

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-524523

(P2012-524523A)

(43) 公表日 平成24年10月18日(2012.10.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2012-501380 (P2012-501380)	(71) 出願人	511232008
(86) (22) 出願日	平成22年3月26日 (2010. 3. 26)		ジェントロニクス・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年11月28日 (2011. 11. 28)		イギリス国, マンチェスター エム13・
(86) 国際出願番号	PCT/GB2010/000581		9エヌティー, グラフトン・ストリート
(87) 国際公開番号	W02010/112821		46, シーティーエフ・ビルディング
(87) 国際公開日	平成22年10月7日 (2010. 10. 7)	(74) 代理人	100099623
(31) 優先権主張番号	0905410.7		弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日	平成21年3月28日 (2009. 3. 28)	(74) 代理人	100096769
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(74) 代理人	100114591
			弁理士 河村 英文
		(74) 代理人	100125380
			弁理士 中村 綾子

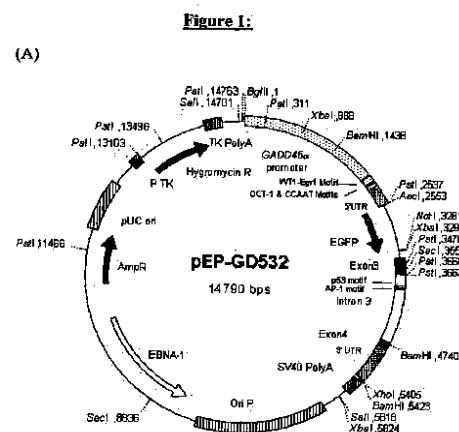
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝毒性試験

## (57) 【要約】

本発明は、DNA損傷を誘導または増強すると推定される物質の存在を検出するための方法であって、(ヒト GADD45 遺伝子プロモーターと、DNA損傷にตอบสนองしてDNA配列の発現を活性化するために配列されたヒト GADD45 遺伝子調節エレメントとに機能的に結合したガウシア・ルシフェラーゼ (GLuc) レポータータンパク質をコードするDNA配列を含有する)細胞を物質に曝露させるステップと、前記細胞からの前記 GLuc レポータータンパク質の発現を測定するステップとを含む方法に関する。本発明はさらに、当該方法によって使用できる発現カセット、ベクターおよび細胞ならびに本発明の方法のアッセイおよび好ましい実施形態において使用できる改変培地にも関する。

(A)



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) レポータータンパク質およびその誘導体をコードする D N A 配列を含む発現カセットであって、前記 D N A 配列は、ゲノム損傷に応答してガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) レポータータンパク質をコードする D N A 配列の発現を活性化するように配列されたヒト G A D D 4 5 遺伝子調節エレメントと、ヒト G A D D 4 5 遺伝子プロモーターとに機能的に連結している発現カセット。

## 【請求項 2】

前記調節エレメントは、前記 G A D D 4 5 遺伝子のエクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、および / もしくはエクソン 4、もしくはそれらの少なくとも 1 つの領域、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の発現カセット。

10

## 【請求項 3】

前記調節エレメントは、前記 G A D D 4 5 遺伝子のエクソン 1 の少なくとも 1 つの領域、前記 G A D D 4 5 遺伝子のエクソン 3 の少なくとも 1 つの領域と、前記 G A D D 4 5 遺伝子のエクソン 4 の少なくとも 1 つの領域とを含む、請求項 2 に記載の発現カセット。

## 【請求項 4】

前記調節エレメントは、前記 G A D D 4 5 遺伝子のイントロン 1、イントロン 2、および / もしくはイントロン 3、もしくはそれらの少なくとも 1 つの領域、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の発現カセット。

20

## 【請求項 5】

前記調節エレメントは、前記 G A D D 4 5 遺伝子のイントロン 3 の少なくとも 1 つの領域を含む、請求項 4 に記載の発現カセット。

## 【請求項 6】

前記調節エレメントは、推定 p 5 3 結合モチーフを含む、請求項 5 に記載の発現カセット。

## 【請求項 7】

前記調節エレメントは、推定 A P - 1 モチーフを含む、請求項 5 または 6 に記載の発現カセット。

30

## 【請求項 8】

前記ゲノム損傷は D N A 損傷である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の発現カセット。

## 【請求項 9】

ガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) をコードする D N A 配列は配列番号 1 の位置 2 6 4 1 ~ 3 1 9 8 に示されたものである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の発現カセット。

## 【請求項 10】

実質的に図 2 に示され、配列番号 2 により提供されている、発現カセット G D 5 3 2 - G L u c。

## 【請求項 11】

40

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の発現カセットを含む組換えベクター。

## 【請求項 12】

実質的に図 2 に示され、配列番号 1 により提供されている、組換えベクター p E P - G D 5 3 2 - G L u c。

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の発現カセットまたは請求項 11 もしくは 12 のいずれか 1 項に記載の組換えベクターを含有する細胞。

## 【請求項 14】

前記細胞は、ヒト細胞である、請求項 13 に記載の細胞。

## 【請求項 15】

50

前記細胞は、完全に機能的な p 5 3 を有するヒト細胞である、請求項 1 4 に記載の細胞。

【請求項 1 6】

前記細胞は、T K 6 ヒト細胞株である、請求項 1 5 に記載の細胞。

【請求項 1 7】

ゲノム損傷を誘導または増強する物質の存在について検出する方法であって、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の細胞を物質に曝露させるステップと、前記細胞からの G L u c レポータータンパク質の発現を測定するステップとを含む方法。

【請求項 1 8】

前記物質は、生体を前記物質に曝露させることが安全かどうかを評価するためにさらにスクリーニングされる、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記物質は、候補薬剤、食品添加物または化粧品である、請求項 1 7 または請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 3 ~ 1 6 に記載の細胞の集団、または請求項 1 1 もしくは 1 2 に記載の組換えベクターによりトランスフェクトされた細胞を調製するステップと、前記細胞を規定時間にわたり前記物質とともにインキュベートするステップと、前記 G L u c レポータータンパク質の発現を前記細胞のサンプルから直接測定するステップとを含む、請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記方法は、S 9 肝抽出物の存在下で実施される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記集団内の細胞密度は、細胞染色を使用して決定される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記細胞染色は、シアニン色素である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記シアニン色素は、チアゾールオレンジである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 G L u c レポータータンパク質の発現は、前記試験化合物への曝露の 4 6 ~ 5 0 時間後に測定される、請求項 1 7 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ゲノム損傷を誘導または増強する物質を検出するための方法、ならびに当該方法において使用できる分子およびトランスフェクト細胞株に関する。詳細には、本発明は、ヒト細胞培養およびその他の哺乳動物細胞株におけるゲノム損傷を検出するためのバイオセンサーに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ゲノム損傷は、様々な物質、例えば紫外線、X 線、フリーラジカル、メチル化剤およびその他の突然変異誘発化合物によって誘導される D N A 損傷を通して発生する可能性がある。ゲノム内の染色体の数は、異数性誘発物質 ( a n e u g e n s ) として公知の化合物によって変化させられることがある。D N A 損傷および / または異数性誘発性は、さらにまた D N A ( ポリメラーゼおよびトポイソメラーゼを包含する ) と相互作用する酵素およびタンパク質に影響を及ぼす物質または原変異原 ( 変異原性になるように代謝され得る物質 ) のいずれかによって間接的に誘導される可能性もある。これらの物質のいずれかは、微生物の遺伝コードを含む D N A に対する損傷を引き起こし、遺伝子内の突然変異を引き起こす可能性がある。動物では、当該の突然変異または染色体数の変化は発がん現象を引き起こすことがある、または配偶子を損傷させて子孫における先天性欠陥を生じさせるこ

10

20

30

40

50

とがある。当該のDNA損傷物質は、集合的に遺伝毒性物質として公知の可能性がある。

【0003】

これらのDNA損傷物質は、DNAを含むヌクレオチドを化学的に修飾し、ヌクレオチドを結合するホスホジエステル結合を破壊する、または塩基間の結び付き（T-AまたはC-G）を崩壊させる可能性がある。その他のゲノム損傷物質は、DNAの構造的成分（例、ヒストン）、核および細胞分割の機序（例、スピンドル形成）、または例えばトポイソメラーゼおよびポリメラーゼなどのゲノム維持系に影響を及ぼす可能性がある。これらのDNA損傷物質の作用に対抗するために、細胞は、多数の機序を進化させてきた。例えば、大腸菌（*E. coli*）におけるSOS応答は、損傷したDNAを修復するDNA修復酵素を包含する一連のタンパク質が発現する、DNA損傷によって誘導されることが明確に特徴付けられた細胞応答である。哺乳動物では、例えばヌクレオチド除去修復および塩基除去修復機序などの系はDNA損傷修復において顕著な役割を果たし、そして巨大なDNA付加物および修飾塩基を除去するための一次機序であるが、他方では非均質な末端結合および均質な組換えは鎖分解の修復において重要である。これらの系の大多数は、細胞分割を通して進行する前に細胞が修復するのを許容するために細胞周期の停止もまた生じさせる。

10

【0004】

どの物質がゲノム損傷を誘導または増強するのかを同定することが重要である極めて多数の状況がある。ヒトをこれらの物質に曝露させるのが安全であるかどうかを判定する場合には、ゲノム損傷を誘導する物質を検出することが特に重要である。例えば、これらの物質を検出する方法は、当該の化合物がゲノム損傷を誘導するか否かを判定するための候補の医薬品、食品添加物または化粧品である化合物をスクリーニングするための遺伝毒性アッセイとして使用できる。または、ゲノム損傷物質を検出する方法は、変異原化合物を含有する汚染物質による上水道の汚染について監視するために使用できる。

20

【0005】

物質の遺伝毒性を決定するために、様々な方法、例えばエームズ（Ames）試験、インビトロ小核試験およびマウスリンパ腫アッセイ（MLA）が公知であるが、多数の理由から不十分である。例えば、サンプルのインキュベーションには数週間を要し、もっと短い時間枠で遺伝毒性データを入手するのが望ましいことが多い。さらに、DNA損傷を検出する多数の公知の方法（エームズ試験および関連方法を包含する）は、誤修復DNA（突然変異および組換え）形態またはフラグメント化DNAの形態にある未修復損傷のいずれかでのエンドポイントとして持続性DNA損傷をアッセイする。しかし、大多数のDNA損傷は、当該のエンドポイントを測定できる前に修復され、持続性DNA損傷は、修復機序が満たされる条件が極めて厳しい場合にのみ発生する。DNA損傷は、正しく修復される、または突然変異が生じるように不正確に修復されることがある。この突然変異エンドポイントは、DNA修復後に測定できる。例えばDNA二本鎖切断などの持続性DNA損傷は、致死性である。

30

【0006】

改良された遺伝毒性試験は、例えば緑色蛍光タンパク質（GFP）などの発光レポータータンパク質をコードするDNA配列に機能的に結合した、DNA損傷に応答して遺伝子発現を活性化する酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）調節エレメントを含む組換えDNA分子に関連する国際特許出願公開第98/44149号明細書に開示されている。当該のDNA分子は、DNA損傷を誘導または増強する物質の存在について検出するための遺伝毒性試験において使用するために、酵母細胞を形質転換させるために使用できる。細胞を物質に曝露させることができ、該細胞由来の発光レポータータンパク質（GFP）の発現は、該物質がDNA損傷を誘導することを示す。国際特許出願公開第98/44149号明細書に記載された遺伝毒性試験は、エンドポイントに到達することを防止できる修復活性の誘導を検出する。このため国際特許出願公開第98/44149号明細書に記載した方法は、DNA損傷物質の存在を検出するために使用できる。

40

50

## 【 0 0 0 7 】

米国特許第 6 , 3 4 4 , 3 2 4 号明細書は、GFP をコードする DNA 配列に結合した、広範囲の細胞ストレス条件に応答して遺伝子発現を活性化するハムスター GADD153 上流プロモーター領域の調節エレメントを含む組換え DNA 分子について開示している。このレポーター系は、ヒト頭頸部扁平細胞癌細胞株内で実施される。しかし、このレポーター系に関連する問題は、続くフローサイトメトリーによる蛍光の分析のためには、10 %未満の細胞生存率を生じさせる試験物質濃度において、少なくとも4日間の処置期間を必要とすることである。さらに、この毒性レベルにある物質で試験した場合には、あらゆる遺伝子誘導の生物学的関連性が検出される。さらに、この開発は、DNA 損傷を誘導または増強する可能性がある物質の存在について詳細に監視する手段は開示しておらず、GADD153 誘導の機序は依然として不明である。そこで、この系は、ヒト DNA 損傷バイオセンサーとしての使用は極めて限定されている。

10

## 【 0 0 0 8 】

国際出願 PCT / GB 2 0 0 5 / 0 0 1 9 1 3 号明細書は、発光タンパク質に結合したヒト GADD45 遺伝子の調節エレメントを含む組換え DNA 分子について開示している。このレポーター系は、遺伝毒性アッセイについての毒性の通常範囲内での遺伝毒性物質の高速ハイスループット検出を可能にする。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 9 】

20

本発明の実施形態の1つの目的は、先行技術に関連する問題を解決すること、およびヒト細胞培養内のゲノム損傷を検出するための改良されたバイオセンサーを提供することである。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

本発明の第1態様によると、ガウシア・ルシフェラーゼ (Gaussia luciferase (GLuc)) レポータータンパク質およびその誘導体をコードする DNA 配列を含む発現カセットであって、該 DNA 配列は、ヒト GADD45 遺伝子プロモーターおよびゲノム損傷に応答してガウシア・ルシフェラーゼ (GLuc) レポータータンパク質をコードする DNA 配列の発現を活性化するように配列されたヒト GADD45 遺 30  
伝子調節エレメントに機能的に連結している発現カセットが提供される。

## 【 0 0 1 1 】

用語「調節エレメント」は、それが結び付いている遺伝子、つまりガウシア・ルシフェラーゼ (GLuc) レポータータンパク質をコードする DNA 配列、の転写を調節する DNA 配列を意味する。

## 【 0 0 1 2 】

用語「機能的に結合した」は、調節エレメントが GLuc レポータータンパク質の発現を誘導できることを意味する。

## 【 0 0 1 3 】

40

本発明の第2態様によると、第1態様による発現カセットを含む組換えベクターが提供される。

## 【 0 0 1 4 】

本発明の第3態様によると、本発明の第2態様による組換えベクターを含有する細胞が提供される。

## 【 0 0 1 5 】

本発明の第4態様によると、ゲノム損傷を誘導または増強する物質の存在について検出する方法であって、本発明の第3態様によって細胞を1つの物質に曝露させるステップと、該細胞からの GLuc レポータータンパク質の発現を監視するステップとを含む方法が提供される。

