

平成15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

目 次

第3分野

課題番号

| | | |
|----------------------|--|-------------|
| 20030917A KH31028 | 非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価 | 吉岡澄江 …… 1 |
| 918A KH31029 | ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発 | 能美健彦 …… 10 |
| 919A KH31030 | バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発 | 川崎ナナ …… 18 |
| 920A KH31031 | 医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究 | 棚元憲一 …… 27 |
| 921A KH31032 | 動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究 | 大野泰雄 …… 33 |
| 922A KH31033 | 医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発 | 藤本純一郎 …… 43 |
| 923A KH31034 | 創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立 | 井上 達 …… 48 |
| 924A KH31035 | 新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究 | 合田幸広 …… 58 |
| 925A KH31036 | 医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究 | 頭金正博 …… 67 |
| 926A KH31037 | 多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発 | 山崎利雄 …… 74 |
| 927A KH31038 | 食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立 | 山本茂貴 …… 83 |
| 928A KH32081 | DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究 | 阿曾幸男 …… 90 |

第4分野

| | | |
|-----------------|--------------------------------------|-------------|
| 929A KH41039 | ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立 | 小熊恵二 …… 97 |
| 930A KH41040 | 小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究 | 奥山虎之 …… 101 |
| 931A KH42074 | 熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究 | 名和行文 …… 105 |
| 932A KH42075 | 新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究 | 山崎俊夫 …… 115 |

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

研究要旨 微生物を用いる遺伝毒性試験のハイ・スループット化を進め、この試験に用いる新規テスター株を樹立した。トランスジェニックラット、マウス培養細胞の有効性について検討し、トランスジェニックマウスを用いる催奇形性試験を開始した。

分担研究者

- (1) 北海道大学大学院薬学研究科 鎌滝哲也
- (2) 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 横山真二
- (4) 中外製薬株式会社 新倉博文
- (5) 明治製菓株式会社 神藤康弘

A. 研究目的

創薬技術の進歩に伴い、従来に比べて飛躍的に多数の候補化合物が創薬の初期段階に生ずることとなった。薬効のスクリーニングに関してはリセプター・アッセイなどの新手法が開発され、そのスループット性の増大が計られている。しかし、安全性の検索に関しては従来と同様の方法がとられていることが多く、効率的な安全性検索方法の開発が望まれている。通常、創薬の初期段階には少量の化合物しか合成されないことが多いので、微量の化合物で効率的に安全性を検索するシステムの創設が望まれている。

遺伝毒性試験では、微生物からヒトまでDNAが共通の遺伝物質であることを利用して、*Salmonella typhimurium* (以下、サルモネラと略) や大腸菌などの微生物が試験のテスターとして汎用されてきた。微生物は生育が速く、多量の検体を一度に処理できるため、スループット性の更なる増大が期待できる。本研究班では、手法の改良とテスター株の遺伝的改変を通じてハイ・スループットな微生物遺伝毒性試験を開発することを第一の研究目的としている。

医薬品開発において遺伝毒性試験を行う目的の一つは、当該医薬品(候補化合物)の発がんリスクを評価することにある。遺伝毒性を介して発がん性を示す化合物には、一般に閾値が無いと考えられており、医薬品の使用に伴う発がん性のメカニズムに遺伝毒性(DNAに対する変異作用)が介在するか否かは重要な問題である。特に発がん試験において腫瘍の発生を認めた臓器があった場合、遺伝毒性との関連を明確にすることが求められる。

本研究班では、個体レベル(実験動物)で発がん遺伝毒性の相関を明確にする試験系の確立を第二の目的としており、変異検出用のレポーター遺伝子を導入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および培養細胞系を開発し、これらを用いる遺伝毒性試験の確立を目指している。

微生物を用いるハイ・スループット試験系を用いて、創薬の初期段階で遺伝毒性を示さない候補化合物を選択し、もし、選択された候補化合物が実験動物に発がん性を示した場合には、個体レベル、培養細胞レベルでその作用メカニズムを検索しうる総合的な遺伝毒性検索システムの構築を目標としている。

