

平成13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

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発

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

- | | | |
|---------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| (1) 北海道大学大学院
薬学研究科 | 鎌滝哲也 | ヒト薬物代謝酵素を発現する高感受性
テスター株の開発 |
| (2) 食品薬品安全センター
秦野研究所 | 原 巧 | ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験
法の確立 |
| (3) グラクソ・スミスクライン
株式会社 前臨床開発部 | 森田 健 | 細菌を用いる遺伝毒性試験の迅速・高感
度・微量化に関する基礎的研究 |
| (4) 中外製薬 安全性研究所 | 井上 誠
竹入 章 | レポーター遺伝子を導入した哺乳類細
胞株の樹立 |
| (5) 明治製菓 薬品総合研究所 | 神藤康弘
林 宏行 | トランスジェニックラットを用いる評
価方法の樹立 |

要旨

細菌を用いるハイ・スループット遺伝毒性試験の基礎を確立し、新しいサルモネラ試験菌株を樹立した。トランスジェニックラット、トランスジェニックマウス細胞株を用いる第二次スクリーニング遺伝毒性試験法の有用性について検討を進めた。

1. 研究目的

コンビナトリアルケミストリーやロボティックスの導入により、きわめて多数の医薬品候補化合物が開発の初期段階に生ずることとなった。薬効の検索に関しては、リセプター・アッセイなどの新手法によりハイ・スループット化が進められ、膨大な数の候補の中から目的物質を迅速に選択する手法が確立されつつある。しかし候補化合物の安全性の検索・評価は、未だ多くが旧来の手法で行われており、安全性検索の過程がボトルネックとなっており、医薬品開発全体の迅速化が妨げられる恐れがある。安全性の検索・評価をハイ・スループット化するためには、テストに用いる生物（テスター）を飛躍的に高感度化し、微量の試料で試験が出来るようにする必要がある。だがテスターの高感度化は、一方で偽陽性の増大を招くことが多く、第1次スクリーニングで検出された物質のリスクを正當に評価する高性能な第2次スクリーニング系の確立が重要となる。本研究班では①遺伝子工学的手法をもちいて極めて高感度化した微生物テスター株を開発し、微量の試料で多検体処理を行う高感度遺伝毒性試験系を樹立すると共に②この系で陽性となった物質のリスク評価を行うトランスジェニックラット、トランスジェニック哺乳類細胞遺伝毒性試験の樹立を行うことを目的とする。

今年度は、発がん性多環芳香族炭化水素の遺伝毒性を高感度に検出する新しい *Salmonella typhimurium*（以下「サルモネラ」と略）テスター株の開発（能美）、ヒト・チトクローム P-450 (CYP)を発現するサルモネラ株の有用性に関する検討（鎌滝）、マイクロプレートを使用したハイ・スループット遺伝毒性試験法の構築（森田、原）、レポーター遺伝子を導入した変異検出用トランスジェニックラットの開発とその有用性の検討（神藤、林）、ラットに導入したのと同じレポーター遺伝子を用いたトランスジェニックマウス細胞株の確立（井上、竹入）を目的とした。

