

の相互作用を含めて検討を行い、製剤機能の評価法開発を行う。第二は非晶質化法、ナノレベル微粒子化法あるいは可溶化剤適用によって製造した超難溶性製剤の製剤機能解析法開発および品質確保の方策の検討である。第三はこれら機能性製剤の製剤開発および製法工程管理の方策の策定である。

B. 研究方法

(1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

1-1) 薬物封入リポソーム製剤の製剤特性の評価：

水素添加大豆レシチン(HSPC)または卵黄レシチン(EPC)とコレステロール(Ch)を主組成とするリポソームにドキシソルピシンを封入し、PBS(pH 7.4)を用いて37°Cと50°Cでの放出に対するウシ血清アルブミン(BSA, 1%)の影響を透析法により検討した。またマウスを用いてリポソーム製剤の *in vivo* 試験を行うとともに、BSAとの混合インキュベートによる結合性を電気泳動により評価した；

1-2) 多変量解析によるリポソーム製剤の評価：

ドキシソルピシン塩酸塩のポリエチレングリコール修飾リポソーム製剤(ドキシル注[®]20mg)をモデルとして、6ロットの製剤についてドキシソルピシン含量、類縁物質、リソフォスファチジルコリン量、濁度、pH、放出性、リポソーム化率及び平均粒子径を因子として多変量解析(クラスター分析)を行うとともに、主要条件である温度及び塩化アンモニウム濃度が放出性に与える影響を比較した；

1-3) リポソーム製剤からの医薬品放出性の検討：

組成とPEG修飾率の異なる4種のドキシソルピシン封入リポソームを作製し、BALB/cマウスに尾静脈内投与後、各時間における血清中のDXR濃度をHPLCにより測定した。また塩化アンモニウムやヒトまたはマウスの血清・血漿の存在下、37~52°Cのインキュベートによる薬物放出に対する影響を検討した；

1-4) タンパク質キャリアーとしての γ -PGA(ポリ γ -グルタミン酸)ナノ粒子の有用性評価：溶液混和により各種タンパク質を内包した γ -PGAナノ粒子(NP)を作製し、粒子径、表面電荷、内包タンパク質を定量した。またFITC標識オブアルブミンを内包した γ -PGA NPをPBSに懸濁して37°Cで保存し、遠心後に上清の蛍光測定からFITC-OVAの放出性を求めた；

1-5) ミセル体を中心としたDDS製剤の非臨床と臨床評価：開発段階にある3種類のみセル製剤[シスプラチン(NC-6004), SN-38(NK012), タキソール(NK105)]につき薬理、抗腫瘍効果、毒性のプ

ロファイルを基礎研究により明らかにした。また内包された親抗がん剤の最近の臨床における位置づけを明らかにし、それらを早期臨床試験への橋渡しの観点から評価した；

1-6) 難溶性薬物の経口固形製剤の溶出性評価：

絶食時の消化管モデル液(FaSSIF)、食後の消化管モデル液(FeSSIF)を定法に従って調製し、イブリフラボン錠とフェニトインとフェノバルビタールの複合錠について、各界面活性剤存在下で溶出試験を実施した；

1-7) 口腔内崩壊錠の評価手法：舌表面を模した多孔板上顎の役目を果たす重りおよび水分供給機構を持つ装置を用い、ボグリボース口腔内崩壊錠を用いて重りの質量および回転速度の影響を検討した；

1-8) 外用剤・経皮吸収製剤の粘着特性評価法：市販のツロブテロール貼付剤を試料として、タック性測定装置と引張り試験機を用いた測定と簡易的な官能試験により粘着特性の評価法を検討した。また、医療用消炎鎮痛ハップ剤を試料として両装置により凝集破壊量を測定し、ヒトによる濾紙剥離試験の結果と比較した。

(2) 超難溶性薬物の製剤機能解析法研究および品質確保の方策の検討

2-1) 非晶質化を利用した可溶化製剤：フルフェナム酸やトログリタゾンの固体分散体について、結晶化を指標とした物理的安定性を明らかにし、物理的安定性に影響を及ぼす固体物性を評価する方法としての¹⁹Fや¹³Cの固体NMRの有用性を検討した。またトログリタゾンをモデルとし、ポリビニルピロリドン(PVP)を添加した固体分散体を混合粉碎法により調製し、溶出速度や結晶化速度に及ぼす粉碎時間の影響を検討するとともに、¹³C-CP/MAS NMRデータについてPartial Least Squares回帰分析(PLS法)を用いた多変量解析を行なった；

2-2) ナノ微粒子化を利用した可溶化製剤：プロブコール、PVP、アルキル硫酸ナトリウム(界面活性剤)を混合粉碎して製造したナノ微粒子製剤について、粒子サイズ、ナノ微粒子生成率に及ぼすアルキル鎖長や添加量の影響を検討した。さらに、テラヘルツ分光法により、チオ尿素や尿素とエテンザミド(EB)あるいは2-メトキシベンズアミド(MB)の複合体形成に伴うテラヘルツスペクトル変化を解析した；

2-3) Cocrystal化を利用した可溶化製剤：モデル化合物として、カフェイン、テオフィリン及びカル

バマゼンピンを選び、晶析および混合粉碎による cocrystal 形成を検討した。また医薬品カウンターイオン、医薬品添加物あるいは食品添加物として実績のある cocrystal former について、モデル化合物との cocrystal 形成を網羅的に検証した。

(3) 製剤開発および製造工程管理の方策の研究

医薬品製造工程のオンラインリアルタイム分析への応用を視野に置いて、下記の研究を実施した：

- 3-1) オンラインレーザー回折器及びオンライン収束ビーム測定器(FBRM)を用いた懸濁性点眼剤における主薬懸濁粒子の粒子径や粒度分布解析；
- 3-2)近赤外分光法 (NIR) による凍結乾燥製剤の水分值測定；
- 3-3)イメージング分析技術 (ラマン法, IR 法, 特性 X 線法) を用いた製剤の配合変化 (変色) の検討；
- 3-4)近赤外レーザー光吸光による細胞培養医薬品の培養工程における菌濃度オンラインモニタリング法；
- 3-5)近赤外分光による原薬微粒子コーティングの分析法 (平均粒子系及び被膜量)；
- 3-6)近赤外イメージングシステムによる固形製剤の溶出性予測；
- 3-7)超高速クロマトグラフィー(UPLC)による合成工程の工程管理

(倫理面への配慮)

動物実験については、各研究機関の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施するものであり、倫理審査の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

1-1) 薬物封入リポソーム製剤の製剤特性の評価

相転移温度の高い脂質で構成される血中滞留性 PEG 修飾リポソーム(SL)製剤を対象に、体内における長時間にわたる薬物放出を短時間で的確に予測・評価するための *in vitro* 放出試験を検討した。

放出試験の温度や液中の BSA はリポソームの粒子径に影響を与えず、各リポソームに対して同程度の吸着を示した。低 Ch-SL の 37℃PBS における放出試験では、PEG 修飾量の高いリポソームの方が放出速度定数が高く、高 Ch-SL では修飾の有無に関わらず低い放出性を示した。試験液に BSA を添加した放出試験では、PEG 未修飾リポソームで高温(50℃)による放出速度定数の顕著な増大が見

られた。高 Ch-SL の PEG 修飾はマウス尾静脈内への投与による肝臓や脾臓への分布に影響を与えないのに対し、放出試験に対応する有意に高い血中濃度を示した。

リポソームの PEG 修飾は BSA 等の脂質膜への入り込みが原因となる膜透過性上昇を抑制し、血中安定性を向上させること、適切な温度選択と BSA 添加が *in vivo* に対応した放出試験設定に有用なことが示唆された。

1-2) リポソーム製剤の評価

リポソーム製剤の機能評価に必要な製剤試験として設定すべき項目と条件を明らかにする目的で、6 ロットのドキシソルビシン塩酸塩のポリエチレングリコール修飾リポソーム製剤 (ドキシル注[®]20mg) についてドキシソルビシン含量、類縁物質、リソフォスファチジルコリン量、濁度、pH、放出性、リポソーム化率及び平均粒子径を因子として多変量解析 (クラスター分析) を行った結果、製剤の特性を示す放出性とリポソーム化率及び平均粒子径が 1 つのクラスターに分類された。このうち試験条件により評価に影響が認められると考えられる放出性はインキュベート温度を上げると大幅に増加し、62℃では 0.5 時間の時点で放出が完了した。一方で試験液の塩化アンモニウム濃度は放出性には顕著な影響を与えなかった。

リポソーム製剤の *in vitro* 放出性評価には製剤の機能特性に対応した試験が必要であり、血中循環時間を延長することを目的として表面を PEG 化した製剤では適度に放出性を促進した温度や溶液条件の設定が重要と考えられた。

1-3) リポソーム製剤からの医薬品放出性の検討

ドキシソルビシン封入 PEG 修飾リポソームを作製し、*in vivo* および *in vitro* 試験による血中における薬物の保持・放出性評価法について検討した。

PEG 修飾率の異なる 4 種のドキシソルビシン封入リポソームについて *in vivo* 試験を行ったところ、PEG 修飾による血中安定性向上が観察された。*In vitro* 試験液への塩化アンモニウム添加により経時的なドキシソルビシン放出が認められ、52℃では 3 時間でほぼ 100%が放出された。マウス血清または血漿の共存は各リポソームからの薬物放出を顕著に促進した。この影響は血清添加の影響が大きく、高温ほど高い放出率が観察された。一方でヒト血清や血漿添加による影響は見られず、動物間で異なる生体成分やその構成比が放出性に影響を与える可能性が示唆された。

In vivo における薬物放出性を反映し得る *in vitro*

評価法として塩化アンモニウムを設定した系が適す可能性が示されたものの、ヒトやマウス由来の血清・血漿を添加剤として用いて *in vitro* 評価法を設定するには、詳細かつ多面的な検討が必要であると考えられた。