B. 研究方法

1) プラスミドと菌株の作製

DNAポリメラーゼIV(DinB)を発現するプラスミドpYG768をサルモネラTA1538株へ導入し、YG5161株を樹立した。YG5161株は原、横山両班員へ分与され、ハイ・スループットAmes試験に用いられた。大腸菌*dinB*遺伝子を含むプラスミドpYG690をTA1538株へ導入しYG5172株とした。YG5172株に、ヒトCYP1A1およびCYP還元酵素遺伝子を持つプラスミドpCW1A1/ORを導入しYG5175株を樹立した。pCW1A1/ORプラスミドのみを導入したTA1538をYG5174株とした。pCW1A1/ORプラスミドは鎌滝班員より供与された。

2) 試験方法

2-1) フラクチュエーションAmes試験(FAT)

試験菌株にはサルモネラTA100、TA98、YG5161株を用いた。被験物質による処理は24ウェルマイクロプレートを用いて行った。S9 mix非存在下では各ウェルに被験物質調製液10 μ Lおよび菌液490 μ Lを、S9 mix存在下では各ウェルに被験物質調製液10 μ L、菌液415 μ LおよびS9 mix 75 μ Lを入れて、37 $^{\circ}$ C、90分間回転培養した。培養終

了後の各ウェルに指示培地を 2.5 mL 加えた後、24 ウェルマイクロプレートの 1 ウェル中の処理液を、384 ウェルマイクロプレートの 48 ウェルに 50 μ L ずつ分注した。指示培地には発色試薬の bromocresol purple の他に histidine、biotin および glucose が含まれている。突然変異が生じたウェルでは菌が増殖して pH が下がることにより、発色試薬の bromocresol purple が紫色から黄色に変色する。37°C で 3 日間静置培養後、48 ウェル中の黄変したウェル（黄変ウェル）の数を計測した後、黄変ウェルの出現頻度（%）を算出した。黄変ウェルの出現頻度が陰性対照の 3 倍以上となり用量依存性が認められた場合に陽性と判定した。

2-2) SOS/*umu* 試験 (SOS)

LB 培養液にサルモネラ TA1535/pSK1002 を接種し、37°C で一夜培養した。菌液を TGA 培地で 100 倍希釈し、その菌液を 37°C で 1 時間培養した。96 ウェルマイクロプレートを用いて、被験物質溶液 4 μ L、S9 mix 非存在下では菌液 96 μ L、S9 mix 存在下では S9 mix 添加菌液を 96 μ L ずつ培養プレートに加え、37°C、2 時間振盪培養した。菌液の濁度 (A_{595}) をマイクロプレートリーダーで測定した。全ウェルにマルチピペットにより、Z 緩衝液を 90 μ L、0.1% SDS を 50 μ L 加え、基質として 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) あるいは chlorophenolred- β -D-galactopyranoside (CPRG) を 10 μ L ずつ添加後、37°C、30 分間静置した。1M 炭酸ナトリウムを 100 μ L ずつ添加し、反応を停止した。マイクロプレートリーダーで吸光度 (ONPG の場合は A_{415} を、CPRG は A_{570}) を測定した。各ウェルの吸光度のブランク補正後の値から、ONPG の場合は A_{415}/A_{595} 、CPRG の場合は A_{570}/A_{595} の計算式から相対酵素活性を求めた。濃度に依存した相対酵素活性が増加し、かつ陰性対照（溶媒）の 2 倍以上を示すものを陽性と判定した。

2-3) Ames 試験

pCW1A1/OR プラスミドを導入した菌株を用いる試験は、菌株を LB 培養液で 37°C、一夜培養した後、改変 TR 培地に一部を植え 30°C で 8 時間振とう培養した。IPTG (1.5 mM) を添加後、さらに 30°C で一晚培養した。培養液を nutrient broth で希釈し、生菌数を $1-2 \times 10^9$ にした後、37°C、20 分間のプレインキュベーションを含む Ames 法で試験を行った。S9 mix を用いる Ames 試験は、nutrient broth で一夜培養した菌液を用い、37°C、20 分間のプレインキュベーションを含む方法で行った。