2. 研究方法

大腸菌の DNA ポリメラーゼ II (PolB)あるいは DNA ポリメラーゼ IV (DinB)を発現するプラスミド pYG787、pYG786 を導入したサルモネラ TA1538 株を、YG5160、YG5161 とした (Table 1)。微生物を用いる遺伝毒性試験は、20 分間のプレ・インキュベーションを含むエームス法で行った。代謝活性化には、phenobarbital と 5,6-benzoflavone で前処理したラットの肝 9,000 x g 上清 (S9) にコファクター (NADPH, NADH) を加えた S9 mix を用いた。樹立した菌株の感受性を、30 種類の変異原物質を用いて既存の TA1538、TA98 株と比較した (能美)。ヒト CYP (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 および CYP3A5) のそれぞれと NADPH-CYP 還元酵素 (OR) を同時に発現するサルモネラ TA1538 株を用い、淀川水系の河川水より単離された新規物質 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-1) とその誘導体 (PBTA-2, -3, -4, -5, -6) の変異原性を検索した (鎌滝)。サルモネラ TA98 および TA100 をテスター株に用い 384 ウェルマイクロプレートによる Fluctuation エームス試験 (FAT) を構築した。すなわち、前培養した試験菌株の適量を処理培地に懸濁し、試験物質溶液および代謝活性化の場合は S9 mix とともに 24 ウェルプレートに接種した。プレートを 37°C で 90 分間回転培養後、各ウェルに指示培地 (pH 指示薬としてプロモクレソールパープルを含有) を添加、次いで 24 ウェルプレートの各 1 ウェルの処理菌液を 384 ウェルプレートの 48 ウェルヘトランスファーした。384 ウェルプレートを 37°C で 3 日間培養後、紫色から黄色に変化したウェル、すなわち、復帰変異した菌の増殖がみられるウェルを計数した (森田、原)。gpt delta トランスジェニックラット (ヘテロ体、雄、10 週齢、n=3) に benzo[a]pyrene (BP) を 62.5 および 125 mg/kg を腹腔投与し、投与後 7 日目に屠殺して肝臓からゲノム DNA を抽出した。導入遺伝子を *in vitro* パッケージング法で回収し、gpt アッセイ、Spi アッセイに供した。また gpt delta トランスジェニックラットに ethylnitrosourea (ENU) を連続腹腔投与 (50 mg/kg/day x 5 days) し、7, 21, 35, 70 日目に屠殺して、肝臓から DNA を抽出した。導入遺伝子を *in vitro* パッケージング法で回収し、gpt アッセイに供し、変異体頻度 (MF) と変異スペクトルを決定した (神藤、林)。gpt delta トランスジェニックラットに導入したレポーター遺伝子 (ラムダー EG10) を組み込んだトランスジェニックマウスの肺の組織細片をトリプシンで処理した後に、10% FBS を含む EMEM 培地で培養し、線維芽細胞様の細胞集団を調製した。この細胞に SV40T 抗原遺伝子を含む pCOSV1 遺伝子を導入した。pCOSV1 は、発現ベクター pCOS1 の EF1 α (Elongation factor 1 α) プロモーターの下流に SV40 T 抗原遺伝子を挿入して作製した (井上、竹入)。

Table 1 Bacterial strains used

Strain	Relevant genotype
<i>Salmonella typhimurium</i>	
TA1538	<i>hisD3052, gal, Δ(chl, uvrB, bio), rfa</i>
TA98	as TA1538 but harbors plasmid pKM101 carrying <i>mucAB</i>
YG5160	as TA1538 but harbors plasmid pYG787 carrying <i>polB</i>
YG5161	as TA1538 but harbors plasmid pYG786 carrying <i>dinB</i>

3. 研究成果

能美は、大腸菌の DNA ポリメラーゼ II (PolB) あるいは DNA ポリメラーゼ IV (DinB) を発現するプラスミドを導入したサルモネラ TA1538 株の誘導株である YG5160、YG5161 を樹立し (Table 1)、さまざまな構造を持つ 30 種類の変異原を用いて、その感受性を既存の TA1538、TA98 と比較検討した。そして、テスター株の感受性の違いに基づき、30 種類の変異原物質を 4 つのグループに分類した。第 1 のグループは、DNA ポリメラーゼ IV (DinB) を発現する YG5161 が最も高い感受性を示した化合物群であり、この中には BP 7,8-dihydroepoxide, BP diol epoxide, 10-BP, BP, 3-BP,