## 【 0 0 1 6 】

50

本発明の第4態様の方法は、製薬産業および有意な数の物質または化合物を試験する必要がある他の用途において使用するための事前規制スクリーニングアッセイを提供するために使用できる、新規の費用効果的な遺伝毒性スクリーニングを提示する。本方法は、現行のインビトロおよびインビボの哺乳動物遺伝毒性アッセイより高速のスループットおよび少ない化合物消費量を提供し、広範囲の遺伝毒性物質に対して感受性である。

#### 【0017】

本発明の第4態様の方法は、物質がゲノム損傷を誘導する可能性があるか否かを判定するために適している。「ゲノム損傷」には、本発明者らは、ヒストン脱アセチル化阻害剤を包含するDNAの構造的成分（例、ヒストン）、核および細胞分割の機序（例、スピンドル形成）、または例えばトポイソメラーゼおよびポリメラーゼなどのゲノム維持系ならびにDNA修復系に影響を及ぼす物質を包含している。本発明者らはさらに、DNA損傷、例えばヌクレオチドの化学修飾またはヌクレオチドの挿入/欠失/置換；ならびに染色体数の変化、およびDNA合成を包含している。好ましくは、本発明者らは、「ゲノム損傷」がDNA損傷を意味すると考える。

10

#### 【0018】

ヒトをゲノム損傷物質に曝露させるのが安全であるかどうかを判定する場合にゲノム損傷を誘導する物質を検出することは特に有用である。例えば、本方法は、公知の物質、例えば候補の医薬品、製薬用および工業用化学物質、殺虫剤、殺菌剤、食料品または化粧品がゲノム損傷を誘導するか否かをスクリーニングするための遺伝毒性アッセイとして使用できる。または、本発明の方法は、ゲノム損傷物質を含有する汚染物質で上水道、浸出液および廃液の汚染について監視するために使用できる。

20

#### 【0019】

国際出願PCT/GB2005/001913号明細書に記載された現行の遺伝毒性アッセイは、発光タンパク質であるGFPに結合したヒトGADD45 遺伝子の調節エレメントを含む組換えDNA分子を使用する。その系は、蛍光分光法を使用する遺伝毒性アッセイについての毒性の通常範囲内での遺伝毒性物質の高速ハイスループット検出を可能にする。

#### 【0020】

本発明者らは、レポータータンパク質を生物発光によって検出できるまた別の遺伝毒性アッセイを開発することを決意した。レポータータンパク質の発現をアッセイするために蛍光ではなく生物発光を使用することは、数多くの利点を有する。第1に、それ自体が蛍光性である試験化合物は、蛍光レポータータンパク質の発現の検出に影響を及ぼす可能性がある。これは、生物発光レポータータンパク質が使用される場合は、試験化合物が蛍光性であることはたとえあっても極めてまれであるので、問題とはならないと思われる。そこで、生物発光の使用は、アッセイにおいて蛍光化合物および試薬によって誘導される干渉を制限するので、これはより広い範囲の試験化合物をアッセイできることを意味する。さらに、本アッセイにおいて使用される試験化合物が蛍光性であることは極めてまれであるので、これは発光性レポータータンパク質を使用する遺伝毒性アッセイにコントロール反応を包含する必要が低いことを意味する。そこで、極めて多数の試験化合物を並行してアッセイすることができる。さらに、破壊または変異した発光レポータータンパク質を使用するコントロール反応を包含することも不必要である。

30

40

#### 【0021】

ルシフェラーゼ類は、生体において光生成化学反応を触媒する一連の酵素である。ルシフェラーゼ類は、生物発光レポータータンパク質の一例である。それらの発現は、発光読取りが可能な適切なマイクロプレートリーダーを使用して監視することができる。マイクロプレートリーダーは、生物発光に基づくアッセイにおいて使用できる。

#### 【0022】

生物発光は、様々な微生物において進化した化学発光の形態である。別個の進化史を通して引き出される多数の別個のクラスの生物発光が存在する。これらのクラスは、それらの化学的特性において広汎に相違するが、それでもそれらは類似の化学反応、つまりジオ

50

キセタン構造の形成および破壊に曝される。これらのクラスは全部が、酵素ルシフェラーゼの発光基質ルシフェリンとの相互作用に基づいている。

【0023】

ルシフェラーゼ遺伝子は、細菌、昆虫（例、ホタルおよびコメツキムシ）、*Renilla*（ウミシイタケ）、*Aequorea*（オワンクラゲ）、*Vargula*（ウミホタル）および*Gonyaulax*（渦鞭毛藻類）、ならびに甲殻類を包含する極めて広範囲の様々な生物からクローン化されてきた。現在では、生物発光アッセイにおいて使用するために利用できる極めて多様なルシフェラーゼ酵素が存在する。

【0024】

本発明者らは、遺伝毒性アッセイにおいてGFPに対する2つの相違するルシフェラーゼの特性を比較することを決定した。本発明者らは、いずれのルシフェラーゼが遺伝毒性アッセイにおいて生物発光レポータータンパク質として使用するために最も適合するかを決定しようと考えた。本発明者らは、これまで最も一般的に使用される生物発光レポータータンパク質であるホタル（*Firefly*）ルシフェラーゼ（*FLuc*）を用いて研究することを選択した。さらに、カラヌス目カイアシ（*calanoid copepod*）であり、生物発光アッセイにおけるレポータータンパク質として一般には使用されない*Gaussia*から単離されたガウシア・ルシフェラーゼ（*Gaussia luciferase*（*GLuc*））の特性について試験することも選択した。

【0025】

驚くべきことに、本発明者らは、遺伝毒性アッセイにおいて使用した場合のガウシア・ルシフェラーゼ（*GLuc*）の多数の有益な特性を確認した。GADD45 遺伝エレメントと結合すると、*GLuc*は細胞内のゲノム修復活性のシグナルとして蓄積し、細胞が死滅した後でさえ存続する。さらに*GLuc*は、ゲノム修復が完了すると測定可能なレポータータンパク質として存続する。これとは対照的に、*FLuc*は、レポーターシグナルとしては*GLuc*ほど長くは存続しない。これらの相違は、*GLuc*を使用する遺伝毒性アッセイは試験化合物の遺伝毒性を測定するために単一サンプリング時点を用いて実施できるが、これは*FLuc*を用いると可能ではないことを意味している。これらの利点は、主として、*FLuc*が短い半減期を備える不安定タンパク質であると言う事実に起因する。遺伝毒性アッセイにおいてレポータータンパク質として*FLuc*ではなくむしろ*GLuc*を使用するというこれらの利点は公知ではなく、本発明者らによって実施された研究の前には予測することができなかった。実際に、本発明までは、*GLuc*は遺伝毒性アッセイのためのレポータータンパク質としては使用されていなかった。

【0026】

さらに、*GLuc*タンパク質は、細胞から分泌されるが、*FLuc*タンパク質は分泌されない。そこで*FLuc*が遺伝毒性アッセイにおいてレポータータンパク質として使用される場合は、*FLuc*を備える細胞は、*FLuc*発現レベルを正確に測定するためには溶解させられなければならない。これとは対照的に、*GLuc*タンパク質は細胞から分泌されるが、これは、以下の遺伝毒性アッセイ法においてレポータータンパク質として使用される場合、*GLuc*を備える細胞は通常は*GLuc*発現レベルをアッセイするために溶解させる必要がないことを意味する。このため、レポータータンパク質としての*FLuc*ではなくむしろ*GLuc*の使用は、試薬添加ステップおよびインキュベーションステップを該アッセイ法から省いて、細胞を溶解させる必要がないことを意味する。

【0027】

これらの所見に基づいて、本発明者らは、ガウシア・ルシフェラーゼ（*GLuc*）発現がGADD45 遺伝エレメントによって調節される遺伝毒性アッセイを開発した。本アッセイは、*FLuc*に基づく現行の遺伝毒性アッセイおよび生物発光アッセイより優れた改良点を有する。本アッセイは、蛍光性試験化合物の遺伝毒性を測定するために使用できる。本アッセイにおいては蛍光化合物および試薬によって干渉はほとんど誘導されない。*GLuc*の使用は、本アッセイが、試験化合物の遺伝毒性の尺度を得るために単一サンプリング時点を用いて実施できることを意味する。

10

20

30

40

50

## 【0028】

さらに、本発明の方法の遺伝毒性アッセイにおいて使用した場合、G L u c 媒介性生物発光は、添付の実施例において証明したように、予想外に高い「シグナル対ノイズ」比を有する。この改良された比率によって、本発明者らは、蛍光に基づくアッセイよりも容易に使用できる、より少ない量のアッセイ液を使用する生物発光に基づく遺伝毒性アッセイを開発することができた。直接的な結果として、G L u c 媒介性生物発光を使用する遺伝毒性アッセイは、384 ウェルマイクロタイタープレートを使用して実施できる。これとは対照的に、類似の蛍光に基づくレポーターアッセイのために384 ウェルマイクロタイタープレートを使用するのは困難であるが、それはアッセイ液の量の減少は細胞数の減少を意味し、その結果として不良な「シグナル対ノイズ」比を意味するからである。

10

## 【0029】

このため、本発明の方法の生物発光に基づく遺伝毒性アッセイは、蛍光に基づくアッセイを用いた場合より高速のスループットスクリーニング系において容易に使用することができる。これは、本アッセイをより少数の試験化合物を用いて実施することを可能にすることができ、そしてアッセイマイクロプレート1枚に付きより多くの化合物を試験することを可能にすることができる。

## 【0030】

用語「ガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) レポータータンパク質およびその誘導体」には、発現した場合にルシフェラーゼアッセイによって検出可能な海洋カイアシであるガウシア・プリンケプス (G a u s s i a p r i n c e p s) 由来のタンパク質が含まれる。G L u c タンパク質をコードする核酸配列は、多数の相違する会社、例えば、N a n o l i g h t 社 (w w . n a n o l i g h t . c o m) から市販で入手できる。それらの核酸配列は、現在はアッセイ法におけるレポータータンパク質としては広汎には使用されていない。

20

## 【0031】

好ましくは、ガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) レポータータンパク質は、発光反応：



におけるセレンテラジンの酸化を触媒し、実質的および測定可能な発光の放出を誘導する。

30

## 【0032】

当該タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、多数の様々な入手源、例えば G e n B a n k アクセッション番号 A Y 0 1 5 9 9 3 から入手できる。

## 【0033】

G L u c の誘導体には、発光活性を保持する G L u c のポリペプチドアナログまたはポリペプチドフラグメントをコードする D N A 配列が含まれる。

## 【0034】

「ヒト化」ガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) レポータータンパク質をコードする核酸は、N a n o l i g h t 社 (w w w . n a n o l i g h t . c o m) から入手できるプラスミドから入手することができる。「ヒト化」G L u c 遺伝子の核酸配列は、ヒト細胞株において発現のために最適化されてきた。ガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) をコードする D N A 配列の例は、本明細書の実施例の項の最後で配列番号1の2641~3198の位置に示されている。そこで本発明の好ましい実施形態は、ガウシア・ルシフェラーゼ (G L u c) レポータータンパク質が配列番号1の2641~3198の位置に示したヌクレオチド配列によってコードされる実施形態である。

40

## 【0035】

G L u c は、高い光線量子収率を生成し、A T P を必要とせず、市販で入手可能な照度計によって容易に検出することができる。本発明の第3態様による細胞は、G L u c レポータータンパク質をコードする D N A 分子を含有していて、本発明の第4態様の方法によって使用できる。

50



## 【 0 0 3 6 】

驚くべきことに、本発明の第 1 態様による発現カセット内でのヒト G A D D 4 5 遺伝子プロモーターに加えたヒト G A D D 4 5 遺伝子調節エレメントの使用は、該カセットの遺伝毒性ストレスへの応答、および第 3 態様による細胞内でのゲノム損傷を根本的に増強する。有益にも、該カセットは、試験培養中のレポータータンパク質の活性についてアッセイすることによって、わずか 4 8 時間以内または 4 8 時間後に該レポータータンパク質の発現について分析することができる。細胞は、試験物質または化合物に曝露させることができ、該細胞内のレポータータンパク質の発現は、該試験物質がゲノム損傷を誘導するかどうかを示す。

## 【 0 0 3 7 】

本発明者らは、ヒト G A D D 4 5 遺伝子プロモーターおよびヒト G A D D 4 5 遺伝子調節エレメントをコードする D N A は、本発明の第 1 態様によるカセットを形成するためにレポータータンパク質と機能的に結合させることができること、そして次に本発明による第 4 態様による遺伝毒性試験において有益にも使用できることを見いだした。当該のカセットは、G L u c レポータータンパク質をコードする D N A に機能的に結合していることを前提に G A D D 4 5 遺伝子（コーディング配列を包含する）全体を含むことができる。例えば、本発明の第 1 態様によって、G A D D 4 5 遺伝子（調節エレメントおよびプロモーターを含む）の全部、または実質的に全部を、G A D D 4 5 プロモーターの 3'（例えば、G A D D 4 5 コーディング配列内またはコーディング配列の 3'）末端に挿入され、ゲノム損傷に応答して G L u c レポータータンパク質をコードする D N A 配列の発現を活性化するように配列された G L u c レポーターをコードする D N A とともに含むカセットを作製することができる。

## 【 0 0 3 8 】

好ましくは、ヒト G A D D 4 5 遺伝子プロモーター配列は、R N A ポリメラーゼが D N A 分子に結合し、G L u c レポータータンパク質をコードする D N A の転写を開始することを誘導する。プロモーター配列がヒト G A D D 4 5 遺伝子プロモーター配列および 5' 未翻訳領域を含むことが好ましい。プロモーター配列は、図 1 に例示された p H G 4 5 - H C プラスミドから入手することができる。G A D D 4 5 遺伝子プロモーターのヌクレオチド配列は、実施例の項の最後に配列番号 1 のヌクレオチド 9 7 ~ 2 6 4 0 として示した。プロモーターは塩基 9 7 ~ 2 6 4 0 の各々を含むことができる、またはそれらの機能的誘導体もしくは機能的フラグメントであってよいと理解されている。機能的誘導体または機能的フラグメントは、トランスクリプターゼが推定プロモーター領域に結合し、その後マーカータンパク質の転写を引き起こすか否かを判定して、容易に同定することができる。または当該の機能的誘導体もしくは機能的フラグメントは、G A D D 4 5 遺伝子と自然に関連している場合は G A D D 4 5 プロモーター上で突然変異生成を実施するステップと、G A D D 4 5 発現が発生する可能性があるか否かを評価するステップとによって試験することができる。

## 【 0 0 3 9 】

本発明による発現カセット内の調節エレメントは、G A D D 4 5 遺伝子プロモーター配列の下流で配列を含むことができる。調節エレメントは、機能的 D N A 配列、例えばリボソーム結合のための翻訳開始配列またはゲノム損傷後の遺伝子発現を促進する転写因子に結合する D N A 配列を含むことができる。

## 【 0 0 4 0 】

好ましくは、用語「調節エレメント」は、G A D D 4 5 遺伝子のプロモーター配列を包含しない。用語「調節エレメント」には、G A D D 4 5 遺伝子の遺伝子内配列が包含され

