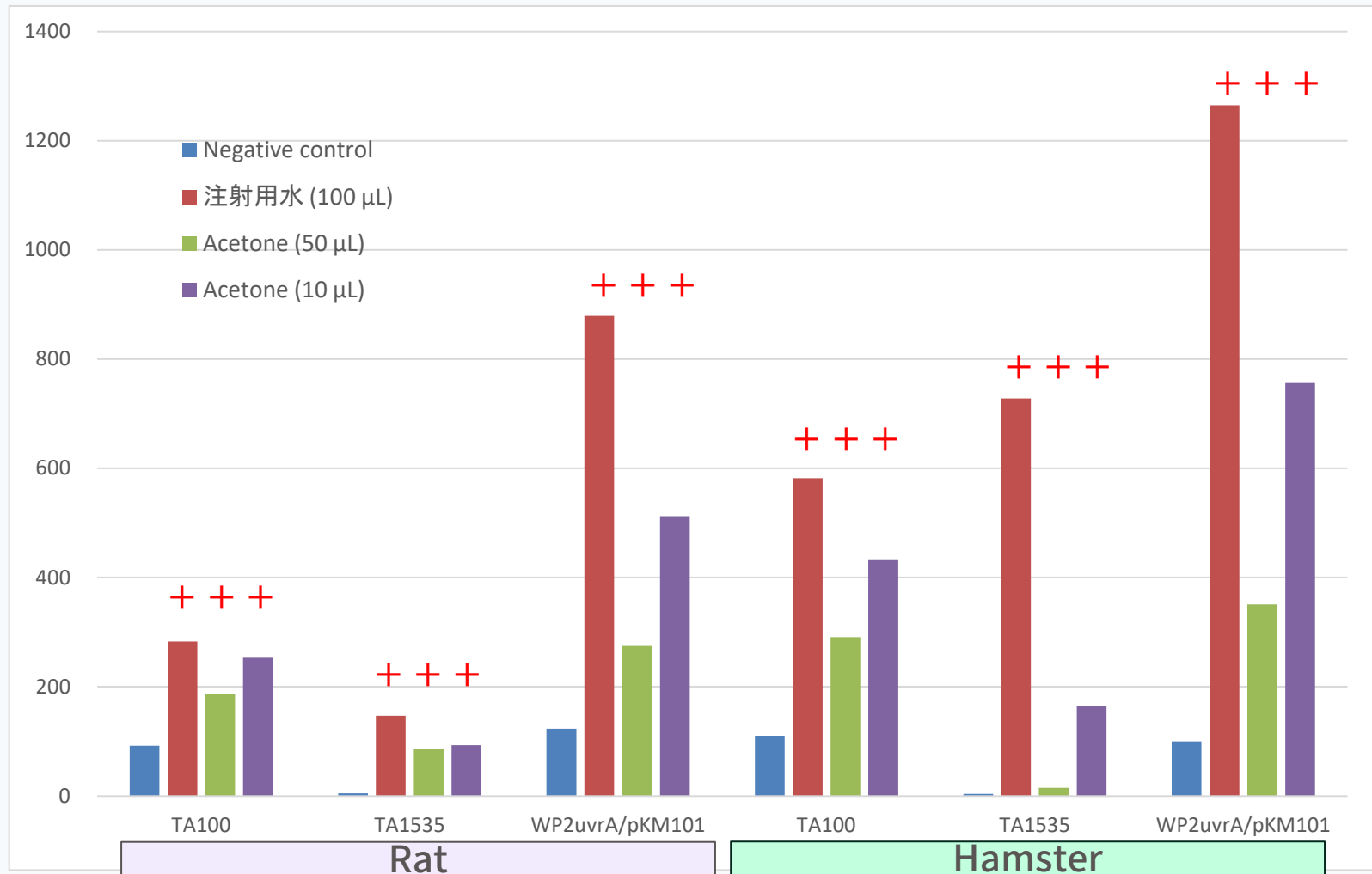


NDMA処理：注射用水 vs DMSO (100 μL) vs DMSO (10 μL)