1-4) タンパク質キャリアーとしての γ -PGA ナノ粒子の有用性評価

天然物由来の γ -PGA の α -カルボキシル基に疎水性アミノ酸としてフェニルアラニンを導入した両親媒化 γ -PGA からなるナノ粒子 (γ -PGA NP) について、タンパク質キャリアーとしての有用性を評価した。各種タンパク質を内包させた γ -PGA NP はいずれも直径 200-350 nm、表面電荷-20 mV 程度の非常に均一な粒子となり、内包効率は 25-60% と従来のキャリアー粒子に比べ高い値を示した。粒子に内包されたタンパク質(FITC-OVA)の懸濁液中における放出は、促進が見られた 10% FBS 共存下においても 1 ヶ月程度を要し、徐放化粒子として機能する可能性が示唆された。

γ -PGA ナノ粒子は高いタンパク質内包率を示すとともに、粒子構造は水溶液中で極めて安定であり徐放性に優れていることが明らかとなった。また、同粒子は他のタンパク質担体と比べ作成過程が高次構造維持に適する等の長所を持つ。

1-5) ミセル体を中心とした DDS 製剤の非臨床と臨床評価

種々の抗がん剤ミセル製剤について、製剤の前臨床試験で得られた基礎データと内包薬物に関する最近の臨床試験結果を活用し、ミセル製剤の適切な臨床応用につなげることを目的とした検討を行った。

ミセル内包化による 3 種類の抗がん剤[シスプラチン (NC-6004), SN-38 (NK012), タキソール (NK105)] の体内分布には違いが観察され、一部製剤は間質の多い腫瘍全体に集積し長期間主薬を徐放することや腎毒性の低下など、主薬単独またはプロドラッグ投与に見られない特性を示した。これらの結果と各薬物の臨床情報を臨床試験の対象選択や条件設定に活用した。また、ミセル体を中心とした DDS 製剤の前臨床データの分析が安全な臨床プロトコール設定に有効なこと、親化合物の臨床動向の情報が臨床試験の展開に貴重なだけでなく、前臨床試験および早期臨床試験の効率化にも役立つことが明らかとなった。

1-6) 難溶性薬物の経口固形製剤の溶出性評価

難溶性医薬品を含有する経口固形製剤の溶出性を評価するための試験液として、各種消化管内モ

デル液(SSIF)を比較検討した。

入手可能であったコール酸では、SSIF の緩衝液の pH で十分な溶解度が得られたのは、タウロデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、グリココール酸であった。これらのコール酸間では、レシチンの存在の有無に関わらず、いずれの製剤でも溶出性にそれほど大きな差は認められなかった。FaSSIF とポリソルベート 80(PS)による溶出性を比較すると、FaSSIF による溶出性と同等となる溶出性を示す PS 濃度は、イプリフラボンでは 0.08%、フェニトインでは 0.11% であった。FeSSIF と PS の比較では、イプリフラボンは 0.32%、フェニトインでは 0.22% の PS 添加時に FeSSIF と同程度の溶出性を示した。

FaSSIF では 0.1% 程度の PS とほぼ同等であること、溶解度の小さいイプリフラボンではフェニトインよりも多量の PS が必要であること、逆に胆汁酸の混合ミセルでは、脂溶性の高い医薬品に対して可溶化能が高いことが示唆された。

1-7) 口腔内崩壊錠の評価手法

口腔内崩壊錠 (Orally Disintegrating Tablet, ODT) の再現性の高い適切な崩壊評価法の構築を目的として、口腔内崩壊性の評価を目的に開発した舌表面を模した多孔板上顎の役目を果たす重りおよび水分供給機構を持つ装置を用い、ボグリボース口腔内崩壊錠について重りの質量および回転速度の影響を検討した。

ボグリボース口腔内崩壊錠(先発品)の崩壊時間は多孔板回転速度の増加に伴い有意に短くなった。一方で重り質量による影響は見られず、機械強度よりも吸湿性に律速されて崩壊するように設計されていることが示唆された。各銘柄のボグリボース口腔内崩壊錠はいずれも 1 分以内に崩壊した。局方崩壊試験法との比較では回帰係数が 0.7818 と崩壊時間が長くなる傾向にあったが、相関係数は 0.9926 (95% 信頼区間 0.8876 < r < 0.9995) と良好であった。回帰式の y 切片と原点の差から、崩壊後の成分が測定法により異なる影響を与えることが示唆された。各製剤の崩壊時間の相対標準偏差 (RSD) は 8% から 25% と小さく、製剤の特性に応じた条件設定によりさらに改善される事が示唆された。

ヒトの口腔内を模した崩壊試験法は従来の局方崩壊試験法に比べ *in vivo* に近い試験環境を提供し、ODT がわずかな唾液で崩壊する過程を的確に反映した精度の高い評価法として、有用なことが明らかとなった。

1-8) 外用剤・経皮吸収剤の製剤化研究

経皮吸収剤の張付き（付着性）についての客観的評価法の設定を目的として、貼付剤（テープ剤）とハップ剤を対象に独自に開発したタック性測定装置(TAK)により、粘着(自着)特性と凝集破壊量を測定し、官能試験の結果と比較・考察した。

市販のツロブテロール貼付剤の粘着力について、引張り試験機による結果と官能試験の結果と比較すると、はほぼ一致した粘着力の順位を示し、貼付剤のような粘着力の強い製剤の評価法としての有用性が明らかとなった。一方でタック性測定装置を用いて測定した各製剤の粘着力順位は官能試験と一致しなかった。また、医療用消炎鎮痛ハップ剤を試料として引張り試験機により得られた凝集破壊量の結果はヒトによる剥離試験の凝集破壊量の結果とよい一致を示した。

貼付剤の粘着特性とハップ剤の凝集破壊性の客観的評価に引張り試験機が有用なことが明らかとなった。一方でタック性測定装置により得られる粘着曲線は剥離挙動の情報を含むことから、各種製剤に対応した機構の改良と詳細な検討が必要と考えられた。

(2) 難溶性薬物の製剤機能解析法および品質確保の方策の研究

超難溶性薬物の可溶化法として注目を集めている非晶質化製剤、ナノ微粒子化製剤、Cocrystal 製剤について、これらの製剤の可溶化機能を支配する製剤の物性評価法の確立をめざした研究を行った。

2-1) 非晶質化を利用した可溶化製剤

ポリビニルピロリドン(PVP)やヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)などの高分子添加剤とともに非晶質化した固体分散体中のフルフェナム酸の結晶化速度は添加剤によって差が見られ、HPMCにくらべPVPを添加した固体分散体においては非晶質フルフェナム酸の残存率の減少が緩やかであり、安定であった。NMR 緩和時間から求めた相関時間(τ_c 、分子が1回転するのに要する時間を表し、長いほど運動性が低い)は何れの温度においてもPVP固体分散体のほうが長く、分子運動性が低いことが示された。固体NMRによって測定される分子運動性は、非晶質固体分散体の安定性の評価に有用であることが明らかになった。

PVPと混合粉碎することにより非晶質化したトログリタゾン製剤は粉碎時間が長い分散体ほど結晶化が始まるまでの誘導期間が長く、安定であっ

た。粉碎時間により粉末X線回折パターンは変化しないが、固体高分解能NMRスペクトルは粉碎時間が長いほどピークのブロード化と強度の低下がみられた。粉末X線回折およびNMRスペクトルのデータについて、Partial Least Squares 回帰分析(PLS法)により多変量解析を行ったところ、固体NMRスペクトルと安定性との間に相関性が見いだされ、固体NMRスペクトルは非晶質製剤の安定性評価に有用な情報を与えることが示唆された。

2-2) ナノ微粒子化を利用した可溶化製剤

プロブコール/PVP/界面活性剤の3成分混合粉碎により得られる微粒子の粒子径と微粒子生成率に及ぼす界面活性剤のアルキル鎖長および添加量の影響を検討したところ、プロブコール/PVP/界面活性剤の重量比を1/3/1にすることにより、界面活性剤のアルキル鎖長によらず平均粒子径100nm以下のナノ微粒子を得ることができた。ナノ微粒子生成率はアルキル鎖長の長い界面活性剤(C16, C18)を用いることにより、アルキル鎖長の短いもの(C6)と比較して少ない添加量でナノ微粒子を形成することが明らかとなった。さらに、ナノ微粒子の ^{13}C 固体NMRの測定により、ナノ微粒子形成には薬物とPVPの相互作用に加え、界面活性剤とPVPとの相互作用も重要であることが明らかになった。

テラヘルツ分光法により、チオ尿素-MB複合体形成による、チオ尿素の分子間水素結合の消失や、MB由来のピークのシフトが観測できた。チオ尿素-EBや尿素-MB複合体においてもスペクトルの変化が観測され、テラヘルツ分光法は医薬品複合体の相互作用を評価する手法として有用であることが示された。

2-3) Cocrystal化を利用した可溶化製剤

カフェイン及びテオフィリンのcocrystal形成を晶析スクリーニング系で検討したところ、12種の文献既知のcocrystalの他に、新規のcocrystal 8種を見出すことができ、本条件は概ね適切な結晶化スクリーニング条件と判断された。

また、カルバマゼピンをモデル化合物として、粉碎法によるcocrystal形成を検討したところ、11種のcocrystal former (CCF)においてcocrystalの形成が確認された。薬物とCCFとの相互作用を固体NMRによって解析した結果、カウンター分子と相互作用している窒素原子に隣接する薬物炭素の化学シフトの変化が観測され、塩酸塩ではcocrystalよりも ^{13}C の化学シフトが大きく変化した。 ^{13}C の化学シフトの変化によって、CCFあるいはカウンターイオンと相互作用している窒素原子の特定、