## 【 0 0 4 1 】

本発明による発現カセット内の調節エレメントは、G A D D 4 5 遺伝子の少なくとも 1 つのエクソンを含むことができる。例えば、調節エレメントは、G A D D 4 5 のエクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、および / もしくはエクソン 4、もしくはそれらの少な

10

20

30

40

50

くとも1つの領域、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。そこで、調節エレメントは、G A D D 4 5 遺伝子の4つのエクソン、またはそれらの少なくとも1つの領域の任意の組み合わせを含むことができる。

【0042】

好ましい実施形態では、調節エレメントは、G A D D 4 5 遺伝子のエクソン1の少なくとも1つの領域、および好ましくはG A D D 4 5 遺伝子のエクソン3の少なくとも1つの領域、およびより好ましくは、G A D D 4 5 遺伝子のエクソン4の少なくとも1つの領域を含んでいる。特に好ましいのは、調節エレメントが、G A D D 4 5 遺伝子のエクソン1の全部、および好ましくはG A D D 4 5 遺伝子のエクソン3の少なくとも1つの領域、およびより好ましくは、G A D D 4 5 遺伝子のエクソン4の全部を含んでいることである。

10

【0043】

G A D D 4 5 遺伝子のエクソン3のヌクレオチド配列は、配列番号1の塩基3325～3562として示されている。G A D D 4 5 遺伝子のエクソン4のヌクレオチド配列は、配列表において配列番号1の塩基4636～5311として示されている。

【0044】

または、もしくは追加して、調節エレメントは、非コーディングDNA配列、例えばG A D D 4 5 遺伝子の少なくとも1つのイントロンを含むことができる。例えば、調節エレメントは、G A D D 4 5 遺伝子のイントロン1、イントロン2、および/もしくはイントロン3、もしくはそれらの少なくとも1つの領域、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。そこで、調節エレメントは、G A D D 4 5 遺伝子の3つのイントロン、またはそれらの少なくとも1つの領域の任意の組み合わせを含むことができる。

20

【0045】

好ましい実施形態では、本発明による発現カセット内の調節エレメントは、G A D D 4 5 遺伝子のイントロン3の少なくとも1つの領域を含んでいる。G A D D 4 5 遺伝子のイントロン3のヌクレオチド配列は、配列表において配列番号1の塩基3563～4635として示されている。

【0046】

好ましい実施形態では、本発明による発現カセットは、G A D D 4 5 遺伝子のプロモーター配列と、さらにゲノムG A D D 4 5 遺伝子配列自体のイントロン3内で見いだされる遺伝子調節エレメントもまた含んでいる。本発明者らは任意の仮説によって拘束しようとは望まないが、G A D D 4 5 遺伝子のイントロン3は、推定p53結合モチーフを含有する、および驚くべきことに発現カセットの遺伝毒性ストレスへの応答を増強するのがこのp53モチーフであると考えている。推定p53結合モチーフは、配列表内の配列番号1にヌクレオチド塩基3746～3765として示されている。

30

【0047】

本発明者らは、G A D D 4 5 遺伝子のイントロン3がAP-1結合部位をコードする可能性がある推定TREモチーフを含有する可能性があると考えている。推定TREモチーフは、配列表内の配列番号1にヌクレオチド塩基3795～3801として示されている。そこで、本発明者らは任意の仮説によって拘束しようとは考えないが、この推定AP-1結合部位が遺伝毒性物質に対する改良された応答にも貢献できる可能性があると考えられている。

40

【0048】

発現カセットは、少なくともG A D D 4 5 遺伝子のイントロン3由来のp53結合モチーフおよび/またはAP-1結合モチーフを含むのが好ましい。

【0049】

調節エレメントは、配列番号1の塩基4750～5311として示されているヌクレオチド配列であるG A D D 4 5 遺伝子の3'未翻訳(UTR)領域を含むことができる。本発明者らは、任意の仮説によって拘束しようとは思わないが、この3'UTRがmRNAカセットの安定化に関係する可能性があること、およびそこで例えばイントロン3など

50

の調節エレメントの残りと一緒に使用されると驚くべきことに重要な可能性があると考えている。

【0050】

そこで本発明の第1態様による好ましい発現カセットは、ヒトGADD45 遺伝子調節エレメントおよびガウシア・ルシフェラーゼ (GLuc) レポータータンパク質をコードするDNA配列に機能的に連結したヒトGADD45 遺伝子プロモーターを含んでいる。最も好ましい発現カセットは、ガウシア・ルシフェラーゼ (GLuc) をコードするDNA配列に機能的に結合したヒトGADD45 遺伝子プロモーター、およびGADD45 遺伝子のイントロン3を含んでいる。

【0051】

また別の実施形態では、第1態様による発現カセットは、好ましくは図2に示したGD532-GLucである。発現カセットGD532-GLucのヌクレオチド配列は、配列番号2に与えられ、配列番号1のヌクレオチド位置97~5311に対応する。

【0052】

本発明の第2態様による組換えベクターは、例えば、プラスミド、コスミドまたはファージであってよい。当該の組換えベクターは、発現カセットを複製する場合に極めて有用である。さらに、組換えベクターは、発現カセットを用いて細胞をトランスフェクトするために高度に有用であり、さらにまたレポータータンパク質の発現を促進することもできる。

【0053】

組換えベクターは、該ベクターが細胞の細胞質ゾル内で自律的に複製するように、またはゲノム内に統合するために使用できるように設計できる。この場合には、DNA複製を誘導するエレメントが組換えベクター内に必要とされることがある。適切なエレメントは当技術分野において周知であり、例えば、pCEP4 (Invitrogen社、3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, PA4 9RF、英国)、pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech UK社、21 In Between Towns Road, Cowley, Oxford, OX4 4LY、英国)、またはpCIおよびpSI (Promega UK社、Delta house, Chilworth Science Park, Southampton SO16 7NS、英国)に由来してよい。

【0054】

当該複製ベクターは、形質転換体内でDNA分子の複数のコピーを生じさせることができ、このためGLucレポータータンパク質の過剰発現（およびそれにより増加した発光）が必要とされる場合に有用である。さらに、該ベクターはヒト、霊長類および/またはイヌ細胞内で複製できることが好ましい。該ベクターは、複製起源、および好ましくは少なくとも1つの選択可能なマーカーを含むことが好ましい。選択可能なマーカーは、抗生物質、例えばハイグロマイシンまたはネオマイシンに耐性を付与することができる。適切なエレメントは、pCEP4プラスミド (Invitrogen社、3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, PA4 9RF、英国)に由来する。

【0055】

第1実施形態では、第2態様による組換えベクターは、図2に例示されたように、および配列番号1に提供されたように、好ましくはpEP-GD532-GLucである。

【0056】

本発明の第3態様によると、本発明の発現カセットまたは組換えベクターは、細胞内に組み込まれる。細胞は真核細胞であるのが好ましい。当該の宿主細胞は、哺乳動物由来細胞および細胞株であってよい。好ましい哺乳動物細胞には、ヒト、霊長類、マウスまたはイヌ細胞が包含される。宿主細胞は、リンパ腫細胞または細胞株、例えばマウスリンパ腫細胞であってよい。宿主細胞は、不死化された、例えばリンパ球であってよい。

【0057】

好ましい宿主細胞は、ヒト細胞株である。好ましくは、宿主細胞は、完全に機能的な p53 を有するヒト株、例えば ML-1 (野生型 p53 を備えるヒト骨髄性白血病細胞株; ECACC アクセション番号 88113007)、TK6 (野生型 p53 を備えるヒトリンパ芽球様細胞株; ECACC アクセション番号 95111725) である。しかし、WI-L2-NS (ECACC アクセション番号 90112121) および WTK1 (そのどちらも TK6 の姉妹株であり、変異 p53 タンパク質を有する) の宿主細胞株もまた想定される。どちらもヒト肝細胞癌由来細胞株である Hep G2 (ECACC アクセション番号 85011430) および HepaRG (BioPredic 社; <http://pagesperso-orange.fr/biopredic/index.html>) もまた使用できる (ECACC General Office, CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG、英国)。

10

**【0058】**

本発明者らは、TK6 ヒト細胞が本発明の方法によって使用するための特に好ましい細胞株であることを見いだした。本発明者らは任意の仮説によって拘束しようとは望まないが、TK6 細胞は完全に機能的な p53 を有するために最も有用であると考える。

**【0059】**

DNA 分子によってコードされたタンパク質の発現のために使用される宿主細胞は、理想的には安定性にトランスフェクトされるが、不安定性 (一過性) にトランスフェクトされた細胞の使用は除外される。

20

**【0060】**

本発明の第3態様によるトランスフェクト細胞は、以下の実施例に記載した方法によって形成することができる。細胞は、理想的にはヒト細胞、例えば TK6 である。当該のトランスフェクト細胞は、本発明の第4態様の方法によって物質が DNA 損傷を誘導または増強するか否かを評価するために使用できる。GLuc 発現は DNA 損傷に応答して誘導され、GLuc による発光は公知の適切な技術を使用して容易に測定することができる。

**【0061】**

本発明の第3態様によって最も好ましい細胞は、ベクター pEP-GD532-GLuc を用いて形質転換された TK6 細胞である。これらの細胞は、本明細書では GLuc-TO1 と呼ぶ。

30

**【0062】**

本発明による発現カセットは、宿主細胞のゲノム内に統合できることもまた想定されている。当業者であれば、該カセットをゲノム内に統合するための適切な方法を認識できる。例えば、発現カセットは、パッケージング細胞株と組み合わせてヘルパーフリー組換えレトロウイルスを生成でき、次に宿主細胞内に導入することのできるレトロウイルスベクター上に提供することができる。該カセットは、次にゲノム内に自ら統合することができる。適切なヘルパーフリーのレトロウイルスベクター系の例には、BING レトロウイルスパッケージング細胞株を備える pBabePuro プラスミドが包含される [Kinsella and Nolan, 1996. Episomal Vectors Rapidly and Stably Produce High-Titer Recombinant Retroviruses. Human Gene Therapy. 7: 1405-1413.]。

40

**【0063】**

本発明の第4態様の方法は、ゲノム、特別には DNA 損傷を誘導する物質を低濃度で検出するために特に有用である。本方法は、化合物、例えば候補の医薬品、食品添加物または化粧品を、それが生体、特にヒトを当該化合物に曝露させることが安全であるかどうかを判定するためにスクリーニングするために使用できる。または、本発明の第4態様の方法は、上水道がゲノム損傷物質またはゲノム損傷を増強する物質によって汚染されているか否かを検出するために使用できる。例えば、本方法は、汚染に曝露させられた人々または他の生物における増加したゲノム損傷を引き起こす可能性がある汚染物質の存在につい

50

て工場廃水を監視するために使用できる。

【0064】

本発明の方法は、好ましくは本発明の第2態様による組換えベクター（例えば、pEP-GD532-GLucなど）を用いて形質転換された細胞を増殖させるステップと、規定時間にわたってゲノム損傷を誘導すると推定される物質とともに該細胞をインキュベートするステップと、および該細胞のサンプルからのGLucレポータータンパク質の発現を直接的に監視するステップとによって実施される。

【0065】

発光を検出および定量する適切な方法は、当業者には公知であり、1つの方法を実施例の項に記載する。

【0066】

本発明の方法の好ましい実施形態によると、発光の示度は、例えばマイクロプレートのウェルから、pEP-GD532-GLucを用いてトランスフェクトされたTK6細胞から記録することができる。適切なマイクロプレートの例は、96ウェルの白色、透明底面、無菌マイクロプレートである（最適性能のためには、Matrix Technologies社製ScreenMates：製品番号4925が推奨される）。

【0067】

さらに、予想外にも高い「シグナル対ノイズ」比に起因して上記で考察したように、本発明の発光に基づく遺伝毒性アッセイ法は、蛍光に基づくアッセイのために容易に使用できるより少ないアッセイ液（およびそこでより少数の細胞およびより少ない試験化合物）を使用して実施することができる。直接的な結果として、本発明の方法は、384ウェルのマイクロタイタープレートを使用して実施できる。そこで、適切なマイクロプレートのまた別の例は、384ウェル、黒色、無菌マイクロプレートである。適切なプレートは、またMatrix Technologies ScreenMatesからも入手できる。

【0068】

発光および吸光度測定値は、適切なマイクロプレートリーダー、例えばインジェクターを備えるTecan Infinite F500を使用して記録できる。

【0069】

本発明の第4態様の方法を実施するための最も好ましいプロトコールは、添付の実施例の項に記載されている。

【0070】

GADD45-GLuc構築物由来のGLucのバックグラウンド（「構成的」）発現が生じる可能性があり、すなわち細胞密度が高いほど、培養の発光が多くなる。増殖の結果として生じる何らかの発光の増加を補正するためには、「輝度単位」、すなわち細胞1個当たりの平均発光の測定結果を得るために、発光データを吸光度データ（細胞密度）で割る。これは、培養密度とは無関係である。したがって、吸光度の測定は、試験物質の遺伝毒性の測定よりむしろ主として発光シグナルの正規化のために使用できる。したがって、細胞生存性およびアポトーシスによって毒性を決定するために吸光度測定と結び付けて二次アッセイを使用することが想定されている。例えば、Biovision生物発光細胞毒性アッセイ（Biovision Incorporated社、2455-D Old Middlefield Way、米国カリフォルニア州94043、マウンテンビュー）、またはVybrant（登録商標）アポトーシスアッセイキット（Molecular Probes社、米国オレゴン州97402、29851 Willow Creek Road）を使用する。

【0071】

本発明の第4態様による好ましい方法は、本発明の第3態様による細胞（例、GLuc-TO1）を利用する。

【0072】

一部の非遺伝毒性化合物が細胞代謝によって化学的に変化させられることは理解される

10

20

30

40

50

と思われる。哺乳動物では、このプロセスは、代謝活性化（MA）と呼ばれることが多い。MAは、所定の非遺伝毒性化合物（例えば、プロ変異誘起物質）を遺伝毒性化合物に変換させることができる。最も頻回には、MAは、肝臓内で発生する。このために、遺伝毒性試験は、試験化合物のアッセイが、あたかもインビボで代謝されたかのように化合物を代謝することのできる肝抽出物の存在下および非存在下で実施されるように適応させられるのが好ましいことが多い。実施例4は、S9と呼ばれる（当業者には公知の）肝抽出物を利用する、本発明の第4態様による好ましい方法を例示している。当該の抽出物を包含すると、アッセイは肝臓の通過後にのみ遺伝毒性になる化合物を検出することができる。

【0073】

S9肝抽出物が本発明の方法において使用される場合は、集団内の細胞の密度は細胞染色を使用して決定されるのが好ましい。これは、実施例4において詳細に記載したように、本発明者らが、細胞密度を推定するために使用される吸光度測定相対不感受性はS9代謝活性化試験におけるプロ遺伝毒性物質についてのアッセイの低下した感受性を生じさせることが見いだされたと決定したからである。