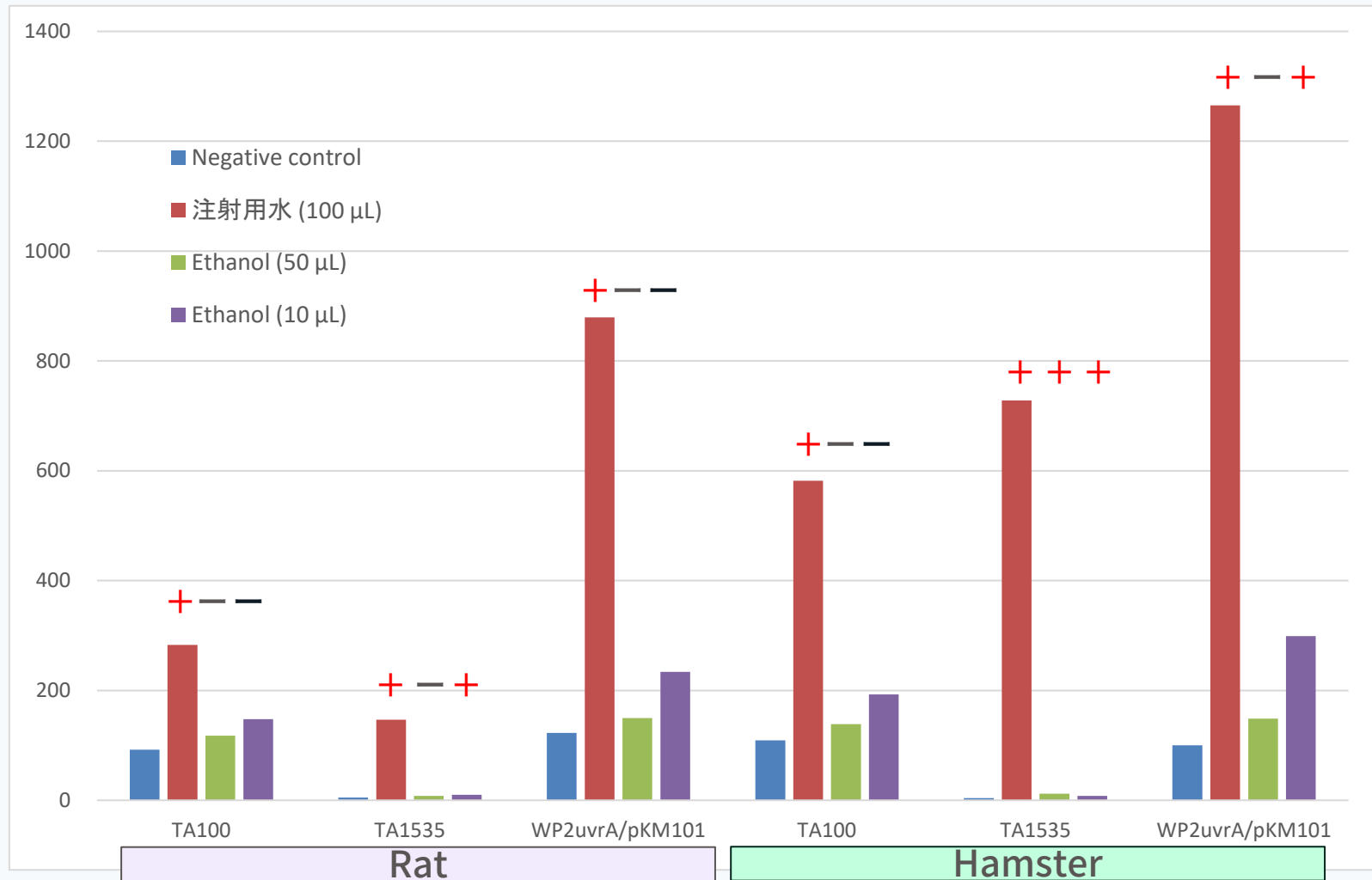
- 注射用水と比較して検出感度低下.
- 添加量減少で検出感度は上昇. 陽性反応が得られるケースあり

NDMA処理：注射用水 vs アセトン (50 μ L) vs アセトン (10 μ L)



