

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261



KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640



## 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス  
に関する研究



## ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築

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 創薬の安全性初期スクリーニングに有用なハイ・スループット微生物遺伝毒性試験系の開発を進め、創薬開発の後期において有用なトランスジェニックラット、マウス培養細胞遺伝毒性試験の改良を進めた。ヒト遺伝子を用いたマウス催奇形性試験系を開発した。

### 分担研究者

- (1) 北海道大学大学院薬学研究科 鎌滝哲也
- (2) 明治製菓株式会社 林 宏行
- (3) 中外製薬株式会社 渡部一人
- (4) 食品薬品安全センター秦野研究所 原 巧
- (5) 株式会社 JIMRO 金谷一司
- (6) 大阪府公衆衛生研究所 小田美光

### A. 研究目的

創薬技術の進歩に伴い、微量かつ多数の候補化合物の中から、安全で有効な化合物をいかに迅速に選択するかが重要になりつつある。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、従来法がとられることが多く、安全性検索の過程が律速となり創薬の開発速度が制約される恐れがある。

遺伝毒性試験は、ヒトゲノムに対する化学物質の毒性を検索・評価する試験系であり、その結果は発がん性と強く相関する。また、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。

本研究班では、微生物を用いたハイ・スループット遺伝毒性検出系を構築するとともに、トラン

スジェニックラットおよびマウス細胞を用いて、化合物の発がん作用に遺伝毒性が寄与しているかを明らかにする in vivo 試験系の開発評価を進めている（図1）。ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験は医薬品候補化合物の初期スクリーニングにおいて汎用される試験であり、トランスジェニックマウス、ラットを用いる in vivo 試験は、開発の後期において、候補化合物の発がん作用に遺伝毒性が関与しているかを発がん標的臓器にて検討する際に有用である。さらに本研究班では、後世代への医薬品の影響を検索するため、ヒト遺伝子を用いた新規な催奇形成試験系の開発を進めている。創薬にあたっては、開発の状況に見合った適切な遺伝毒性試験を実施し、遺伝毒性を示さない候補化合物を選択することが大切である。

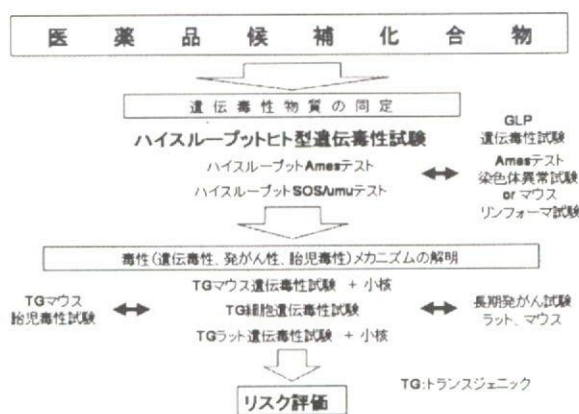


図1 遺伝毒性、発がん性、胎児毒性を勘案した毒性スクリーニングのフローチャート

今年度は、ヒト CYP1A2 を発現する umu テスト株の有用性を検討すると共に、大腸菌の損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ Pol IV (DNA Pol IV) を発現する新しいテスト株 (YG5161) がハイ・スルーブット Ames 試験に有用であることを明らかにした。さらに Pol IV のヒト・ホモログである DNA ポリメラーゼ  $\kappa$  の生化学的性質を明らかにし、thalidomide が誘発する催奇形性には、ヒト胎児特異的に発現する CYP3A7 が関与することを示唆する結果を得た。

## B. 研究方法

### B-1 umu テスト

LB 培養液に *Salmonella typhimurium* (以下サルモネラと略) OY1002/1A2 (ヒト CYP1A2 と NADPH-CYP 還元酵素及びサルモネラのアセチル転移酵素 (NAT) 高産生株) を接種し、37°C で一夜培養した。菌液を TGYT 培地で 100 倍希釈し、その菌液を 37°C で 1 時間培養した。菌液 0.96 mL に被験物質溶液 4  $\mu$ L を加え、37°C、3 時間振盪培養した。その後、発色基質である chlorophenolred- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) を加え 37°C、1 時間反応後、菌液の  $\beta$ -D-galactosidase 活性を測定した。濃度に依存して相対酵素活性が増加し、かつその値が陰性対照 (溶媒) の 1.5 倍以上となった場合を陽性と判定した (小田)。

### B-2 umu テストのキット化と溶媒の検討

サルモネラ NM2009 (サルモネラ NAT 高生産株) を凍結乾燥させ、試験当日に 1 mL の TGA 培養液を加えて 37°C で培養した。96 ウェルプレートに溶媒のみあるいは被験物質を含む液 0, 1, 2, 4, 6  $\mu$ L、試験菌液を 100  $\mu$ L 加え、37°C で 2 時間培養した。その後 X-Gal を 100  $\mu$ L 加え  $\beta$ -D-galactosidase 活性を測定した (金谷)。