2-4) トランスジェニックマウス肺由来 *gpt* delta L1 細胞を用いる変異の解析

培養フラスコ (25 cm²) に *gpt* delta L1 細胞を 2×10^5 cells/flask の密度で播種し、翌日、mitomycin C (MMC) を 0.1 μ g/mL の用量で 24 時間処理した。適宜継代を繰り返して 1 週間培養した後、細胞から DNA を抽出して、*in vitro* packaging により λ EG10 ファージを回収した。6-thioguanine (6-TG) selection および Spi⁻ selection における変異体頻度 (MF) を測定し、変異部位の配列変化を解析した。*gpt* 変異体については無処置群で 46 個、MMC 処置群で 45 個、Spi⁻ 変異体については無処置群で 43 個、MMC 処置群で 45 個についてそれぞれ解析を行なった。

2-5) *gpt* delta ラットを用いた変異の解析

gpt delta ラット（ヘテロ体、13-14 週齢、雄雌計 46 匹）を 2 群（control 群および phenacetin 0.5% 混餌投与群）に分け、52 週間投与を継続した。麻酔下で腹大静脈から採血後、主要臓器（肝臓、腎臓、脾臓、膀胱および骨髄）を摘出し、臓器重量測定後直ちに液体窒素で凍結して -80°C にて保存した。凍結保存した臓器からゲノム DNA を抽出し、*in vitro* packaging 法にて λ EG10 ファージを回収後、6-TG および Spi⁻ MF を測定した。

2-6) トランスジェニックマウスを用いる催奇形性試験

ヒト胎児 P450 分子種 (CYP1A1、CYP1B1、CYP2E1 および CYP3A7) およびプロスタグランジン G/H 合成酵素 (COX-1 および COX-2) を発現するトランスジェニックマウスを作出し、*in vivo* における毒性的検討を予備的に行った。

（倫理面への配慮）全ての動物実験は、実施施設における「動物実験管理に関する指針」従い、動物実験管理委員会の承認を受けて実施された。マウス培養細胞ならびに微生物を用いる実験は、倫理面の問題はないものと判断した。

C. 研究結果

C-1 多環芳香族炭化水素に高感受性を示すヒト CYP1A1 遺伝子を導入したサルモネラ・テスター株 (YG5175) の樹立

pCW1A1/OR プラスミドを導入した菌株 (YG5174、YG5175) は、S9 mix を添加しない場合にも benzo[a]pyrene (BP) および 10-aza BP の変異原性を検出した。特に *dinB* プラスミド pYG690 を導入

した YG5175 株は、BP および 10-aza BP に対してきわめて高い感受性を示し、BP および 10-aza BP の用量 0.25 μ g/プレートにおいて 947 および 878 誘発 His⁺ 復帰株数を示した。これに対し、pYG690 が導入されていない YG5174 株は、BP および 10-aza BP の用量 0.25 μ g/プレートにおいて 48 および 66 誘発 His⁺ 復帰株数を示した。pCW1A1/OR プラスミドが導入されていない TA1538 株および同株に pYG690 を導入した Y5172 株は、S9 mix が存在しない場合には、BP および 10-aza BP の変異原性を検出できなかった (能美)。

C-2 改良法 FAT

昨年度までの研究で、指示培地に histidine を添加することにより、陽性反応が顕著となり、しかも陰性対照値には影響を及ぼさないことが明らかにされている。今年度は、この改良法 FAT を用いて米国国家毒性計画 (NTP) で試験された 18 種類の化合物について試験を行い、その結果を従来からの Ames 試験と比較した。Ames 試験で陰性の 7 化合物はすべて改良法 FAT でも陰性となり特異性は 100% であった。また、Ames 試験で陽性の 11 化合物のうち 8 化合物 (73%) は改良法 FAT でも陽性となった。また、能美らが作製した YG5161 株を用いて、上記 NTP 選定化合物 7 種について改良法 FAT を実施した。YG5161 株は、他の菌株では検出できなかった Ames 試験陽性化合物 (4-nitro-*m*-phenylenediamine、および 9-nitroanthracene) を検出した (原)。また、3-methylcholanthrene、2-aminoanthracene についても、YG5161 株の方が TA98 株に比べ高い感受性を示した (横山)。