得られた結晶が塩か cocrystal かの判別が可能と考えられる。

(3) 製剤開発および製造工程管理の研究

医薬品製造工程のオンラインモニタリングへの応用を視野にいれて、分析方法の検討を行い、以下の結果を得た。

3-1) 懸濁性点眼剤における主薬懸濁粒子の粒子系や粒度分布は点眼剤の有効性、安全性に影響を及ぼす場合がある。そこでモデル点眼剤について分散時間を変動させ、粒度分布を測定したところ、分散時間の増加に伴い粒子径が小さくなり、 $5\mu\text{m}$ 以上の粒子径頻度が特に減少する傾向を示した。また、これら点眼剤を一定条件で保存し、凝集発生率と粒度分布の関係を評価したところ、点眼剤の粒度分布において $5\mu\text{m}$ 以上の粒子径頻度が大きい時に凝集発生率が高くなることを確認した。この結果を基に粒度分布の管理幅を設定し、オンラインレーザー回折器を用いてオフラインで検証を行った結果、本測定器において分散時間の経過に伴い変動する粒度分布を測定でき、かつ、凝集発生に影響する $5\mu\text{m}$ 以上の粒子径頻度の差異を検出することが確認できた。以上のことより、オンラインレーザー回折器を用いて懸濁性点眼剤製造時の主薬分散工程において品質に影響する粒度分布を検出・管理できる可能性が示唆された。

3-2) 凍結乾燥製剤の水分値測定は通常カール・フィッシャー法 (KF 法) あるいは乾燥減量で行うが、迅速かつ非破壊的に測定可能な近赤外分光 (NIR) で水分を測定し、比較した。検量線はスペクトルを MSC (Multiplicative Scattering Correction) 及び平滑化処理し、PLS を用いて作成した。NIR 法と KF 法による水分値を比較した結果、ほぼ同等の水分値を得られることが確認できた。

3-3) 製剤の変色をイメージング分析技術を用いて解析する方法を検討した。有機酸、糖類、リン酸ナトリウムなどから構成される製剤について、 40°C あるいは 50°C で1~3箇月保管して、ラマン法、IR 法、特性 X 線法による評価、X 線による元素マッピングを行った。処方成分間の配合変化試験の結果、変色はモデル製剤処方中の糖成分と微量成分のリン酸ナトリウム塩との反応で生じることが示唆された。そこで、錠剤表面中のリン酸ナトリウム塩の分布について種々の分析法による評価を試みたところ、特性 X 線法を用いてリン酸ナトリウム塩特有の元素であるナトリウムとリンのピークを検出できることが明らかとなった。特性 X 線

法による元素マッピングを試みた結果、変色部に特異的に高濃度のナトリウム元素とリン元素が分布していることを確認することができ、変色はリン酸ナトリウム塩の錠剤表面における偏析に起因すると考えられ、配合変化試験の結果と一致した。

3-3) 細胞培養医薬品における培養工程のオンラインモニタリング法の検討を行った。 850nm の近赤外レーザー光を利用して、酵母の菌濃度を測定した。オフラインサンプリングによる従来法の菌体濃度測定結果と菌体濃度センサーのシグナルに明確な直線性があることが示され、また、幅広い範囲でかつリアルタイムに菌体濃度を測定できることが示された。

3-4) 原薬の溶出性を制御する目的で実施する原薬微粒子コーティングについて、近赤外分析技術を用いて、流動層装置の既存ガラス窓越しによる品質測定の可能性を検討した。乳糖及び原薬コーティングともに非接触によるリアルタイム測定において比較的安定したスペクトルを取得できた。乳糖へのコーティングについては原スペクトル結果による粒子径の予測、スペクトルの1次微分結果によるコーティング量の予測可能性を示した。原薬へのコーティングについてもスペクトル処理によってコーティング量の予測可能性を示した。特にコーティング初期に発生する測定部付近での流動不良が近赤外分析結果にも表れた。また予測されるコーティング量の増加分からコーティング効率を算出できることがわかった。

3-5) 固形製剤の処方成分の分布を、エネルギー分散型 X 線分析 (EDAX) の元素マッピングによって分析した。錠剤表面及び切断面の SEM 画像や元素マッピングによって確認された各処方成分粒子の分布状態を観察した結果、錠剤の表面付近 (深さ $100\text{ }\mu\text{m}$) では内部に比べて主薬粒子の分布が少ないことが確認された。EDAX の測定深度は $3\text{ }\mu\text{m}$ 以内であるため、測定深度の深い NIR ケミカルイメージングによる比較測定を行なった。その結果、NIR ケミカルイメージングで観察された主薬の粒子サイズは内部に比べて表面が小さく、EDAX と同様な主薬の分布情報が得られた。打錠前のブレンド品の処方成分の粒度分布を見ると、造粒した主薬の粒子サイズ ($100\sim 500\mu\text{m}$) は、他の処方成分の粒子サイズ ($100\mu\text{m}$ 以下) と比較して大きい。これらから、造粒された大きな主薬の粒子が打錠時に内部に押しやられて圧縮されていることが考えられる。

3-6) 近赤外イメージングシステムと固形製剤の溶

出との相関について検討した。造粒評価法について、近赤外イメージングより得られた各構成成分の含量分布（ヒストグラム）を検討したところ、乳糖のヒストグラムは造粒時間に依存して尖度・歪度共に小さくなっていった。エテンザミド尖度は小さく、歪度が大きくなっていく傾向が認められた。スターチ及びメチルセルロースについては、ほとんど変化は認められなかった。造粒時間5分の錠剤について初期の溶出速度と尖度、歪度との相関を分析したところ、エテンザミドについては弱かったが、乳糖に対してはかなり強い相関が認められた。また、エテンザミドとコーンスターチの分布の相関について検討を行ったところ、エテンザミドの含量が多いピクセルほどコーンスターチの含量が高くなることが明らかとなった。この相関をパドル法で測定した溶出速度と比較すると対数曲線的な相関が見られ、製剤の溶出性を近赤外イメージングによる造粒評価によって予測することが可能であることを示唆する結果を得た。

3-7) 超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)の工程管理技術としての適用性および具体的な導入手法を検討した。モデル合成工程として、ケトンの金属触媒による水酸基への還元反応を選択した。原料にはアセトフェノン (AcPh) を用い、ルテニウム金属触媒を加え、2-プロパノールを溶媒として反応を行い、合成工程における原料及び生成物フェニルエタノール (PhEt) の量の変化について経時的に反応溶液を採取してクロマトグラフィーにより解析した。AcPh 及び PhEt について、HPLC ではそれぞれ約 2.9 分及び約 2.3 分、UPLC では約 0.75 分及び約 0.64 分で検出された。180 分までの合成工程では、PhEt の量が経時的に増大し、また AcPh の量が減少していることが合成工程中に迅速に確認、追跡することが可能であった。反応プロセスをリアルタイムに追跡する場合、試料の前処理を含めて次の試料採取までに分析結果を得ることが望ましいが、反応液の採取から希釈、ろ過等の前処理を含めて 5 分以内での検出が可能であった。合成工程において、プロセス解析工学 (PAT) を適用する場合には、試料の採取から分析装置への注入まで自動化を検討することが必要であるが、UPLC により、十分にリアルタイム分析が達成できることが示唆された。

D. 考察

(1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

薬物封入リポソーム製剤からの主剤の *in vitro*

放出性は、これら製剤の開発に必須の評価指標であるばかりでなく、市販後の製造ロットの製品の一定性評価という視点でも、適切な評価系の設定が望まれる。本研究では、複数のグループが評価系開発研究を開始した。しかし、塩化アンモニウム濃度の影響の有無など、一部に背反する結果も得られている。このことは、*in vivo* に対応した評価系の設定までには、詳細かつ多面的な検討が必要なことを示している。今後ヒト体内での予測性を検討するために、ヒト等の血漿、血清を用いた放出評価系を検討してゆくが、慎重な検討が必要であろう。

γ -PGA ナノ粒子は高いタンパク質内包率を示すとともに、粒子構造は水溶液中で極めて安定であり、徐放性に優れていることが明らかとなった。また、同粒子は他のタンパク質担体と比べ作成過程が高次構造維持に適する等の長所を持つことから、様々なタンパク質担体としての活用の可能性があり、今後多面的な検討により、その有用性を明らかにしてゆく予定である。

難溶性医薬品を含有する経口固形製剤の標準的溶出性試験系の開発は、古くから望まれている課題であったものの、未だ適切な条件設定は考案されていない。消化管内モデル液はこの課題解決への一つの試みであるが、今後さらに混合ミセル系の特性をより明らかにし、適切な応用方法の検討や、より簡便な系の探索を試みる予定である。

(2) 超難溶性薬物の製剤機能解析法研究および品質確保の方策の検討

本研究によって、難溶性薬物の可溶化法として注目を集めている方法を用いた非晶質化製剤、ナノ微粒化製剤、cocrystal 製剤について、安定性の高い可溶化機能を有する製剤の設計とその評価法に関する重要な知見を得ることができた。

例えば、ナノ微粒化法による可溶化製剤においては、効率的な微粒形成にはアルキル鎖長の長い界面活性剤を用いることが有用であることがわかった。これらの知見は難溶性薬物の安定な可溶化製剤の設計にむすびつく知見と考える。今後、調製条件と製剤品質の関連の系統的な検討を継続することにより、今年度得られた知見の普遍性を確認することが必要と考える。また、異なる方法によって調製した非晶質固体分散体の安定性とそれを支配する物性を明らかにすることにより、非晶質固体分散体に共通する物性と製造法に依存する物性を切り分けて理解することも必要と考える。