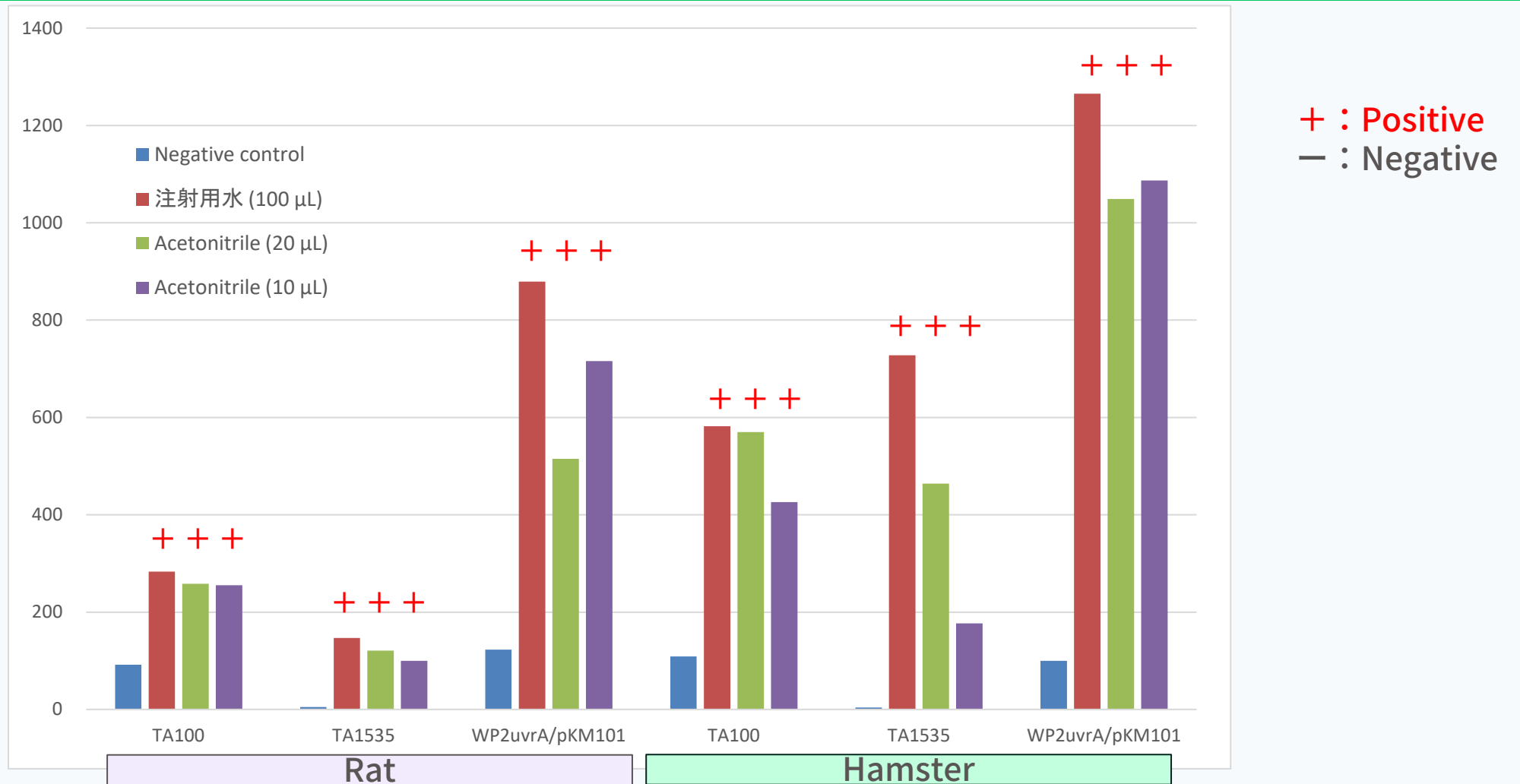
- 注射用水と比較して検出感度低下.
- 添加量減少で検出感度は上昇. 通常の添加量でも陽性として検出可能

NDMA処理：注射用水 vs エタノール (50 μ L) vs エタノール (10 μ L)