C-3 SOS

SOS の感度を増大させるため、従来からの ONPG と新しい基質 CPRG を比較した。8 種類の化合物を用いて比較し、その結果、CPRG を用いると、より低い用量から遺伝毒性を検出することができることが明らかになった。特に *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) に関しては、CPRG が ONPG よりも 16 倍高い感度を示した (横山)。

C-4 *gpt* delta L1 細胞を用いた変異検出

6-TG selection における MF は、無処置群に対して、MMC 処置群では 3.4 倍増加した。MMC 処置群では G:C→T:A および G:C→A:T の 1 塩基置換、5' -GG-3' および 5' -CG-3' におけるタンデム塩基置換、2 塩基以上の欠失変異の増加

が認められた。Spi⁻MF は、無処置群に対して、MMC 処置群では 4.3 倍に増加した。MMC 処置群では 7.6 kbp 以下の欠失変異の増加が認められた。これらの欠失変異のうち 24% (5/21) は 16 bp から 1.1 kbp の DNA 断片の挿入を伴う複雑な欠失変異であった (新倉)。

C-5 *gpt* delta トランスジェニックラットを用いた変異検出

52 週間 phenacetin 投与を行ったトランスジェニックラットの腎臓における *gpt* 遺伝子の変異について検討した。無処置群の MF が 2.59 ± 1.5 (mean \pm SD) であったのに対し、phenacetin 投与群の MF は 5.60 ± 3.0 (mean \pm SD) と 2 倍以上の上昇を示した。昨年度の、26 週間投与時のデータに比べた場合、無処置群および phenacetin 群共に MF の増加傾向が認められた (神藤)。

C-6 トランスジェニックマウスを用いる催奇形性試験

ヒト胎児に発現する酵素群 2~5 種類を同時に発現するトランスジェニックマウスを樹立した。これらトランスジェニックマウスを用いた検討の結果、thalidomide 投与群 (1mg/kg) において奇形 (浮腫および頭蓋骨における形態異常) および後期胚吸収が認められた。後期胚吸収および奇形の頻度はトランスジェニックマウスにおいて 8.3% であったのに対し、非トランスジェニックマウスにおいては 2.9% であった。phenytoin 投与群 (50mg/kg) においては奇形 (右眼球形態異常および背骨髄膜瘤) および後期胚吸収が観察された。後期胚吸収および奇形の頻度はトランスジェニックマウスにおいて 30.0% であったのに対し、非トランスジェニックマウスにおいては 8.4% であった (鎌滝)。

D. 考察

創薬の初期段階にあっては、候補化合物の (遺伝) 毒性を少量の試料で迅速にスクリーニングするシステムの確立が望まれている。今年度は、ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の実施に有用な新規テスター株の開発を進めるとともに、これまでに樹立された新規テスター株を用いて改良法 FAT を行い良好な結果を得た。

今年度に樹立された YG5175 株には、ヒト CYP1A1 とその還元酵素遺伝子を持つプラスミド (pCW1A1/OR) と大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV (*dinB*) 遺伝子を持つプラスミド (pYG690) が導入されている。BP をはじめとする多環芳香族炭化水素は、主

にCYP1A1により代謝的に活性化されDNA付加体を形成する。付加体を持つDNAを鋳型に複製が起こると、損傷部位の向かいに誤った塩基（例えばBPのグアニン付加体の向かい側にアデニン）が挿入されたり（塩基置換）、付加体部分を飛ばしてDNA合成が進んだり（フレームシフト）することにより、塩基配列変化（突然変異）が誘発される。DNAポリメラーゼIVはBPなどの多環芳香族炭化水素が付加した損傷部位を乗り越えてDNA合成を行う性質があり、YG5175株の多環芳香族炭化水素に対する高い感受性はDNAポリメラーゼIVの性質を反映している。これまで使われてきたテスター株TA1538やTA98に比べ、YG5175はより低い用量（0.25 μg/プレート）でより多くのHis⁺復帰株数を示し、10-azaBPに対する感受性をμg/プレート当たりの誘発復帰株数で比較すると、TA1538株5.1（1.0）、TA98株9.0（1.8）、YG5175株3512（689）となる（括弧内の数字はS9 mix存在下でのTA1538株の感受性を1.0として表した相対値。YG5175の値はS9 mixの無い条件で行ったもの）。YG5175株はS9 mixによる代謝活性化なしに多環芳香族炭化水素に対して高い感受性を示すことから、ハイ・スループットAmes試験のテスター株として有用である（能美）。

