

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
研究者 能美 健彦

分担研究者

三宅 幸雄	塩野義製薬株式会社 新薬研究所
鎌滝 哲也	北海道大学大学院 薬学研究科 代謝分析学分野
神藤 康弘	明治製菓株式会社 薬品総合研究所 安全性研究所
林 宏行	同上
鈴木康生	オリエンタル酵母工業株式会社 研究統括部
澁谷 徹	財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

要旨 突然変異検出用トランスジェニックマウスを用いて、重粒子線(能美・三宅・鈴木)、MMS(澁谷)による突然変異誘発を分子レベルで解析した。化学物質の毒性発現に関与するヒトCYP3A7を胎仔期に発現するようなトランスジェニックマウスを樹立し(鎌滝)、本プロジェクトで開発した変異原性検出用トランスジェニックラットの有用性についても検討した(神藤、林)。

1. 研究目的

トランスジェニック動物を用いた毒性評価法の有用性は、近年広く認められるようになり、ICH ガイドラインにおいても遺伝毒性試験及び発がん性試験の選択肢として取り上げられている。トランスジェニック動物を用いる評価法により、これまで実現が困難であった、メカニズムに基づいた毒性発現解析が可能になることが期待される。

能美は、独自に開発した *gpt delta* マウスを用いて、重粒子線の個体レベルにおける突然変異の中で、欠失変異の誘発性に注目し、その変異頻度を臓器別に比較した。鈴木は変異の生じるメカニズムを明らかにする目的で、変異体の塩基レベルでの解析を行うこととした。さらに、三宅は、p53 遺伝子欠損マウスと掛け合わせた *gpt delta* マウスを用いて、p53 遺伝子の重粒子線誘発突然変異に対する影響を調べることを目的に、6-thioguanine (TG) アッセイを行うこととした。

化学物質の代謝的な活性化に関与する主要な薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) の発現量、酵素学的な性質には種差があり、環境中に存在する化学物質のヒトにおける毒性を予測するためには、ヒトの CYP を用いる必要がある。鎌滝は、環境中に存在する化学物質の活性化を予測するため、Ames テストに汎用されるサルモネラ菌株に、ヒト CYP 分子種のそれぞれと NADPH-CYP 還元酵素(OR)を同時に発現させ、新しい試験系を樹立した。OR は CYP が触媒活性を示すために必要な電子を NADPH より CYP に伝達する酵素である。より広範な化学物質の変異原性を検討するために、サルモネラ菌 TA1538 株および YG7108 株を宿主として用いることとした。また、齧歯類などの実験動物では発現しないがヒト胎児では発現している CYP を実験動物に導入し、化学物質のヒト胎児における毒性を *in vivo* にて検討できる系の開発を目的として、新規なトランスジェニックマウスを開発する。

神藤らは、薬物動態やがん原性などに関する毒性情報の豊富なラットに国立医薬品食品衛生研究所で開発された λ EG10 変異原性検出用ベクターを導入し、新しい変異原性評価系を確立することで、薬物の発がん性評価のより多面的な解析を目的として研究を進めている。昨年までに上記ベクターを用い、遺伝毒性試験に利用可能なトランスジェニックラットのラインを作出し、有用性評価を実施するためにブリーダーでの繁殖を開始した。本年度は、*gpt delta* ラットに導入した遺伝子の解析および遺伝毒性物質による変異誘発について検討することとした。

MMS は、マウス特定座位試験(SLT)において減数分裂後の時期に突然変異を誘発することが示されているが、トランスジェニックマウスの精子では遺伝子突然変異は検出されないことが報告されている。マウス優性

致死試験では、MMS 投与後 10 日目において、最も高い頻度で遺伝子突然変異体が得られていることから、澁谷は、投与後 3 日目および 10 日目の雄 *gpt delta* マウス生殖細胞において Spi⁻アッセイを行い、欠失タイプの突然変異について調べることにした。また同時に、分裂が盛んな骨髄細胞についても Spi⁻アッセイを行い、体細胞と生殖細胞での誘発突然変異について比較することとした。また、部分切除により誘起された肝細胞分裂の亢進が、肝細胞の突然変異誘発に及ぼす影響を調べる目的で、突然変異誘発物質 ENU を投与した MutaTMMouse を用いて調べることにした。