### B-3 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 TA98 あるいは YG5161

株 (大腸菌 DNA Pol IV 発現株) 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  $\mu$ L および菌懸濁液 490  $\mu$ L を、S9 mix 存在下では各ウェルに被験物質調製液 10  $\mu$ L、菌懸濁液 415  $\mu$ L および S9 mix 75  $\mu$ L を入れて、37°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 60  $\mu$ 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。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 (原)。

### B-4 ヒト DNA polymerase $\kappa$ の発現と精製

ヒト DNA polymerase  $\kappa$  の N 末からアミノ酸 560 個分のペプチド (hDNA pol  $\kappa$   $\Delta$ C) を発現するプラスミド pYG8591 を大腸菌 BL21 (DE3)/Rosetta pLysS 株に導入し、IPTG により発現を誘導した。細胞破砕液の可溶性画分を金属キレートカラム (TALON Superflow Metal Affinity Resin)、ゲル濾過 (HiLoad Superdex)、イオン交換カラム (HiTrap Heparin HP) により精製した。トランスリレーション DNA 合成は、benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE) 付加体が付加した合成オリゴヌクレオチドを鋳型鎖にして行った。精製した hDNA pol  $\kappa$   $\Delta$ C に対するポリクローナル抗体を、家兎を用いて調製した。フルサイズの hDNA pol  $\kappa$  コード領域を pTriEx-4 Hygro ベクターに連結し pYG8589 プラスミドとした (能美)。

### B-5 トランスジェニックマウス *gpt delta* 肺由来 GDL1 細胞へのトランスフェクション

国立衛研にて作製した pYG8589 プラスミドを GDL1 細胞へ FuGene6 (Roche) を用いてトランスフ



エクシオンした。細胞を 500  $\mu$ g/mL hygromycin を含む培地で培養し、トランスフェクタントを選択した。得られたクローンより 6 クローンを選び pYG8589 プラスミド導入の有無を PCR で確認した (渡部)。

#### B-6 Phenacetin の長期間混餌投与における遺伝子突然変異誘発性検討

Phenacetin を 26 週および 52 週間混餌投与した *gpt delta* ラットから回収した *gpt* 遺伝子についてシーケンス解析を行った。26 週間投与では無処理群 (6 匹) から分離された 16 コロニー、投与群 (16 匹) から分離された 62 コロニーについて、52 週間投与では無処理群 (8 匹) から分離された 31 コロニー、投与群 (15 匹) から分離された 60 コロニーについてシーケンス解析を行った (林)。

#### B-7 Hras128 ラットとの交配種を用いた遺伝毒性評価

SD 系の *gpt delta* ラットに短期発がん物質検出用 Hras128 ラットを交配させ、得られた産仔を用いて遺伝毒性評価を実施した。産仔は *gpt* (+/-) Hras (-/-)、*gpt* (+/-) Hras (+/-)、*gpt* (-/-) Hras (-/-)、*gpt* (-/-) Hras (+/-) の 4 群に分け、乳がんを誘発する methyl nitrosourea (MNU) を 50mg/kg で静脈内投与し、4 週間後に *gpt* (+/-) Hras (-/-) および *gpt* (+/-) Hras (+/-) の個体から乳腺を採取した (林)。

#### B-8 トランスジェニックマウスを用いる催奇形性試験

マウスの胎生 11.5 日の胎仔を摘出した。摘出した胎仔を用いて thalidomide (250  $\mu$ g/ml) 存在下、非存在下で培養液中に昆虫細胞を用いた CYP3A7 発現系の膜画分を添加し、24 時間、胎仔全培養を行った。胎仔を培養した後、胎仔の形態を観察し、奇形の有無を評価した (鎌滝)。

(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 ヒト CYP1A2 を発現する *umu* テスト株の感受性

OY1002/1A2 株を用いて IQ, MeIQ, MeIQx, 2-AA, Glu-P-1, Trp-P-1 及び Trp-P-2 による *umuC* 遺伝子誘導を調べた。*umuC* 遺伝子誘導の強さの順序は IQ > MeIQ = MeIQx > 2-AA = Glu-P-1 = Trp-P-2 であり、いずれの化合物も S9 mix による代謝活性化なしに *umu* テストに陽性結果を示した (小田)。

