

## 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      |
| (2) (財)食品薬品安全センター秦野研究所 | 原 巧        |
| (3) グラクソ・スミスクライン株式会社   | 森田 健       |
| (4) 明治製菓(株)薬品総合研究所     | 神藤 康弘、林 宏行 |
| (5) 中外製薬株式会社 富士御殿場研究所  | 井上 誠、竹入 章  |

### 要旨〔120字以内〕

微生物を用いるハイ・スループット遺伝毒性試験を構築し、これに有用な新規 DNA ポリメラーゼ、ヒト CYP 遺伝子を発現する試験菌株を作製した。遺伝毒性試験用トランスジェニックラットを開発し、同一のレポーター遺伝子を持つマウス培養細胞を樹立した。

### 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、きわめて多数の候補化合物が医薬品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。本研究では DNA ポリメラーゼ遺伝子の発現、ヒト薬物代謝酵素遺伝子の導入を通じて、検出感度を高めた遺伝毒性試験用 *Salmonella typhimurium* (サルモネラ) 株を開発するとともに、開発した菌株を用いてマイクロウェルプレート上でアッセイを行うハイ・スループット (少量・多検体・高感度) 遺伝毒性試験法を確立する。また微生物 1 次スクリーニング系の高感度化に伴い現れる偽陽性結果を排除するため、ハイ・パフォーマンスな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評価系を樹立する。これにより、化合物の臓器特異性、変異の分子レベルにおける特徴について情報を得ることができる。第 1 次、第 2 次スクリーニング系の確立により、多数の候補化合物の中から、真に発がんリスクの低い物質を創薬開発の初期段階に選択しうる試験系の確立を目指す。

平成 13 年度、14 年度は、新規な DNA ポリメラーゼ (大腸菌 DNA pol IV) を発現するサルモネラ・テスター株の開発とその感受性の検討 (能美)、11 種類のヒト・チトクローム P450 (CYP) を発現するサルモネラ株の樹立とこれを用いた変異原代謝活性化機構の研究、ヒト胎児 P450 を発現するトランスジェニックマウスを用いたサリドマイド胎児毒性の検討 (鎌滝)、マイクロプレートを使用したハイ・スループット Fluctuation Ames 試験 (HTFT) および SOS/*umu* 試験 (SOS) 法の構築 (原、森田)、レポーター遺伝子 ( $\lambda$ EG10) を導入した遺伝毒性試験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)、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とその変異感受性に関する検討 (新倉) を目的とした。

### 2. 研究方法

大腸菌の DNA ポリメラーゼ IV (DinB) を発現するプラスミド pYG786 を導入したサルモネラ TA1538 株 (YG5161) を樹立し、その感受性を 30 種類の変異原を用いて従来株 (TA1538、TA98) と比較した。サルモネラの *dinB* 遺伝子をクローニングし、サルモネラ TA1538 株の染色体上の *dinB* を薬剤耐性遺伝子と置換した株 (YG6202, YG6205) を作製した。樹立した菌株の感受性を親株の TA1538 と比較した。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方法で行った (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 株あるいはアルキル化損傷突然変異に高い感受性を示す YG7108 株を用い、淀川水系の河川より単離された 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-methoxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-1)とその誘導體(PBTA-2, -3, -4, -5, -6)の変異原性を検索した。ヒト胎児に発現する P450 分子種(CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A7)およびプロスタグランジン G/H 合成酵素(COX-1, COX-2)遺伝子を導入したトランスジェニックマウス由来の精子と非トランスジェニックマウスの卵を体外受精させ、受精卵を仮親に移し、妊娠 9 日目にサリドマイドを腹腔投与して毒性学的検討を行った(鎌滝)。サルモネラ TA100 および TA98 を用いて 384 ウェルマイクロプレートによる HTFT を実施した。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、被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ゾールパープルを含有) を添加、次いで各ウェルの処理菌液を 384 ウェルプレートの 48 ウェルに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測した。本研究では、陽性と判定する基準を TA100 では復帰変異ウェル数が陰性対照値の 2 倍以上、TA98 では 3 倍以上となる用量段階があることとした。また大腸菌 WP2 *uvrA* を用いる HTFT 法の樹立を試みた(原)。サルモネラ TA1535/pSK1002 および芳香族アミン類に高感受性を示す NM2009 株を用いた 96 ウェルプレートによる SOS/*umu* 試験(SOS)を実施した。試験菌液、被験物質溶液および 0.1M リン酸緩衝液(代謝活性化の場合は S9 mix)を 96 ウェルプレートに接種した。プレートを 37°C、2 時間培養し、TGA 培地を各ウェルに添加した 96 ウェルプレートに培養物をトランスファーして、再び 37°C、2 時間培養した。培養終了後、マイクロプレートリーダーにて 600nm の OD を測定した(生存率プレート)。さらに新たな 96 ウェルプレートの各ウェルに、処理菌液、ONPG 溶液を添加し、28°C、30 分間培養し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性を算出した(森田)。