2. 研究方法

能美・三宅らは *gpt delta* (8~10 週齢, 雄) に理研リングサイクロロンにて 135 MeV/核子で炭素を核種とする重粒子線 (5 又は 10 Gy) を照射後、臓器 (肝臓, 腎臓, 脾臓, 精巣) を回収した。各臓器より DNA を抽出し、Spi⁻アッセイにより欠失突然変異体頻度を測定 (能美)、肝臓についてはさらに塩基配列の変化を調べた (鈴木)。また、肝臓について 6-TG アッセイによる突然変異体頻度 (MF) を測定した (三宅)。それぞれについて、p53 遺伝子の関与を検討するため、p53 遺伝子をホモ又はヘテロで欠損した *gpt delta* マウスでも同様の処理を行った。

鎌滝は、独自に開発した 11 種類のヒト CYP 分子種の cDNA それぞれと OR の cDNA を同時に導入した発現プラスミドを、サルモネラ菌 TA1538 株および YG7108 株にエレクトロポレーション法にて導入し、それぞれの CYP 分子種のサルモネラ菌における最適な発現条件を検討した。サルモネラ菌における CYP ホロ酵素の発現は、CO-差スペクトルにより確認した。またサルモネラ菌における OR の発現量を、波長 550 nm における吸光度の増加により測定した。樹立したヒト CYP と OR を同時に発現するサルモネラ菌 TA1538 株および YG7108 株において発現した CYP の酵素活性を、それぞれの CYP 分子種の典型的な基質を用いて検討した。それぞれの CYP 分子種の酵素活性をキネティックパラメータ K_m および V_{max} を算出して検証した。 K_m および V_{max} は、Lineweaver-Burk Plots より算出した。さらに、ヒト CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A7, COX-1 および COX-2 cDNA をマウス受精卵に導入したトランスジェニックマウスを作出し、生まれたキメラマウスを交配し、生殖細胞に目的の遺伝子が導入された F1 マウスを得た。

神藤らは、前年度までに作製した λ EG10 遺伝子導入ラットから遺伝子突然変異検出系として実用化が最も有望視される SD 系ライン 2 番について、肝臓の DNA を用いてサザンブロットにより、また、胎仔の DNA を用いて FISH 法により、導入遺伝子の導入コピー数及び導入位置の解析を行った。遺伝子変異検出の効率化を図るためホモ体の作製を行った。さらに、遺伝子変異検出能のスペクトラムを明らかにするために、SD 系ライン 2 の 9 (または 10) 週齢のヘテロ体ラットについて、典型的な発がん物質である B(a)P をオリーブ油に溶解し、62.5, 125 mg/kg を各群雄 3 匹に腹腔内単回投与した。投与 7 日後に屠殺し主要臓器 (脳, 肺, 肝, 腎, 脾臓, 大腸, 精巣, 骨髄) を摘出し、ゲノム DNA を抽出し、遺伝子突然変異誘発性を 6-TG アッセイにより、遺伝子欠失誘発性を Spi⁻アッセイによって評価した。また、各化合物の曝露確認と骨髄における作用比較のため、同じ個体について投与 48 時間後に小核誘発頻度を測定した。

澁谷は、9 週齢の雄 *gpt delta* マウスに MMS (80, 160 mg/kg) を腹腔内投与した。投与後 3 日目および 10 日目に精巣上体および輸精管から精子を、両大腿骨から骨髄細胞を回収した。得られた各臓器について genomic DNA の抽出を行い、in vitro パッケージング後、Spi⁻アッセイを行った。また、細胞分裂亢進の実験では、12 週齢の雄 MutaTMMouse に ENU (50 mg/kg) を腹腔内投与後、14 日目に屠殺し、肝臓を摘出して保管した。DNA を抽出してパッケージングし、*lacZ* および *cII* 遺伝子のポジティブセレクションにより、突然変異体頻度を調べた。*cII* 遺伝子に関しては、塩基レベルの変化も解析した。

3. 研究成果

能美は、重粒子線を照射した *gpt delta* マウス (p53^{+/+}) の各臓器 (肝臓, 脾臓, 腎臓, 精巣) における Spi⁻ MF を算出した。肝臓, 脾臓, 腎臓の 10 Gy 照射群で非照射群に対して Spi⁻ MF の有意な上昇が認められたが、各臓器の 5 Gy 照射群および精巣では非照射群に対して有意差は認められなかった。さらに p53 遺伝子をヘテロおよびホモに欠損した (それぞれ p53^{+/-}, p53^{-/-}) *gpt delta* マウスの肝臓, 脾臓, 腎臓における Spi⁻ MF を比較したところ、非照射群に関しては p53 遺伝子型の違いによる有意差は認められなかった。しかし脾