Cocrystal 法を利用した可溶化製剤に関しては、晶析法による cocrystal スクリーニング系を開発することができた。また、粉碎法によっても cocrystal が安定的に得られることを明らかにした。溶液晶析法と粉碎法において cocrystal 形成能が異なることが考えられることから、今後、創薬研究における両法の適用範囲や手順を考察し、効率的・効果的な cocrystal 研究スキームを確立する必要があると考える。

可溶化製剤の物性評価法に関して、固体 NMR 法は緩和時間による薬物の分子運動性の解析やスペクトルの多変量解析を行うことにより物理的安定性を予測する手段となり得ること、また、薬物と添加剤や CFF との相互作用を評価する上で有用であることが明らかとなった。また、テラヘルツ分光法は医薬品の複合体形成を検出する手法として有用であり、cocrystal 形成を評価する上で有用であると考えられる。今後、これらの評価法の有用性が普遍性をもつことを明らかにする必要があると考える。

(3) 製剤開発および製造工程管理の方策の研究

現在、医薬品の品質は ICHQ8 でもとりあげられている「Quality by design」に象徴されるように、品質は製品試験だけで保証するのではなく、目的の品質の製品が製造されるように設計を行い、製造工程を適切にコントロールすることによって保証するという考え方が浸透しつつある。ここで重要なのは医薬品設計及び製造プロセスの理解と製造工程のコントロール技術であり、本研究で取り上げている X線や近赤外を利用した顕微分光システムは品質を左右する要因を把握するプロセス理解のツールとして非常に有用であることが、また、製造工程をコントロールする技術のための分析手法 (PAT) に関する研究としてレーザー回折器や近赤外分光器、イメージング、UPLC などが有用であることも本研究によって示された。また、バイオプロセスへの PAT の適用については、日本のバイオ医薬品業界では、必ずしも取り組みが十分とはいえ、本研究での取り組みが今後のこの分野の研究を触発するものと期待される。

E. 結論

機能性製剤の品質確保の方策の策定にむけて、

- (1) リポソーム製剤、ナノ粒子製剤、難溶性製剤等の製剤機能評価法を検討し、
- 1-1) 薬物封入リポソーム製剤の製剤特性の研究を行

い、適切な温度選択と BSA 添加が *in vivo* に対応した *in vitro* 放出試験設定に有効なことを示唆する結果を得た；

- 1-2) リポソーム製剤の因子に関するクラスター分析により、放出性とリポソーム化率および平均粒子系が同一クラスターに分類されることを見いだした；
- 1-3) PEG 修飾リポソーム製剤の *in vitro* 放出性評価系として塩化アンモニウムを設定した系が適する可能性を示す結果を得た；
- 1-4) タンパク質キャリアーとして γ -PGA が高いタンパク質内包性を示し、水溶液中で安定であり、徐放性に優れていることを明らかにした；
- 1-5) ミセル内包化による抗ガン剤について早期臨床治験にむけた非臨床データの分析を行った；
- 1-6) 難溶性経口固形製剤の溶出性試験の試験液として、各種消化管内モデル液を比較検討した；
- 1-7) ヒトの口腔内を模した口腔内崩壊試験法を行い、局方試験法より精度が高い事を示した；
- 1-8) 貼付剤の粘着特性とハップ剤の凝集破壊性の客観的評価に引張り試験器が有用なことを明らかにした。

(2) 超難溶性薬物の可溶化法として注目されている以下の製剤における可溶化に関係する物性評価法を検討し、

- 2-1) 非晶質製剤について、固体 NMR 等により物理的安定性、溶出速度、あるいは結晶化速度に及ぼす固体物性の解析が可能であることを示した；
- 2-2) ナノ粒子化製剤について、ナノ微粒子生成率への添加剤の影響を調べるとともに、テラヘルツ分光が医薬品複合体の相互作用の評価に有用であることを示した；
- 2-3) Cocrystal 結晶化スクリーニング系を構築し、モデル化合物で多様な cocrystal の得られることを検証するとともに、Cocrystal の結晶構造や機能性評価において固体 NMR が有効なツールとなりうることを示唆した。

(3) 医薬品製造工程のオンラインリアルタイムモニタリングへの応用を視野にいた分析法に関する研究を行い、

- 3-1) オンラインレーザー回折器を用いて、懸濁性点眼剤における主薬懸濁粒子の粒度分布の解析を行った；
- 3-2) 近赤外分光スペクトルによる凍結乾燥製剤の水分値測定に成功した；
- 3-3) 各種イメージング分析技術を用いて、製剤の配

- 合変化による変色の解析に成功した；
- 3-4)近赤外レーザー光の吸光を利用して，細胞培養工程の酵母濃度の測定に成功した；
- 3-5)エネルギー分散型X線分析の元素マッピングによって固形製剤の処方成分の分布の解析を検討した；
- 3-6) 近赤外イメージングによる造粒評価による溶出性予測の可能性を検討した；
- 3-7) 超高速液体クロマトグラフィーによる合成工程のリアルタイム分析実現の可能性を示した。

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Kawai, H., Suzuki, T., Kobayashi, T., Ishii-Watabe, A., Sakurai, H., Ohata, H., Honda, K., Momose, K., Hayakawa, T., Kawanishi, T.: Caspase cascade proceeds rapidly after cytochrome c release from mitochondria in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death, *J Pharmacol Sci.*, **103**, 159-67 (2007)
- 2) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Significance of Local Mobility in Aggregation of β -Galactosidase Lyophilized with Trehalose, Sucrose or Stachyose, *Pharm Res.*, **24**, 1660-1667 (2007)
- 3) Miyazaki, T., Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T.: Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelated to the glass transition temperature, *Int J Pharm*, **336**, 191-195 (2007)
- 4) Ida-Tanaka, N., Namekata, I., Kaneko, M., Tamura, M., Kawanishi, T., Nakamura, R., Shigenobu, K., Tanaka, H.: Involvement of intracellular Ca^{2+} in the regulatory volume decrease after hyposmotic swelling in MDCK cells, *J Pharmacol Sci.* **104**, 397-401 (2007)
- 5) 川西徹：抗体医薬の現状と展望，日薬理誌，**131**，102-108 (2008)
- 6) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T., Tanaka, K., Kitamura, S., Takakura, A., Hayashi, T., Muranushi, N.: Miscibility of nifedipine and hydrophilic polymers as measured by 1H -NMR spin-lattice relaxation, *Chem Pharm Bull.*, **55**, 1227-1231 (2007)
- 7) K.Izutsu, C.Yomota, N.Aoyagi. Inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium phosphates and citrates. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**: 565-570 (2007)
- 8) A.Hayama, T.Yamamoto, M.Yokoyama, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani. Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J Nanosci Nanotechno* (in press)
- 9) Y. Maitani, S. Igarashi, M. Sato, V. Hattori. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression, *Int.J.Pharm.*, **342**: 33-39 (2007)
- 10) Y. Hattori, W. Ding, V. Maitani. Highly efficient cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated gene transfer in vivo and in vitro in prostate carcinoma PC—3 cells, *J Control. Release*, **120**: 122-130 (2007)
- 11) E. Kajiwara, K. Kawano, V. Hattori, M. Fukushima, K. Ilayashi, V. Maitani. Long-circulating liposome encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy, *J Control. Release*, **120**: 104-110 (2007)
- 12) V. Zhang, X. R. Qi, V. Gao, L. Wei. V. Maitani, T. Nagai. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J Control Release*, **117**: 281-290 (2007)
- 13) T. Hamaguchi, Y. Matsumura, et al., A. Pharmacokinetic Study Paclitaxel-incorporating Nanoparticle Formulation. *Brit J Cancer.*, **97**: 170-176, 2007.
- 14) Y. Matsumura, Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. *J Drug Targeting.*, **15(7-8)** :507-517, 2007.
- 15) K. Maekawa, Y. Matsumura, et al., Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. *J Hum Genet.*, **52** : 804-819, 2007.
- 16) T. Nakajima, Y. Matsumura, et al., Synergistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NKO12, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int. J Cancer* (in press).
- 17) S. Yajima, Y. Matsumura, et al., Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer. *Int J Oncol.* Nov;31(5):1029-37, 2007.
- 18) M. Sumitomo, Y. Matsumura, et al., Novel SN-3