【0074】

以下の実施例2でより詳細に考察するように、ルーチンアッセイからの陽性および陰性の結果の明確な定義を有することは有用であり、当該の定義は、遺伝毒性および作用機序に関する明白な合意がある場合の化学薬品からのシステムおよびデータ内の最大雑音を考慮に入れて引き出されてきた。

【0075】

本アッセイがS9肝抽出物を包含する場合は、遺伝毒性閾値は1.5の相対GLuc誘導率（すなわち、50%増加）で設定する。そこで、陽性遺伝毒性結果（+）は、試験化合物が1.5閾値より大きな相対GLuc誘導率を生じさせる場合に結論される。

【0076】

本アッセイがS9肝抽出物を包含しない場合は、遺伝毒性閾値は1.8の相対GLuc誘導率（すなわち、80%増加）で設定する。そこで、陽性遺伝毒性結果（+）は、試験化合物が1.8閾値より大きな相対GLuc誘導率を生じさせる場合に結論される。

【0077】

同様に、遺伝毒物学の分野の範囲内では、相違する化合物間の遺伝毒性作用の力価における変動を認識する方法でアッセイ結果を評価することが時には望ましいことがある。そこで、GLuc誘導はまた以下の基準を使用して判定することもできる：陽性（+）遺伝毒性結果は、1つ以上の試験化合物濃度が1.5または1.8閾値より大きな発光誘導率を生じさせる場合に結論づけられる。陰性遺伝毒性結果（-）は、いずれの化合物希釈液も1.5または1.8閾値より大きな相対GLuc誘導率を生じさせない場合に結論づけられる。

【0078】

本発明者らは、引き続いて、吸光度測定値と置換するために蛍光細胞染色を使用できることを見いだした。これは、2つの方法が同一物を推定する効果的に相違する方法であるためである。驚くべきことに、本発明者らが細胞染色を使用した方法は、細胞数推定の感受性およびこのためプロ遺伝毒性物質の検出を改良した。

【0079】

好ましくは、適応させられたプロトコールにおいて使用された細胞染色は、シアニン色素、より好ましくはDNAおよびRNAに結合するシアニン色素であるチアゾールオレンジ（TO）である。TOのDNAへの結合は、その蛍光強度を大きく増強し、バックグラウンドの未結合TOを洗い流す必要を伴わずにその検出を許容する。

【0080】

好ましくは、本発明の第4態様の方法では、GLucレポータータンパク質の発現は、試験化合物への曝露の46～50時間後に、最も好ましくは48時間後に監視される。

【0081】

本発明の第4態様の一部の実施形態では、ゲノム損傷を誘導または増強する物質の存在

10

20

30

40

50

を検出する方法は、細胞からの G L u c レポータータンパク質の発現を監視するステップを包含する。G L u c レポータータンパク質は、発光反応における基質セレンテラジンの酸化を触媒する。本発明者らは、一部の反応条件（特に多数の反応が連続的に実施される場合）においては、セレンテラジンは、ある程度の変動をアッセイの感受性および信頼性に影響し得る発光シグナルを生じ得るような不安定な場合があることを決定した。

#### 【0082】

また別の調査では、本発明者らは、アスコルビン酸（ビタミンC）などの酸化剤の存在によってセレンテラジンを安定化できることを決定した。または、セレンテラジンは、好ましくは pH 7.4 および 100 mM の最終濃度でのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（T R I S）の存在によって安定化させることができる。さらに、セレンテラジンは、 $\alpha$ -シクロデキストリンの存在によってさらに安定化させることができる。

10

#### 【0083】

そこで本発明の好ましい方法は、セレンテラジンが酸性化メタノール中の 5 mM ストック液として調製される方法である。発光バッファー（400 mM の T r i s - H C l ; 5 mM の  $\alpha$ -シクロデキストリン；脱イオン水；10 N の N a O H を用いて pH 7.4 へ緩衝）を調製する。セレンテラジンストック液を次に発光バッファー中で 2,000 倍に希釈すると、2.5  $\mu$ M セレンテラジン溶液が得られた（T R I S によって pH を 7.4 に緩衝した）。これは反応アッセイに加えられる注入溶液である（さらにセレンテラジンの 4 倍希釈液を生じさせる）。

20

#### 【0084】

本明細書に記載した特徴の全部（任意の添付の請求項、要約書および図面）、および/または本明細書に開示した任意の方法またはプロセスのステップの全部は、当該の特徴および/またはステップの少なくとも一部が相互に排他的である場合の組み合わせを除いて、任意の組み合わせにおいて上記の態様のいずれかと組み合わせることができる。

#### 【0085】

以下では、本発明の実施形態について、下記の実施例および図面を参照しながら、一例としてのみ詳細に記載する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0086】

【図1】ベクター（A）p E P - G D 5 3 2 ; （B）p H G 4 5 - H C プラスミド；および（C）p C M V - G L u c - 1 の制限地図を示す図である。

30

【図2】ベクター（A）p E P - G D 5 3 2 - G L u c のプラスミド地図および（B）発現カセット G D 5 3 2 - G L u c の図である。

【図3】F L u c、G L u c および G F P レポータータンパク質活性のメチルニトロソ尿素（M N U）誘導を示す図である。

【図4】エンドポイント時間経過実験からの G A D D 4 5 - F L u c 発現カセットを有する細胞上の4種の試験化合物についての典型的データを示す図である。

【図5】G D 5 3 2 - G L u c 発現カセットを有する2種の試験化合物；（A）非遺伝毒性物質；（B）遺伝毒性物質についての典型的データを示す図である。

【図6】G F P レポータータンパク質を使用して高蛍光性試験化合物を使用するアッセイからのデータを示す図である；（A）アクリジンオレンジを用いた G F P データ；（B）アクリジンオレンジを用いた G L u c データ。

40

【図7】S 9 抽出物の存在下での G L u c レポータータンパク質を用いた原遺伝毒性物質のアッセイからの結果を示す図である；（A）細胞数を用いたチアゾールオレンジ（T O）の校正；（B）T O 細胞数が本アッセイに組み込まれた場合の 6 - アミノクリセンを用いた S 9 アッセイからのデータ。S 9 抽出物を加えた場合の陽性決定閾値は 1.5 であるが、S 9 抽出物を加えていない場合の陽性決定閾値は 1.8 である；どちらもグラフ上に示されている。

【図8】遺伝毒性物質である 4 - ニトロキノリン - 1 - オキシド（N Q O）についての 384 - ウェルマイクロタイタープレートを使用した G L u c に基づく遺伝毒性アッセイが

50

らのデータを示す図である；（Ａ）実施例４に記載した蛍光細胞染色（ＴＯ）法を使用して測定したＮＱＯについての相対毒性曲線；（Ｂ）ＮＱＯについての相対ＧＬｕｃ発光誘導率。

【実施例１】

【００８７】

[ p E P - G D 5 3 2 - G L u c のクローン化 ]

< 要約 >

G A D D 4 5 レポーター構築体内で G F P O R F をガウシア・ルシフェラーゼ（G L u c）O R F と置換すること。

【００８８】

10

< プロトコール >

ガウシア・ルシフェラーゼ O R F は、P C R を使用してプラスミド p C M V - G L u c - 1（N a n o l i g h t 社）からクローン化した。p C M V - G L u c - 1 プラスミドは、N E B 社によって p C M V - G L u c として市販されている。p C M V - G L u c - 1 のプラスミド地図は、図１に提供した。P W O 高忠実度ポリメラーゼ（R o c h e 社）を使用して、P C R 誘導突然変異の生成を最小限に抑えた。フォワードおよびリバースプライマーは、制限エンドヌクレアーゼの X h o I および N o t I についての認識配列を各々コードする８つの追加の（非相補的）ヌクレオチドを含有していた。P C R 反応についてのプロトコールを以下に示す。

【００８９】

20

【表１】

プライマー：

名称	配列 5'-3'	Tm	配列番号
GLuc-F	gggtcgagagtcaaagttctgtttgccctg	50.4°C (69.9°C)	3
GLuc-R	gcggccgcattagtcaccaccggcccc	50.2°C (77.9°C)	4

【００９０】

【表２】

反応ミックス：

試薬	量
dNTP ミックス (各 10mM)	1μl
pGLuc-F (10μM)	3μl
pGLuc-R (10μM)	3μl
10×PWO PCR バッファー (+20mM MgSO <sub>4</sub> )	5μl
pCMV-GLuc (miniprep)	1μl
PWO ポリメラーゼ (5U/μl)	0.4μl
ddH <sub>2</sub> O	36.6μl

30

【００９１】



【表 3】

## PCR反応条件：

条件	サイクル数
94℃ - 2 分間	1×
94℃ - 20 秒間 45℃ - 30 秒間 72℃ - 60 秒間	10×
94℃ - 25 秒間 65℃ - 30 秒間 72℃ - 60 秒間+5 秒間/サイクル	8×
72℃ - 4 分間 4℃ - 浸漬	1×

10

## 【0092】

PCR産物を清浄化し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（NEB）を使用して5'末端をリン酸化した。プラスミドpBluescript II SK（-）は、EcoRI部位を使用して線状化し、鈍端PCR産物をプラスミド内にライゲートした。

## 【0093】

pEP-GD532プラスミド（図1）を切断し、AscIを用いて線状化し、結果として生じた5'オーバーハングはマングベーンヌクレアーゼ酵素を用いて除去した。次にGFPのORFはNotI消化物を用いて線形化プラスミドから除去し、pEP-GD532プラスミド主鎖は、アガロースゲル電気泳動法およびゲル抽出法を使用して分離および清浄化した。pEP-GD532プラスミドのクローン化および配列は、国際出願PCT/GB2005/001913号明細書に完全に記載されている。

20

## 【0094】

GLucのPCR産物を含有するpBluescript II SK（-）プラスミドはXhoIを用いて切断し、結果として生じた5'オーバーハングはマングベーンヌクレアーゼ酵素を用いて除去し、結果として生じたDNA産物を清浄化した。次にDNAはNotIを用いた消化にかけ、遊離したGLucのPCR産物は、アガロースゲル電気泳動法によって分離および清浄化した。

30

## 【0095】

精製されたGLucのORFは次に、NotI消化によって生成された付着末端ならびにXhoIおよびAscI消化によって生成され、その後にマングベーンヌクレアーゼ処理を受けた鈍端を使用してpEP-GD532主鎖内にクローン化した。これは、図2に示したように、GADD45レポーターベクターpEP-GD532-GLucを生成した。

## 【0096】

< pEP-GD532-GLucについての配列情報 >

pEP-GD532-GLucプラスミドの核酸配列（配列番号1）は、添付の実施例の最後の付属書1に提供した。pEP-GD532-GLucプラスミド内の重要な核酸配列を下記に列举した。

40

## 【0097】

【表 4】

付属書 1 に示した pEP-GD532-GLuc プラスミドの配列注釈：

モチーフ	位置
GADD45 $\alpha$ プロモーター	97-2640
ガウシア・ルシフェラーゼ・オープンリーディングフレーム	2641-3198
GADD45 $\alpha$ エクソン3	3325-3562
GADD45 $\alpha$ イントロン3	3563-4635
GADD45 $\alpha$ エクソン4	4636-5311
SV40ポリA	5356-5597
OriP複製起源	6018-7993
EBNA-1潜在性EBV複製起源ORF	8294-10219
アンピシリン耐性ORF	10845-11705
pUC複製起源	11714-12489
チミジンキナーゼ・プロモーター	12857-13019
ハイグロマイシン耐性ORF	13083-14093
チミジンキナーゼ・ポリA	14105-14376

10

## 【0098】

20

< pEP - GD532 - GLuc プラスミドを有する細胞株 >

TK6細胞は、Xia and Liber [Methods in Molecular biology, Vol. 48: Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols, 1995. Edited by J. A. Nickoloff. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, Pages 151 - 160] から適応させられた方法を用いたエレクトロポレーションによって pEP - GD532 - GLuc を用いてトランスフェクトし、該レポータープラスミドを有するクローンを選択する。その後の研究のために選択した細胞株は、GLuc - TO1 と呼ばれる。

30

## 【実施例 2】

## 【0099】

[ GLuc を使用した遺伝毒性および細胞毒性アッセイのためのプロトコール ]

本発明者らは、pEP - GD532 - GLuc プラスミドを有する細胞株 GLuc - TO1 を使用して試験化合物の遺伝毒性および細胞毒性を測定するための好ましいアッセイを開発した。

## 【0100】

本アッセイは、以下に詳述するような下記のステップ：(1) アッセイにおいて使用するためのマイクロプレート調製するステップと、(2) 該マイクロプレート内でアッセイを実施するステップと、(3) データを収集および分析するステップと、(4) ゲノム損傷に関する判定および結論を下すステップとを有する。

40

## 【0101】

本アッセイは、単一ウェルへの添加が可能なインジェクターが装備された、発光および吸光度読取りが可能なマイクロプレートリーダーを使用して実施する。

## 【0102】

< 2.1 マイクロプレート >

アッセイは、白色、透明底面、96ウェル、無菌マイクロプレート（最適性能のためには Matrix Technologies 社製 ScreenMates：製品番号 4925 が推奨される）内で実施する。黒色、透明底面、96ウェル、無菌マイクロプレート（Matrix Technologies 社製 ScreenMates：製品番号 4929）もまた使用できる。

50

## 【 0 1 0 3 】

## &lt; 2 . 2 アッセイ &gt;

本明細書に記載した標準希釈プロトコールを使用すると、75  $\mu$ Lのサンプル量と75  $\mu$ Lの細胞培養とが合わされた場合に、マイクロプレート内において全濃度が半分にされる。全標準物質ならびに試験化学薬品および試薬類は、本アッセイを実施する直前に新しく調製しなければならない。

希釈液 - 2 % ( v / v ) D M S O の無菌水

## 【 0 1 0 4 】

## 2 . 2 . 1 試験化合物の調製

各試験化合物の最終濃度は、使用される希釈剤に適合する溶液中において、希釈溶媒自体がプレート全体にわたって希釈されないように、典型的には無菌水中で2 % ( v / v ) D M S O でなければならない。

10

## 【 0 1 0 5 】

2 m M または 1 m g / m L ( いずれか低い方 ) の初期濃度 ( マイクロプレート上の 1 m M または 5 0 0  $\mu$  g / m L の試験化合物と同等 ) が推奨される。試験化合物は、試験される最高濃度で完全に可溶性であることが望ましい。1プレート当たり最少250  $\mu$ Lの試験化合物が必要とされる。試験化合物の溶液を調製するための推奨方法は、以下のとおりである：