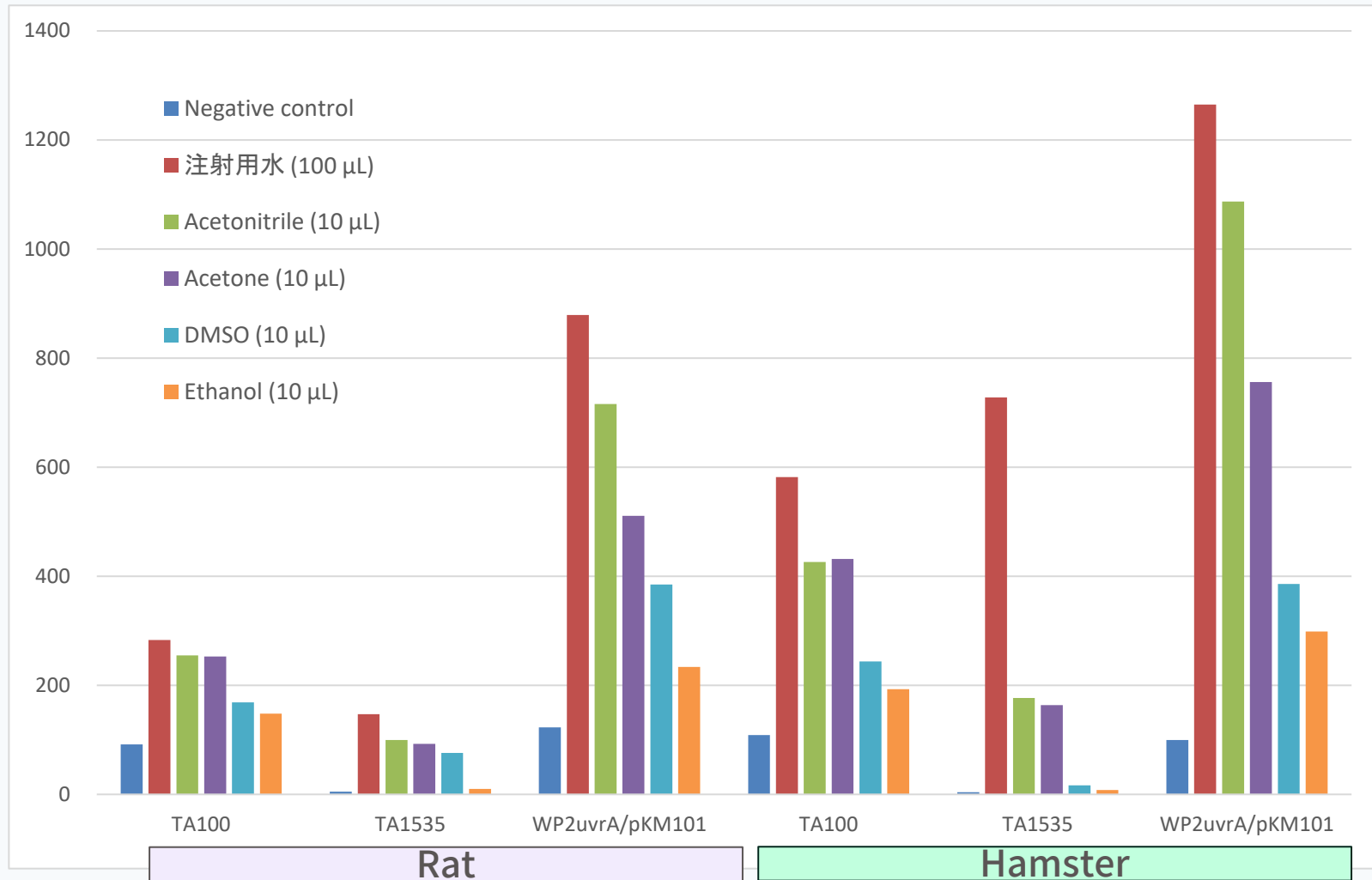
- 注射用水と比較して大幅に検出感度低下。
- 添加量減少で検出感度は上昇。添加量減少でも検出不可の条件あり

NDMA処理：注射用水 vs アセトニトリル (20 μ L) vs アセトニトリル(10 μ L)



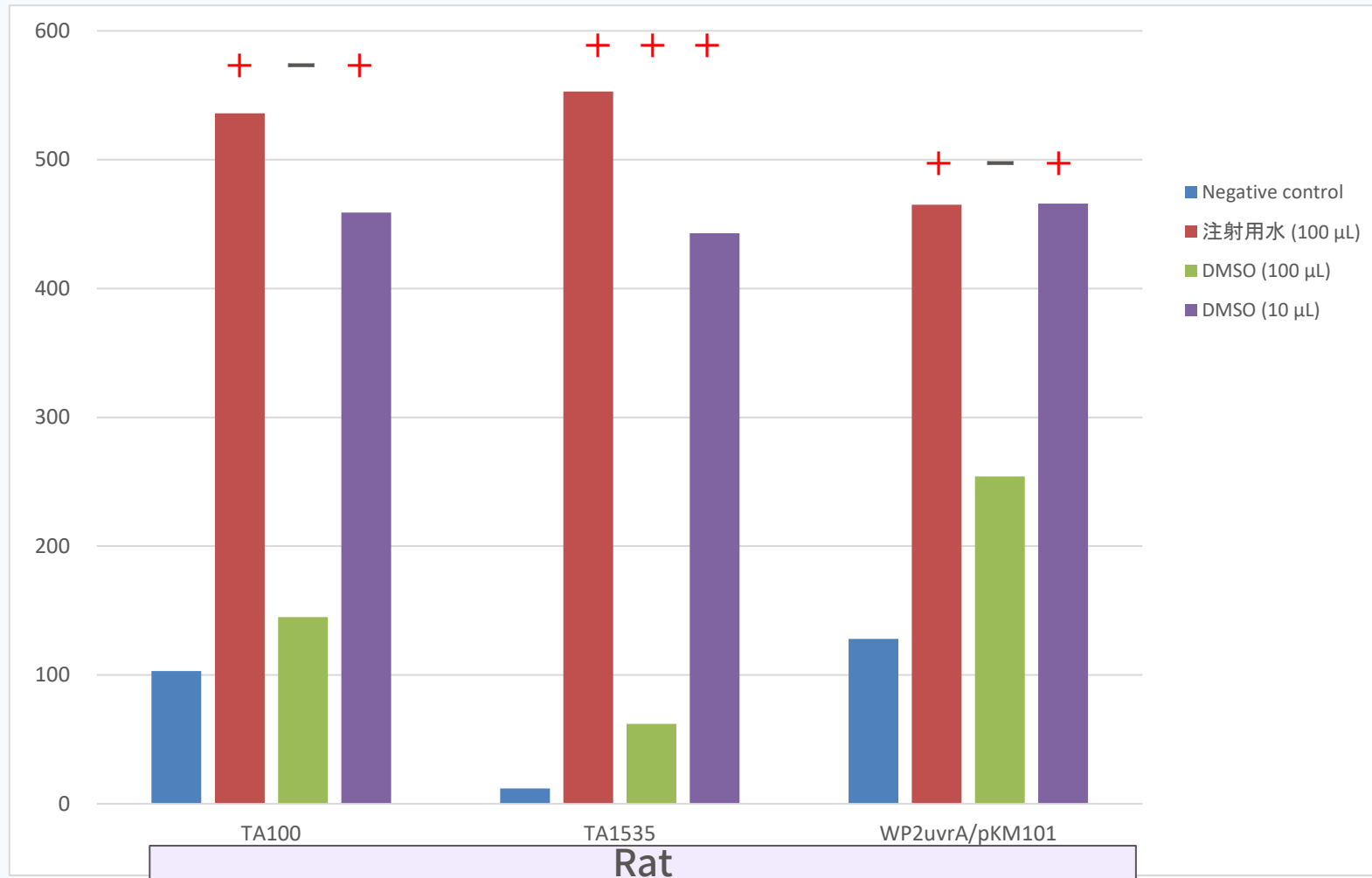
- 注射用水と比較して検出感度低下するが、影響小さめ
- 添加量減少による検出感度に大きく違いがない。すべて陽性として検出可能