3-methylcholanthrene (3-MC), 1-aminoanthracene(1-AA), 2-aminoanthracene(2-AA)が含まれる。第2のグループは、YG5161株とTA98株が、ともに高い感受性を示した化合物群である。この中には7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), 6-aminochrysene, 1-nitroBP, BP 4,5-dihydroepoxide, *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidineが含まれる。第3のグループは、TA98株が最も高い感受性を示した化合物群である。この中には1-nitropyrene, 1,8-dinitropyrene, 6-nitroBP, 1-nitro-6-BP, 3-nitro-6-azaBP, furylfuramide, aflatoxin B1, BP 7,8-tetrahydroepoxide, acridine orange (AO), benz[a]anthraceneが含まれる。第4のグループは、いずれのテスター株もほぼ同じような感受性を示した化合物群である。この中にはPBTA-1, Glu-P-1, aminophenylnorharman, *N*-hydroxyacetylaminofluorene, 4-nitroquinoline *N*-oxide (4NQO), 2-acetylaminofluorene (2AAF), 2-nitrofluoreneが含まれる。以上の結果から、DNAポリメラーゼIV(DinB)を発現するYG5161株は、BP、3-MC、DMBAなどの発がん性多環芳香族炭化水素に対し、従来から用いられてきたTA98株と同等かそれ以上高い感受性を示すことが明らかとなった。

鎌滝は、樹立したヒトCYPのそれぞれをORと同時に発現するサルモネラTA1538株を用いて変異原試験を実施し、6種類のPBTA誘導体がヒトCYPにより変異原活性化されるか否かを検討した。その結果、6種類すべてのPBTA誘導体は、ヒトCYP1A1によりほぼ特異的に代謝的に活性化されることを明らかにした。

森田は、種々の条件検討により384ウェルプレートを用いたFATの方法を確立した。検討項目ならびにその至適条件は以下のとおりである。

- (1) 至適菌量およびヒスチジン量：TA100では前培養菌液を少量のヒスチジンを含む処理培地で39倍希釈するのみでよいが、TA98では前培養菌液を遠心洗浄後、等量のマイクロF緩衝液に懸濁し、さらにそれを処理培地で8.75倍希釈する必要がある。
- (2) 回転培養時間および速度：使用機器の性能との兼合いにより170回転/分での90分が適切である。
- (3) 変異発現のための培養日数：3日間が適当である。
- (4) 至適陽性対象物質ならびにその濃度：TA98は、S9 mix非存在下および存在下でそれぞれ4NQO (1.0 μ g/mL) および2-AA (0.4 μ g/mL)、TA100は、S9 mix非存在下および存在下でそれぞれアジ化ナトリウム (1.0 μ g/mL) および2-AA (0.4 μ g/mL) である。
- (5) 陽性反応の基準：陽性と判断する基準は、TA98では復帰変異ウェル数が対応する陰性対照の平均自然復帰変異ウェル数の3倍以上、TA100では2倍以上となる用量段階があり、その反応が用量依存的であることである。また、必要に応じて再現性を確認する。

さらに17種のエームス試験陽性変異原物質の反応性を検討した結果、15化合物が陽性を示し(88%, 15/17)、FATが従来のエームス試験と同様の感受性を示すことを確認した。

原は、森田が確立したFATの手法を自らの研究所(食品薬品安全センター秦野研究所)に移植し、13種類の既知の変異原物質を用いてFATを行い、森田研究室で得られた結果と比較した。TA100およびTA98を用いた判定結果は、ほとんどのケースで両機関で一致しており、本試験系は十分に信頼性のあることが示された。

井上らは、SV40 T抗原を哺乳類培養細胞で発現するベクターpCOSV1を作製した。この遺伝子を*gpt delta*マウスの肺由来の線維芽様初代培養細胞に導入し、*gpt delta*マウス由来の細胞を用いた*in vitro*遺伝毒性試験確立の基礎を築いた。

神藤らは、作製したトランスジェニックラットを用いBPによる*in vivo*突然変異誘発について検討した。その結果、BPにより用量依存的な*gpt* MFおよびSpi⁻ MFの上昇を観察した。*gpt* MFは、62.5および125 mg/kg投与群でそれぞれ非投与群の2.2倍および4.3倍高い値を示した。Spi⁻ MFは、それぞれ2.4倍および9.4倍高い値を示した(Table 2)。