##### C-2 *umu* テストのキット化と溶媒の検討

*umu* テスト用キット (96 ウェルプレート法) を用いて、水にも dimethyl sulfoxide (DMSO) にも不溶性化合物をテストする際に用いる溶媒を検索した。その結果 glycerol formal, N,N-dimethylformamide, acetonitrile, ethanol, methanol, ethylene glycol dimethyl ether (EGDE), 1,4-dioxine, tetrahydrofuran の 8 種類の溶媒が本キット試験に有用であることが明らかになった (金谷)。

##### C-3 改良法 FAT における菌株と実験条件の改良

YG5161 株と TA98 株を用いて改良法 FAT を実施した。その結果、benzo[a]pyrene, 3-methyl cholanthrene, 1-aminoanthracene, 2-aminoanthracene, benzo[k]fluoranthane について YG5161 株が TA98 株よりも高い感受性を示した。benzo[b]fluoranthane, fluoranthane, benzo[e]pyrene, indeno[1,2,3-cd]pyrene については YG5161 株でのみ陽性結果を得た。Ames 試験では陽性であるが、改良法 FAT では陽性結果が得られなかった 3 化合物 (3-amino-6-methylphenol, 4-nitrophthalimide, 4-nitrophthalic anhydride) について処理濃度を上げて試験を実施



した。その結果、通常の最高濃度 (1000  $\mu$ g/mL) の 2-4 倍の濃度で 3 化合物すべてについて陽性結果が得られた (原)。

#### C-4 ヒト DNA polymerase $\kappa$ による benzo[a]pyrene 付加体のトランスリージョン DNA 合成

精製標品を用いて in vitro DNA 合成を行うと、hDNA pol  $\kappa$   $\Delta$ C は遺伝毒性発がん物質である benzo[a]pyrene の活性体 BPDE の DNA 付加体を乗り越えて DNA 合成を続けた。対照として用いた Klenow fragment  $exo^-$  は、ほぼ全てが付加体の 1 塩基手前で DNA 合成を停止した。付加体のない鋳型鎖の場合には、どちらの酵素もプライマー鎖を末端まで伸長させた。hDNA pol  $\kappa$   $\Delta$ C に対するポリクローナル抗体はマウス由来の DNA pol  $\kappa$  とも交叉した。この抗体を用いてマウス各臓器の細胞抽出液についてウェスタン・プロテイングを行うと、DNA pol  $\kappa$  は精巣で最も強く発現しており、次いで副腎、脳、胸腺、卵巣でほぼ同等に発現し、肝臓、肺では弱く発現し、腎臓での発現は検出できなかった (能美)。

#### C-5 *gpt delta* L1 細胞を用いた変異解析

遺伝子導入の有無を PCR で確認した 6 クローン全てについて hDNA pol  $\kappa$  遺伝子 (pYG8589 プラスミド) の導入が確認された (渡部)。

#### C-6 Phenacetin の長期間混餌投与における遺伝子突然変異誘発性検討

フェナセチン投与群では、*gpt delta* ラットに特異的な *gpt* 遺伝子の 299 番目の塩基置換 (A:T to T:A) に加え、26 番目および 27 番目における G:C to A:T 変異が投与期間に応じて増加することが明らかとなった (林)。

#### C-7 Hras128 ラットとの交配種を用いた遺伝毒性評価

無処理群の突然変異体頻度 (MF) ( $\times 10^{-6}$ ) は、*gpt* (+/-) Hras (-/-) で  $3.8 \pm 4.8$ 、*gpt* (+/-) Hras

(+/-) で  $7.4 \pm 4.9$ 、MNU 投与群の MF ( $\times 10^{-6}$ ) は、*gpt* (+/-) Hras (-/-) で  $38.9 \pm 20.8$ 、*gpt* (+/-) Hras (+/-) で  $23.5 \pm 14.8$  であり、Hras 導入の有無によって自然突然変異頻度や MNU に対する感受性に変化は認められなかった。次に MNU 投与群で得られた 6-TG 耐性コロニーについて *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を実施した。その結果、*gpt* (+/-) Hras (-/-)、*gpt* (+/-) Hras (+/-) とともに G:C to A:T 変異が多く、変異スペクトルからも Hras 導入による影響は認められなかった (林)。

#### C-8 ヒト CYP3A7 を用いる催奇形性試験

胎仔全培養の結果、CYP3A7 を酵素源として添加しない場合、thalidomide による奇形は誘発されなかった。昆虫細胞を用いた CYP3A7 発現系の膜画分を添加した場合、thalidomide 処置によって四肢に奇形が誘発された。CYP3A7 を酵素源として添加した場合、thalidomide によって誘発される奇形の頻度は 57% と CYP3A7 を発現するトランスジェニックマウスを用いた場合の奇形の発生頻度とほぼ同程度であった (鎌滝)。