NDMA処理：有機溶媒添加量10 μLの場合の影響比較



- 媒体影響：注射用水 < アセトニトリル < アセトン < DMSO < エタノール
- 10 μLまで添加量を減らしても注射用水と比較するとコロニー出現数は低め。

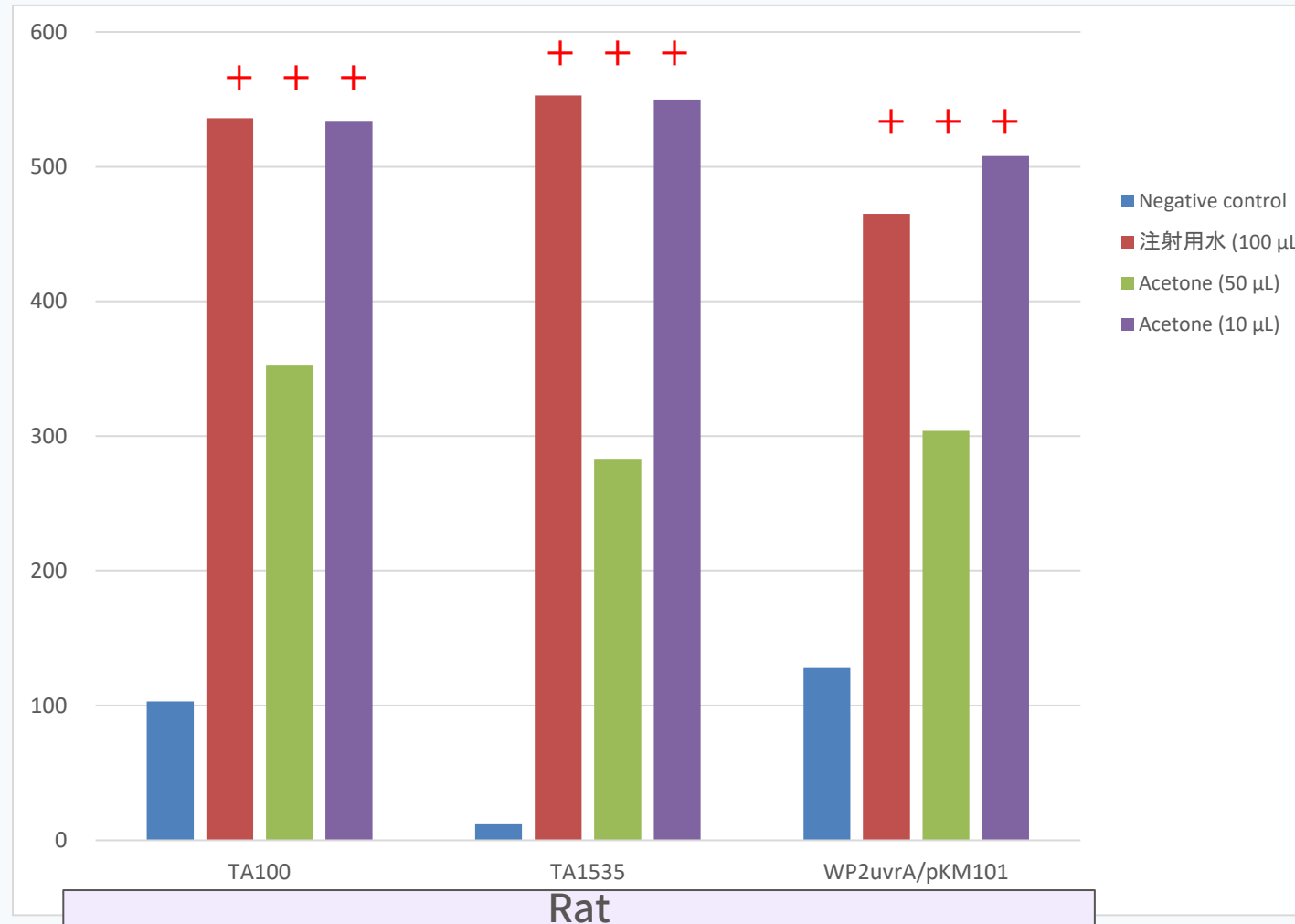
CPNP処理：注射用水 vs DMSO (100 μL) vs DMSO (10 μL)