Table 2 Induction of *gpt* and *Spi* mutations and micronuclei formation by benzo[a]pyrene treatments

Dose (mg/kg)	<i>gpt</i> assay			<i>Spi</i> assay			Induction of micronuclei (%)
	Total Cfu	Mutant	MF ($\times 10^{-6}$)	Total Pfu	Mutant	MF ($\times 10^{-6}$)	
0	5,973,000	5	0.98	7,108,500	3	0.49	0.067
62.5	4,018,000	9	2.2	4,594,500	6	1.2	0.283*
125	3,115,000	12	4.2	7,536,000	37	4.6	0.367*

*P < 0.01

また ENU 投与後の *gpt* MF の経時的変化を調べた。すなわち ENU を 5 日間連続投与した後、7, 21, 35, 70 日目に肝臓の *gpt* MF を測定した (Table 3)。 *gpt* MF は 16×10^{-6} (7 日目), 20×10^{-6} (21 日目), 25×10^{-6} (35 日目), 20×10^{-6} (70 日目) で 35 日目をピークに緩やかに減少した。非投与群の MF は 2×10^{-6} であった。DNA シークエンス解析の結果、自然突然変異スペクトルは主に GC→AT トランジション (56%)、AT→TA トランスバージョン (21%)、GC→TA トランスバージョン (11%) であることが明らかとなった。ENU 投与群では、投与 7 日目では AT→TA トランスバージョンが最も多く (38%)、その GC→TA トランスバージョン (25%)、GC→AT トランジション (13%) が認められた。しかし投与 21, 35, 70 日目においては、AT→TA トランスバージョンがそれぞれ 80%、60%、60% を占めた。

Table 3 Time-course effects on *gpt* mutant frequency (MF) induced by ENU

ENU dose (mg/kg)	Days after the last treatment	MF ($\times 10^{-6}$)	
		mean	SD
0	7	2	1
	70	0.4	0.7
50 x 5 days	7	16	3
	21	20	7
	35	25	10
	70	20	8

4. 考察

能美は、DNA ポリメラーゼ II あるいは IV をコードするプラスミドを TA1538 株に導入し、その感受性を TA1538、TA98 と比較した。TA98 には、*mucAB* 遺伝子を持つ pKM101 プラスミドが導入されている。*mucAB* 遺伝子にコードされた DNA ポリメラーゼ RI は大腸菌 DNA ポリメラーゼ V (UmuDC) のホモログである。この 2 年ほどの間に、大腸菌からヒトまでさまざまな生物種から、新規な DNA ポリメラーゼが見出され Y ファミリー DNA ポリメラーゼと命名された。この一群のポリメラーゼの特徴は、DNA 上の損傷部位を乗り越えて複製を続ける、いわゆるトランスリジョン DNA 合成 (translesion DNA synthesis、以下 TLS と略) に関わる点である。TLS は正しい塩基対合を作りながら進む場合もある (error-free TLS) が、誤った塩基を挿入しながら進む場合 (error-prone TLS) もあり、後者の TLS は、塩基置換やフレームシフト変異の誘発につながる。大腸菌には従来 3 種類の DNA ポリメラーゼ (DNA polymerase I, II, III) があると考えられてきたが、それ以外に 2 種類の Y ファミリー DNA ポリメラーゼ、すなわち DNA ポリメラーゼ IV (DinB)、DNA ポリメラーゼ V (UmuDC) があることが明らかにされた。特に DNA ポリメラーゼ IV (DinB) の存在は、能美らがフランスのグループと国際共同研究を進める中で明らかにしたものである。30 種類の変異原物質に対する感受性を 4 つのテスター (Table 1) で比較することにより、大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV (DinB) を発現する YG5161 株が、従来 TA98 では高感度に検出することが困難であった第 1 グループに含まれる化合物の変異原性を効率よく検出することを明らかにした。第 1、第 2 グループには、BP, 3-MC, DMBA などの発がん性芳香族炭化水素が