#### D. 考察

創薬の初期段階にあつては、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、ヒト CYP1A2 を発現する *umu* テストの新規指標菌株 (OY1002/1A2) の評価を進めるとともに、*umu* テストのキット化に必要な溶媒の検討を行った。また FAT の改良を進め、Ames テストとの相関をさらに改善した。さらに個体レベルで候補化合物の遺伝毒性や催奇形性を評価する系の開発を進めた。

がん原性芳香族アミンは、第一相として CYP1A2 により代謝活性化され、第二相のアセチル転移酵素によりアセチル化され、その最終産物が DNA を損傷し *umuC* 遺伝子発現を誘導する。ヒト CYP1A2 とヒト NADPH-P450 還元酵素及びサルモネラ・アセチル転移酵素を発現する試験菌株 OY1002/1A2 を用いることで、今回試験に供した全ての芳香族ア



ミンが、S9 mix による代謝活性化なしに umu 試験において陽性を示すことを明らかにした。他のヒト型 CYP 遺伝子を導入した試験菌株を用いることにより、創薬のハイ・スループット化に貢献できるものと考えられる (小田)。

umu テストのキット化を進める上で、被験物質を溶解する溶媒の選択は重要である。多くの被験物質は水あるいは DMSO に溶解するが、水にも DMSO にも不溶な被験物質を処理するのに用いる溶媒の umu 試験適合性を検討した。その結果、8 種類の溶媒が本試験に用いることが出来ることを明らかにした。今後は、小田の開発したヒト CYP を発現する株を用いて umu 試験のキット化を試みる必要がある (金谷)。

国立衛研にて前年度に開発された大腸菌 DinB (DNA Pol IV) を発現する Ames テスト用サルモネラ株 (YG5161) を、より少量の被験物質で Ames 試験の結果を予測し得る改良法 FAT に応用した。YG5161 株と TA98 株は、共に TA1538 株を親株にしているが、異なった DNA ポリメラーゼ (YG5161 では DNA Pol IV、TA98 株では DNA Pol RI) が発現している。Ames 試験で YG5161 株の方が TA98 株より高い感受性を示した化合物については、改良法 FAT でも YG5161 がより高い感受性を示し、Ames 試験で両菌株に感受性の差が認められなかった化合物については、改良法 FAT においても両菌株の差は認められなかった。これらの結果から、改良法 FAT においては、Ames 試験における菌株の感受性の相違が反映されるものと考えられ、多環芳香族炭化水素については YG5161 が TA98 より高い感受性を示すものと考えられる (原)。

Ames 試験では陽性であるが、通常改良法 FAT では陽性結果が得られなかった 3 化合物について処理濃度を上げて改良法 FAT を実施した。その結果、通常最高濃度 (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の 2-4 倍の濃度で陽性結果が得られた。したがって、改良法 FAT の処理濃度を上げることにより、感受性がさらに向上することが示唆された。今後は、処理時の液量を減らし処理濃度を上げることにより、被験物

質量を増やさずに感受性を向上させることが期待される (原)。

hDNA pol  $\kappa$   $\Delta$ C は鋳型鎖上の BPDE を乗り越えて DNA 合成を続けることが示された。この結果から hDNA pol  $\kappa$  はベンツピレンの遺伝毒性発現において重要な役割をはたしているものと推論した。現在、hDNA pol  $\kappa$  をマウス細胞で発現するプラスミド pYG8589 を中外製薬 (渡部班員) へ送り、変異検出用マウス細胞 GDL1 にトランスフェクションし、hDNA pol  $\kappa$  の in vivo における役割を検討している (能美)。

GDL1 細胞へ Y ファミリー DNA ポリメラーゼ遺伝子 (pYG8589 プラスミド) を導入し、変異原物質に対して高感受性を示す新たな細胞株の樹立を試みた。遺伝子導入の有無を PCR で確認した結果、調べた 6 クローン全てにおいて遺伝子の導入が確認された。今後は RT-PCR により mRNA の転写を確認する予定である (渡部)。

*gpt delta* ラットを用いた phenacetin の長期連投検討結果において、発がん標的臓器である腎臓よりも発がん非標的臓器である肝臓において強い遺伝子突然変異の誘発が認められた。非標的臓器において誘発された変異の特徴を明らかにするため、*gpt* 遺伝子変異スペクトルを解析した。その結果、*gpt* 遺伝子の 26 番目および 27 番目の塩基に G:C to A:T 変異が投与期間に比例して高頻度に誘発されることが明らかになった。G:C to A:T 変異は、0<sup>6</sup>-アルキルグアニンのミスコーディングにより生ずることが知られているが、phenacetin の代謝活性物がどの様にして G:C to A:T 変異を誘発するかは今後の問題である。Phenacetin は肝臓に変異を誘発し、その変異頻度は対照群の 8 倍以上に及ぶが、肝臓にはがんを誘発しない。この結果から、変異誘発の強さのみで発がん性の有無を判断することは困難であることが示唆された (林)。