これまでにFATの条件検討を行い指示培地にhistidineを添加すると、2-aminobiphenilおよび4-nitroquinoline N-oxideに対する感受性が増大することを報告し、この手法を改良法FATとした。今年度は、この感受性の増大が一般的なものか否かを検討するため、NTP試験に用いられた18化合物についてAmes試験と改良法FATを実施し、両試験の一致率を調べた。その結果、Ames試験で陰性の7化合物はすべて改良法FATでも陰性となり、感受性の増大は擬陽性結果を増やすものではないことが示された。またYG5161株について、改良法FATのテスター株としての有効性について検討し、有用性を示唆する結果を得た（原）。

ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の一つであるSOS試験については、基質をONPGとCPRGで比較し、新しい基質CPRGがより高い感度を示すことを明らかにした。SOS試験は、FATに比べてより短期間に候補化合物の遺伝毒性を検索することが可能であり、今後は、宿主に用いる菌株の遺伝的改良を通して、より微量の試料で遺伝毒性を試験できる系を開発する必要がある（横山）。

医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインでは、複数の遺伝毒性試験の組み合わせにより医薬品使用時のリスクを総合的に判断することが求められている。特に発がん試験において腫瘍の発生

を認めた場合には、遺伝毒性との関連を明確にしなければならない。このような際に、最も重要な点はメカニズムを明らかにすることであり、標的臓器における作用の検討と詳細な変異の解析が求められる。本研究班では、これらの課題を解決するため、トランスジェニック動物を用いた評価系に着目し、変異検出用レポーターDNAλEG10をSprague-DawleyラットおよびC57BL/6Jマウス受精卵に導入して樹立した*gpt delta*トランスジェニックラットおよびマウスを用いる試験系の検討を進めた。さらにトランスジェニックマウス肺の繊維芽細胞からSV40 T抗原を用いて細胞株*gpt delta L1*を樹立した。

今年度は、樹立した細胞株をMMCで処理し、そのMFおよび変異スペクトルをマウス個体での結果と比較した。*gpt delta L1*細胞においてMMCにより誘発された変異は、*gpt delta*マウスにおいて*in vivo*で誘発された変異と概して同様であり、*in vivo*でみられた変異を全て網羅していた。一方で、G:C塩基対における1塩基置換、DNA断片の挿入を伴う複雑な欠失変異等は*gpt delta L1*細胞に特異的であり、*in vivo*では観察されないものであった。誘発される変異の*in vivo*、*in vitro*間での相違にはDNA修復系の違いが関係しているものと推察され、特にSV40 T抗原によるp53の不活化が関連するものと推測された（新倉）。

*gpt delta*トランスジェニックラットにphenacetinを52週間投与し、腎臓の*gpt MF*が有意に上昇していることを明らかにした。なお、0.5%混餌によるラットのphenacetin摂取量は概算で約80mg/dayとなる。投与期間中および投与終了後の各臓器に明らかな毒性を認めていないことから、炎症反応に起因した細胞分裂促進による間接的な遺伝子変異の影響は小さいものと考えられた。今回のラットへの投与量は体重50kgのヒトに換算すると一日当たり10gとなる。一方、ヒトにおいて発がんが報告されたphenacetin投与量は一日当たり約1~5gであるが、その際には必ず腎障害が付随していた。これらのことから、今回のトランスジェニックラットを用いた評価はヒトの暴露状況よりもマイルドな条件である可能性が考えられた。さらに確かな根拠をもってリスク評価を行うためには、発がん非標的臓器である肝臓等の評価を追加するとともに、変異コロニーに含まれるレポーター遺伝子の変異スペクトラムを解析することが必要である（神藤）。

ヒト胎児に発現するP450分子種（CYP1A1、CYP1B1、CYP2E1およびCYP3A7）およびprostaglandin G/H合成酵素（COX-1およびCOX-2）

を導入したトランスジェニックマウスを作出し、thalidomide および phenytoin を用い、ヒト P450 および COX による *in vivo* における毒性学的検討を行った。樹立したトランスジェニックマウスを用いて化学物質の催奇形性を検討し得ることを示唆した (鎌滝)。