臓の 10 Gy 照射群においては p53^{+/+}, p53^{-/-}が p53 野生型に対して上昇傾向を示し、腎臓においては p53^{-/-}が p53 野生型に対して上昇傾向を示した。だが肝臓においては p53 欠損による MF の有意な上昇は認められなかった。以上の結果から、p53 による突然変異抑制作用には臓器特異性のあることが示唆された。鈴木は重粒子線(10Gy)照射マウスの肝臓由来の Spi⁻変異体の塩基配列の解析を行い、5kb 以上の欠失と複雑な変異という、いずれも大きな欠失が誘発されることを示唆する結果を得た。三宅は、重粒子線を照射した p53^{+/+}, p53^{-/-}の *gpt delta* マウスの、肝臓の *gpt* MF を算出した。10 Gy 照射群は p53 のいかににかかわらず p53 野生型の非照射群に対し有意な MF の上昇を示さなかった。

鎌滝は、各 CYP 分子種がサルモネラ菌 TA1538 および YG7108 株で発現したことを、CO-差スペクトルで確認した。サルモネラ菌における CYP ホロ酵素の最適な発現条件及び発現量は、分子種により異なっていた。発現量は 32 nmol/L culture から 320 nmol/L culture に渡っていた。OR の発現量は、同時に発現した CYP 分子種により異なり、290 unit/L culture から 670 units/L culture に渡っていた。サルモネラ菌 YG7108 株における CYP の発現量は TA1538 株の場合とほぼ同等であった。両サルモネラ菌株に発現した全てのヒト CYP は典型的な基質に対して触媒活性を示した。それぞれの CYP による触媒反応のキネティックパラメータ K_m および V_{max} を算出して酵素の特性を比較するため、ヒト肝ミクロゾームや他の宿主を用いて得られた結果を、ヒト CYP 発現系を用いて得られた結果と比較した。また、ヒト CYP1A1, CYP1B1, CYP3A7 および COX-2 をゲノム DNA 上に有する F1 マウスに関して、約 100 匹の 12 日齢のマウス胎仔よりゲノム DNA を抽出した。

神藤らは、サザンブロット解析結果より、今回測定した *gpt delta* ラットはヘテロ体であるため、diploid あたりのコピー数として計算した場合、約 4 から 5 コピーと推定した。トランスジーンを持つ haploid には約 8~10 コピーが組み込まれていると考えられた。また、今回の FISH 解析では間期の細胞を含め、1細胞当たり1つのシグナルが観察されたことから、 λ EG10 遺伝子は一カ所にタンデムに導入されていると判断され、その位置は 4q24-q31 であった。ホモ体を得るためにヘテロ個体同士 16 ペアを交配したところ、10 ペアでは全例食殺もしくは不妊となり、6 ペアから切り歯が生えない個体が 11 匹生まれた。PCR 法により、非トランスジェニック体、ヘテロ体、ホモ体の選別を検討したが、歯が生えない個体については成長が遅く成熟しないため、採血が困難となりヘテロ体とホモ体を明確に区別することはできなかった。B(a)P 投与肝臓における *gpt* アッセイ、Spi⁻アッセイの結果、および末梢血小核試験の結果はを Table 1 に示した。末梢血中の小核誘発頻度は 62.5mg/kg, 125mg/kg の双方で有意な上昇を示したが、*gpt* アッセイおよび Spi⁻アッセイにおいては、陰性対照群と投与群の間に変異頻度(MF)の差は認められなかった。

Table 1 Induction of mutant frequency in liver and micronuclei with B[a]P treatment.

Dose (mg/kg)	Spi ⁻ target			<i>gpt</i> target			Induction of MN(%)
	Total PFU	mutant	MF (x10 ⁻⁶)	Total PFU	mutant	MF (x10 ⁻⁶)	
0	1,514,000	4	2.6	1,515,000	9	5.9	0.067
62.5	1,796,000	3	1.7	2,076,000	12	5.8	0.283*
125	1,097,000	3	2.7	3,198,000	19	5.9	0.367*