化学物質の発がん性を検討するためには、2 年間に渡る投与実験が必要になる。しかしながら、時間的制約などのリソースを考えると評価可能な検体数は限られたものになる。この課題を解決す



るため、*gpt delta* ラットと短期発がん評価モデルである *Hras128* ラットを交配し、ダブルトランスジェニック動物を作製することで、評価の短期化、使用動物数の削減を図る検討を開始した。今年度は、導入された遺伝子ヒト *ras (Hras)* が *gpt* 変異頻度にどの様に影響するかを検討した。*Hras* 遺伝子の有無によって、自然突然変異頻度および *MNU* によって誘発された変異頻度および変異スペクトラムに *gpt delta* ラットとの間に差は認められなかった。*gpt delta* ラットと *Hras128* ラットのダブルトランスジェニック動物が、発がん性と遺伝毒性の関連をより短期間に検討出来る系になりうる事が期待される(林)。

化学物質が誘発する催奇形性やヒト胎児の発がん性を予測するため、ヒトの薬物代謝酵素を持つトランスジェニックマウスを作出して化学物質のヒトにおける胎児毒性を予測可能にするを旨としている。昨年度までにヒト胎児肝に豊富に発現する *CYP3A7* を発現するトランスジェニックマウスでは、*thalidomide* 処置によって四肢に奇形が誘発されることを明らかにした。本年度は、マウスの胎生 11.5 日の胎仔を摘出し、*thalidomide* (250  $\mu$ g/ml) 存在下、非存在下で培養液中に *CYP3A7* を添加して胎仔全培養を行った。その結果、*thalidomide* および *CYP3A7* 存在下のマウス胎仔でのみ四肢の形態異常が観察された。以上の結果から、*thalidomide* が誘発する催奇形性にはヒト胎児特異的に発現する *CYP3A7* が関与する可能性が示唆された(鎌滝)。

#### E. 結論

創薬に有用な遺伝毒性試験系の構築を行った。創薬の初期段階において迅速に遺伝毒性を検索する、ヒト遺伝子を発現するハイ・スループット微生物試験菌株を確立し、その評価を行った。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新たな試験系を開発し、*thalidomide* が誘発する催奇形性にはヒト胎児特異的に発現する *CYP3A7* が関与することを示唆した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sato, Y., Takahashi, S., Kinouchi, Y., Shiraki, M., Endo, K., Matsumura, Y., Kakuta, Y., Tosa, M., Motida, A., Abe, H., Imai, G., Yokoyama, H., Nomura, E., Negoro, K., Takagi, S., Aihara, H., Masumura, K., Nohmi, T. and Shimosegawa, T. IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD. *Carcinogenesis*, in press.
- 2) Matsui, K., Yamada, M., Imai, M., Yamamoto, K. and Nohmi, T. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. *DNA Repair*, 5: 465-478 (2006)
- 3) Yamada, M., Matsui, K. and Nohmi, T. Development of a bacterial hyper-sensitive tester strain for specific detection of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Genes and Environ.*, 28: 23-30 (2006)
- 4) Mazaki, M., Kataoka, K., Kinouchi, T., Vinitketkumnuen, U., Yamada, M., Nohmi, T., Kuwahara, T., Akimoto, S. and Ohnishi, Y. Inhibitory effects of caraway (*Carum carvi* L.) and its component on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutagenicity. *J. Med. Invest.*, 53: 123-133 (2006)
- 5) Asami, Y., Murakami, M., Shimizu, M., Pisani, F.M., Hayata, I. and Nohmi, T. Visualization of the interaction between archaeal DNA polymerase and uracil-containing DNA by atomic force microscopy. *Genes to Cells*, 11: 3-11 (2006)
- 6) Nishikawa, A., Sai, K., Okazaki, K., Son, H.Y., Kanki, K., Nakajima, M., Kinoshita, N., Nohmi, T., Trosko, J.E., Inoue, T. and Hirose, M. MX, a by-product of water