E. 結論

創薬開発の初期段階と後期段階に有用な遺伝毒性試験系の構築を行った。すなわち創薬の初期段階において迅速に遺伝毒性を検索するハイ・スループット微生物試験系を確立し、これに有用なテスター株を開発した。また創薬の後期段階において、ラット、マウスに発がん性を示す候補化合物の作用機構を明らかにするため、トランスジェニックラットおよびトランスジェニックマウス細胞試験系を樹立し、その有用性について検討を進めた。催奇形性を検索するトランスジェニックマウス試験系について予備的検討を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Takeiri, M. Mishima, K. Tanaka, A. Shioda, O. Ueda, H. Suzuki, M. Inoue, K. Masumura and T. Nohmi, 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)
2. H. Hayashi, H. Kondo, M. Masumura, Y. Shindo and T. Nohmi, A novel transgenic rat for *in vivo* genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi⁻ selection. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41, 253-259 (2003)
3. M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, S.-R. Kim, F. M. Pisani, C. Masutani, Y. Kanke, H. Harashima, F. Hanaoka and T. Nohmi, Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases, *EMBO reports*, 4, 269-273 (2003)
4. A. Shibata, M. Masutani, T. Nozaki, N. Kamada, H. Fujihara, K. Masumura, H. Nakagama, T. Sugimura, S. Kobayashi, H. Suzuki and T. Nohmi, Improvement of the Spi⁻ assay for mutations in *gpt* delta mice by including magnesium ions during plaque formation. *Env. Mol. Mutagen.*, 41, 370-372 (2003)
5. E. Yamamura, T. Nunoshiba, T. Nohmi and K. Yamamoto, Hydrogen peroxide-induced microsatellite instability in the *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 570-576 (2003)
6. P. Gruz, M. Shimizu, F.M. Pisani, M.D. Felice, Y. Kanke and T. Nohmi, Processing of DNA lesions by archaeal DNA polymerases from *Sulfolobus solfataricus*, *Nucleic Acids Res.*, 31, 4124-4030 (2003)
7. I. Furuno-Fukushi, K. Masumura, T. Furuse, Y. Noda, M. Takahagi, T. Saito, Y. Hori, H. Suzuki, A. Wynshaw-Boris, T. Nohmi and K. Tatumi, Effect of Atm disruption on spontaneously-arising and radiation-induced deletion mutations in mouse liver, *Radiation Res.*, 160, 549-58 (2003)
8. K. Masumura, M. Horiguchi, A. Nishikawa, T. Umemura, K. Kanki, Y. Kanke and T. Nohmi, Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice, *Mutat. Res.*, 541, 91-102 (2003)
9. K. Masumura, Y. Totsuka, K. Wakabayashi and T. Nohmi, Potent genotoxicity of aminophenylnorharman, formed from non-mutagenic norharman and aniline, in the liver of *gpt* delta transgenic mouse, *Carcinogenesis*, 24, 1985-93 (2003)
10. V. Thybaud, S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R. Heflich, I. Lambert, H.J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima, *in vivo* transgenic mutation assays. *Mutat. Res.*, 540, 141-151 (2003)
11. T. Nohmi and K. Masumura, *gpt* delta transgenic mouse: a novel approach for molecular dissection of deletion mutations *in vivo*, *Advances in Biophysics*, 38, 97-121 (2004)
12. A. Shibata, M. Masutani, N. Kamada, K. Masumura, H. Nakagama, S. Kobayashi, H. Teraoka, H. Suzuki and T. Nohmi, An efficient method for mapping and characterizing structures of deletion mutations in *gpt* delta mice using Southern blot analysis with oligo DNA