- 8-incorporated polymeric micelles, NKO 12, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res.*, **122** : 2148-2153, 2008.
- 19) T. Yoshikawa, N. Okada, A. Oda, K. Matsuo, K. Matsuo, Y. Mukai, Y. Yoshioka, T. Akagi, M. Akashi, S. Nakagawa, Development of amphiphilic γ -PGA-nanoparticle based tumor-vaccine: Potential of the nanoparticulate cytosolic protein delivery carrier. *Biochem Biophys Res Commun.*, **366**, 408-413 (2008)
- 20) Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T.: Wide-Ranging Molecular Mobilities of Water in Active Pharmaceutical Ingredient (API) Hydrates as Determined by NMR Relaxation Times. *J Pharm. Sci.*, (2008) in press.
- 21) Maitani, Y., Aso Y., Yamada, A., Yoshioka S.: Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/DNA complexes with high transfection efficiency. *Int. J. Pharm.*, (2008) in press.
- 22) Yoshioka, S., Aso, Y.: Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability During Storage of Amorphous Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, (2007) **96**, 960-981.
2. 学会発表
- 1) 中川晋作, 生分解性高分子を用いた新規ワクチンキャリアーの開発. 生物資源開発センターセミナー, 大阪府立大学, 2007年10月.
- 2) 吉岡澄江, 阿曾幸男, 大迫 勉, 川西 徹: NMR緩和時間に反映される医薬品水和物中の水分子の運動性. 日本薬学会第128年会 (2008.3).
- 3) 阿曾幸男, 吉岡澄江, 川西 徹: デキストランゲル生成過程における β -ガラクトシダーゼおよびインスリンの活性に及ぼす γ 線照射の影響とデキストランによる失活抑制作用. 日本薬学会第128年会 (2008.3).
- 4) Yoshioka, S., Miyazaki T., Aso, Y., Kawanishi T.: Significance of Local and Global Mobility in Aggregation of Lyophilized- \square -Galactosidase. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2007.11).
- 5) Aso, Y., Miyazaki T., Yoshioka, S., Kawanishi T.: A comparison of the physical stability of amorphous nitrendipine and its enantiomer, American Association of Pharmaceutical Scientists. Annual Meeting (2007.11).
- 6) 阿曾幸男, 吉岡澄江, 川西 徹: ^{19}F -NMRによる非晶質フルフェナム酸の結晶化過程の解析, 第46回NMR討論会 (2007.9).
- 7) 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度に及ぼす局所的分子運動性の影響. 日本薬学会第22年会 (2007.5).
- 8) 阿曾幸男, 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 川西 徹: 非晶質ジヒドロピリジン系薬物の物理的安定性と α および β 緩和時間で表される分子運動性との関係. 日本薬学会第22年会 (2007.5).
- 9) 吉岡澄江, 阿曾幸男, 川西 徹: 固体分散体中のアスピリンの拡散速度と化学反応性に関する分子動力的検討. 日本薬学会第127年会 (2007.3).
- 10) 阿曾幸男, 吉岡澄江, 川西 徹: ^{13}C -NMR緩和時間によるデキストランゲル中の β ガラクトシダーゼの分子運動性の測定. 日本薬学会第127年会 (2007.3).
- 11) T. Koide, T. Nagato, S. Natsuyama, Y. Hiyama: Analysis of granulation mechanisms using NIR (Near Infrared Rays) imaging system, 2007 AAPS Annual meeting and Exposition (2007.11 San Diego CA. USA)
- 12) 松井 航, 長門 琢也, 徳山 大地, 夏山 晋: 微粒子コーティング操作におけるコーティング性能のモニタリング技術, 平成19年度 標準処方研究会, (2007.11 浜松)
- 13) 小出達夫, 檜山行雄: 分光顕微シシステムの医薬品品質評価への応用, 日本薬学会 128 年会 (2008.3 横浜)
- 14) 坂本知昭, 水飼恵子, 檜山行雄: 超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)及び近赤外分光分析(NIR)を用いた不斉医薬品合成工程におけるプロセス解析工学(PAT)としての適用性に関する研究, 日本薬学会第128年会 (2008.3 横浜)
- 15) 本田昌徳, 澤 輝, 播磨 武, 山田清孝, 檜山行雄: エネルギー分散型X線分析を用いる固形製剤の分析評価, 日本薬学会 128 年会 (2008.3 横浜)
- 16) 米持悦生, 吉橋泰生, 寺田勝英: 錠剤の溶出挙動に及ぼすステアリン酸マグネシウムのロット間差の影響, 日本薬学会 128 年会 (2008.3 横浜)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

代替毒性試験法の評価と開発に関する研究

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 ヒト遺伝子、ヒト細胞、ヒト由来の代謝酵素を用いて *in vitro* 遺伝毒性試験系のヒト化を進め、トランスジェニックラット・マウスを用いる遺伝毒性試験法のバリデーションと高感度化を推進し、代替毒性試験法の基盤的研究を進めた。

分担研究者

- (1) 大阪府公衆衛生研究所 小田美光
- (2) サントリー株式会社 藤居 亙
- (3) 蛋白精製工業 持田 弘
- (4) 食品薬品安全センター秦野研究所 須井哉
- (5) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (6) 第一三共株式会社 高崎 涉
- (7) 大鵬薬品工業株式会社 岡 宏明
- (8) 中外製薬株式会社 三島雅之
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所 西川秋佳
- (10) 明治製菓株式会社 林 宏行
- (11) 和研製薬株式会社 真田尚和

A. 研究目的

医薬品を含む化学物質の安全性評価は、実験動物（ラット、マウス）を用いる毒性試験の結果に基づいて行われて来たが、近年、動物愛護に対する関心の高まりを受けて、動物実験を出来る限り *in vitro* 試験（培養細胞）で代替（Replacement）し、実験動物を用いる場合には、使用する頭数の削減（Reduction）、また一匹あたりの動物からより多くの有用情報を得るなどの工夫（Refinement）が求められつつある。すでに EU（欧州共同体）は、化粧品の安全性評価に関して 2009 年から実験動物を使ったデータを基本的に受け入れないことを表明している。したがって医薬品の安全性評価に関しても、

上記の 3R (Reduction, Refinement, Replacement) を念頭に試験方法を再吟味することが喫緊の課題である。

遺伝毒性試験は、ゲノム DNA に対する化学物質の変異作用（突然変異および染色体異常誘発性）を評価する試験法であり、その結果は発がん性と密接に関連する。現在の評価法によれば、ある化学物質に発がん性があり、その発がん作用が遺伝毒性に基づく場合には、当該物質の発がん作用には閾値がないものとされ、ADI（一日許容摂取量）の設定が行えない。したがって医薬品等の候補化合物に遺伝毒性が認められた場合には、開発が中止される例が少なくない。

医薬品の遺伝毒性評価には(1)微生物(2)哺乳類細胞(3)マウス（小核試験）を用いることが ICH ガイドラインで求められている。しかし(2)哺乳類培養細胞を用いる試験については、動物に対して発がん性を示さないにもかかわらず陽性となる物質（偽陽性）が少なくないことから試験細胞株の遺伝的改良が望まれている。また(3)小核試験においては、血液系の細胞に対する遺伝毒性のみが評価の対象となるため、多臓器において遺伝毒性を評価しうる試験、例えばトランスジェニック遺伝毒性試験法の確立が望まれている。特に発がん試験で汎用される F344 ラットを基にした試験系の確立が期待されている。

本研究では、ヒト遺伝子を導入した微生物株、哺乳類細胞株の樹立、遺伝的に改良したヒト細胞株の作出を通して、動物実験を真に代替する *in vitro* 試験系の確立を目指す。また変異検出用のレポーター遺伝子を導入した F344 *gpt* delta トランスジェニックラット遺伝毒性試験系を確立する。F344 トランスジェニックラット試験系の確立により、発がんの標的臓器で遺伝毒性を検出することができるようになり、発がん試験に用いられる動物数を削減できる可能性が高まる。さらに DNA 損傷部位の乗り越え DNA 合成 (トランスリージョン DNA 合成、TLS) に関わる DNA ポリメラーゼ κ (Pol κ) の活性を特異的に不活化したノックイン (KI) マウスとヒト細胞株を作出する。Pol κ KI マウスおよびヒト細胞株は、多環芳香族炭化水素系の遺伝毒性物質に対して、高い感受性を示すことが期待される。これらの研究の実施により、医薬品の遺伝毒性、発がん性評価における 3R が前進し、動物数を削減しつつ安全な医薬品を社会に供給することが可能となる (図 1)。

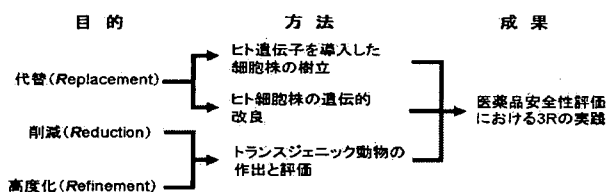


図 1 遺伝毒性分野における代替試験法開発の指針

今年度は、(1)ヒト薬物代謝酵素を導入した微生物株を用いる遺伝毒性試験法のキット化とハイ・スループット化を進め、(2)ヒト細胞の遺伝的改作(hPol κ 遺伝子の KI およびノックアウト (KO))、ヒトおよびラット由来の S9 (肝ホモジエネートの 9,000 x g 上清) の代謝活性化能を比較し、(3) *gpt* delta トランスジェニックラットのバリデーションを開始するとともに、Pol κ KI マウスを樹立した。

B. 研究方法

B-1 微生物を用いた高感度・迅速な遺伝毒性試験の構築研究

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) の一夜培養液を 1 mM IPTG、0.5 mM δ aminolevulinic acid、250 μ L /L trace element を含む L-broth (modified L-broth) で 50 倍希釈し、その菌液を 37°C で 3 時間培養した。試験化合物への曝露は、菌液 96 μ L に被験物質溶液 4 μ L を加え、37°C、3 時間振盪培養して行った。用いた被験物質は 2-aminofluorene、Glu-P-1 及び IQ である。菌体の破壊は、培養後の菌液 10 μ L に Z 緩衝液 90 μ L、0.1% SDS 50 μ L を加え 30 秒攪拌した。SDS の代わりに PopCulture Reagent (Novagen) を用いる際には、同試薬を 10 μ L 加え、室温で 10 分放置した。Chlorophenolred- β -D-galactopyranoside (CPRG) を加え β -D-galactosidase 活性を測定した (小田)。

B-2 ヒト型高感度 umu テスト株のバリデーション

サルモネラ OY1002/1A2 の一夜培養液を、modified L-broth で 50 倍希釈し 37°C で 3 時間培養した場合 (method 1) と、L-broth で 1 時間培養した後に、IPTG、 δ aminolevulinic acid、trace element をそれぞれ 1 mM、0.5 mM、250 μ L /L になるように加え、その菌液を 37°C で 3 時間培養した場合 (method 2) について、 β -D-galactosidase 活性を比較した。用いた化合物は 2-aminoanthracene、Glu-P-1、MeIQ、IQ である (藤居)。

B-3 ヒト型高感度 umu テスト株のキット化

試験菌株にはサルモネラ OY1002/1A1、OY1002/1A2、OY1002/1B1、OY1002/3A4 の 4 株を用いた。一夜培養液を TGyT 培地で希釈した後、

37°Cで培養し、遠心して集めた菌体を凍結乾燥した。凍結乾燥菌株に1 mLのTGA培地を加え、37°Cで1時間復水を行った。復水後、10 mLのTGA培地を加えて37°Cで培養しumu試験に供した。陽性対照化合物としては4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)とmethylmethanesulfonate (MMS)を用いた(持田)。