・高水溶性を備える化合物に対して - 水性希釈剤 ( すなわち、2 % D M S O ) 中に直接的に溶解させ、必要に応じて希釈剤を用いて希釈する。

20

・難水溶性の化合物に対して - 1 0 0 % D M S O 中に溶解させ、必要に応じて1 0 0 % D M S O 中で希釈し、次に2 % ( v / v ) D M S O を含有する試験化合物を生成するために980  $\mu$ Lの無菌水に20  $\mu$ LのD M S O ストック標準溶液を加える。D M S O 標準溶液を水に加えた場合に化合物が溶液から沈殿したら、最初のD M S O ストック標準溶液をさらに1 0 0 % D M S O を用いて希釈することができる。次に、新鮮試験標準液を生成するために、20  $\mu$ L + 水980  $\mu$ Lの希釈ステップを繰り返す。

## 【 0 1 0 6 】

## 2 . 2 . 2 コントロール化合物の調製

4 - ニトロキノリン - 1 - オキシド ( N Q O : 例、S i g m a - A l d r i c h 社、製品番号：N 8 1 4 1 - 2 5 0 M G ) をコントロール化合物として使用する。

30

## 【 0 1 0 7 】

コントロール化合物溶液は、希釈剤中で以下の濃度に調製する。

- ・ 標準物質 1 - N Q O H I G H = 1  $\mu$  g / m L
- ・ 標準物質 2 - N Q O L O W = 0 . 2 5  $\mu$  g / m L

## 【 0 1 0 8 】

1 0 0 % D M S O 中の N Q O のアリコート調製し、50倍の試験濃度で20  $\mu$ Lの容量に冷凍し、次に使用直前に解凍し、2 % D M S O 中の正確な試験濃度を達成するために980  $\mu$ Lの水を加える。

## 【 0 1 0 9 】

## 2 . 2 . 3 細胞の調製

40

標準細胞培養法を使用して、本アッセイに使用するためのG L u c - T O 1細胞を調製する。本アッセイは、細胞が対数増殖期となることを必要とする。このため、培養は本アッセイに使用できるようになる前に5  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個 / m L および1 . 2  $\times$  1 0 <sup>6</sup> 個 / m L の間の密度を達成しなければならない。細胞は、所定の培養培地中で増殖させる。

## 【 0 1 1 0 】

【表 5】

試薬	ストック液濃度	最終濃度	量 (ml)
RPMI 1640 + GlutaMAX	-	-	500
ピルビン酸ナトリウム	100mM	1.8mM	10.4
ハイグロマイシン B	50mg/ml	200µg/ml	2.3
Pen/Strep	5,000IU/ml/5,000µg/ml	50IU/ml/50µg/ml	5.8
熱非働化ドナーウマ血清	100%	10%	57

10

## 【0111】

使用する時点に、アッセイ培地（GS - HC - AM）中において  $2 \times 10^6$  個/mL の密度で GLuc - TO1 細胞の 10 mL 懸濁液を調製する。

## 【0112】

アッセイ培地

本アッセイ培地の構成成分の作業濃度は、以下に規定した。

## 【0113】

【表 6】

構成成分	mg/L
無機塩：	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	100.00
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> （無水物）	48.84
NaCl	6000.00
NaHCO <sub>3</sub>	2000.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> （無水物）	800.00
その他の構成成分：	
D-グルコース	2000.00
グルタチオン（還元）	1.00
アミノ酸：	
L-アルギニン HCl	241.86
L-アスパラギン（遊離塩基）	50.00
L-アスパラギン酸	20.00
L-シスチン・2HCl	65.20
L-グルタミン酸	20.00
グリシン	10.00
L-ヒスチジン（遊離塩基）	15.00
L-ヒドロキシプロリン	20.00
L-イソロイシン	50.00
L-ロイシン	50.00
L-リシン・HCl	40.00
L-メチオニン	15.00
L-フェニルアラニン	15.00
L-プロリン	20.00
L-セリン	30.00
L-トレオニン	20.00
L-トリプトファン	5.00
L-チロシン（二ナトリウム塩）	28.83
L-バリン	20.00
ビタミン類：	
D-ビオチン	0.20
D-パントテン酸 Ca	0.25
塩化コリン	3.00
葉酸	1.00
イノシトール	35.00
ニコチンアミド	1.00
パラ-アミノ安息香酸	1.00
ピリドキサル HCl	1.00
チアミン HCl	1.00
ビタミン B <sub>12</sub>	0.005

10

20

30

40

## 【0114】

## 2.2.4 アッセイの調製

以下の標準プロトコールに従うことができる。試験化学物質のストック、またはDNA損傷を誘導することが推定される物質を含有するサンプルを上述したように2%（v/v）DMSO水溶液中で調製し、96ウェルマイクロプレート全体にわたる一連の希釈液および「コントロール」を作製するために使用する（下記参照）。これを達成するために150 μLの試験化学物質溶液をマイクロプレートウェル内に注入する。各サンプルは、7

50

5  $\mu\text{L}$  を 75  $\mu\text{L}$  の 2 % DMSO 中に移し、混合し、次に 75  $\mu\text{L}$  を取り出して隣のウェルに入れることによって連続的に希釈する。これは各 75  $\mu\text{L}$  の 9 つの連続希釈液を作製する。試験化学物質 / サンプルの最終最大濃度は、マイクロプレート上で 1 mM または 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  である。

【0115】

上述したアッセイ培地 (GS - HC - AM) 中の 75  $\mu\text{L}$  の GLUC - TO1 細胞は、次に適切に各ウェルに加える。

【0116】

以下のコントロールをマイクロプレート内に包含する。

- a . ブランクウェル
- b . 試験化合物 / サンプル単独
- c . アッセイ培地単独
- d . 細胞を含むコントロール化合物

10

【0117】

「ブランクウェル」は、コントロールが試験化合物のための担体として使用される溶媒、典型的には 2 % DMSO を含有することを意味する。

【0118】

終了したら、マイクロプレートを通気性のある膜で被覆する。プレートを 10 ~ 15 秒間にわたりマイクロプレートシェーカー上で (各ウェルの内容物を完全に混合するために) 緩徐に振とうし、次に振とうせずに 48 時間にわたり 37 °C、5 % CO<sub>2</sub>、95 % 湿度でインキュベートする。プレートをインキュベートして 48 時間 ± 2 時間後に分析しなければならない。

20

【0119】

< 2 . 3 データの収集および分析 >

プレートは最初に、約 620 nm の波長で、各ウェル内の吸光度について読み取る。発光を読み取る場合は、各ウェルに 50  $\mu\text{L}$  のインジェクター溶液を加え、リーダー設備を使用してプレートを振とうし、次に 3 秒間の発光の積分時間後に読み取る。適切なリーダーおよびインジェクターシステムの例は、Tecan Infinite (登録商標) F500 である。

【0120】

30

2 . 3 . 1 インジェクター溶液

酸性化メタノール (10 mL) = 9 . 9 mL メタノールおよび 100  $\mu\text{L}$  の 37 % HCl

5 mM セレンテラジinstock液 (4 . 72 mL) = 4 . 72 mL の酸性化メタノール中に溶解させた 10 mg セレンテラジン (天然、MW 423 . 48、CAS # 55779 - 48 - 1)。20  $\mu\text{L}$  のアリコート微量遠心チューブ内にピペットで移し、暗所において - 80 °C で保管する。

50 mM の  $\alpha$  - シクロデキストリン (100 mL) = 7 . 3 g の 2 - ヒドロキシプロピル -  $\beta$  - シクロデキストリン (0 . 8 モル置換、MW 1460、CAS # 128446 - 35 - 5) および蒸留水を 100 mL まで。フィルターを滅菌し、4 °C で保管する。

40

セレンテラジン担体溶液 = 20 mL の Gentronix アッセイ培地、5 mL の 50 mM  $\alpha$  - シクロデキストリンおよび 25 mL の無菌蒸留水。全構成成分が無菌であれば、溶液は 2 週間にわたり 4 °C で保管できる。

【0121】

酸性化メタノール中の 5 mM のセレンテラジinstock液は、最初のプレート読取りのおよそ 30 分前に担体溶液に加えなければならない。少量の担体溶液は、プレートリーダー・インジェクターシステムをプライミングするために使用されるとともに、実際の発光の読み取りにおいて使用される死容積となる。以下の量の担体溶液 + セレンテラジンを調製しなければならない。

【0122】

50

【表 7】

プレート数	セレンテラジンストック液の量	担体溶液の量
1	6 $\mu$ l	12ml
2~4	12 $\mu$ l	24ml

## 【0123】

調製後、インジェクター溶液は、光線への曝露を最小限に抑え、室温で保持しなければならない。

## 【0124】

上記で言及したように、本アッセイは、pH 7.4に緩衝したセレンテラジン溶液を使用して実施することもできる。この場合は、セレンテラジンは、酸性化メタノール中の5 mMストック溶液として調製する。発光バッファーを調製する(400 mMのTris-HCl; 5 mMの $\beta$ -シクロデキストリン; 脱イオン水; 10 NのNaOHを用いてpH 7.4に緩衝した)。セレンテラジンストック液を次に発光バッファー中で2,000倍に希釈すると、2.5  $\mu$ Mセレンテラジン溶液が得られた(TRISによってpHを7.4に緩衝した)。これは、反応アッセイに加えられる注入溶液である(さらにセレンテラジンの4倍希釈液を生じさせる)。

10

## 【0125】

## 2.3.2 インジェクター溶液の添加

20

シリンジのインジェクション速度は、セレンテラジン溶液がウェル内に注入された場合に迅速に混合されることを保証する程度に高速に設定しなければならない。シリンジの再充填速度は、シリンジパレル内で気泡が作り出されないことを保証する程度に低く設定しなければならない。

## 【0126】

## 2.3.3 データの分析

48時間のインキュベーション後、発光および吸光度のデータをマイクロプレートから収集する。発光および吸光度の機能性を結合したマイクロプレートリーダーを使用する。例として、このリーダーはTecan Infinite F500(Tecan UK社)であってよい。発光データは、基質の注入およびマイクロプレートの振とう(リーダー内で)後の3秒間の積分時間で収集する。吸光度は、600 nmまたは620 nmフィルターを通して測定する。これらの発光および吸光度のデータは、Microsoft Excelスプレッドシートにトランスポートし、グラフィックデータに変換する。データ処理は最小限である。吸光度データは、増殖能の減少の指標を与え、これらのデータはビヒクル処理コントロール(=100%増殖)に正規化する。発光データを吸光度データで割ると、細胞1個当たり平均GLuc誘導の測定結果である「輝度単位」が生じる。これらのデータをビヒクル処理コントロール(=1)に正規化する。この方法で、少数の高発光細胞と多数の弱発光細胞とを識別することができる。化合物が遺伝毒性であると分類されるか否かに関する決定(以下を参照)は、ソフトウェアを用いて自動で行われる。

30

## 【0127】

40

ルーチンアッセイからの陽性および陰性の結果の明確な定義を有することは有用であり、当該の定義は、遺伝毒性および作用機序に関する明白な統一見解がある場合の化学薬品からのシステムおよびデータ内の最大ノイズを考慮に入れて引き出されてきた。当然ながら、ユーザーが数値およびグラフ的データを査察し、独自の結論を出すこともまた可能にする。例えば、閾値と交差しなかった遺伝毒性データにおける上昇傾向はそれでもまだ2種の化合物を識別することができる。決定閾値は、以下のように規定した。

## 【0128】

細胞毒性閾値は、未処理コントロール細胞が達した細胞密度の80%に設定する。これは、バックグラウンドの標準偏差の3倍高い。陽性細胞毒性結果(+)は、1または2つの化合物希釈液が80%閾値より低い最終細胞密度を生成した場合に結論される。強陽性

50

細胞毒性結果陽性(++)は、(i) 3つ以上の化合物希釈液が80%閾値より低い最終細胞密度を生じさせた場合、または(ii) 少なくとも1つの化合物希釈液が60%閾値より低い最終細胞密度を生じさせた場合のいずれかに結論される。陰性結果(-)は、いずれの化合物希釈液も80%閾値より低い最終細胞密度を生成しなかった場合に結論される。最低有効濃度(LEC)は、80%閾値より低い最終細胞密度を生じさせる最低試験化合物濃度である。

#### 【0129】

化合物吸光度コントロールは、試験化合物が有意に吸収性である場合には警告を出すことを可能にする。化合物コントロールウェル対培地単独が充填されたウェルの吸光度の比率が>2である場合は、解釈への干渉の危険性が存在する。細胞毒性コントロールは、細胞株が正常に挙動していることを示す。「高」MMS標準物質は最終細胞密度を80%閾値未満に減少させなければならず、「低」標準物質より低い数値でなければならない。

10

#### 【0130】

遺伝毒性閾値は、1.8の相対Glu c誘導率(すなわち、80%の増加)に設定する。この決定閾値は、バックグラウンドの標準偏差の3倍高く設定する。陽性遺伝毒性結果(+)は、化合物希釈液が1.8閾値より大きな相対Glu c誘導率を生じさせる場合に結論される。遺伝毒物学の分野の範囲内では、相違する化合物間の遺伝毒性作用の力価における変動を認識する方法でアッセイ結果を評価することが時には望ましいことがある。そこで、Glu c誘導率は、以下の基準を使用して判定することもできる。強陽性遺伝毒性結果(++)は、3つ以上の化合物希釈液が1.8閾値より大きな相対Glu c誘導率を生じさせる場合に結論される。陰性遺伝毒性結果(-)は、いずれの化合物希釈液も1.8閾値より大きな相対Glu c誘導率を生じさせない場合に結論される。LECは、1.8閾値より大きな相対Glu c誘導率を生じさせる最低試験化合物濃度である。遺伝毒性コントロールは、細胞株がDNA損傷に正常に応答することを証明する。「高」コントロールは>2の発光誘導率を生成しなければならず、「低」コントロールより高い数値でなければならない。異常な輝度データは、毒性がブランクの細胞密度の30%より低い最終細胞密度をもたらした場合に生成される。遺伝毒性データは、この毒性閾値より上方では計算されない。遺伝毒性について陰性の試験結果が出た化合物は、10mMもしくは5,000µg/mLまで、または溶解度もしくは細胞毒性の限界まで再試験された。

20

#### 【0131】

化合物発光コントロールは、化合物が高度に自己発光性である場合に警告を出すことを可能にする。化合物コントロールウェルの発光対ビヒクル処理Glu c - TO1細胞が充填されたウェルからの平均発光の比率が>0.05である場合は、解釈への干渉の危険性が存在する。

30

#### 【実施例3】

#### 【0132】

[pEP - GD532 - Glu c データ]

<はじめに>

GFPは、Green Screen HC 遺伝毒性アッセイのための極めて良好なレポーターであることが証明されている。しかしGFPは、多数の限界を有するので、代替レポーターについての探索が推進されてきた。