- probes, *Env. Mol. Mutagen.*, in press.
13. K. Toide, H. Yamazaki, R. Nagashima, K. Itoh, S. Iwano, Y. Takahashi, S. Watanabe and T. Kamataki, Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A1, in human freshly isolated white cells: trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxins, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 12, 219-222 (2003)
 14. D. Mizuno, Y. Takahashi, T. Hiroi, S. Imaoka, T. Kamataki and Y. Funae, A novel transcriptional element which regulates expression of the *CYP2D4* gene by Oct-1 and YY-1 binding, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Structure and Expression*, 1627, 121-128 (2003)
 15. S. Yamaori, H. Yamazaki, A. Suzuki, A. Yamada, H. Tani, T. Kamidate, K. Fujita and T. Kamataki, Effects of cytochrome *b5* on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: Similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7, *Biochem. Pharmacol.*, 66, 2333-2340 (2003)
 16. K. Kiyotani, H. Yamazaki, M. Fujieda, S. Iwano, K. Matsumura, S. Satarug, P. Ujjin, T. Shimada, F.P. Guengerich, A. Parkinson, K. Nakagawa, T. Ishizaki and T. Kamataki, Decreased coumarin 7-hydroxylase activities and CYP2A6 expression levels in humans caused by genetic polymorphism in CYP2A6 promoter region (CYP2A6*9), *Pharmacogenetics*, 13, 689-695 (2003)
 17. H. Takeuchi, K. Saoo, M. Yokohira, M. Ikeda, H. Maeta, M. Miyazaki, H. Yamazaki, T. Kamataki and K. Imaida, Pretreatment with methoxsalen, a potent human CYP2A6 inhibitor, strongly inhibits lung tumorigenesis induced by NNK in female A/J mice, *Cancer Res.*, 63, 7581-7583 (2003)
 18. M. Ando, N. Hamajima, N. Ariyoshi, T. Kamataki, K. Matsuo and Y. Ohno, Association of *CYP2A6* gene deletion with cigarette smoking status in Japanese adults, *J. Epidemiol.*, 13, 176-182 (2003)
 19. Y. Kanamori, K. Fujita, K. Nakayama, H. Kawai and T. Kamataki, Large-scale production of genetically engineered CYP3A4 in *E. coli*: Application of a jarfermenter, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 18, 42-47 (2003)
- ## 2. 学会発表
1. T. Nohmi, Novel Y-family DNA polymerases and their roles in mutagenesis, 国立遺伝学研究所 Biological Symposia (2003, 2)
 2. K. Masumura, A. Nishikawa, K. Okazaki, T. Umemura, M. Hirose, T. Nohmi, Analysis of different susceptibility of rat and mouse in mutagenesis induced by potassium bromate, Keystone Symposium: Functional Genomics: Global Analysis of Complex Biological Systems (2003.2)
 3. M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, S.-R. Kim, F.M. Pisani, Y. Kanke, H. Harashima, T. Nohmi, Misincorporation of oxidized dNTPs by archaeal Y-family DNA polymerases, International Workshop on Modeling of Radiation Effects at Molecular and Cellular Level (2003, 2)
 4. 清水雅富, Petr Gruz, 紙谷浩之, Francesca M. Pisani, 金秀良, 益谷央豪, 菅家祐輔, 原島秀吉, 花岡文雄, 能美健彦, YファミリーDNAポリメラーゼによる酸化的損傷ヌクレオチド(8-OH-dGTPと2-OH-dATP)の誤りがちな取り込み, ワークショップ「DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2003」(2003, 2)
 5. 能美健彦, 突然変異の誘発とDNAポリメラーゼ, ワークショップ「ゲノム維持におけるDNAポリメラーゼの役割」(2003, 2)
 6. 清水雅富, Petr Gruz, 紙谷浩之, 金秀良, Francesca M. Pisani, 菅家祐輔, 原島秀吉, 能美健彦, 放射線などによる酸化損傷ヌクレオチドに対する古細菌YファミリーDNAポリメラーゼの取り込み, 放射線リスク研究の革新的技術に関する国際シンポジウムー量子生命科学時代の技術ー(2003, 3)
 7. 小久保清子, 山田雅巳, 松井恵子, 菅家祐輔, 能美健彦, ネズミチフス菌DNAポリメラーゼ遺伝子破壊株の各種変異原に対する感受性, ワークショップ「大腸菌ゲノミクスのさらなる発展に向けて: リソースの開発と今後」(2003, 3)
 8. 橋本顯子, 天沼喜美子, 日吉孝子, 高野裕久,