- chlorination, lacks *in vivo* genotoxicity in *gpt* delta mice but inhibits gap junctional intercellular communication in rat WB cells. *Env. Mol. Mutagen.*, 47: 48-55 (2006)
- 7) Totsuka, Y., Nishigaki, R., Enomoto, S., Takamura-Enya, T., Masumura, K., Nohmi, T., Kawahara, N., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Structures and biological properties of DNA adducts derived from N-nitroso bile acid conjugates. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 1553-1562 (2005)
  - 8) Kim, S.-R., Kokubo, K., Matsui, K., Yamada, N., Kanke, Y., Fukuoka, M., Yamada, M. and Nohmi, T. Light-dependent mutagenesis by benzo[*a*]pyrene is mediated via oxidative DNA damage. *Env. Mol. Mutagen.*, 46: 141-149 (2005)
  - 9) Satou, K., Yamada, M., Nohmi, T., Harashima, H. and Kamiya, H. Mutagenesis induced by oxidized DNA precursors: roles of Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Chem. Res. Tox.*, 18: 1271-1278 (2005)
  - 10) Hashimoto, A., Amanuma, K., Hiyoshi, K., Takano, H., Masumura, K., Nohmi, T. and Aoki, Y. *in vivo* mutagenesis caused by benzo[*a*]pyrene instilled into the lung of *gpt* delta transgenic mice. *Env. Mol. Mutagen.*, 45: 365-373 (2005)
  - 11) Shibata, A., Kamada, N., Masumura, K., Nohmi, T., Kobayashi, S., Teraoka, H., Nakagama, H., Sugimura, T., Suzuki, H. and Masutani, M. *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*, 24: 1328-1337 (2005)
  - 12) Kanki, K., Nishikawa, A., Masumura, K., Umemura, T., Imazawa, T., Kitamura, Y., Nohmi, T. and Hirose, M. *In vivo* mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol. Carcinog.*, 42: 9-17 (2005)
  - 13) Kokubo, K., Yamada, M., Kanke, Y. and Nohmi, T. Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of *Salmonella typhimurium* strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals. *DNA Repair*, 4: 1160-1171 (2005)
  - 14) Nohmi, T., Kim, S.-R. and Yamada, M. Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutat. Res.*, 591: 60-72 (2005)
  - 15) Nohmi, T. and Masumura, K. Molecular dissection of *in vivo* DNA rearrangements induced by radiation and chemical mutagens. International Congress Series (High Levels of Natural Radiation and Radon Areas: Radiation Dose and Health Effects), 1276: 25-28 (2005)
  - 16) Nohmi, T. and Masumura, K. Molecular natural of intra-chromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens. *Env. Mol. Mutagen.*, 45: 150-161 (2005)
  - 17) Iwano, S., Shibahara, N., Saito, T. and Kamataki, T. Activation of p53 as a causal step for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEBS Lett*, 580: 890-893 (2006)
  - 18) Iwano, S., Asanuma, F., Nukaya, M., Saito, T. and Kamataki, T. CYP1A1-mediated mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337:708-712 (2005)
  - 19) Kamataki, T., Fujieda, M., Kiyotani, K., Iwano, S. and Kunitoh, H. Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk. *Biochem Biophys Res Commun*, 338: 306-310 (2005)
  - 20) Iwano, S., Nukaya, M., Saito, T., Asanuma, F. and Kamataki, T. A possible mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 335:220-226 (2005)
  - 21) Yamazaki, H., Fujieda, M., Cashman, J.R. and Kamataki, T. Mild trimethylaminuria observed in a Japanese cohort with liver damage, *Am. J. Med.*, 118: 803-805 (2005)
  - 22) Kimura, M., Yamazaki, H., Fujieda, M., Kiyotani, K., Honda, G., Saruwatari, J.,

- Nakagawa, K., Ishizaki, T. and Kamataki, T. CYP2A6 is a principal enzyme involved in hydroxylation of 1,7-dimethylxanthine, a main caffeine metabolite, in humans, *Drug Metab. Dispos.*, 33:1361-1366 (2005)
- 23) Miyazaki, M., Yamazaki, H., Takeuchi, H., Saoo, K., Yokohira, M., Masumura, K., Nohmi, T., Funae, Y., Imaida, K. and Kamataki, T. Mechanisms of chemopreventive effects of 8-methoxypsoralen against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung adenomas, *Carcinogenesis*, 26:1947-55 (2005)
- 24) Endo, M., Takahashi, Y., Sasaki, Y., Saito, T. and Kamataki, T. Novel gender-related regulation of CYP2C12 gene expression in rats, *Mol. Endocrinol.*, 19:1181-1190 (2005)
- 25) Nakamura, K., Ariyoshi, N., Iwatsubo, T., Fukunaga, Y., Higuchi, S., Itoh, K., Shimada, N., Nagashima, K., Yokoi, T., Yamamoto, K., Horiuchi, R. and Kamataki, T. Inhibitory effects of Nicardipine to CYP in Human Liver Microsomes, *Biol. Pharm. Bull.*, 28:882-885 (2005)
- 26) Yamaori, S., Yamazaki, H., Iwano, S., Kiyotani, K., Matsumura, K., Saito, T., Parkinson, A., Nakagawa, K. and Kamataki, T. Ethnic Differences between Japanese and Caucasians in the Expression Levels of mRNAs for CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7: Lack of Co-regulation of CYP3A Expression in Japanese Livers, *Xenobiotica*, 35:69-83 (2005)
- 27) Miyazaki, M., Sugawara, E., Yoshimura, T., Yamazaki, H. and Kamataki, T. Mutagenic activation of betel quid-specific N-nitrosamines catalyzed by human cytochrome P450 coexpressed with NADPH-cytochrome P450 reductase in *Salmonella typhimurium* YG7108. *Mutat Res*, 581: 165-171 (2005)
- 28) Nishimura, M., Imai, T., Morioka, Y., Kuribayashi, S., Kamataki, T. and Naito, S. Effects of NO-1886 (Ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, on gene induction of cytochrome P450s, carboxylesterases, and sulfotransferases in primary cultures of human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*, 19: 422-429 (2005)
- 29) Afari Gyamfi, M., Fujieda, M., Kiyotani, K., Yamazaki, H. and Kamataki, T. High prevalence of cytochrome P450 2A6\*1A alleles in a black African population of Ghana. *Eur J Clin Pharmacol*, 60: 855-857 (2005)

