

P-093

Further improvement of high-throughput fluctuation Ames test (Part VIII)

Hajime Sui¹, Kumiko Kawakami¹, Saki Negishi¹, Masami Yamada²¹Hatano Research Institute, FDSC, ²National Institute of Health Sciences

We have improved a fluctuation Ames test (FAT) using a 384-well microplate, and the improved FAT is more sensitive than the conventional method (Sui *et al.*, Genes and Environ., 31, 47-55, 2009). High correlation (i.e., negative specificity: 100%, sensitivity: 71.4% and concordance: 80.0%) was observed between the results of the improved FAT and the Ames test using 40 National Toxicology Program compounds with TA100 and TA98. Then, we reported that the higher sensitivity was observed in the improved FAT without S9 mix (AF-2 and 4NQO) by using one-tenth of the conventional bacterial cell number, and more than one revertant per well is necessary for yellow discoloration of the mixture in the 39th and 40th JEMS annual meeting. Based on these results, we focused on the bacterial cell number, and evaluated the test condition of the improved FAT by using mutagens (ENNG, 2AB, 2AAF, CP etc.) and the NTP compounds which showed positive in the Ames test, but negative in the improved FAT. We will report these results in the meeting.

This study was partly supported by a Grant-in-Aid for Research on Public-private sector joint research on Publicly Essential Drugs from The Japan Health Sciences Foundation.

P-094

Involvement of human sulfotransferase in the genotoxic activation of N-OH-aristolactam compounds using SOS μ mu test systemYoshiharu Okuno¹, Viktoriya Sidokenko², Sivaprasad Attaluri², Francis Johnson², Arthur P. Grollman², Yoshimitsu Oda³¹Department of Material Science and Engineering, Wakayama National College of Technology, ²Department of Pharmacological Sciences, Stony Brook University, ³State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, CA S

Aristolochic acid (AA) is a potent nephrotoxin and human carcinogen. We investigated whether N-OH-aristolactam compounds (AAI-NOH and AAI-NOH), which are produced by nitroreduction of AA, can cause genotoxicity through a sulfation pathway using human sulfotransferase (SULT)-expressing μ mu test strains. AAI-NOH showed the increased genotoxicity in μ mu strains express human SULT1A1 (NM7001) and SULT1A2 (NM7002) compared to the parent strain, whereas AAI-NOH showed enhanced genotoxicity in NM7002. The specific inhibitor, 2,6-dichloro-4-nitrophenol inhibited μ muC gene expression induced by AAI/II-NOH in NM7002. Additionally, in ³²P-postlabelling methods, these compounds formed DNA adducts. These results suggest that the genotoxicity of N-OH-aristolactam compounds is highly dependent on sulfonylation catalyzed by SULTs.

ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討8

須井 哉¹, 川上 久美子¹, 根岸 沙記¹, 山田 雅巳²¹(財)食品薬品安全センター-秦野研究所, ²国立医薬品食品衛生研究所

我々は、384ウェルマイクロプレートを用いるFluctuation Ames Test (FAT) に改良を加えて、感受性を向上させた(改良法FAT, Sui *et al.*, Genes and Environ., 31, 47-55, 2009)。また、40種のNational Toxicology Program選定化合物を用い、TA100およびTA98を用いた改良法FATとAmes試験の結果に、高い相関性(特異性: 100%、感受性: 71.4%、予測性: 80.0%)が認められることを明らかにした。その後、改良法FATについては、従来の1/10量の菌数を用いることにより、S9 mix非存在下 (AF-2および4NQO) では陽性反応の向上が認められたこと、黄変ウェル出現には、1ウェル当たりの復帰変異菌が複数であることを第39および40回大会において報告した。これらの結果を踏まえ、菌数に着目し、変異原物質 (ENNG、2AB、2AAF、CPなど) およびAmes試験で陽性、改良法で陰性を示したNTP選定化合物を用いて改良法FATの試験条件を検討したので、それらの結果を報告する。

本研究は、ヒューマンサイエンス振興財団による政策創薬マッチング研究事業の一環として行われた。

 μ mu試験系を用いたN-OH-アリストラクタム類の遺伝毒性活性化におけるヒト型硫酸転移酵素の関与奥野 祥治¹, Viktoriya Sidokenko², Sivaprasad Attaluri², Francis Johnson², Arthur P. Grollman², 小田 美光³¹和歌山工業高等専門学校物質工学科, ²Department of Pharmacological Sciences, Stony Brook University, ³中国科学院生态环境研究中心, 環境水質学国家重点實驗室

アリストロキア酸 (AA) は、アリストロキア種のチャイニーズハーブに含まれ、腎毒性およびヒトで発がん性を示すことが知られている。本研究では、AAがニトロ還元酵素によりN-水酸化へ還元されたAAIおよびAAIIのN-水酸化物 (AAI-NOH、AAII-NOH) が硫酸化の経路を介して遺伝毒性を示すかどうかを3種類のヒト型スルフトランスフェラーゼ (SULT) を発現する μ mu試験系および*in vitro*の³²Pポストラベリング法を用いて検討した。 μ mu試験において、AAI-NOHは親株に比べてSULT1A1および1A2発現株、AAII-NOHはSULT1A2発現株において強い遺伝毒性を示した。また、SULTの特異的阻害剤である2,6-dichloro-4-nitrophenolを用いたSULT1A2に対する阻害試験を行なったところ、両化合物の遺伝毒性は抑制された。さらに、これらの化合物は*in vitro*の³²Pポストラベリング法でも有意にDNA付加体を示した。以上の結果から、N-ヒドロキシアリストラクタム化合物は硫酸化を介して遺伝毒性作用を示すことが明らかになった。