+ : Positive
- : Negative

- 注射用水と比較して検出感度低下.
- 添加量減少で検出感度は上昇. 陽性反応が得られるケースあり

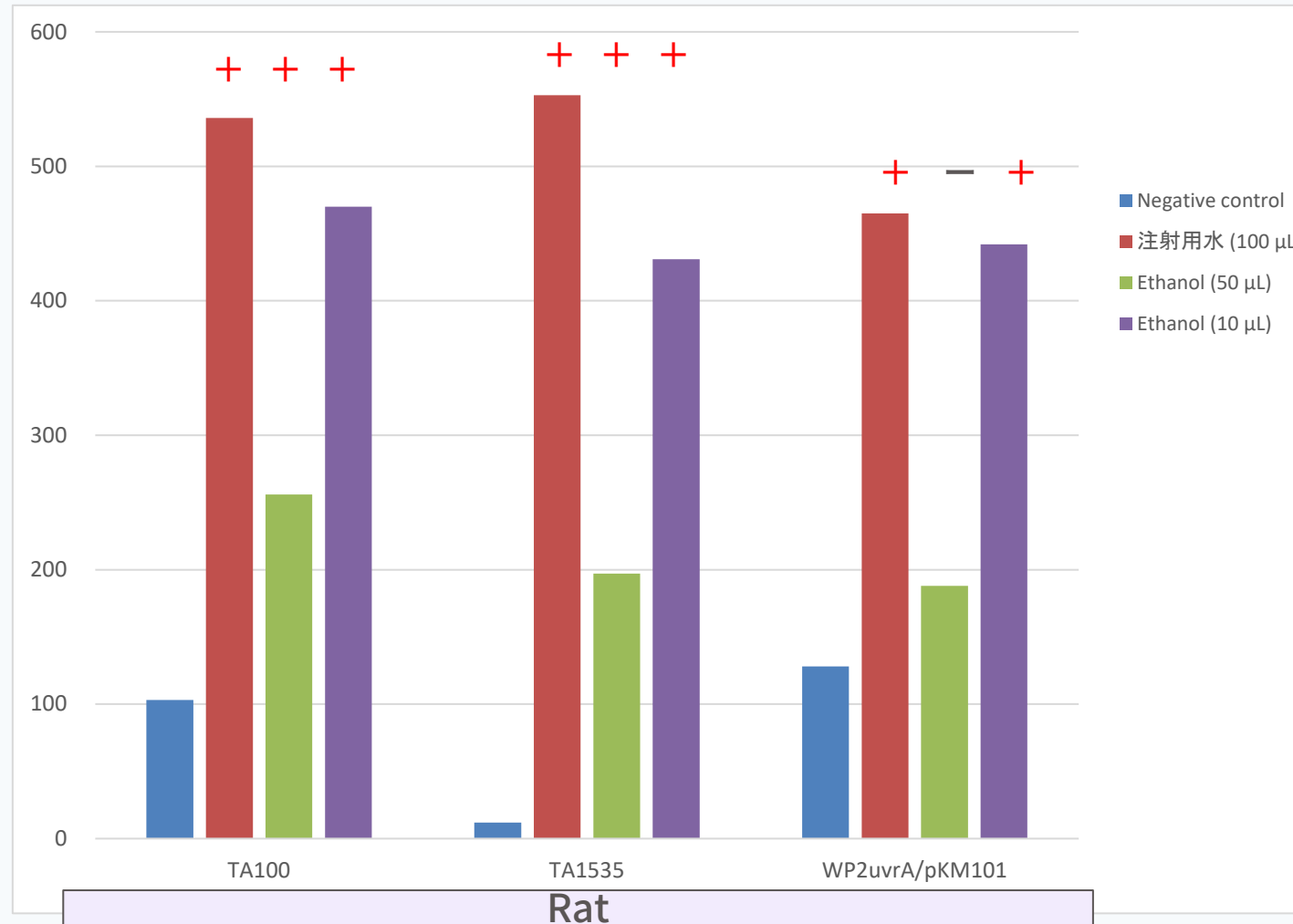
CPNP処理：注射用水 vs アセトン (50 μ L) vs アセトン (10 μ L)