樹立した S.D.系 *gpt delta* トランスジェニックラットに benzo[a]pyrene (BP)(62.5 および 125 mg/kg)を投与し、7 日後に肺における *gpt* 突然変異体頻度と、Spi<sup>-</sup>欠失変異体頻度を測定した。Ethyl nitrosourea (ENU)を 50 mg/kg/日、5 日間連続腹腔内投与し、7、21、35 および 70 日目に屠殺し、肝の *gpt* 突然変異体頻度を測定した。また変異体のシーケンス解析を行った。またフェナセチンを混餌(0.5%)投与し、26 週目における腎臓の *gpt* および Spi<sup>-</sup>変異体頻度を測定した。F344 系のトランスジェニックラットを作製するため、受精卵にレポーター遺伝子( $\lambda$ EG10) DNA をマイクロインジェクションした(神藤)。*gpt delta* マウスより肺を摘出後、0.1%(w/v) trypsin EDTA を含む MEM 培養液でインキュベートして線維芽細胞を取得し、10%(v/v)FBS (GIBCO fetal bovine serum)を含む DMEM 培養液中で培養した。SV40 large T 抗原を哺乳類細胞で発現するベクター-pCOSVI を導入し、得られた細胞株を 10%(v/v)FBS を含む DMEM 培養液で培養し *gpt delta* L1 細胞とした。樹立した *gpt delta* L1 細胞の既知変異原物質に対する反応性を確認するため、BP および mitomycin C (MMC) を細胞に暴露し、6TG selection および Spi<sup>-</sup> selection により変異体頻度を測定した(新倉)。

### 3. 研究成果

大腸菌の 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 YG5161 株を樹立し、同株が BP, BP diolepoxide, 3-methylcholanthrene (3MC), BP 7,8-dihydroepoxide, 10-aza-BP, 1-aminoanthracene, 2-aminoanthracene(2-AA)など、主に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 株よりも高い感受性を示すことを明らかにした。サルモネラの *dinB* 遺伝子を欠損させた株(YG6202, YG6205)を作製し、この株が BP に対し親株の TA1538 よりも低い変異感受性を示したことから、サルモネラにおいても DNA ポリメラーゼ IV (DinB)が BP の変異誘発に重要な役割を果たしているものと結論した。大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV(DinB)を高発現するサルモネラ YG5161 株は、発がん性多環芳香族炭化水素の変異原性を検出する際に有用である(能美)。6 種類すべての PBTA 誘導體は、ヒト CYP1A1 によりほぼ特異的に代謝的に活性化された。以上のことから、樹立した菌株を用いてこれらの化学物質の変異原性を検討し得ること、また活性化に関与する P450 分子種を同定し得ることが明らかとなった。体外受精させた卵を仮親の卵管へ 20 個移植し妊娠させ、サリドマイドを妊娠 9 日目に腹腔投与した。トランスジェニックマウス由来の精子を用いた胚では、毒性