*P≤0.01

澁谷は、*gpt delta* マウスに MMS を投与し Spi⁻ MF の変化を調べた。投与後 3 日目では、陰性対照群 1.3 × 10⁻⁶ に対して MMS80 および 160 mg/kg 投与群はそれぞれ、1.8 × 10⁻⁶, 1.2 × 10⁻⁶ で、MF の増加はみられなかった。また、投与後 10 日目においても MMS 80 および 160 mg/kg 投与群で MF の増加はみられなかった。分裂が盛んな骨髄細胞においても、投与後 3 日目、10 日目ともに、陰性対照群に比べて、MMS 投与による MF の明らかな増加はみられなかった。また、肝細胞増殖亢進の実験では、*lacZ* 遺伝子のポジティブセレクションの結果、陰性対照群の MF は 79.8 × 10⁻⁶ で、肝切除 (PH) 群と ENU 処理群の MF は陰性対照群よりわずかに増加したが、統計学的な有意差は認められなかった。しかし、肝切除して ENU 処理した (PH/ENU) 群では、コントロール群の約 10 倍、PH 群および ENU 処理群の約 7 倍に増加した。また、*cII* 遺伝子に関するポジティブセレクションによる MF は、*lacZ* 遺伝子に比して、やや低かったものの、群間の相

対的な関係はほとんど同じ傾向を示した。cII 遺伝子の変異体を塩基レベルで解析した結果、コントロール群で得られた突然変異の大部分 (89%) が 1 塩基置換であり、その多くは CpG sites に生じた G:C から A:T への置換であることがわかった。1 塩基置換の他には、2 塩基置換および 1 塩基挿入の突然変異がみられた。PH 群では陰性対照群とほぼ同様の突然変異スペクトラムを示した。ENU 処理群も陰性対照群とほぼ同様のスペクトラムを示した。PH/ENU 群においても、得られた突然変異体の大部分 (97%) は 1 塩基置換であった。その内訳は、A:T から G:C の 1 塩基置換が最も多く (31%)、G:C から T:A (23%) と A:T から T:A (20%) がこれに続いた。

4. 考 察

高い linear energy transfer (LET) 示す放射線は、低い LET の放射線 (X 線や γ 線) に比べると数倍から 10 倍程度高い頻度で放射線障害を引き起こすことが知られている。前者に分類される重粒子線は、エネルギー付与によって生じるラジカル等も、ある点に集中すると考えられ、その作用が DNA 鎖に及ぶと、多くの切断部位が生じるものと推察される。主として、5kb 以上の大きな欠失が生じているという鈴木の結果は、この切断部位の非相同組換えによる修復過程で DNA 鎖の欠失が起こったためと考えられる。重粒子線は *in vitro* で DNA 鎖の切断を誘発することが知られており、B6C3F1 マウスに対し発癌性を示す。重粒子線は、マウス個体において臓器特異性をもって突然変異を誘発することが示唆された。精巣は他の臓器に比べ低い照射量で感受性を示し、10 Gy では何らかの原因で変異が減少したと考えることができる。

p53 遺伝子は癌抑制遺伝子として知られており、細胞周期の調節、DNA の修復、アポトーシスの誘導に関与している。能美の得た結果では、非照射群の Spi⁻ MF は、p53 遺伝子型が違っていても有意な差は認められなかった。同様の結果が肝臓と脾臓に関して Buettner らの Big Blue[®] Mouse を用いた研究によっても報告されている。従って、p53 遺伝子は自然突然変異の抑制には関与していないものと考えられる。p53 の発現量は臓器により異なることが知られている。p53 遺伝子の欠損による突然変異における影響は p53 の発現量の順 (脾臓 > 腎臓 > 肝臓) と一致した。すなわち、p53 遺伝子の発現量の高い臓器においては、p53 の欠損の効果が顕著に現れ MF が上昇することが明らかとなり、p53 遺伝子のゲノム安定化作用には臓器特異性のあることが示唆された。三宅は、p53 の放射線誘発突然変異に対する影響を調べるため、p53 欠損マウスと掛け合わせた *gpt delta* マウスに重粒子線を照射し、肝臓について *gpt* MF を算出したが、非照射群の *gpt* MF ($2.35 \pm 0.94 \times 10^{-6}$) に比べいずれも有意な上昇は認められなかった。この結果は、重粒子線が直接 DNA に作用して DNA 鎖の切断を起こすことを示唆している。p53^{-/-}における 10 Gy 照射群の MF は p53^{+/+}の非照射群に比べ 2.5 倍高く、ここで得られた *gpt* 変異体についてはシーケンズ解析を行い、どのような変異が重粒子線により誘発されているかを明らかにする必要があるだろう。