+ : Positive
- : Negative

- 注射用水と比較して検出感度低下.
- 添加量減少で検出感度は上昇し，注射用水と遜色なし

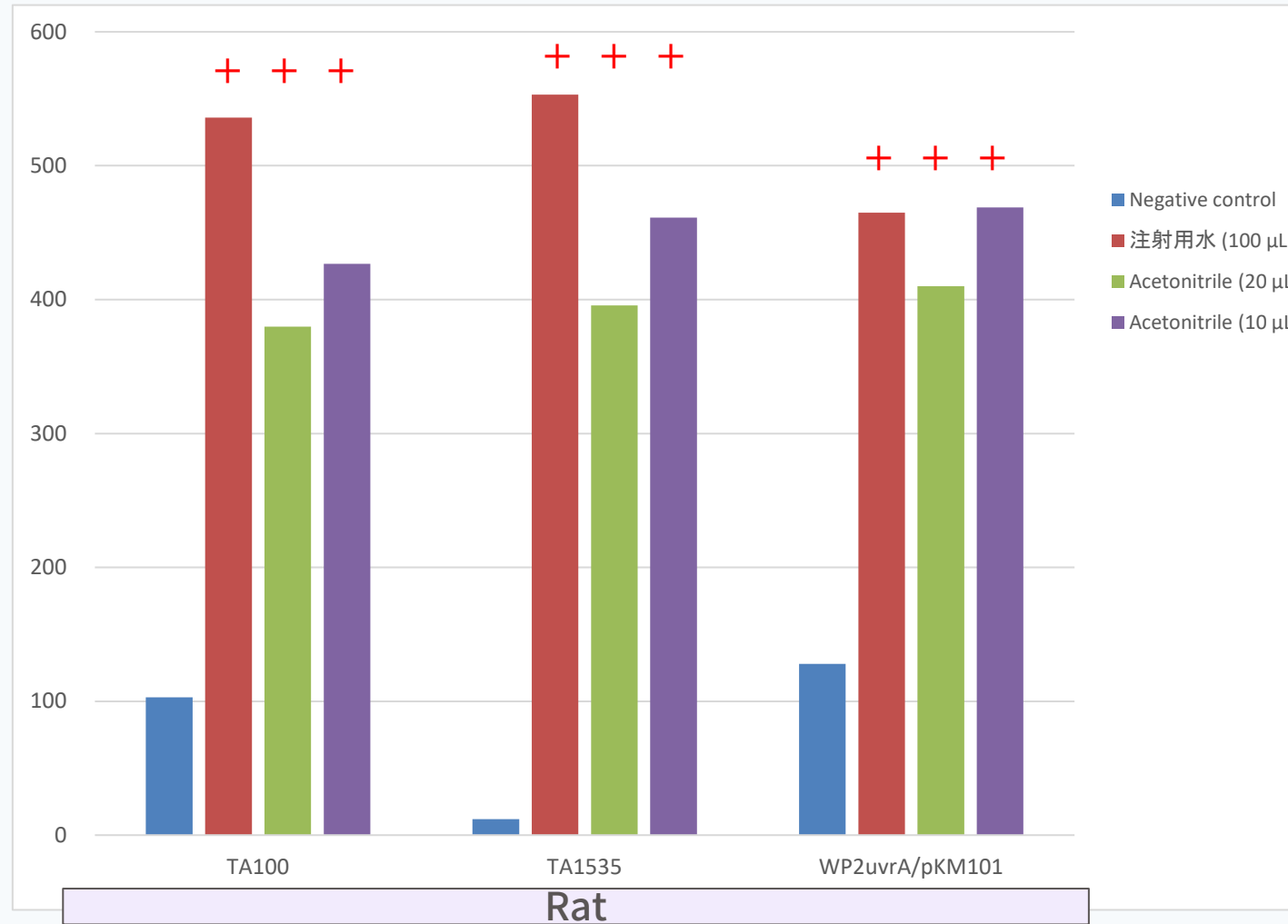
CPNP処理：注射用水 vs エタノール (50 μ L) vs エタノール(10 μ L)



+ : Positive
- : Negative

- 注射用水と比較して検出感度低下.
- 添加量減少で検出感度は上昇.