(胚吸収や死亡)がサリドマイド処理群において溶媒処理群や無処理群よりも強く現れたが、無処理群においても毒性が高率(約60%)に見られたため、バックグラウンドレベルを下げて更に検討することが必要であると結論した(鎌滝)。従来法のAmes試験で陽性結果を示す13化合物のうち11化合物がHTFTで陽性となった。HTFTで陰性となった2化合物は9-aminoacridine(9-AA)とdanthron(DAN)である。大腸菌WP2 *uvrA*株を用いるHTFTにおいて、試験菌液の調製およびトリプトファン添加量を種々検討し、処理培地と指示培地の両方に0.5 µg/mlのトリプトファンを添加する条件で、S9 mix存在下における2-AAの明確な陽性結果を得ることができた(原)。96ウェルプレートを用いるSOSの方法に関し(1)回転培養速度および試験菌液調製用培養時間(2)至適陽性対照物質ならびにその濃度(3)陽性の判断基準を検討し最適条件を確立した。当初陰性となったBPおよび3MCについて改変プロトコルを用いた再検討の結果、2化合物とも陽性を示した。最終的に17種のAmes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)、SOSがAmes試験と同様の感受性を示すことを確認した(森田)。

S.D.系トランスジェニックラットにBPを投与した後の肝臓における*gpt*変異体頻度は、62.5および125 mg/kg投与群でそれぞれコントロールの2.2および4.3倍、Spi<sup>-</sup>変異体頻度はコントロールの2.4および9.4倍に上昇した。ENU投与群の*gpt*変異体頻度は、投与後7、21、35および70日目において、それぞれ16、20、25および20×10<sup>-6</sup>であった。ENU投与群における変異スペクトルは、投与後7日目ではAT→TAトランスバージョンが38%を占めたが、その他の変異(GC→TAトランスバージョン(25%)やGC→ATトランジション(13%))も認められた。しかし投与後21、35および70日目では、AT→TAトランスバージョンが80%、60%および60%と高い値を示した。*gpt delta*トランスジェニックラットに26週間フェナセチンを投与し、腎臓における遺伝子突然変異体頻度を測定した。統計的な有意差はないものの、*gpt* MFは1.7倍、Spi<sup>-</sup> MFは2倍、処理群が無処理群よりも高い値を示した。F344系ラットの受精卵を用いてトランスジェニックラットの作製を試み、2系統のファウンダーを得たが、いずれからもλEG1は回収されず実用にはいたらなかった(神藤)。*gpt delta*マウス由来の肺線維芽細胞にSV40 large T抗原を発現させることにより、不死化細胞株*gpt delta* L1を樹立した。*gpt delta* L1の増殖曲線より求めた倍加時間はおおよそ12時間であった。染色体数を計測した結果、染色体モードは75~76であり、マウス染色体数(2n=40)と比較して倍数性を示した。細胞はクローニングから約6ヶ月間、約60回継代した後も安定して増殖を続けた。BPおよびMMCを暴露させた*gpt delta* L1細胞において、6TG selectionおよびSpi<sup>-</sup> selectionともに変異体頻度の有意な増加を認めた。BPを0、2.5、5および10・g/mlの用量で暴露させた細胞における変異体頻度は、6TG selectionではそれぞれ1.7×10<sup>-5</sup>、10.7×10<sup>-5</sup>、15.8×10<sup>-5</sup>および47.4×10<sup>-5</sup>、Spi<sup>-</sup> selectionではそれぞれ1.1×10<sup>-5</sup>、5.7×10<sup>-5</sup>、9.5×10<sup>-5</sup>および13.6×10<sup>-5</sup>であった。MMCを0、0.025、0.05および0.1・g/mlの用量で暴露させた細胞における変異体頻度は、6TG selectionではそれぞれ2.7×10<sup>-5</sup>、3.9×10<sup>-5</sup>、9.0×10<sup>-5</sup>および11.8×10<sup>-5</sup>、Spi<sup>-</sup> selectionではそれぞれ3.3×10<sup>-5</sup>、2.3×10<sup>-5</sup>、5.0×10<sup>-5</sup>および6.3×10<sup>-5</sup>であった(新倉)。