B-4 ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の実用化

Ames試験で陽性でありながら改良法FAT(Fluctuation Ames Test)で陰性となるNTP(National Toxicology Program)選定化合物13種について、大腸菌DNAポリメラーゼIV(DinB)を発現するYG5161株(TA1535/pYG768)を用いてFAT法でAmes試験を行い、その感受性を従来株(TA100、TA98)と比較した(須井)。

B-5 DNAポリメラーゼ遺伝子の改変による代替毒性試験法の改良に関する研究

ヒトDNAポリメラーゼ κ (Pol κ)の活性中心部に存在する198番目のアスパラギン酸(198D)と199番目のグルタミン酸(199E)をアラニンに置換したヒトNalm-6 KI細胞を樹立するためのターゲティングベクターを作製した。また活性中心が存在するエクソン6を欠失させたKO細胞を樹立するためのターゲティングベクターも作製した。それぞれのベクターをエレクトロポレーション法にてNalm-6細胞に導入し、薬剤耐性をマーカーに遺伝子導入株を選別し、さらにサザン解析、シーケンス解析により目的の変異が導入されている株を選抜した。中外製薬にて樹立したPol κ KIマウスの胸腺、副腎、肝臓、精巣におけるPol κ の発現を、ウェスタンブロット法にて解析した(能美)。

B-6 ヒト型遺伝毒性試験のリスクアセスメントへの応用

発がん物質 2,4-diaminotoluene(2,4-DAT)と

非発がん性の構造類似体2,6-diaminotoluene(2,6-DAT)のヒト細胞TK6に対する遺伝毒性を、ラットおよびヒトS9の存在下においてin vitro小核試験、TK遺伝子突然変異試験により検索した(本間)。

B-7 ヒト型遺伝毒性試験における遺伝子多型を考慮したリスクアセスメント

8種類の社内化合物について、チャイニーズハムスターCHO/IU細胞を用いてin vitro小核試験と染色体異常試験を行い、その結果を比較した(高崎)。

B-8 遺伝毒性試験に使用される細胞株の感受性に関する研究

MeIQxのヒト細胞WTK-1に対する遺伝毒性を、ラットおよびヒトS9の存在下、in vitro小核試験、TK遺伝子突然変異試験により検索した。代謝拮抗剤(methotrexate、6-mercaptopurine)についてマウスリンフォーマL5178Ytk+/-、ヒトBリンパ球由来のTK6、WTK-1細胞を用いてin vitro小核試験を行った(岡)。

B-9 遺伝子導入哺乳類細胞を用いた遺伝毒性スクリーニング法の開発

Pol κ の198Dと199Eをともにアラニンに置換したKIマウスを作製するため、C57BL/6のES細胞にターゲティングベクターを導入した。ネオマイシン耐性(Neo^r)コロニーの中から目的遺伝子の相同組換え体を選別した。Cre蛋白を一過的に発現してloxP配列に囲まれたNeo^r遺伝子を除去した。このES細胞をマウス胚盤胞へ注入し、その胚をレシピエントマウスに移植してキメラマウスを得た。キメラマウスをC57BL/6Nと交配してKIヘテロマウスを得た。ヘテロマウス同士を交配することでKIホモマウスを得た(三島)。

B-10 *gpt delta* マウスを用いた環境化学物質の

発がん機序解明へのアプローチ

6週齢の雄性 F344 *gpt delta* トランスジェニックラットに 2, 4-DAT (500ppm、250ppm、125ppm) あるいは 2, 6-DAT (500ppm) を 13 週間混餌投与した (西川)。

B-11 遺伝毒性評価用トランスジェニックラットのバリデーション

2, 4-DAT の 100、300 および 1000 ppm、2, 6-DAT の 500 および 1500 ppm を *gpt delta* ラットと同系統である F344 雄性ラットに 4 週間混餌投与し、各種毒性検査を行った。4 週間混餌投与の結果から、2, 4-DAT は、125、250、500 ppm の 3 用量を設定し、毒性発現の認められなかった 2, 6-DAT は、2, 4-DAT の最高用量と同じ 500 ppm を設定し、3 ヶ月間の混餌投与を行った。

B-12 フローサイトメトリーによる *in vivo* 小核試験のバリデーション

7 週齢の雄性 F344 ラットに cyclophosphamide (CP、10 mg/kg、経口)、mitomycin C (MMC、2 mg/kg、腹腔)、colchicine (COL、8 mg/kg、3 日間反復経口) を投与した。骨髓細胞小核試験は、最終投与 24、48 及び 72 時間後に、右大腿骨を摘出し、acridine orange で染色して、幼若赤血球 2000 個中の小核を有する細胞の頻度 (% Micronucleus-Reticulocyte: % MN-RET) を算出した。末梢血小核試験は、最終投与 24、48 及び 72 時間後に、尾静脈より血液採取し、超低温メタノールで固定し、MicroFlow^{PLUS} Kit の方法に従い、抗 CD71 抗体及び抗 CD61 抗体、propidium iodide (PI) と反応させた。フローサイトメーターを用いて、FITC 標識抗 CD71 抗体、PE 標識抗 CD61 抗体及び PI で標識した細胞を検出した。1 サンプルにつき CD71 陽性幼若赤血球 20000 個をカウントし、その中で % MN-RET を算出した。顕微鏡を用いて小核を検索した際には、生理食塩水あるいは CP を投与した 24 時間後に 5 μ L の尾静脈血を採取

し、acridine orange で染色し、蛍光顕微鏡で 1 サンプルあたり 8000 個の幼若赤血球をカウントして % MN-RET を算出した。

(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」に従い、動物実験管理委員会の承認を受けて実施された。ヒト培養細胞ならびに微生物を用いる実験は、倫理面の問題は無いものと判断した。

C. 研究結果

C-1 微生物を用いた高感度・迅速な遺伝毒性試験の構築研究

従来、菌体の破壊に用いてきた 0.1% SDS の代わりに、PopCulture を用いて菌体を破壊し、発色に対する影響を検討した。その結果、PopCulture を用いると、従来は 50-60 分かかっていた発色時間が 10-15 分に短縮できることが明らかになった。また PopCulture の添加量は 5~10 μ L が最適であった (小田)。

C-2 ヒト型高感度 *umu* テスト株のバリデーション

試験した全ての被験物質について、IPTG、 δ -aminolevulinic acid、trace elements を培養開始後 1 時間目に添加する Method 2 の方で、*umuC* 遺伝子の発現がより強く誘導された。また培養の際に用いる平底と深型のプレートによる差異を比較したが、顕著な影響は認められなかった (藤居)。

C-3 ヒト型高感度 *umu* テスト株のキット化

凍結乾燥が菌に及ぼす影響を検討するため、凍結乾燥した菌を復水させた際に半分の量に減らし、培養時間を 1 時間にして検討を行った。条件を合わせる為、 -80°C で凍結した菌体も半分の量に減らして *umu* 試験に供した。その結果、4 菌株とも (OY1002/1A1、/1A2、/1B1、/3A4) とともに、凍結乾燥による悪影響は観察されなかった (持田)。

C-4 ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の実用化

改良法 FAT で陽性結果が得られなかった 13 化合物について、大腸菌 DinB を発現する YG5161 を用いて FAT 試験を行ったところ、2 化合物 (4-nitro-m-phenylenediamine、2, 3-xylydine) について S9 mix 存在下において陽性の結果が得られた。また 9-nitroanthracene については、陽性とはならなかったものの、陰性対照に比べて、明らかな変異 (黄変ウェル数) の増加が認められた (須井)。

C-5 DNA ポリメラーゼ遺伝子の改変による代替毒性試験法の改良に関する研究

KI ヒト細胞については、変異導入部位を PCR で増幅後シーケンス解析を行い、目的とした変異 (198D 199E→198A 199A) が導入されていることを確認した。またウェスタン解析により、野生型細胞と同レベルの hPol κ が発現していることを確認した。K0 細胞については、ウェスタン解析により hPol κ が発現していないことを確認した。Pol κ KI マウスの胸腺、副腎、肝臓、精巣において、野生型マウスと同レベルに Pol κ が発現していることを確認した (能美)。

C-6 ヒト型遺伝毒性試験のリスクアセスメントへの応用

発がん性を示す 2, 4-DAT は、S9 不在下で TK6 細胞に遺伝子突然変異を誘発した。S9 を添加すると細胞毒性はむしろ減弱した。この解毒作用にはラットとヒトの間で顕著な差は観察されなかった。一方、非発がん物質の 2, 6-DAT は、ラット S9 の存在下で、強い細胞毒性と遺伝子突然変異を誘発した。ラット S9 に比べヒト S9 の影響は小さく、ヒト S9 を加えると S9 不在下と同様、弱い細胞毒性と遺伝子突然変異の誘発が観察された (本間)。

C-7 ヒト型遺伝毒性試験における遺伝子多型を考慮したリスクアセスメント

自社化合物 6 種について CHL/IU チャイニーズハムスター細胞を用いる *in vitro* 小核試験と染色体異常試験を実施し、その結果を比較した。6 化合物のうち 4 化合物は両試験において陽性となり、2 化合物はいずれの試験においても陰性となった。以上の結果から、*in vitro* 小核試験が染色体異常試験の代替法として有用であることが示された。また、従来の 6 ウェルプレート代わりにチャンバースライドを用いて行う小核試験も、染色体異常試験の代替法として有用であることが明らかになった (高崎)。