40

#### 【0133】

この背景に対して、本発明者らは、レポータータンパク質としてルシフェラーゼを使用する遺伝毒性アッセイを開発しようと考えた。ルシフェラーゼ類は、光生成化学反応を触媒する酵素である。生成された光は、1つのアッセイを使用して測定することができ、そして(正確なアッセイ条件下では)存在するルシフェラーゼの量の直接的測定であると見なすことができる。このため、「GADD45 - ルシフェラーゼ」発現力セットを有する細胞によって生成された光の量は、試験化合物の遺伝毒性の測定であるところのGADD45 レポーターエレメントの活性の測定である。

#### 【0134】

50



## &lt; どのルシフェラーゼ &gt;

本発明者らは、本アッセイに組み込むために利用できるルシフェラーゼ類の中からホタルルシフェラーゼ ( F L u c ) およびガウシア・ルシフェラーゼ ( G L u c ) を試験することを選択した。F L u c を選択したのは、F L u c に基づくアッセイを設計するために利用できる広汎な文献とともに全ルシフェラーゼ類の中で最も明確に記載されているためであった。G L u c は、F L u c とは相違して細胞から分泌されるので選択した。

## 【 0 1 3 5 】

F L u c は、最初にホタルであるフォチヌス・ピラリス ( P h o t i n u s p y r a l i s ) からクローン化した。F L u c は、光を生成する化学反応においてルシフェリンの酸化を触媒する。反応における補因子としてマグネシウムが必要とされる。

10

ルシフェリン + A T P + O <sub>2</sub>      オキシルシフェリン + A M P + 光

## 【 0 1 3 6 】

F L u c は、記載された全ルシフェラーゼ類の最高量子収率 ( > 8 8 % ) を有する。反応の光出力は、スペクトルの黄色 - 緑色部分内にある 5 6 2 n m でピークに達する。F L u c 反応の半減期は < 1 0 分間であるが、ルシフェラーゼタンパク質の半減期は他のより高い数値が報告されているが一般には約 3 時間であると認められている。反応の半減期を延長させるためには、例えばコエンザイム A および所定のシチジヌクレオチドなどの多数の様々な試薬を F L u c 反応に加えることができる。天然 F L u c タンパク質は、細胞のペルオキシソーム内に隔離されるが、細胞質に局在できる突然変異体が生成されている。ルシフェリンが F L u c を発現する細胞に加えられると、細胞が溶解した場合に比較して生細胞内では極めてわずかな光出力しか観察されない。

20

## 【 0 1 3 7 】

ガウシア・ルシフェラーゼ ( G L u c ) は、海洋カイアシであるガウシア・プリンケプスからクローン化されている。G L u c は、発光反応においてセレンテラジンの酸化を触媒する。

セレンテラジン + O <sub>2</sub>                      セレンテラミド + 光

## 【 0 1 3 8 】

反応の光出力は、スペクトルの青色部分内にある約 4 7 0 n m でピークに達するが、G L u c 反応の半減期は 3 0 秒間未満である。G L u c タンパク質は、自然に分泌され、G L u c を発現する細胞内では、このタンパク質の大部分は細胞外環境内で見いだされる。G L u c タンパク質は、p H および温度誘導性分解に対して安定性および抵抗性であると報告されている。

30

## 【 0 1 3 9 】

## &lt; F L u c 試薬およびアッセイ法 &gt;

F L u c アッセイのための試薬は、最初は論文 W e t t e y F R , J a c k s o n A P . L u c i f e r a s e R e p o r t e r A s s a y . I n : R e v i e w s a n d P r o t o c o l s i n D T 4 0 R e s e a r c h . S p r i n g e r N e t h e r l a n d s , 2 0 0 6 , p p . 4 2 3 - 4 2 5 から取り出された。これらの試薬およびそれらの濃度を以下に列挙する。両方のミックスの p H は、ルシフェラーゼからの光出力を最大化するために p H 7 . 8 へ調整する。

40

## 【 0 1 4 0 】

細胞をベレット化して洗浄することをプロトコールに追加のステップとして加えると、このためデータ内への変動性を増加させるので、G r e e n S c r e e n H C アッセイ培地中で T K 6 細胞を直接的に溶解させることを決定した。実験によって、溶解およびアッセイミックスを結合して同時に細胞に添加できることが決定された。溶解が即時の F L u c 定量的のために十分に高速で発生することは明白であった。この結合溶解およびアッセイミックスの溶液 ( L & A バッファー ) を以下に示す。

## 【 0 1 4 1 】

【表 8】

## L &amp; A バッファー

試薬	CAS 番号	最終濃度	初期濃度
トリシン	<u>5704-04-1</u>	20mM	80mM
EDTA	<u>6381-92-6</u>	0.1mM	0.4mM
CDTA	<u>482-54-2</u>	2mM	8mM
(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> *Mg(OH) <sub>2</sub> *5H <sub>2</sub> O	<u>56378-72-4</u>	1.07mM	4.28mM
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<u>10034-99-8</u>	2.67mM	10.68mM
グリセロール	<u>56-81-5</u>	10%	40%
Triton X-100	<u>9002-93-1</u>	1%	4%
ジチオトレイトール	<u>3483-12-3</u>	33.5mM	134mM
コエンザイム A	<u>85-61-0</u>	270μM	1.08mM
ATP	<u>987-65-5</u>	530μM	2.12mM
ルシフェリン	<u>2591-17-5</u>	470μM	1.88mM

10

## 【0142】

上記に列挙した最終濃度は、L & A バッファーが GreenScreen HC アッセイ培地と混合された後の試薬類の濃度である。試薬類の最終濃度は一定であり、Wet t e y a n d J a c k s o n プロトコルからの情報に基づいている。現在実施されて いる F L u c アッセイは、40 μ L の L & A バッファーの 120 μ L の Green S c r e e n H C アッセイバッファーへの添加に依存している。このため、L & A バッファー内の試薬類の初期濃度は、所望の最終濃度より4倍以上高くなければならない。L & A バッファーは、L & A バッファーが GreenScreen HC アッセイ培地 (pH 7 . 2) と結合されると約 7 . 8 の最終 pH を生じさせるので、pH 8 . 0 でなければならない。

20

## 【0143】

## &lt; G L u c 試薬およびアッセイ法 &gt;

G L u c アッセイバッファーの調製を以下に示す。完全アッセイバッファーは、室温の暗所で 20 分間にわたりインキュベートし、その後に等量の G L u c サンプルと混合する 。セレンテラジンは自然に崩壊し、水溶液中において長期間おくには不安定性である。セレンテラジンを室温へ 20 分間にわたり馴化させると、サンプル間でのこの自然崩壊における変動性を最小限に抑える。

30

## 【0144】

【表 9】

## G L u c アッセイバッファー

試薬	CAS 番号	量	濃度
NaCl (5M)	<u>7647-14-5</u>	20	1M
天然セレンテラジン (2mg/ml)	<u>55779-48-1</u>	0.847	40μM
2.5×GreenScreen HC 培地	-	40	1×
H <sub>2</sub> O	<u>7732-18-5</u>	39.153	-

40

## 【0145】

上述したように、本アッセイは、pH 7 . 4 に緩衝したセレンテラジン溶液を使用して実施することもできる。この場合は、セレンテラジンは、酸性化メタノール中の 5 m M ストック溶液として調製する。発光バッファーを調製する ( 400 m M の T r i s - H C l ; 5 m M の - シクロデキストリン ; 脱イオン水 ; 10 N の N a O H を用いて pH 7 . 4 へ緩衝した ) 。セレンテラジンストック液を次に発光バッファー中で 2 , 000 倍に希釈すると、2 . 5 μ M セレンテラジン溶液が得られた ( T R I S によって pH を 7 . 4 に緩

50

衝した)。これは、反応アッセイに加えられる注入溶液である(さらにセレンテラジンの4倍希釈液を生じさせる)。

【0146】

<結果 - G L u c と F L u c および G F P との比較>

p E P - G D 5 3 2 - G L u c の調製については、添付の実施例において記載されている。本発明者らは、類似の戦略を使用してプラスミド p E P - G D 5 3 2 - L もまた調製したが、このとき F L u c をレポータータンパク質として使用した。T K 6 細胞は、G D 5 3 2 - L または G D 5 3 2 - G L u c 発現カセットを有するプラスミドを用いてエレクトロポレーションによってトランスフェクトし、該レポータープラスミドを有するクローンを選択する。

10

【0147】

本発明者らは、G L u c および F L u c レポータータンパク質のいずれが遺伝毒性アッセイにおいて使用するために最も適合するかを決定したいと考えた。これを決定するために、本発明者らは、G D 5 3 2 - L または G D 5 3 2 - G L u c 発現カセットを有する細胞を試験化合物に曝露させ、G L u c および F L u c の活性を測定し、標準 G A D D 4 5 - G F P 発現カセットと比較する一連の実験を実施した。

【0148】

(M N U の作用)

図3に提示したデータは、メチル-ニトロソ尿素(M N U)がG F P、F L u c および G L u c によって報告されたように、G A D D 4 5 誘導を引き起こす方法を示している。図3を精査すると、レポータータンパク質の安定性およびこれがG r e e n S c r e e n H C アッセイに影響を及ぼす方法に関する多数の仮説の構築が可能になる。F L u c タンパク質は、細胞内で約3時間の半減期を有すると報告されてきた。これと比較して、G F P は、細胞内で約26時間の半減期を有すると報告されてきた。これに関連して、G F P は G A D D 4 5 誘導のより累積的測定結果を生じさせると見なすことができるが、他方 F L u c は最近の G A D D 4 5 誘導しかレポートしない。

20

【0149】

G A D D 4 5 誘導は、この濃度でのG F P シグナルにおけるピークによって証明されたように、少なくとも258  $\mu$ g / mL のM N U となるまでピークには達しない。32  $\mu$ g / mL より大きなM N U 濃度は、有意な細胞死を引き起こし、これはより高い濃度のM N U でのF L u c シグナルの減少を説明する。M N U の2つの最高濃度では、全細胞が実験時間経過の早期に死滅し、生成された任意のタンパク質がそれ以後は分解されているので、検出可能なF L u c シグナルはほとんどない。これとは対照的に、M N U の2つの最高濃度ではG F P およびG L u c 両方の明白に検出可能なレベルが存在していて、これら2種のタンパク質がF L u c より高い安定性を有することを証明している。G L u c は、このタンパク質が細胞から分泌されるという点で、F L u c およびG F P とは相違することに留意すべきである。これは、本アッセイを設定した時点で、G L u c タンパク質の大部分がT K 6 細胞から分離されることを意味しているが、それはT K 6 細胞がP B S およびG r e e n S c r e e n H C アッセイ培地中で洗浄されるからである。G F P および F L u c タンパク質は細胞質性であり、このため本アッセイの開始時には有意な量で存在する。図3はさらに、最高相対誘導が見られる相違する化合物試験濃度を示しており、これはF L u c については最低であり(32  $\mu$ g / mL)、死滅および瀕死細胞内でのF L u c シグナルの消失を反映している。さらに、測定可能なG A D D 4 5 応答の大きさは、G F P およびF L u c と比較した場合に、M N U 処理細胞に対してG L u c についての方が明白にはるかに大きい。

30

40

【0150】

全体としてみると、図3に提示したデータは、G F P およびG L u c はどちらも蓄積するが、他方F L u c は蓄積しないことを示している。F L u c の誘導ピークは低い試験化合物濃度にあると思われ、シグナルは高濃度では急に減少する(これらの高濃度では、試験化合物は本アッセイの24時間の時間枠内では極めて毒性である)。事実上、細胞が毒

50

性を経験する／死滅するにつれて、F L u c シグナルはそれらとともに消失する。これは F L u c がエネルギー要件もまた有する短い半減期を備える不安定タンパク質であるためである。G F P は F L u c よりはるかに長い半減期を有するので、このため細胞が毒性条件下にあって瀕死である場合でさえ蓄積して遺残し、そこで誘導のピークははるかに高い濃度で生じる可能性がある。重要にも、G L u c はさらにまた相対的に安定性のタンパク質であり、さらに G F P と類似する蓄積を示す。これは、F L u c ではなく G L u c をルシフェラーゼレポータータンパク質として使用するための重要な利点である。F L u c が使用された場合は、ルシフェラーゼシグナルが G A D D 4 5 活性、したがってレポータータンパク質の分解および試験物質の細胞毒性作用によって有意に影響を受ける応答ではなくむしろ試験化合物の遺伝毒性の測定結果であることを確認するために、多数の時点でデータを測定することが必要になる可能性がある。

10

#### 【 0 1 5 1 】

( 4 種の試験化合物が F L u c 活性に及ぼす作用 )

F L u c 細胞を数種の公知の遺伝毒性物質および非遺伝毒性物質と組み合わせた。F L u c の発現を処理 8、16、24、32、40 および 48 時間後に測定した。示した結果は、試験した 4 種の化合物について、処理 16、24 または 48 時間後のいずれかの時点で最大誘導率が観察されたことを明らかにした。図 4 は、3 種の遺伝毒性物質 ( コルヒチン、5 - フルオロウラシルおよび硫酸ピンブラスチン ) ならびに 1 種の非毒性非遺伝毒性物質 ( エチレングリコール ) についての経時的な最大誘導値を示している。図 4 は、最大 G L u c 誘導率は様々な試験化合物について様々な時点で達成されたことを示している。コルヒチンおよびおそらく 5 - フルオロウラシルは、G r e e n S c r e e n H C アッセイにおける好ましい 48 時間のエンドポイントを使用して遺伝毒性であるとは検出されない可能性がある。これは、全部の公知の遺伝毒性物質を検出するためには多数の時点が必要とされることを意味し、使用可能なアッセイを動力学的に実施する必要があることを示唆している。しかし、この結果は、F L u c 誘導率決定には細胞の溶解を必要とし、個別細胞における多数の時点を除くので、問題が多い。さらに、図 4 に示した同一化合物は、G L u c を用いた 48 時間のエンドポイントを使用するアッセイにおいてレポータータンパク質であると ( 3 種の遺伝毒性物質および 1 種の非遺伝毒性物質 ) 正確に同定された。

20

#### 【 0 1 5 2 】

このため、図 4 は、タンパク質不安定性および蓄積の欠如に起因する F L u c についての測定時点の問題を証明している。

30

#### 【 0 1 5 3 】

< 要約 >

F L u c の半減期が短いという不利点は、F L u c を使用した遺伝毒性アッセイが、ピーク F L u c 誘導が記録されることを保証するために多数の時点 ( 3 回以上 ) を必要とする点である。これは、F L u c 濃度を決定するためには細胞溶解が必要とされるので重大な問題であり、各時点に対してパラレルアッセイ・マイクロプレートがセットアップされなければならない。G L u c は、F L u c に比して少なくとも 2 つの利点を提供する。第 1 に、G L u c は分泌されるので、細胞溶解を行わずにその存在を決定することができる。第 2 に、G L u c は F L u c より安定性であり、このため 2 回以上の時点の必要を排除する。

40

#### 【 0 1 5 4 】

このデータから、本発明者らは、G L u c は、遺伝毒性アッセイにおけるルシフェラーゼレポータータンパク質として使用するために F L u c より優れた特性を有すると結論した。