- 増村健一, 能美健彦, 青木康展, *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いた Benzo(a)pyrene の気管内投与による突然変異の解析, 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3)
9. M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, S.-R. Kim, F.M. Pisani, C. Masutani, Y. Kanke, H. Harashima, F. Hanaoka, T. Nohmi, Incorrect incorporation of oxidized dNTPs by Y-family DNA polymerases, 34th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (2003, 5)
 10. T. Nohmi, Molecular nature of genome rearrangements induced by crosslinker mitomycin C in vivo, Columbia University, Center for Radiological Research, Seminar (2003, 5)
 11. 能美健彦, 遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性試験の開発, 第 50 回日本実験動物学会総会 (2003, 5)
 12. K. Masumura, M. Hoshino, F. Yatagai, M. Ochiai, O. Ueda, H. Suzuki, H. Nakagama, T. Nohmi, Non-homologous end-joining in X-ray-irradiated *scid/gpt delta* transgenic mouse, Gordon Research Conferences "Genetic toxicology" (2003, 8)
 13. 麻見安雄, 村上正弘, 早田 勇, F.M. Pisani, 能美健彦, DNA ポリメラーゼによる損傷塩基認識機構の原子間力顕微鏡を用いた解析, 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2003, 10)
 14. 能美健彦, DNA 前駆体の酸化損傷と突然変異, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003, 11)
 15. 山田雅巳, 松井恵子, 金秀良, 小久保清子, 菅家祐輔, 山田典代, 福岡正道, 能美健彦, Benzo[a]pyrene の DNA 付加体が可視光により活性化されて活性酸素を生じる機構について, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003, 11)
 16. 小久保清子, 山田雅巳, 松井恵子, 菅家祐輔, 能美健彦, Ames 試験菌株における DNA ポリメラーゼ破壊株の各種変異原に対する感受性, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003, 11)
 17. 橋本顯子, 天沼喜美子, 日吉孝子, 高野裕久, 増村健一, 能美健彦, 青木康展, Benzo[a]pyrene および 1,6-dinitropyrene 投与 *gpt delta* トランスジェニックマウスの肺に生じた突然変異スペクトルの解析, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003, 11)
 18. 増村健一, 松井恵子, 山田雅巳, 能美健彦, アルキル化 DNA 損傷修復欠損サルモネラ株を用いたニトロソ化合物の突然変異誘発機構の解析, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003, 11)
 19. 落合雅子, 瀬尾友子, 上田乙也, 鈴木宏志, 増村健一, 能美健彦, 杉村隆, 中益斉, 自然発生及び azoxymethane 誘発の欠失型突然変異に *scid* 変異が及ぼす影響, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003, 11)
 20. 竹入章, 三島雅之, 田中健司, 塩田明文, 原田麻子, 新倉博文, 麻生良典, 増村健一, 能美健彦, *gpt delta* L1 細胞において mitomycin C により誘発された変異の解析, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003, 11)
 21. 山田雅巳, 金秀良, 松井恵子, 能美健彦, Y ファミリー DNA ポリメラーゼが乗り越える損傷の違いについて, 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003, 12)
 22. 増村健一, 宇多洋美, 西川秋佳, 岡崎和志, 梅村隆志, 広瀬雅雄, 能美健彦, 酸化的 DNA 損傷によりラット個体に誘発される突然変異スペクトルの解析, 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003, 12)
 23. 清水雅富, グルーズ ピーター, 紙谷浩之, 益谷央豪, 徐 岩, 杉山弘, 原島秀吉, 花岡文雄, 能美健彦, ヒト Y ファミリー DNA ポリメラーゼによる酸化的損傷ヌクレオチドの取り込み, 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003, 12)
 24. 麻見安雄, 村上正弘, 早田 勇, Pisani Francesca, 能美健彦, 原子力間顕微鏡を用いた DNA ポリメラーゼによる損傷塩基認識機構の解析, 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003, 12)
 25. M. Yamada, M. Shimizu, P. Gruz, K. Matsui, T. Nunoshiba, H. Kamiya, H. Harashima and T. Nohmi, SOS-inducible DNA polymerases and their roles in genome instability, Keystone Symposium: Bacterial Chromosome (2004. 2)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録

なし
3. その他
なし

平成15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16年9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