含まれており、その変異原性を高感度に検出するテスターを開発したことは意義深いものと考えられる。今後は、ヒト由来の Yファミリー DNA ポリメラーゼを発現するテスターを構築する予定である。

鎌滝は、ヒト CYP と OR を発現するサルモネラ株を用いて、6 種類すべての PBTA 誘導体が CYP1A1 によりほぼ選択的に代謝活性化されることを明らかにした。CYP1A1 は肝臓には構成的に発現していない。しかし、ヒト肝における CYP1A1 の発現は、たばこ煙中に含まれる多環芳香族炭化水素などにより誘導されることが知られている。CYP1A1 の肝における発現が誘導された場合は、PBTA 類は肝において代謝的に活性化されると考えられ、肝が PBTA 類の毒性の標的臓器になる可能性がある。PBTA 類自身が、自らを活性化する酵素である CYP1A1 の発現を誘導する可能性が考えられるが、この点については今後検討する予定である。CYP1A1 は皮膚や肺にその発現が認められるため、これらの臓器も PBTA 類の毒性の標的臓器になる可能性がある。

森田は、17 種のエームス試験陽性物質について FAT を実施した。その結果、9-aminoacridine (9AAc) および Danthrone を除く 15 化合物が陽性を示した (88%, 15/17)。9AAc は、エームス試験では TA1537 に対して変異原性を示すが、TA98 および TA100 に対しては変異原性を示さない。FAT においても、9AAc の TA98 および TA100 に対する陰性特異性が明らかとされ、本結果は妥当なものと考えられた。一方、Danthrone は酸化的 DNA 損傷作用を有し、ラジカルが変異原性発現に関与していると考えられる。FAT では溶媒に DMSO を用いたため、抗酸化作用を有する DMSO によりラジカルが捕捉されたため陰性を示したと推測される。9AAc を除いた 16 化合物による評価では、FAT の陽性検出率は 94% (16/17) となり、Ames 試験と同様の感受性を示した。FAT の利用により、従来法のエームス試験 (TA100 と TA98 を用いたプレインキュベーション法) に比べ、必要化合物量は 20 分の 1 (100mg に対し 5mg) に減少し、スループット (処理化合物数) は 2 倍 (6 化合物/2 回/週に対し 12 化合物/2 回/週) に増加した。さらにスケールダウン効果により、1 化合物当たりの試験経費も 3 分の 1 (¥20000 に対し ¥6400) に減少した。以上のように、FAT は迅速・高感度・微量化に優れた試験法であり、自動化も可能であることから、細菌を用いたハイ・スループット遺伝毒性試験法として有用と考えられる。

原は、森田のもとで確立された FAT の手法に基づき、自らの研究室にて 13 種類の変異原物質の試験を行い、本試験系は十分に信頼性のあるものであることを確認した。しかし、詳細に見てみると両機関の間に微妙な差異も認められた。例えば、TA98 の S9 mix 非存在下および存在下における 2-nitrofulorene や、TA100 の S9 mix 非存在下における cyclophosphamide については、森田研究室では「weak positive」としているが、原研究室では強い陽性反応が得られた。これらの結果から、同じ菌株を用いても試験機関により若干結果にばらつきが認められることが示された。両機関が所有している菌株の間にわずかながら差異が生じていることが考えられる。また、両機関の前培養や試験方法の微妙な差異が影響している可能性も否定できない。

井上らは、*gpt delta* マウスの肺由来の細胞に SV40 T 抗原を発現させ、不死化細胞の樹立を進めた。SV40 T 抗原の発現による p53 および Rb タンパクの不活化は、細胞の分裂寿命を延長させ、不死化細胞の出現確率を増加させる一要因である。しかし、細胞を不死化させるにはこれ以外の要因も必要であると考えられており、SV40 T 抗原を発現させた状態で培養を継続し、不死化に必要な何らかの変異の誘発を待つ必要があると考えられる。今後、今回作製した細胞集団を更に維持継代させることにより出現した不死化細胞を、クローニングし細胞株として樹立する予定である。