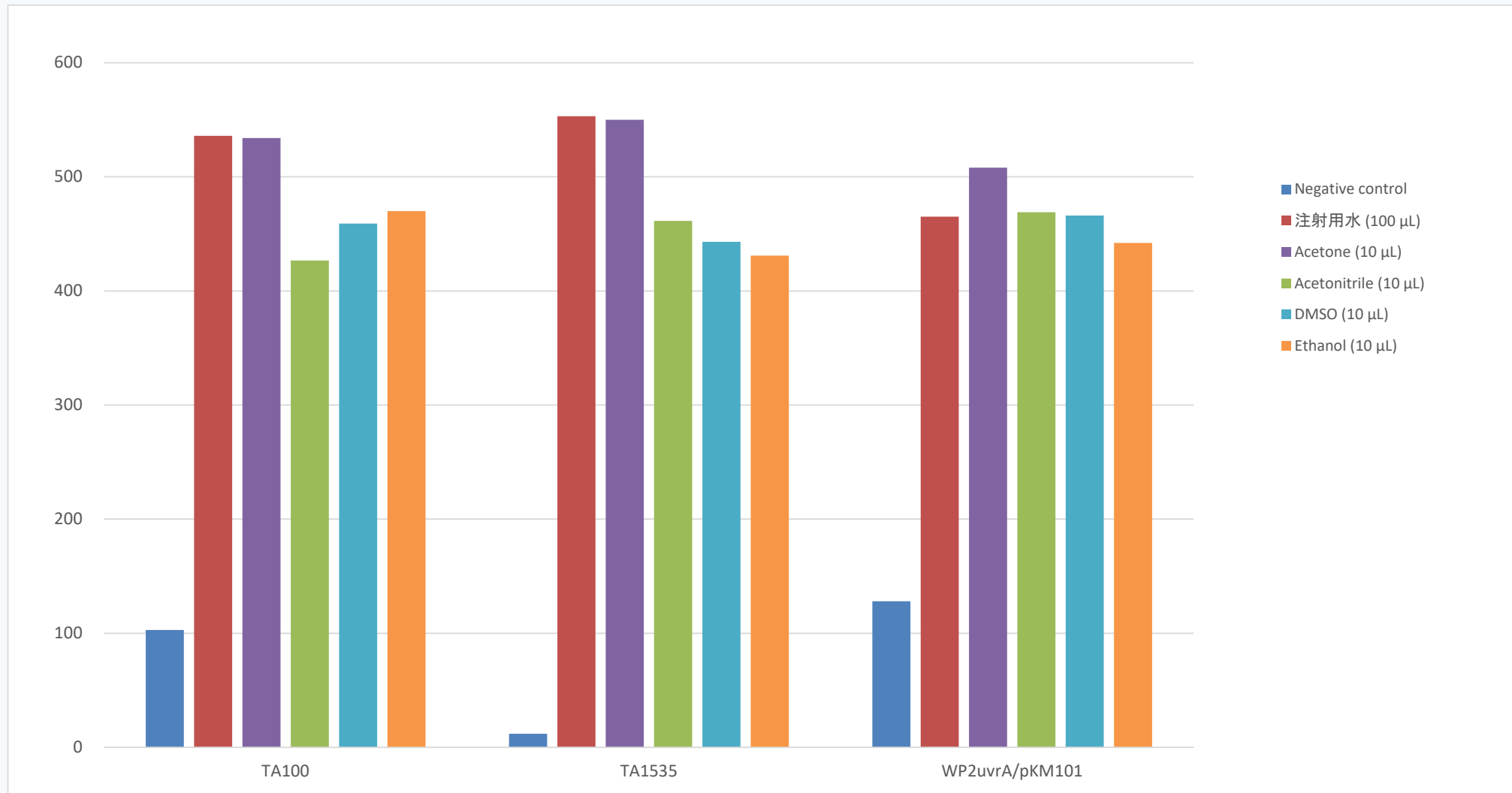
CPNP処理：注射用水 vs アセトニトリル (20 μ L) vs アセトニトリル(10 μ L)



+ : Positive
- : Negative

- 注射用水と比較して検出感度低下.
- 添加量減少で検出感度は上昇. 通常の添加量でも陽性として検出可能

CPNP処理：有機溶媒添加量10 μLの場合の影響比較



- 媒体影響：注射用水 ≤ アセトン < アセトニトリル, DMSO, エタノール
- NDMAよりも各媒体の差は小さい

まとめ/今後の課題

まとめ

- 陽性対照としてNDSRIの使用は現実的ではない
- 有機溶媒によるコロニー阻害の影響
 - 添加量を10 μ Lに減らすと有機溶媒の影響を低減できるが、媒体差がある
 - NDMAとCPNPによっても媒体影響が変わる
 - 最高濃度の調製液は500 mg/mLとなるため、溶解性を考慮する必要あり

今後の課題

- 添加量をより減らすべきか
- 被験物質によって影響の大きい媒体が変わる可能性：何が影響しているのか

ご清聴ありがとうございました