## 2. 学会発表

- 1) 日高勝彦、山田雅巳、紙谷浩之、益谷央豪、原島秀吉、花岡文雄、能美健彦、DNA ポリメラーゼηによる酸化損傷 dNTP 取り込みで生ずる突然変異の特徴、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、(2005 年 12 月)
- 2) 山田雅巳、松井恵子、今井勝、山本和生、能美健彦、DNA ポリメラーゼのヒエラルキー、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、(2005 年 12 月)
- 3) Hashimoto, A.H., Amanuma, K., Masumura, K., Nohmi, T. and Aoki, Y. In vivo mutagenicity of diesel exhaust inhalation in the testis of *gpt delta* mice, 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 4) Totsuka, Y., Nishigaki, R., Enomoto, S., Takamura-Enya, T., Masumura, K., Nohmi, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Structural analysis of DNA adducts formed from N-nitrosotaurocholic acid (NO-TCA), 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 5) Sakamoto, Y., Masumura, K., Ikeda, M., Hirata, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M. and Nohmi, T. Mutational analyses of p53 deficient *gpt delta* transgenic mice treated with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005 年 11 月)
- 6) Yamada, M., Matsui, K. and Nohmi, T. Development of bacterial tester strains to detect the mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons sensitively and specifically, 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 7) Sui, H., Kawakami, K., Ohyama, N., Hara, T. and Nohmi, T. Further improvement of



- high-throughput fluctuation Ames test (FAT): the effects of *dinB* plasmid (IV), 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 8) Nishigaki, R., Totsuka, Y., Mori, Y., Masumura, K., Nohmi, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Analysis of *N*-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine (BOP) and its metabolites in pancreatic juice of Syrian golden hamsters treated with BOP, 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 9) Horiguchi, M., Aoe, S., Tanaka, C., Tutuki, H., Yamada, M., Matui, K., Nohmi, T. and Ikegami, S. Evaluation of inhibitory effects of food components on genotoxicity of chemicals by Ames test, 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 10) Masumura, K., Ikeda, M., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K., Hayata, I. and Nohmi, T. Effect of low dose-rate gamma-irradiation on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induced mutagenesis in *gpt* delta mice, 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 11) Sakamoto, Y., Masumura, K., Ikeda, M., Hirata, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M. and Nohmi, T. Mutational analysis of p53 deficient *gpt* delta mice treated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 12) Matsui, K., Yamada, M., Imai, M., Yamamoto, K. and Nohmi, T. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens, 日本環境変異原学会第 34 回大会、東京 (2005 年 11 月)
- 13) 増村健一、坂元康晃、池田 恵、平田暁大、塚本徹哉、立松正衛、能美健彦、p53 欠損 *gpt* delta マウスにおける *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine 誘発突然変異の解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌 (2005 年 9 月)
- 14) 神吉けい太、西川秋佳、梅村隆志、増村健一、石井雄二、黒岩有一、児玉幸夫、能美健彦、広瀬雅雄、p53<sup>+/-</sup>/*gpt* delta マウス肝臓におけるアクロレイン経口投与による in vivo 遺伝子変異の検索、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌 (2005 年 9 月)
- 15) 能美健彦、SOS DNA ポリメラーゼ: 環境とゲノム進化を結ぶ架け橋、第 7 回日本進化学会大会、仙台 (2005 年 8 月)
- 16) 能美健彦、ハイ・スループット遺伝毒性試験系の構築、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2005 年 6 月)
- 17) Nohmi, T. Roles of multiple DNA polymerases in mutagenic bypass of DNA lesions by various environmental chemicals. Gordon Research Conference "DNA damage, mutation and cancer", Ventura, U.S.A., (March 2006)
- 18) Nohmi, T. Environmental mutagenesis: from molecules to man. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (9<sup>th</sup> ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005)
- 19) Satou, K., Yamada, M., Nohmi, T., Harashima, H. and Kamiya, H. Roles of the *Escherichia coli* DinB and UmuDC proteins in mutations induced by oxidized DNA precursors. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (9<sup>th</sup> ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005)
- 20) Kokubo, K., Yamada, M., Kanke, Y. and Nohmi, T. Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of *Salmonella typhimurium* strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (9<sup>th</sup> ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005)
- 21) Masumura, K., Hoshino, M., Yatagai, F., Ochiai, M., Nakagama, H. and Nohmi, T. Non-homologous end-joining in X-ray-irradiated *scid/gpt* delta transgenic mouse. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (9<sup>th</sup> ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005)
- 22) Takeiri, A., Mishima, M., Tanaka, K., Shioda, A., Harada, A., Watanabe, K., Deki,