神藤らは、BP をトランスジェニックラットに投与し、BP による欠失変異を Spi assay により検出することができた。このことから、他の化合物による欠失変異の誘発も *gpt delta* マウスと同様に、*gpt delta* ラットにおいても検出可能であると考えられる。ENU 投与後の MF および変異スペクトルを経時的に解析した結果、肝臓において MF は投与後上昇し、投与後 35 日目においてピークに達し、その後減少することが示

唆された。同様の傾向は、他のトランスジェニックマウス(Muta Mouse)肝臓の場合にも報告されており、ENU誘発突然変異の形成および消失の過程において、*gpt delta* ラットは他のトランスジェニックマウスと類似した特徴をもっていると考えられた。遺伝子配列解析の結果、ENU誘発突然変異は主に AT→TA トランスバージョンであることが明らかとなった。*gpt MF* (全体の変異頻度) に占める AT→TA トランスバージョンの分布比から求めた AT→TA 変異頻度は、投与後 7 日目から上昇し 21 日目にピークに達しその後ゆっくり減少した。この経時的な変動は MF の時間推移と見かけ上似ていた。これらの結果から AT→TA トランスバージョンが ENU による遺伝毒性において主要な役割を果たしている可能性が考えられた。このように ENU 投与により AT→TA トランスバージョンが特徴的に誘発されることは、他のトランスジェニックマウスの例でも報告されており、*gpt delta* ラットと他のマウスの応答性が類似していたことから、両者は ENU による突然変異の誘発メカニズムにおいて共通した性質を持つと考えられた。

5. まとめ

384 ウェルプレートによる Fluctuation エームス試験 (FAT) の確立により、従来法のエームス試験に比べ、迅速・高感度・微量化した細菌を用いる遺伝毒性試験の基礎を構築することができた (森田、原)。また、発がん性多環芳香族炭化水素に高感受性を示す新しいサルモネラ株を樹立した (能美)。この株は、ヒト CYP を発現するサルモネラ株 (鎌滝) と共に、今後、FAT のテスター株として使用する予定である。さらに第 2 次スクリーニング遺伝毒性のための *gpt delta* トランスジェニックマウス由来の細胞について、不死化の試みが進められた (井上)。同じレポーター遺伝子を組み込んだ *gpt delta* トランスジェニックラットを用いた BP, ENU の遺伝毒性試験が行われ、樹立されたトランスジェニックラットの有用性が明らかにされた (神藤)。

6. 研究発表

1. Gruz, P., Pisani, F.M., Shimizu, M., Yamada, M., Hayashi, I., Morikawa, K. & Nohmi, T. Synthetic activity of Sso DNA polymerase Y1, an Archaeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replicating factor C. J. Biol. Chem. 276, 47394-47401 (2001).
2. Abril, N., Luque-Romero, F.L., Yamada, M., Nohmi, T. & Pueyo, C. The effectiveness of the *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase encoded by the *ogt_{ST}* gene from *S. typhimurium* in protection against alkylating drugs, resistance to *O*⁶-benzylguanine and sensitisation to dibromoalkane genotoxicity. Mutat. Res. 497, 111-121 (2001).
3. Kim, S.-R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P. & Nohmi, T. Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. Mol. Genet. Genomics 266, 207-215 (2001).
4. Horiguchi, M., Masumura, K., Ikehata, H., Ono, T., Kanke, Y. & Nohmi, T. Molecular nature of UVB-induced deletions in the murine epidermis. Cancer Res. 61, 3913-3918 (2001).
5. Swiger, R.R., Cosentino, L., Masumura, K., Nohmi, T. & Heddle, J.A. Further characterization and validation of *gpt delta* transgenic mice for quantifying somatic mutations *in vivo*. Env. Mol. Mutagen. 37, 297-303 (2001).
6. Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C., Wang, Z. & Woodgate, R. The Y-family of DNA polymerases. Molecular Cell 8, 7-8 (2001).
7. Nishikawa, A., Suzuki, T., Masumura, K., Furukawa, F., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H.Y., Nohmi, T., Hayashi, M. & Hirose, M., Reporter gene transgenic mice as a tool for analyzing the molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis.