#### 4. 考察・まとめ

この3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、いわゆるトランスレージョンDNA合成(translesion DNA synthesis, TLS)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5種類のDNAポリメラーゼ(DNA polymerase I-V)があり、そのうち2種類(DNAポリメラーゼIV(DinB)、DNAポリメラーゼV(UmuDC))がYファミリーに属する。30種類の変異原物質に対する感受性を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、BP、3MCなどの発がん性多環芳香族炭化水素の変異原性を高感度に検出できることを明らかにした。森田の報告にあるように、BP、3MCの変異原性は検出しづらいことが知られており、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(能美)。PBTA類を披験物質として用いた変異原性試験の結果、CYP1A1の役割が重要であることが明らかになった。

CYP1A1 は構成的に発現していないが、タバコ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 の発現が誘導された場合は、その臓器が PBTA 類の毒性の標的臓器になる可能性がある。さらに 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。BP も CYP1A1 で活性化されることが知られており、ヒト CYP1A1 を組み込んだテスター株は、多環芳香族炭化水素の変異原性を HTFT や SOS で検出する際に有用であろう。またヒト P450 遺伝子等を組み込んだトランスジェニックマウスは、胎児毒性を検出する有用なモデルとなる可能性が示唆された（鎌滝）。今回、秦野研究所で得られた HTFT の結果は、グラクソ・スミスクライン筑波研究所の森田研究室で得られた HTFT の試験結果と良く一致していた。このことは各化合物に関する判定が試験機関の間で一致していることを示しており、HTFT は信頼性の高い試験系といえる。HTFT で陰性となった 2 つの Ames 陽性化合物のうち、9-AA はサルモネラ TA1537 株に特異的に陽性結果を示す変異原であり、TA100 と TA98 を用いる HTFT で陰性となったことは妥当と考える。もう一つの陰性となった DAN は、活性酸素を介して DNA 損傷を起こすと考えられる物質であり、変異原性よりも致死性が高いために陰性に終わった可能性が考えられる。今後は能美や鎌滝により開発された新規テスター株を用いて HTFT 試験を実施する（原）。SOS では、当初 17 種の Ames 陽性変異原物質中 BP、cyclophosphamide (CP)、DAN および 3MC の 4 化合物が陰性を示した。BP および 3MC について処理培養後のトランスファーによる回復培養を実施せず、直ちに酵素反応を行う改変プロトコルを用いた結果、この 2 化合物は陽性を示した。改変プロトコルによる BP および 3MC の陽性結果は、試験操作法の標準化にはさらなる検討が必要であることを示唆するが、総合評価では SOS の陽性検出率は 88% (15/17) となり、Ames 試験と高い一致性を示すことができた。17 種の Ames 陽性変異原物質を用いた HTFT および SOS のバリデーション試験の結果、Ames 試験との陽性一致率はいずれも 88% (15/17) を示し、HTFT と SOS の組合せでは、陽性一致率は 94% (16/17) であった。また、Ames 試験 (TA98 と TA100 を使用)、HTFT (TA98 と TA100 を使用) および SOS (TA1535/pSK1002 と NM2009 を使用) のスルーットおよび経費を比較した。HTFT および SOS は、従来法の Ames 試験に比べ、それぞれ必要化合物量は 20 分の 1 (100mg に対し 5mg) および 100 分の 1 (1mg) に減少し、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) および 3 倍 (18 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はそれぞれ 3 分の 1 (¥20000 に対し ¥6400) および 8 分の 1 (¥2400) に減少した。以上のように、HTFT および SOS は Ames 試験と良い相関性を示し、かつ迅速・高感度・微量化に優れた試験法で、自動化も可能であることから、細菌を用いたハイ・スルーット遺伝毒性試験法として有用と考えられる（森田）。