鎌滝は、CO-差スペクトルにおいて CYP に特徴的なピーク波長が観察され、精製した CYP において認められたものとほぼ一致したため、各 CYP 分子種ともサルモネラ菌 TA1538 および YG7108 株に発現したとみなした。本培養開始から IPTG 添加までの培養温度を 25 または 30°C に決定し、IPTG 添加から回収までの時間は 18-24 h、培養液の温度は 25 または 30°C とした。サルモネラ菌 TA1538 株における CYP の発現量は分子種により異なっていた。培養液 1L あたりの CYP1A2 の発現量はヒトの肝臓約 240g 分に相当した。OR の発現量はヒト肝マイクロゾームにおける CYP と OR の発現量比から、CYP が触媒活性を示すのに十分であると考えられた。YG7108 株に発現した CYP2A6 の *K_m* 値は 0.72 μ M であり、ヒト肝マイクロゾームを用いて得られた値約 0.5 μ M とほぼ同程度であった。*V_{max}* 値は 10.5 nmol/min/nmol CYP であり、HepG2 細胞に発現した CYP2A6 を用いて得られた値 13.1 nmol/min/nmol CYP とほぼ同程度であった。

神藤らは、トランスジェニックラットの導入遺伝子コピー数が *gpt delta* マウスの 1/10 程度であるため、遺伝子回収効率が低くなることが予想されたので、交配によりホモ体を得ることで、diploid あたりのコピー数を上げ、遺伝子回収効率を改善することを試みた。しかし、ヘテロ体同士の交配では離乳まで至る個体数が少なく、かつ歯が欠損している個体が認められた。歯欠損は、導入した遺伝子がホモになることによって、その導入位置もしくは付近の遺伝子が機能を失ったためという可能性が考えられる。ブリーダーにおいて、F344 系ラットとのバッククロスを行い、このような形質を生じないホモ個体の作製について検討を進めている。歯の発生に関する遺伝子が、遺伝子の導入位置として判明した、4 番染色体近辺に存在するかどうかを検索中である。

B(a)P 投与による検討においては, *gpt* アッセイおよび Spi⁻アッセイともに有意な上昇は認められなかったが, 両試験とも個体あたりの遺伝子変異の評価ベクター数が少ないため, 追加試験により, 差が生じる可能性があるだろう。

MMS は SLT において, 減数分裂後の雄生殖細胞に突然変異を誘発することが認められているのに対して, 従来のトランスジェニックマウスの雄生殖細胞では, MMS 投与による突然変異を検出することができなかった。澁谷は, その原因が MMS が DNA に通常よりも大きな損傷を与えるためと考え, *gpt delta* に MMS を投与後 3 日目および 10 日目に回収した精子及び骨髄について, Spi⁻アッセイにより欠失タイプの突然変異について調べた。しかし, この系を用いても MMS 投与に誘発される突然変異は検出できなかった。おそらく, *gpt delta* の Spi⁻アッセイを用いても検出することができないくらいに大きな欠失が誘発されているものと考えられる。

5. 結論

能美は, *gpt delta* マウスを用いて, 重粒子線が誘発する突然変異には臓器特異性があることを明らかにした。また, 鈴木による塩基配列の解析により, 誘発された欠失変異は 5kb 以上の大きさが多いことが明らかになった。三宅はさらに, p53 の影響を調べるため, p53 欠損マウスと掛け合わせた *gpt delta* マウスに重粒子線を照射し, 肝臓での 6-TG アッセイによる MF を調べた。p53 のバックグラウンドに関わらず, 非照射群の MF に比べ照射群は有意な上昇は認められなかった。以上の結果から, *gpt delta* トランスジェニックマウスは, 各臓器に起こる欠失変異を効率よく検出し, 分子レベルで解析しうる有用なマウスであることが分かった。

鎌滝は, 11 種類のヒト CYP のそれぞれと OR を同時に発現するサルモネラ菌 TA1538 株および YG7108 株を樹立した。樹立したサルモネラ菌に発現したヒト CYP は, 典型的な基質に対して十分な触媒活性を示した。

神藤らは, 新たに 4 ライン (SD 系 1 ライン, Wistar 系 3 ライン) のトランスジェニックラットを得た。昨年度に作製した 2 ラインの Wistar 系トランスジェニックラットのうち, Wistar-TG6 ラインのホモ個体では, DNA 回収効率に 1.5 倍程度の改善が認められた。作製されたトランスジェニックラットの実用性を検討するため, 同じ λ EG10 ベクターを導入されたマウスを用いる変異原性検出法の導入を行った。