- J. Exp. Clin. Cancer Res. 20, 111- 115 (2001).
8. Fujita, K., Nakayama, K., Yamazaki, Y., Tsuruma, K., Yamada, M., Nohmi, T. & Kamataki, T. Construction of *Salmonella typhimurium* YG7108 strains, each coexpressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase. Environ. Mol. Mutagen. 38, 329-338 (2001).
 9. Mushiroda, T., Ariyoshi, N., Yokoi, T., Takahara, E., Nagata, O., Kato, H. & Kamataki, T. 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. 14, 228-232(2001).
 10. Ariyoshi, N., Sawamura, Y. & Kamataki, T. A novel single nucleotide polymorphism altering stability and activity of CYP2A6. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 810-814(2001).
 11. Ozeki, T., Takahashi, Y., Kume, T., Nakayama, K., Yokoi, T., Nunoya, K., Hara, A. & Kamataki, T. Cooperative regulation of the transcription of human dihydrodiol dehydrogenase (DD)4/AKR1C4 gene by hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha/gamma and HNF-1alpha. Biochem. J. 355, 537-544(2001).
 12. Ariyoshi, N., Miyazaki, M., Toide, K., Sawamura, Y. & Kamataki, T. A single nucleotide polymorphism of CYP2B6 found in Japanese enhances catalytic activity by autoactivation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281, 1256-1260(2001).
 13. Fujita, K. & Kamataki, T. Screening of organosulfur compounds as inhibitors of human CYP2A6. Drug Metab. Dispos. 29, 983-989(2001).
 14. Muto, S., Fujita, K., Yamazaki, Y. & Kamataki, T. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. Mutat. Res. 479, 197-206(2001).
 15. Iwano, S., Saito, T., Takahashi, Y., Fujita, K. & Kamataki, T. Cooperative regulation of *CYP3A5* gene transcription by NF-Y and Sp family members. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 55-60(2001).
 16. Saito, T., Takahashi, Y., Hashimoto, H. & Kamataki, T. Novel transcriptional regulation of the human *CYP3A7* gene by specificity protein (Sp) 1 and Sp3 through nuclear factor-κB-like element. J. Biol. Chem. 276, 38010-38022(2001).
 17. Fujita, K., Nakayama, K., Yamazaki, Y., Tsuruma, K., Yamada, M., Nohmi T. & Kamataki, T. Construction of *Salmonella typhimurium* YG7108 strains each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase. Environ. Mol. Mutagen. 38, 329-338(2001).
 18. Fujita, K. & Kamataki, T. Predicting the mutagenicity of tobacco-related *N*-nitrosamines in humans using eleven strains of *Salmonella typhimurium* YG7108 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase. Environ. Mol. Mutagen. 38, 339-346(2001).
 19. Fujita, K. & Kamataki, T. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of *N*-alkylnitrosamines: Application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. Mutat. Res., 483, 35-41(2001).
 20. Daigo, S., Takahashi, Y., Fujieda, M., Ariyoshi, N., Yamazaki, H., Koizumi, W., Tanabe, S., Saigenji, K., Nagayama, S., Ikeda, K., Nishioka, Y. & Kamataki, T. A novel mutant allele of the *CYP2A6* gene (*CYP2A*11*) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype toward tegafur. Pharmacogenetics In press(2001).

7. 知的所有権の取得状況

特許出願中（発明の名称：突然変異検出用トランスジェニックラットおよび突然変異試験方法）

平成13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

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10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