現在、発がん試験の多くはラットを用いて行われており、*in vivo* で発がん と遺伝毒性の関連を調べるためには、遺伝毒性試験用トランスジェニックラットの実用化が重要である。医薬品の毒性評価に汎用されている SD 系ラットを基に開発された *gpt delta* ラットのバリデーション試験および標準的プロトコルの構築を行い、発がん性を早期に予測できる *in vivo* 遺伝毒性試験系としての有用性を検討した。*gpt delta* ラットの特徴の一つとなる Spi<sup>-</sup> assay による欠失型変異の検出の可否を、BP を用いて評価した結果、用量相関的な陽性反応を得ることができ、BP による欠失変異誘発をラットにおいても検出できることが明らかになった。ENU 投与後の変異体頻度および変異スペクトルを経時的に解析した結果、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ことが示唆された。さらに、変異体の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り、ENU による突然変異の誘発メカニズムもラットとマウスで類似していることが示唆された。フェナセチンを 26 週投与した群では、無処理群に比べて高い変異体頻度を示したが、統計的な有意差は見られなかった。さらに 52 週投与後の評価を行うことにより、フェナセチンの発がん性と遺伝毒性の関係を明らかにできるものと考えられる。発がん試験で汎用されるフィッシャーラットのトランスジェニック作製を試みたが、実用化には至っていない。マイクロインジェクションの方法を変更することで再検討する予定である（神藤）。*gpt delta* L1 細胞において SV 40 large T 抗原の核への局在および染色体の倍数性が認められた。これらの性状は、SV 40 large T 抗原を用いて不死化させた細胞において広く認められるものであり、*gpt delta* L1 において SV 40 large T 抗原が当初のねらい通り発現、機能することで細胞を不死化させたものと考えられる。BP および MMC に対しても、変異体頻度の有意な増加が認められた。これは *gpt delta* L1 細胞が *in vitro* 遺伝子突然変異検出系として利用可能であることを示唆するものである（新倉）。