澁谷は, *gpt delta* マウスに MMS を投与し, 3 および 10 日後の精子と骨髄細胞について Spi⁻アッセイを行ったが, 突然変異の誘発は検出されなかった。さらに, 突然変異と細胞分裂の関係を調べるためにマウスを部分肝切除し, Spi⁻アッセイによる MF と塩基配列を調べ, 突然変異の誘発には細胞分裂が密接に関連していることを明らかにした。

6. 研究発表

K.Shinmura, S.Yamaguchi, T.Saitoh, M.Takeuchi-Sasaki, S.R.Kim, T.Nohmi, J.Yokota. Adenine excisional repair function of MYH protein on the adenine:8-hydroxyguanine base pair in double-stranded DNA, *Nucleic Acids Res.*, 28, 4912-4918 (2000).

T.Nohmi, T.Suzuki, K.Masumura. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays, *Mutat.Res.*, 455, 191-215 (2000).

H.Kushida, K.Fujita, A.Suzuki, M.Yamada, T.Nohmi, T.Kamatani. Development of a *Salmonella* tester strain sensitive to promutagenic *N*-nitrosamines: expression of recombinant CYP2A6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *S. typhimurium* YG7108, *Mutat.Res.*, 471, 135-143 (2000).

K.Masumura, K.Matsui, M.Yamada, M.Horiguchi, K.Ishida, M.Watanabe, K.Wakabayashi, T.Nohmi. Characterization of mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in the colon of *gpt delta* transgenic mouse: novel G:C deletions beside runs of identical bases, *Carcinogenesis*, 21, 2049-2056 (2000).

J.Wagner, T.Nohmi. *Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity, *J.Bacteriol.*, 182, 4587–4595 (2000).

H.Kushida, K.Fujita, A.Suzuki, M.Yamada, T.Endo, T.Nohmi, T.Kamataki. Metabolic activation of *N*-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase, *Carcinogenesis*, 21, 1227–1232 (2000).

J.A.Heddle, S.Dean, T.Nohmi, M.Boerrigter, D.Casciano, G.R.Douglas, B.W.Glickman, N.J.Gorelick, J.C.Mirsalis, H.J.Martus, T.R.Skopek, V.Thybaud, K.R.Tindall, N.Yajima. In vivo transgenic mutation assays, *Environ.Mol.Mutagen.*, 35, 253–259 (2000).

O.Minowa, T.Arai, M.Hirano, Y.Monden, S.Nakai, M.Fukuda, M.Itoh, H.Takano, Y.Hippou, H.Aburatani, K.Masumura, T.Nohmi, S.Nishimura, T.Noda. Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97, 4156–4161 (2000).

T.Sofuni, M.Hayashi, T.Nohmi, A.Matsuoka, M.Yamada, E.Kamata. Semi-quantitative evaluation of genotoxic activity of chemical substances and evidence for a biological threshold of genotoxic activity, *Mutat.Res.*, 464, 97–104 (2000).

N.Ariyoshi, Y.Takahashi, M.Miyamoto, Y.Umetsu, S.Daigo, T.Tateishi, S.Kobayashi, Y.Mizorogi, M.A.Loriot, I.Stucker, P.Beaune, M.Kinoshita, T.Kamataki. Structural characterization of a new variant of the CYP2A6 gene (CYP2A6*1B) apparently diagnosed as heterozygotes of CYP2A6*1A and CYP2A6*4C., *Pharmacogenetics*, 10, 687–693 (2000).

K.Fujita, A.Mogami, A.Hayashi, T.Kamataki. Establishment of *Salmonella* strain expressing catalytically active human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1), *Life Sci.*, 66, 1955–1967 (2000).

T.Satoh, K.Fujita, H.Munakata, S.Itoh, K.Nakamura, T.Kamataki, S.Itoh, I.Yoshizawa. Studies on the interactions between drugs and estrogen: analytical method for prediction system of gynecomastia induced by drugs on the inhibitory metabolism of estradiol using *Escherichia coli* coexpressing human CYP3A4 with human NADPH-cytochrome P450 reductase, *Anal.Biochem.*, 286, 179–186 (2000).

T.Mushiroda, N.Ariyoshi, T.Yokoi, E.Takahara, O.Nagata, H.Kato, T.Kamataki. Accumulation of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in suncus (*Suncus murinus*) brain: Implication for flavin-containing monooxygenase activity in brain microvessels., *Chem. Res. Toxicol.*, In press, (2000).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社