C-8 遺伝毒性試験に使用される細胞株の感受性に関する研究

MeIQx の遺伝毒性にラット S9 とヒト S9 の間で差が見られるかを検討した。いずれの S9 を用いても MeIQx のヒト WTK-1 細胞に対する突然変異誘発性は低く (陰性対照値の 2 倍を若干超える程度) また *in vitro* 小核試験も陰性であった。代謝拮抗剤に対する感受性を比較すると、methotrexate に対する小核誘発の感受性は WTK1 細胞が最も高く、次いでヒト TK6、マウスリンフォーマの順であった。6-mercaptopurine に対する感受性も WTK-1 が最も高かった (岡)。

C-9 遺伝子導入哺乳類細胞を用いた遺伝毒性スクリーニング法の開発

Cre 蛋白質の一過的な発現を ES 細胞あるいは受精卵の前核で行うことにより、loxP 配列で囲まれた薬剤耐性遺伝子を除去することに成功した。Pol κ の 198D と 199E がいずれもアラニンに置換したヘテロ KI マウスを交配してホモ KI マウスを得た。ホモ KI マウスと *gpt delta* マウスを掛け合わせるによりダブル TG マウスを作出した (三島)。

C-10 *gpt delta* マウスを用いた環境化学物質

の発がん機序解明へのアプローチ

F344系の *gpt delta* ラットに 2,4-DAT、2,6-DAT を 13 週間混餌投与した。2,4-DAT の 500 ppm 投与群では第 1 週より試験終了まで有意な体重増加抑制が認められた。2,4-DAT の 500 ppm 投与群では第 8 週に体重が減少に転じたため、第 9 週より投与用量を 400 ppm に減じて試験を継続した(西川)。

C-11 遺伝毒性評価用トランスジェニックラットのバリデーション

2,4-DAT、2,6-DAT の 13 週間混餌投与試験(上記参照)の用量設定試験として、4 週間混餌投与試験を行った。2,4-DAT では 1000 ppm で死亡例および中程度の摂餌量の減少がみられ、300 ppm で軽度な肝傷害が観察されたことから、500 ppm を最高用量とし、以下 250、125 ppm を用量として設定した。2,6-DAT の 1500 ppm は中程度の摂餌量の減少がみられた。2,6-DAT の用量は、2,4-DAT の対照物質であることをふまえ、2,4-DAT と同用量となる 500 ppm とした(林)。

C-12 フローサイトメトリーによる *in vivo* 小核試験のバリデーション

ラットに CP 及び MMC をそれぞれ経口及び腹腔内単回投与し、骨髓細胞及び末梢血を用いる小核試験を実施した。自然小核誘発頻度は、骨髓細胞では 0.13 ± 0.03 % (平均値±標準偏差)であったのに対し、末梢血では 0.09 ± 0.01 % であった。いずれの化合物においても、骨髓細胞では 24 時間をピークとした小核の誘発が認められたのに対し、末梢血を用いた場合は、48 時間をピークとした小核の誘発が認められた。COL では、72 時間後をピークとする有意な小核の誘発が認められた。フローサイトメーターでの測定成績と顕微鏡下で観察した成績を比較したが、フローサイトメーター測定で得られた値は、顕微鏡観察に比べて若干高い傾向を示した(真田)。

D. 考察

医薬品の安全性評価には実験動物が用いられてきたが、近年、動物愛護に対する関心の高まりを受けて、*in vitro* (培養細胞) で毒性試験を代替(Replacement)する手法の確立が求められている。また、動物を用いる際にも、動物数の削減(Reduction)と、同一の個体からより多くの有用情報を得ること(Refinement)が求められている。だが、動物を用いた試験結果の全てを、培養細胞で代替できるかについては議論も多く、医薬品の安全性を考える上で代替毒性試験法の評価が重要な課題になりつつある。また、動物数の削減、有用情報の取得を可能にするためには、新しい実験動物の作出とそのバリデーションが必要である。

本研究班では、班全体を 3 つのグループに分け、第一グループではヒト遺伝子を導入した微生物遺伝毒性試験の開発と普及をめざし(小田、藤居、持田、須井)、第二グループでは遺伝毒性試験用のヒト細胞の遺伝的改良およびヒト由来の S9 の代謝活性化能の検討を行い(能美、本間、高崎、岡)、第三グループでは *gpt delta* トランスジェニックラットのバリデーションと Pol κ の活性を KI により不活化した *gpt delta* トランスジェニックマウスの作出を行った(三島、西川、林、真田)。

第一グループでは、各種のヒト薬物代謝酵素 CYP を発現させる *umu* 試験系を確立し、今年度は更なる迅速化とキット化を進め、4 菌株について凍結乾燥を行っても変異感度に影響が無いことを確認した。*umu* 試験は、一日で試験を済ませることができ、データベースも比較的豊富であることから、ハイ・スループット試験として有用である。また、遺伝毒性試験の中で最も汎用されている Ames 試験のスループット性を高めた FAT 試験菌株に新しい DNA ポリメラーゼ DinB を発現させることで、検出効率が上昇することを明らかにした。今後は、ヒトの DNA ポリメラーゼ遺伝子を導入・発現することで、ハ

イ・スループット化とヒト化を同時に進める予定である。

第二グループでは、DNA 損傷の乗り越えに関わる Pol κ を KI および KO 法で不活化したヒト細胞株を樹立した。Pol κ は benzo[a]pyrene 等による DNA 損傷の乗り越えに関与していることが示唆されており、多環芳香族炭化水素による変異作用に高い感受性を示すことが期待される。Pol κ は、細胞内で他の蛋白質と相互作用していることが報告されており、KO により発現を止めると、蛋白質間相互作用に影響を与えて、二次的な作用により細胞の感受性が修飾される可能性が考えられた。このため、活性を失った蛋白質を発現する KI 細胞を樹立した。今後は、KO および KI 細胞の変異原に対する感受性を比較する。

また第二グループでは、ヒト由来の S9 とラット由来の S9 について代謝活性化能を比較した。2,4-DAT、MeIQx については、両者の間には顕著な差は観察されなかったが、2,6-DAT についてはラットがより高い代謝活性可能を示した。今後は、代謝物の同定、定量を行い、ヒト S9 の有効性について検討を行う。さらに、従来、汎用されてきた染色体異常試験と *in vitro* 小核試験の結果を比較し、後者が前者を代替しうる結果を得た。

第三グループでは、*gpt delta* トランスジェニックラットのバリデーションを開始し、第二グループで遺伝毒性を比較している 2,4-DAT (発がん物質) と 2,6-DAT (非発がん物質) の *in vivo* における遺伝毒性の検討を進めている。トランスジェニック遺伝毒性試験では、これまでに 100 種類の発がん物質について試験が行われ、約 80% の確率で陽性結果を得ることができると報告されているが、非発がん物質については 10 あまりの化合物しか試験されておらず、非発がん物質を陰性と判定することができるかに感心が集まっている。こうした意味で、今回の 2,4-DAT と 2,6-DAT の遺伝毒性の比較結果は重

要である。トランスジェニック遺伝毒性試験では、発がんの標的臓器において遺伝毒性を検索することができ、発がん過程に遺伝子変異が関与しているかを直接検討することができる。*gpt delta* ラットは、主任研究者と明治製菓が共同で作出したものであり、今回用いた F344 以外に S.D. を背景としたトランスジェニックも作出されている。今年度は 2,4-DAT と 2,6-DAT を 13 週間混餌投与するための予備試験と本試験を行った。また、ラットを用いる小核試験の条件検討を進め、良好な結果を得た。*gpt delta* ラットを用いて、遺伝子突然変異と小核誘発を同一個体で観察できるようにすることで、動物数の削減をはかる。

この他に第三グループでは、Pol κ を KI 法により不活化した *gpt delta* トランスジェニックマウスを作出した。KI マウスと KI ヒト細胞 (第二グループ) の結果を比較することで、マウスおよびヒト細胞の有用性と限界を明らかにする。

以上のごとく、本研究班では、各グループがそれぞれのモデル生物 (微生物、ヒト細胞、マウス・ラット) を用いながら、同一の化合物あるいは同一の遺伝子に着目して研究することにより、それぞれの試験系の有用性に検討を加え、ヒトに対するリスク評価に貢献する代替法試験を確立することをめざしている。