## 5. 研究発表

- 1) Hayashi, H., Kondo, H., Masumura, M., Shindo, Y. and Nohmi, T. A novel transgenic rat for in vivo genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi<sup>-</sup> selection. *Environ. Mol. Mutagen.*, in press.
- 2) Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Kim, S.-R., Pisani, F.M., Masutani, C., Kanke, Y., Harashima, H., Hanaoka, F. and Nohmi, T. Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases. *EMBO reports*, 4, 269-273, 2003.
- 3) Takeiri, A., Mishima, M., Tanaka, K., Shioda, A., Ueda, O., Suzuki, H., Inoue, M., Masumura, K. and Nohmi, T. Molecular characterization of mitomycin C-induced large deletions and tandem-base substitutions in the bone marrow of *gpt* delta transgenic mice, *Chem. Res. Toxicol.*, 16: 171-179, 2003.
- 4) Masumura, K., Kuniya, K., Kurobe, T., Fukuoka, M., Yatagai, F. and Nohmi, T. Heavy-ion-induced mutations in the *gpt* delta transgenic mouse: Comparison of mutation spectra induced by heavy-ion, X-ray and  $\gamma$ -ray radiation. *Environ. Mol. Mutagen.*, 40: 207-215, 2002.
- 5) Yatagai, F., Kurobe, T., Nohmi, T., Masumura, K., Tsukada, T., Yamaguchi, H., Kasai-Eguchi, K. and Fukunishi, N. Heavy-ion induced mutations in transgenic mouse *gpt* delta: Effect of *p53* gene knockout. *Environ. Mol. Mutagen.*, 40: 216-225, 2002.
- 6) Horiguchi, M., Masumura, K., Ikehata, H., Ono, T., Kanke, Y. and Nohmi, T. Molecular nature of UVB-induced deletions in the murine epidermis. *Cancer Res.*, 61: 3913-3918, 2001.
- 7) Swiger, R.R., Cosentino, L., Masumura, K. and Nohmi, T. and 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.
- 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) Kim, S.R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P., & Nohmi, T., Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA polIV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics* 266: 207-215, 2001.
- 10) 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 replication factor C. *J. Biol. Chem.*, 276: 47394-401, 2001.
- 11) Abril, N., Luque-Romero, F.L., Yamada, M., Nohmi, T., & Pueyo, C., The effectiveness of the *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase encoded by the *ogt*<sub>ST</sub> gene from *S. typhimurium* in protection against alkylating drugs, resistance to *O*<sup>6</sup>-benzylguanine and sensitisation to dibromoalkane genotoxicity. *Mutat. Res.*, 497: 111-121, 2001.
- 12) Ariyoshi, N., Sekine, H., Saito, K., and Kamataki, T. Characterization of a genotype previously designated as CYP2A6 D-type: CYP2A6\*4B, another entire gene deletion allele of the CYP2A6 gene in Japanese. *Pharmacogenetics*, 12: 501-504, 2002.
- 13) Ariyoshi, N., Miyamoto, M., Umetsu, Y., Kunitoh, H., Dosaka-Akita, H., Sawamura, Y., Yokota, J., Nemoto, N., Sato, K., and Kamataki, T. Genetic polymorphism of CYP2A6 gene and tobacco-induced lung cancer risk in male smokers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Preven.*, 11: 890-894, 2002.
- 14) Chida, M., Ariyoshi, N., Yokoi, T., Nemoto, N., Inaba, M., Kinoshita, M., and Kamataki, T. New allelic arrangement CYP2D6\*36x2 found in a Japanese poor metabolizer of debrisoquine. *Pharmacogenetics*, 12: 659-662, 2002.
- 15) Daigo, S., Takahashi, Y., Fujieda, M., Ariyoshi, N., Yamazaki, H., Koizumi, W., Tanabe, S., Saigenji, K., Nagayama, S., Ikeda, K., Nishioka, Y., and Kamataki, T. A novel mutant allele of the CYP2A6 gene (CYP2A6\*11) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype towards

- tegafur. *Pharmacogenetics*, 12: 299-306, 2002.
- 16) Fujieda, M., Yamazaki, H., and Kamataki, T. Genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes. *Gan To Kagaku Ryoho*, 29: 663-668, 2002.
  - 17) Hashizume, T., Imaoka, S., Mise, M., Terauchi, Y., Fujii, T., Miyazaki, H., Kamataki, T., and Funae, Y. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal Microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300: 298-304, 2002.
  - 18) Kamataki, T., Fujita, K., Nakayama, K., Yamazaki, Y., Miyamoto, M., and Ariyoshi, N. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: Application of genetically engineered Salmonella expressing human CYP. *Drug Metab. Rev.*, 34: 667-676, 2002.
  - 19) Kiyotani, K., Fujieda, M., Yamazaki, H., Shimada, T., Guengerich, F. P., Parkinson, A., Nakagawa, K., Ishizaki, T., and Kamataki, T. Twenty one novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2A6 gene in Japanese and Caucasians. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 17: 453-458, 2002.
  - 20) Kiyotani, K., Yamazaki, H., Fujieda, M., Daigo, S., Satarug, S., Ujjin, P., and Kamataki, T. Novel mutations of the CYP2A6 gene in a Thai population with lowered capacity of coumarin 7-hydroxylation. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 17: 161-163, 2002.
  - 21) Nakamura, K., Ariyoshi, N., Yokoi, T., Ohgiya, S., Chida, M., Nagashima, K., Inoue, K., Kodama, T., Shimada, N., and Kamataki, T. CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 293: 969-973, 2002.

知的所有権の取得状況

- |           |                                     |
|-----------|-------------------------------------|
| 1) 特許取得   | 出願中「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」 |
| 2) 実用新案登録 | 該当無し                                |
| 3) その他    | 該当無し                                |