#### 【 0 1 5 5 】

< 結果 - p E P - G D 5 3 2 - G L u c を使用した遺伝毒性試験データ >

一連の遺伝毒性アッセイは、G D 5 3 2 - G L u c 発現カセット ( 「 G L u c アッセイ 」 ) を有する T K 6 細胞株を使用して実施した。これらのアッセイは、後述する実施例に

50

提供する実験プロトコールを使用して実施した。

【 0 1 5 6 】

アッセイからの典型的データは、図 5 に提供した。この場合には、パネル A から、非遺伝毒性物質であるクロラムフェニコールが G L u c アッセイにおいて予想されたように陰性として検出されたことが明らかである。これとは対照的に、パネル B では、遺伝毒性物質であるエトポシドは、G L u c アッセイにおいて予想されたように陽性であると検出された。

【 0 1 5 7 】

本発明者らは、G D 5 3 2 - G L u c レポーター系を用いて試験された様々なクラスの遺伝毒性物質についての典型的な遺伝毒性試験結果の一覧も以下に包含している。

【 0 1 5 8 】

【表 1 0 】

化合物	CAS 番号	GLuc 遺伝毒性	
		結果	LEC/ $\mu$ g/ml
直接作用性			
シスプラチン	15663-27-1	+++	0.25
マイトマイシン C	50-07-7	+++	0.13
メチルメタンサルホネート	66-27-3	+++	6.25
N-メチル-N-ニトロ-ニトロソグアニジン	70-25-7	+++	0.39
N-ニトロソ-N-メチル尿素	684-93-5	+++	8.05
4-ニトロソキノリン-1-オキシド	56-57-5	+++	0.13
トポイソメラーゼ阻害剤			
カンプトテシン	7689-03-04	+++	0.08
エトポシド	33419-42-0	+++	0.06
異数性誘発物質			
ベノミル	17804-35-2	+++	1.81
グリセオフルビン	126-07-8	+++	5.50
パクリタキセル (タキソール)	33069-62-4	+++	0.03
硫酸ビンクリスチン	2068-78-2	+++	0.0008
ヌクレオチド/DNA 合成阻害剤			
5-アザシチジン	320-67-2	+++	0.38
5-フルオロウラシル	51-21-8	+++	0.63
アフジコリン	38966-21-1	+++	0.13
ヒドロキシ尿素	127-07-1	+++	4.75
ピリメタミン	58-14-0	+++	0.39
反応性酸素種			
過酸化水素	7722-84-1		5.00

【 0 1 5 9 】

各「+」は、個別アッセイにおける転帰を表している。すなわち、試験化合物は全部を 3 回ずつ試験した。列挙した全試験化合物は、G D 5 3 2 - G L u c レポーター系によっ

て遺伝毒性物質として陽性であると同定された。

【0160】

< 結果 - 高い信号対雑音比および発光出力は蛍光干渉の衝撃を減少させる >

G L u c レポータータンパク質を使用する遺伝毒性アッセイを詳細に特徴付けるために、本発明者らは、G L u c および G F P レポータータンパク質を使用した高蛍光性試験化合物のアッセイの「シグナル対ノイズ比」を評価した。生成されたデータは、図 6 に明らかである。パネル (A) において、蛍光菌株 (下方の線) および非蛍光菌株 (上方の線) との間にはほとんど、または全く区別がないことに留意されたい。これは、G F P レポータータンパク質から蛍光を効果的に遮蔽する化合物からの自家蛍光のためである。これとは対照的に、G L u c 系からは干渉を伴わずに明白な陽性シグナルが生じる。

10

【0161】

ここで、レポータータンパク質として G L u c を使用するアッセイは、ほぼゼロのバックグラウンドを伴って高強度の光出力を生成することを見て取ることができる。レポーターアッセイとして発光を使用する利点は、蛍光に基づくアッセイにおいて使用されるように、入射光線の必要がないことである。これは、G F P レポータータンパク質からのシグナルを遮蔽する可能性がある望ましくない蛍光の励起が生じないことを意味する。G F P ではなく G L u c を使用することによって、高度に蛍光性の化合物さえ G L u c 出力に対する問題を引き起こさずに試験することができる。結果として、ルシフェラーゼ測定は、着色または蛍光性試験材料からの干渉に悩まされる可能性が低い。

20

【0162】

さらに、高い「シグナル対ノイズ比」は、G L u c 媒介性生物発光を使用した遺伝毒性アッセイを、図 8 に提示したデータから明らかのように、384 ウェル・マイクロタイタープレートを使用して実施することを可能にする。

【実施例 4】

【0163】

[ 代謝活性化試験のための G L u c を使用した適応させた遺伝毒性アッセイ ]

本発明者らは、S9 肝抽出物をアッセイに使用できるように上述した、および添付の実施例に記載した遺伝毒性アッセイを適応させた。S9 抽出物を使用することによって、本アッセイは、それらの天然形では本質的に遺伝毒性ではないが、代謝反応に起因して遺伝毒性になるプロ変異誘起物質またはプロ遺伝毒性物質化合物の検出を許容する。

30

【0164】

S9 は、それらの天然形では非遺伝毒性であるが、(主として肝臓内での)代謝によって化学的に変化させられてインビボで遺伝毒性化合物を生成する化合物を検出することを許容する(当業者には公知の)肝抽出物である。

【0165】

S9 抽出物は、実施例 2 の方法への並行アッセイまたは独立アッセイのいずれかとして、上記の実施例 2 に記載したアッセイ方法の適応化に組み込むことができる。S9 組み込みアッセイでは、G L u c - T O 1 細胞は酵素補因子(例えば、グルコース - 6 - ホスフェート(2.5 mM)および - ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(0.5 mM))との混合物中において S9 抽出物の存在下で試験化合物に曝露させられる。S9 抽出物は、通常はアッセイマイクロプレート内において 1% (v/v) の最終濃度で使用される。試験化合物および S9 ミックスとのインキュベーション時間は、一般には 3 時間であり、その後 S9 および試験化合物は除去され、細胞は P B S 中で洗浄され、次にインキュベーションの残り 45 時間にわたり新鮮アッセイ培地中で再懸濁させられる。S9 組み込みアッセイの条件(例えば、曝露時間および S9 のタイプ、動物種、肝酵素の化学的誘導など)は、実験要件にしたがって変動してよい。

40

【0166】

< 適応させたプロトコール >

プレートリーダー測定値の使用は、結果として S9 代謝活性化試験におけるプロ遺伝毒性物質についてのアッセイの感受性低下を生じさせることが見いだされた。これは予想外

50

であった。本発明者らは、この事態をさらに詳細に調査し、これが細胞密度を推定するため、およびレポーター出力の正規化のために使用された吸光度測定値の相対非感受性に起因することを見いだした。相対非感受性は、典型的な標準のプロ遺伝毒性化合物の一部が遺伝毒性であると確実に検出されないことを意味した。

【 0 1 6 7 】

本発明者らは、引き続いて、吸光度測定値と取り換えて蛍光細胞染色を使用できることを見いだした。これは、2つの方法が同一物を推定する効果的に相違する方法であるためである。驚くべきことに、細胞染色を使用した方法は、細胞数推定の感受性およびこのためプロ遺伝毒性物質の検出を改善した。

【 0 1 6 8 】

適応させたプロトコールにおいて使用した細胞染色は、核酸に結合するシアニン色素であるチアゾールオレンジ ( T O ) である。T O の D N A および R N A への結合は、その蛍光強度を大きく増強し、バックグラウンドの未結合 T O を洗い流す必要を伴わずにその検出を許容する。

【 0 1 6 9 】

この方法は、マイクロプレートウェル内に存在する D N A または全細胞に接近することを可能にするために、G L u c - T O 1 細胞を溶解させることを必要とする。存在する核酸の量は細胞数に比例し、このため D N A 結合 T O からの蛍光強度もまた細胞数に比例している。

【 0 1 7 0 】

T O は、ストック溶液を 2 5 m M で形成するために 1 0 0 % D M S O 中に溶解させる。これを P B S および T r i t o n - X 1 0 0 からなる細胞溶解溶液と混合する。各マイクロプレートウェルに 5 0  $\mu$  L の T O / 溶解ミックスを加え、5 ~ 2 0 分間にわたりインキュベートし、その後蛍光測定値を獲得する ( 励起 : 4 8 5 n m および発光 : 5 3 5 n m ) 。マイクロプレート内では、T O の最終濃度は 1 5  $\mu$  M であり、T r i t o n - X 1 0 0 については 1 % ( v / v ) である。

【 0 1 7 1 】

図 7 は、細胞数を用いた ( アッセイに関連する最適化条件および細胞密度を使用する ) T O 蛍光の検量線 ( A ) および T O 細胞数推定値を組み込んだ S 9 代謝活性化 G L u c アッセイを使用して検出された標準プロ遺伝毒性物質 ( 6 - アミノクリセン ) についての典型的データ ( B ) を示している。

【 0 1 7 2 】

上記の実施例 2 で考察したように、ルーチンアッセイからの陽性および陰性の結果の明確な定義を有することは有用であり、当該の定義は、遺伝毒性および作用機序に関する明白な合意がある場合の化学薬品からのシステムおよびデータ内の最大雑音を考慮に入れて引き出されてきた。

【 0 1 7 3 】

本アッセイが S 9 肝抽出物を包含する場合は、遺伝毒性閾値は 1 . 5 の相対 G L u c 誘導率 ( すなわち、5 0 % 増加 ) で設定する。そこで、陽性遺伝毒性結果 ( + ) は、試験化合物が 1 . 5 閾値より大きな相対 G L u c 誘導率を生じさせる場合に結論される。

【 0 1 7 4 】

付属書 1 : p E P - G D 5 3 2 G L u c の配列 ( 配列番号 1 )

10

20

30

40

【表 1 1 A】

1	gtcgaccaat tctcatgttt gacagcttat catcgagat ccgggcaacg	
51	ttgttgccat tgctgcaggc gcagaactgg taggtatgga agatcttggg	
101	tggggcactt taggactgtg gttcatttga attggtgtaa acaatacacc	
151	ggttctactg tcctacagcc tccattcaga tgactgaagt catgggactt	
201	tcagcatagc tagctgatga cagtgcatac tattttgtcc caaaatccag	
251	ttcaagcatg gacataccaa taagagccta agctctttaa aggcaaagga	
301	ccaggaattg tacagttctt ggtatagaag aagacaggca aaagtgtttt	
351	tgaactaacg ttaaagtgtc aatatgttag aattcatgca atgcacagga	10
401	ctgcaggatt ctgatatctt atttaactct caaattctat tcaactcaat	
451	aaaccttgac tgtgcttcta ctaaatgcag gtattgtact aggagctgag	
501	gacaccaaac tgatgaagtc cttgctgtca agaaactcac atgattccct	
551	aattctttgt cagcttgctg tgatcacatt ttcttccaa gaacctctaa	
601	gaaatgccta gtgtagataa ccttgaggtt ccacggaaca tattaacaat	
651	cgccaaatga tgactcaggc tagattgtgt aattcagggt ttgtctgcaa	
701	aactgaaaat gcttcggtaa cctacctaaa tttcaatgtt gaggaattct	
751	ttaagaaaga catcaaagt taagatttaa ggcatagata tgagatacat	
801	agtcatgctt aggtgaatta tgactgacc atgaccattt ctttactcaa	
851	atgttgtcca tggctgacaa cacagtga aaatgagtg aaaatgacaa	20
901	ctcaaataaa tgaaccagaa aacctatcac tttcttttc caccaaatta	
951	agatcaagag agctggagaa tattttgtct agagtataa aaacataagg	
1001	gtgcaaaact tccaggtacc tttgcagaaa ttacttctgt gacctttggc	
1051	tgtacagcaa ccttaataat gcaagcactg ttttgaatgc aagcatgtgg	
1101	gagccatttt caccactttt gatgacttca gtaggtttaa gaaatgtttt	
1151	tgcttttatt gcataaacca taaaacaaag gaagggactt ttgaactact	
1201	cagtgaagat ctatatatta aagtttgtt ttcaaaaatg tgtaactacc	
1251	atttgcagtt ttaaaggtct gctttccacc tacaagttgc cattatctca	
1301	aaggtgaaat tttagcatat gactaaaaac ttcttatagt tacagcttca	30
1351	tgattcagca tctaacaatca ataattcaca gtgagatcat aggaggctct	
1401	ctgtggaagg taacgacata catacgttag gaaaggaagc ttagggcata	
1451	tcgagagcat tttgaattta gacttgtggg ctgtgtgggt gtcagatggt	
1501	tgtctctcag ctggtgggcg tccagaagga tccttgtttg ggcaaggctc	
1551	tttgagaaaag gagaatctgg gttgccaggg attcccatat gtggtcacca	
1601	gctccccacg cagaccagct cacgatttcc cagttacacc gggcagggtg	
1651	gaaaccgttc tgctttctgt ggaaaagatt ctaacttgggt tccctgccat	
1701	ccctgaatac aaacgggttg gtttttcttt tttgagcttc caacccttgc	
1751	agcttttcaa aaataaatca aaccagccat cagggcaccg aaataatact	
1801	actgctaata agcagcttcg cctagactta gataaacaac acttctgagg	40
1851	taaactttgc cccggaggtc tggagacact tttttaatgt aacctgtta	
1901	ctaataatta ctgacttca gtgcattaac cctggaaata gattttaata	
1951	gccaccctt aaaacaaaag acatgaaaag ataataagaa aaaagtgccg	