E. 結論

遺伝毒性分野における代替法の確立を目的に、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、ヒト細胞の遺伝的改良とヒト由来の S9 の代謝活性可能を検討した。さらに、発がん性と遺伝毒性の相関を検討するためのトランスジェニックラットのバリデーションを進め、ヒト細胞にて不活化させた Pol κ を KI 法で不活化させたトランスジェニック遺伝毒性試験系を樹立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M. and Honma, M. Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases, *J. Mol. Biol.*, in press.
- 2) Nohmi, T., Yamada, M. and Gruz, P. DNA repair and DNA damage tolerance in archaeal bacteria: extreme environments and genome integrity, in *Archaea: new models for prokaryotic biology*, Horizon Scientific Press. in press.
- 3) Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)
- 4) Hidaka, K., Yamada, M., Kamiya, H., Masutani, C., Harashima, H., Hanaoka, F. and Nohmi, T. Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase η , *DNA Repair*, 7, 497-506 (2008)
- 5) Yamauchi, K., Kakinuma, S., Sudo, S., Kito, S., Oota, Y., Nohmi, T., Masumura, K., Nishimura, M. and Shimada, Y. Differential effects of low- and high-dose X-rays on N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutagenesis in thymocytes of B6C3F1 *gpt*-delta mice, *Mutat. Res.*, 640: 27-37 (2008)
- 6) Oda, Y., Watanabe, T., Yamazaki, H. and Hirayama, T. Genotoxic activation of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone by human cytochrome P450 enzymes expressed in *Salmonella typhimurium umu* tester strains, *Genes and Environ.*, 29: 146-152, (2007)
- 7) Hashimoto, A.H., Amanuma, K., Hiyoshi, K., Sugawara, Y., Goto, S., Yanagisawa, R., Takano, H., Masumura, K., Nohmi, T. and Aoki, Y. Mutations in the lungs of *gpt* delta transgenic mice following inhalation of diesel exhaust, *Environ. Mol. Mutagen.*, 48: 682-693 (2007)
- 8) Umemura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Ishii, Y., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Nishikawa, A. and Hirose, M. Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and in vivo mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using *gpt* delta mice, *Mutat. Res.*, 633: 46-54 (2007)
- 9) Aoki, Y., Hashimoto, A.H., Akanuma, K., Matsumoto, M., Hiyoshi, K., Takano, H., Masumura, K., Itoh, K., Nohmi, T. and Yamamoto, M. Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient *gpt* delta mice, *Cancer Res.*, 67: 5643-5648 (2007)
- 10) Takeiri, A., Mishima, M., Tanaka, K., Shioda, A., Hrada, A., Masumura, K. and Nohmi, T. Mutation spectra in cisplatin- and transplatin-treated GDL1 cells clarified the different mode of action of these compounds in mammalian cells, *Genes and Environ.*, 29: 89-99 (2007)
- 11) Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Masutani, C., Xu, Y., Usui, Y., Sugiyama, H., Harashima, H., Hanaoka, F. and Nohmi, T. Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase η , *Biochem.*, 46: 5515-5522 (2007)
- 12) Barone, F., McCullouch, S.D., McPherson, P., Maga, G., Yamada, M., Nohmi, T., Minoprio, A., Mazzei, F., Kunkel, T.A., Karran, P. and Bignami, M. Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA substrates and recognition by human MutSalpha, *DNA Repair*, 6: 355-366 (2007)
- 13) De Felice, M., Medagli, B., Esposito, L., De Falco, M., Pucci, B., Rossi, M., Gruz, P., Nohmi, T. and Pisani, F.M. Biochemical evidence of a physical interaction between *Sulfolobus solfataricus* B-family and Y-family DNA polymerases, *Extremophiles*, 11: 277-282 (2007)

- 14) Xu, A., Smilenovl, L. B., He, P., Masumura, K., Nohmi, T., Yu, Z. and Hei, T.K. New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in *gpt* delta transgenic, Environ. Health Perspective, 115: 87-92 (2007)
- 15) Ikeda, M., Masumura, K., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K., Hayata, I. and Nohmi, T. Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of *gpt* delta transgenic mice, Mutat. Res., 626: 15-25 (2007)
- 16) Kuroiwa, Y., Umemura, T., Nishikawa, A., Kanki, K., Ishii, Y., Kodama, T., Masumura, K., Nohmi, T. and Hirose, M. Lack of in vivo mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice, Arch. Toxicol., 81: 63-69 (2007)
- 17) Tweats, D. J., Blakey, D., Heflich, R. H., Jacobs, A., Jacobsen, S. D., Morita, T., Nohmi, T., O'donovan, M. R., Sasaki, Y. F., Sofuni, T. and Tice, R. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards, Mutat. Res., 627: 78-91 (2007)
- 18) Tweats, D. J., Blakey, D., Heflich, R. H., Jacobs, A., Jacobsen, S. D., Morita, T., Nohmi, T., O'donovan, M. R., Sasaki, Y. F., Sofuni, T. and Tice, R. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test, Mutat. Res. 627: 92-105 (2007)
- 19) Nohmi, T. Novel DNA polymerases and novel genotoxicity assays, Genes and Environ., 29: 75-88 (2007)
- 20) Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup Mutat. Res., 627: 31-35 (2007)
- 21) Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O' Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. Mutat. Res., 627: 36-40 (2007)
- 22) Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing- Metabolic considerations Mutat. Res., 627: 59-77 (2007)
- 23) Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3' -Azido-3' -deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. Environ. Mol. Mutagen., 48: 248-257 (2007)
- 24) Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. DNA Repair, 6: 781-188 (2007)
- 25) Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. Mutat. Res., 619: 113-123 (2007)
- 26) Newwirth, E., Honma, M., and Grosovsky, A., Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts. Mol. Cell. Biol., 27: 5261-5274 (2007)

27) Yatagai, F, Umebayashi, Y., Suzuki, M., Abe, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M, and Honma, M. Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing radiation on mutation induction in human cells. *Advan. Space Res.*, 40: 470-473 (2007)

2. 学会発表

- 1) Nohmi, T. Validity of *gpt* delta transgenic rodent genotoxicity assays, 47th Annual Meeting of Society of Toxicology in Seattle, USA, March 2008.
- 2) Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H., and Hayashi M. Inter-allelic homologous recombination and target integration induced by DNA double strand break Key Stone Symposium” DNA Repair and Recombination” (2008, 2)
- 3) Nohmi, T. Development of in vivo genotoxicity assays with transgenic mice and rats, International Symposium on the Predictive, Preventive and Mechanistic Mutagenesis & XXXIII EMSI Annual Meeting in Aligarh, India, January 2008.
- 4) Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Hayashi M.: Genotoxic Responses by Live Cell Imaging Analysis International Conference on Toxic Exposure Related Biomarker, Genome and Health Effects (2008, 1)
- 5) Ikeda, M., Masumura, K., Matsui, K., Kohno, H., Sakuma, K., Tanaka, T., Kamataki, T. and Nohmi, T. Chemopreventive effects of nobiletin, a citrus constituent, against the genotoxicity of NNK, a tobacco-specific nitrosamine, in the lung of *gpt* delta transgenic mice, The 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA-2007) in Jeju island, Korea, December 2007.
- 6) 村田香織、森山英樹、高島良生、本間正充、岡茂範、杉本憲治：マルチカラーライブセルイメージングにより明らかとなった

Aurora-Bキナーゼ阻害剤VX-680の染色体分配ダイナミズムに及ぼす影響 第30回日本分子生物学会年会(2007, 12)

- 7) 清水雅富, P. Gruz, 藤井慎吾, 紙谷浩之, 徐岩, 碓井之雄, 杉山弘, 原島秀吉, R.P. Fuchs, 能美健彦, 大腸菌DNAポリメラーゼ IIIによる酸化的損傷ヌクレオチドの取り込み, 第30回日本分子生物学会, 第80回日本生化学会合同大会(2007, 12)
- 8) 新見直子, 佐々 彰, 片渕 淳, ピーター グルーズ, 能美健彦, ヒトDNAポリメラーゼ κ の損傷DNAに対する親和性と伸長反応の解析, 第30回日本分子生物学会, 第80回日本生化学会合同大会(2007, 12)
- 9) Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Yamauchi, K., Imaoka, T., Shang, Y., Nohmi, T., Kawaguchi, I. and Doi, M. Dose dependency of combined effects of ionizing radiation and other agents on cancer induction, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation in Tokyo, Japan, November 2007.
- 10) Ikeda, M., Masumura, K., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K., Hayata, I. and Nohmi, T. Suppression of radiation-induced large deletions by combined treatments with a tobacco-specific nitrosamine in the lung of *gpt* delta transgenic mice, New Nuclear Research Symposium, Biological Responses to Low Dose Radiation in Tokyo, Japan, November 2007.
- 11) Matsumoto, M., Amanuma, K., Hashimoto, A.H., Sakashita, Y., Yanagisawa, R., Takano, H., Masumura, K., Nohmi, T., Wakabayashi, K., Watanabe, T. and Aoki, Y. in vivo mutations by 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene instilled into the lung of *gpt* delta transgenic mice, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 12) Sakamoto, Y., Ikeda, M., Masumura, K., Asami, Y., Tsukamoto, T., Ikehata, H., Kuroiwa, Y., Umemura, T., Nishikawa, A., Tatematsu, M., Ono, T. and Nohmi, T.

- Antigenotoxic effects of p53 on UVB-induced and spontaneous deletions in the murine epidermis, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 13) Niimi, N. and Nohmi, T. Generation and characterization of human cells knocked-in and knocked-out of DNA polymerase kappa, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 14) Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi, T., Hayashi, M. and Honma, M. Translesion synthesis past 2' -deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase eta and kappa, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 15) Gruz, P., Matsui, K. and Nohmi, T. Effects of human Y-family DNA polymerases expressed in the enterobacterial mutagenicity tester strains, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 16) Yamada, M., Matui, K. and Nohmi, T. Novel *Salmonella* strains highly sensitive to mutagens that cause oxidized pyrimidines in DNA, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 17) Masumura, K., Ikeda, M., Matsui, K., Tanaka, T. and Nohmi, T. Chemopreventive effects of nobiletin against genotoxicity induced by NNK in the lung of *gpt* delta transgenic mice, 1st Asian Conference on Environmental Mutagens (1st ACEM)/ 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (36th JEMS), November 2007.
- 18) 山内一己, 柿沼志津子, 須藤聡美, 太田有紀, 鬼頭誠司, 増村健一, 能美健彦, 西村まゆみ, 島田義也, *gpt*-deltaマウスを用いた複合曝露胸腺細胞における欠失変異の解析, 日本放射線影響学会第50回大会(2007, 11)
- 19) 安井学, 小山直己, 高島良生, 小泉朋子, 櫻庭真弓, 坂本浩子, 杉本憲治, 林 真, 本間正充: ライブセルイメージングを用いた γ 線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第47回大会 (2007, 11)
- 20) 本間正充, 櫻庭真弓, 林 真: DNAマイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本放射線影響学会第47回大会(2007, 11)
- 21) 谷田貝文夫, 鈴木雅雄, 本間正充: 低線量・低線量率 γ 線照射によるヒトリンパ芽球細胞での変異誘発 日本放射線影響学会第47回大会 (2007, 11)
- 22) Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinoshita N., Matsuda T, Hayashi M., and Honma M: Genotoxicity of acryamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 23) Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., and Honma M.: Translesion synthesis past 2' -deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase η and κ . 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)
- 24) Yatagai F., Matsumoto H., Honma M.: A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007, 11)