- T., Masumura, K. and Nohmi, T. Molecular characterization of cisplatin and transplatin-induced base substitutions and deletion mutations in newly established *gpt* delta L1 cells. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (9<sup>th</sup> ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005)
- 23) Hayashi, H., Shindo, Y. and Nohmi, T. Carcinogenic risk estimation of organ specific mutagenicity induced by phenacetin using *gpt* delta transgenic rats. 9<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (9<sup>th</sup> ICEM). San Francisco, U.S.A., (September 2005)
- 24) Nohmi, T. Y-family DNA polymerases in archaea and eubacteria, and their roles in genome maintenance. Gordon Research Conference "Archaea: Ecology, Metabolism and Molecular Biology", Oxford, U.K., (August 2005)
- 25) 鎌滝哲也, Genetic Polymorphism of CYP2A6 as One of the Potential Determinants of Tobacco-related Cancer Risk, 第25回札幌がんセミナー国際シンポジウム、山形 (2005年8月)
- 26) 鎌滝哲也, CYP2A6の遺伝的多型と喫煙による発がんリスクの相関, 第32回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2005年6月)
- 27) Kamataki, T. Genetic Polymorphism of CYP2A6 is One of the Potential Determinants of Tobacco-related Cancer Risk, 14th International Conference on Cytochromes P450, Dallas (June 2005)
- 28) 鎌滝哲也, ラットにおける薬物代謝の性差とその発現調節機構, 第52回日本実験動物学会総会、東京 (2005年5月)
- 29) 鎌滝哲也, ヒト CYP3A7 トランスジェニックマウスについて, 第12回HAB研究機構学術年会、東京 (2005年5月)
- 30) Kiyotani, K., Fujieda, M., Shimada, T., Guengerich, F.P., Parkinson, A., Honda, G., Nakagawa, K., Yamazaki, H. and Kamataki, T. Haplotype and functional analyses of novel genetic polymorphisms of CYP2A6, 12th Annual Meeting of the Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics (PRACP2005), Kyoto, Japan (April 2005)
- 31) Yamazaki, H., Gunji, T., Kamataki, T. A novel deleterious mutation in the flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) gene probably as a cause of trimethylaminuria in a Japanese population, PRACP & IPS 2005 (Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics), Kyoto, Japan (April 2005)
- 32) 中田智久、樋口進、横山顕、藤枝正輝、鎌滝哲也、食道がんリスクに及ぼす CYP2A6 および ALDH2 の遺伝子多型の影響, 第125年会日本薬学会、東京 (2005年3月)
- 33) 郡司貴彰、清谷一馬、藤枝正輝、鎌滝哲也、山崎浩史、日本人におけるトリメチルアミン尿症の原因となる新規 FM03 遺伝子変異、日本薬学会 第125年会、東京 (2005年3月)
- 34) 山崎浩史、村井景子、川合良成、鎌滝哲也、日本人肝ミクロゾームのレトロゾール酸化酵素活性に及ぼす CYP2A6 遺伝子多型の影響、日本薬学会第125年会、東京 (2005年3月)
- 35) 湯本聡一、斉藤俊光、小田美光、金谷一司: umu-試験用試薬キット (96Well プレート法) における溶媒の検討、日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
- 36) 小田美光、渡辺徹志、平山晃久: umu アッセイを用いた 3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene の代謝的活性化における遺伝毒性作用、日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
- 37) 須井 哉、川上久美子、大山 徳子、原 巧、能美健彦、ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討4、日本環境変異原学会第34回大会、東京 (2005年11月)
- 38) 竹入章、三島雅之、田中健司、原田麻子、新倉博文、増村健一、能美健彦、*gpt* delta L1 細胞を用いた mitomycin C により誘発される遺伝子突然変異および小核の検出、第23回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 (2005年6月)
- 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17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31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