【表 1 1 B】

2001 caactattat agaaaaacac ttggcagcct gcttcagccc aagctgaggc  
 2051 cacctctagc ctctgctaaa gccccccact cccaatggc cccgccaacc  
 2101 ggataagagt gcgcgcggga cccgccttcc cctctcggca cgcgcccg  
 2151 ccccgcccc tcggctcgcc tcccgcgtgg ctctccctt ttccgctcct  
 2201 ctcaacctga ctccaggagc tgggggtcaaa ttgctggagc aggctgattt  
 2251 gcatagccca atggccaagc tgcattgcaa tgaggcggaa ggtggttggc  
 2301 tgagggttgg caggataacc ccggagagcg gggccctttg tcctccagt  
 2351 gctggttagc agtggtcggg aggcagcggc ccaattagtg tcgtgcggcc  
 2401 cgtggcgagg cgaggtccg ggagcagcg agcaagcaag gcgggagggg  
 2451 tggccggagc tgcggcggct ggacacagg gagagcccc ggcggcgag  
 2501 gggcgcccg agagcgccag gccctgagct gccggagcgg cgcctgtgag  
 2551 tgagtgcaga aagcaggcgc ccgcgcgcta gccgtggcag gagcagccc  
 2601 cacgccgcgc tctctccctg ggcgacctgc agtttgcaat atgggagtca  
 2651 aagttctgtt tgccctgac tgcattcgtg tggccgaggc caagcccacc  
 2701 gagaacaacg aagacttcaa catcgtggcc gtggccagca acttcgcgac  
 2751 cacggatctc gatgctgacc gcgggaagtt gcccggaag aagctgccgc  
 2801 tggaggtgct caaagagatg gaagccaatg cccggaagc tggctgcacc  
 2851 aggggctgtc tgatctgcct gtccacatc aagtgcacgc ccaagatgaa  
 2901 gaagttcatc ccaggacgct gccacacct cgaaggcgac aaagagtccg  
 2951 cacaggcgcg cataggcgag gcgacgtcg acattcctga gattcctggg  
 3001 ttcaaggact tggagcccat ggagcagttc atcgacagg tcgatctgtg  
 3051 tgtggactgc acaactggct gcctcaaagg gcttgccaac gtgcagtgtt  
 3101 ctgacctgct caagaagtgg ctgccgcaac gctgtgcgac ctttgccagc  
 3151 aagatccagg gccagggtga caagatcaag ggggcccgtg gtgactaatg  
 3201 cggccgcgac tctagatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt  
 3251 acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa  
 3301 tgaatgcaat tgtgtgtgtt atcgcgacct cgataacgtg gtgtgtgccc  
 3351 tgctggcggc ggacgaggac gacgacagag atgtggctct gcagatccac  
 3401 ttcacctga tccaggcgtt ttgctgcgag aacgacatca acatcctgcg  
 3451 cgtcagcaac ccgggccggc tggcgagct cctgctcttg gagaccgacg  
 3501 ctggccccgc ggcgagcagc ggccggagc agccccgga cctgactgc  
 3551 gtgctggtga cggtaaggga ctgggggact gcagcctgca gggtagagcc  
 3601 ccggaaggac gggagtcagg actgggttgc ctgattgtgg atctgtggtg  
 3651 ggtgagggtc aggaggggtg ctgcctttgc ccgactagag tgtggctgga  
 3701 ctttcagccg agatgtgcta gtttcatcat caggattttc tgtggtacag  
 3751 aacatgtcta agcatgctgg ggactgccag cagcggaaga gatccctgtg  
 3801 agtcagcagt cagcccagct actccctacc tacatctgca ctgcctccc  
 3851 tgactaattc cttagcagg gcagattaga taaagccaaa tgaattcctg  
 3901 gctacccct cattaaggag tcagcttcat tctctgccag tcagagctaa  
 3951 aaatagaaat tgtgtaggag acaaaccttg ttaattccct agaaatacat

10

20

30

40

【表 1 1 C】

4001	taagaggata	gagtgggaatt	ttttttctct	gcaatcttgc	attttttttaa	
4051	tggctctttt	tttttttctt	gataaaaacc	tttggtaggt	agggaagtta	
4101	tgttttcagg	ggtaaatgtg	ctacttttgt	cttctaaatt	ttgctctttt	
4151	ttgactggtc	tagtcaagtg	acagcccgat	tatttttgcta	ctccttaaaa	
4201	gtactattct	gtctcttggg	gtatggttga	tggcaattcc	agttaactgc	
4251	tgtgcagctc	tcactctcatt	gtgcacacag	catggaaatc	tttctcaaaa	
4301	ctgtttcact	caggtcaggg	taacaagttt	ggtagagcaa	accggtgaat	
4351	gatactctca	tgcaaaactg	aacagatatg	caaacatatg	tatgtgggtc	10
4401	agcttgggtt	gcatgggttc	agactttgca	atgtgtagtt	taataggtaa	
4451	ttacccttaa	cgcttttgca	gggaacccaa	ctaccttgaa	gaaactttaa	
4501	tttttttgtg	cttctaattt	gtctccatgt	cacatagcca	aaatatagaa	
4551	tgttcaagtg	ttttctcctc	aaaagtataa	ttactagaat	atactgggtt	
4601	ttaaaataag	tttattttta	taaatttggt	tccagaatcc	acattcatct	
4651	caatggaagg	atcctgcctt	aagtcaactt	atgtgttttt	gccgggaaag	
4701	tcgctacatg	gatcaatggg	ttccagtgat	taatctccct	gaacggtgat	
4751	ggcatctgaa	tgaaaataac	tgaaccaa	at	tgcaactgaag	tttttgaaat
4801	acctttgtag	ttactcaagc	agttactccc	tacactgatg	caaggattac	
4851	agaaactgat	gccaaagggc	tgagtgaagt	caactacatg	ttctgggggc	20
4901	ccggagatag	atgactttgc	agatggaaa	agg	tgaaaat	gaagaaggaa
4951	gctgtgttga	aacagaaaaa	taagtcaaaa	ggaacaaaaa	ttacaaagaa	
5001	ccatgcagga	aggaaaacta	tgtattaatt	tagaatggtt	gagttacatt	
5051	aaaataaacc	aaatatgtta	aagtttaagt	gtgcagccat	agtttgggta	
5101	tttttggttt	atatgccctc	aagtaaaaga	aaagccgaaa	gggttaatca	
5151	tatttgaaaa	ccatatttta	ttgtattttg	atgagatatt	aaattctcaa	
5201	agttttatta	taaattctac	taagttat	tt	tatgacatga	aaagttat
5251	atgctataaa	ttttttgaaa	cacaatacct	acaataaact	ggatgaata	
5301	attgcatcat	ttcttattgt	gtgctcgagg	ccggcaaggc	cggatccaga	
5351	catgataaga	tacattgatg	agtttgga	ca	aaccacaact	agaatgcagt
5401	gaaaaaaatg	ctttatttgt	gaaatttggt	atgctattgc	tttatttgta	
5451	accattataa	gctgcaataa	acaagttaac	aacaacaatt	gcattcattt	
5501	tatgtttcag	gttcagggg	agggtgtgga	ggttttttta	agcaagtaaa	
5551	acctctacaa	atgtggtatg	gctgattatg	atccggctgc	ctcgcgctgt	
5601	tcggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	tgcaactccc	ggagacggtc	
5651	acagcttgct	tgtaagcgga	tgccgggagc	agacaagccc	gtcagggcgc	
5701	gtcagcgggt	gttggcgggt	gtcggggcgc	agccatgagg	tcgactctag	
5751	aggatcgatg	ccccgccccg	gacgaactaa	acctgactac	gacatctctg	
5801	ccccttcttc	gcggggcagt	gcatgtaatc	ccttcagttg	gttggtacaa	40
5851	cttgccaact	gggccctgtt	ccacatgtga	cacggggggg	gaccaaacac	
5901	aaaggggttc	tctgactgta	gttgacatcc	ttataaatgg	atgtgcacat	
5951	ttgccaacac	tgagtggctt	tcacctctga	gcagactttg	cagtcgtgtg	

【表 1 1 D】

6001 actgcaacac aacattgcct ttatgtgtaa ctcttggtg aagctcttac  
 6051 accaatgctg ggggacatgt acctcccagg gggccaggaa gactacggga  
 6101 ggctacacca acgtcaatca gaggggcctg tgtagctacc gataagcggg  
 6151 ccctcaagag ggcattagca atagtgttta taaggccccc ttgttaaccc  
 6201 taaacgggta gcatatgctt cccgggtagt agtatatact atccagacta  
 6251 accctaattc aatagcatat gttacccaac gggaagcata tgctatcgaa  
 6301 ttagggtagg taaaagggtc ctaaggaaca gcgatatctc ccaccccatg  
 6351 agctgtcacg gttttattta catgggggtca ggattccacg agggtagtga  
 6401 accatttttag tcacaagggc agtggctgaa gatcaaggag cgggcagtga  
 6451 actctcctga atcttcgcct gcttcttcat tctccttcgt ttagctaata  
 6501 gaataactgc tgagttgtga acagtaagggt gtatgtgagg tgctcgaaaa  
 6551 caaggtttca ggtgacgccc ccagaataaa atttgacgag ggggttcagt  
 6601 ggtggcattg tgctatgaca ccaatataac cctcaciaac cccttgggca  
 6651 ataaatacta gtgtaggaat gaaacattct gaatatcttt aacaatagaa  
 6701 atccatgggg tggggacaag ccgtaaagac tggatgtcca tctcacacga  
 6751 atttatggct atgggcaaca cataatccta gtgcaatatg atactggggt  
 6801 tattaagatg tgtcccaggc agggaccaag acagggtgaac catgttggtta  
 6851 cactctatct gtaacaaggg gaaagagagt ggacgcccag agcagcggac  
 6901 tccactgggt gtctctaaca cccccgaaaa ttaaagggg ctccacgcca  
 6951 atggggccca taaacaaaga caagtggcca ctcttttttt tgaaattgtg  
 7001 gagtgggggc acgcgtcagc cccacacgac cgccctgcgg ttttggactg  
 7051 taaaataagg gtgtaataac ttggctgatt gtaacccgc taaccactgc  
 7101 ggtcaaacca cttgcccaca aaaccactaa tggcaccgag ggaataacct  
 7151 gcataagtag gtgggcgggc caagataggg gcgcgattgc tgcgatctgg  
 7201 aggacaaatt acacacactt gcgcctgagc gccaaacaca ggggtgttgg  
 7251 tcctcatatt cacgaggtcg ctgagagcac ggtgggctaa tgttgccatg  
 7301 ggtagcatat actacccaaa tatctggata gcatatgcta tcctaatacta  
 7351 tatctgggta gcataggcta tcctaatacta tatctgggta gcatatgcta  
 7401 tcctaatacta tatctgggta gtatatgcta tcctaattta tatctgggta  
 7451 gcataggcta tcctaatacta tatctgggta gcatatgcta tcctaatacta  
 7501 tatctgggta gtatatgcta tcctaatacta tatccgggta gcatatgcta  
 7551 tcctaatacta gattagggta gtatatgcta tcctaattta tatctgggta  
 7601 gcatatacta cccaaatata tggatagcat atgctatcct aatctatatc  
 7651 tgggtagcat atgctatcct aatctatatc tgggtagcat aggctatcct  
 7701 aatctatatc tgggtagcat atgctatcct aatctatatc tgggtagtat  
 7751 atgctatcct aatttatatc tgggtagcat aggctatcct aatctatatc  
 7801 tgggtagcat atgctatcct aatctatatc tgggtagtat atgctatcct  
 7851 aatctgtatc cgggtagcat atgctatcct catgcatata cagtcagcat  
 7901 atgataccca gtagtagagt gggagtgtga tcctttgcat atgccgccac  
 7951 ctccaagggt ggcgtgaatt ttcgctgctt gtccttttcc tgctggttgc

10

20

30

40

【表 1 1 E】

8001 tccattcttt aggtgaattt aaggaggcca ggctaaagcc gtcgcatgtc  
 8051 tgattgctca ccaggtaaat gtcgctaatag ttttccaacg cgagaagggtg  
 8101 ttgagcgcgg agctgagtga cgtgacaaca tgggtatgcc caattgcccc  
 8151 atgttgggag gacgaaaatg gtgacaagac agatggccag aaatacacca  
 8201 acagcacgca tgatgtctac tggggattta ttcttttagtg cgggggaata  
 8251 cacggctttt aatacgattg agggcgtctc ctaacaagtt acatcactcc  
 8301 tgcccttcct caccctcatc tccatcacct ccttcatctc cgtcatctcc  
 8351 gtcatcaccc tccgcggcag ccccttccac cataggtgga aaccagggag  
 8401 gcaaacttac tccatcgtca aagctgcaca cagtcaccct gatattgcag  
 8451 gtaggagcgg gctttgtcat aacaagggtcc ttaatcgcat cttcaaaac  
 8501 ctacagcaat atatgagttt gtaaaaagac catgaaataa cagacaatgg  
 8551 actcccttag cgggccagggt tgtgggcccgg gtccaggggc cattccaaag  
 8601 gggagacgac tcaatgggtg aagacgacat tgtggaatag caagggcagt  
 8651 tctcgcctt aggttgtaaa gggaggctt actacctcca tatacgaaca  
 8701 caccggcgac ccaagttcct tcgtcggtag tcctttctac gtgactccta  
 8751 gccaggagag ctcttaaacc ttctgcaatg ttctcaaatt tcgggttgga  
 8801 acctccttga ccacgatgct ttccaaacca cctcctttt ttgcgcctgc  
 8851 ctccatcacc ctgaccccg ggtccagtgc ttgggccttc tcctgggtca  
 8901 tctgcggggc cctgctctat cgctcccggg ggcacgtcag gctcaccatc  
 8951 tgggccacct tcttgggtgt attcaaaata atcggcttcc cctacaggggt  
 9001 ggaaaaatgg cttctacct ggagggggcc tgcgcggtgg agaccggat  
 9051 gatgatgact gactactggg actcctgggc ctcttttctc cacgtccacg  
 9101 acctctcccc ctggctcttt cacgacttcc cccctgggt ctttcacgtc  
 9151 ctctaccccg gcggcctcca ctacctctc gaccccggcc tccactacct  
 9201 cctcgacccc ggctccact gcctcctga cccggcctc cacctcctgc  
 9251 tcctgcccct cctgctcctg cccctcctcc tgcctcctgc cctcctgccc  
 9301 ctctgctccc tgccctcct gcccctcctg ctctgcccc tcctgcccct  
 9351 cctgctcctg cccctcctgc cctcctcct gctcctgccc ctctgcccc  
 9401 tcctcctgct cctgcccctc ctgcccctcc tgcctcctgc cctcctgccc  
 9451 ctctgctccc tgcccctcct gcccctcctg ctctgcccc tcctgctcct  
 9501 gcccctcctg ctctgcccc tcctgctcct gcccctcctg cccctcctgc  
 9551 cctcctcct gctcctgccc ctctgctcc tgcccctcct gcccctcctg  
 9601 cccctcctgc tcctgcccct cctcctgctc ctgcccctcc tgcccctcct  
 9651 gcccctcctc ctgctcctgc cctcctgccc cctcctcctg ctctgcccc  
 9701 tcctcctgct cctgcccctc ctgcccctcc tgcccctcct cctgctcctg  
 9751 cccctcctgc cctcctcct gctcctgccc ctctcctgct tcctgcccct  
 9801 cctgcccctc ctgcccctcc tcctgctcct gcccctcctc ctgctcctgc  
 9851 cctcctgccc cctcctgccc ctctgcccc tcctcctgct cctgcccctc  
 9901 ctctgctccc tgcccctcct gctcctgccc ctcccgtccc tgctcctgct  
 9951 cctgttccac cgtgggtccc tttgcagcca atgcaacttg gacgtttttg

10

20

30

40

【表 1 1 F】

10001	gggtctccgg	acaccatctc	tatgtcttgg	ccctgatcct	gagccgcccg	
10051	gggtcctcgg	tcttccgcct	cctcgtcctc	gtcctcttcc	ccgtcctcgt	
10101	ccatggttat	cacccctct	tctttgaggt	ccactgccgc	cggagccttc	
10151	tgggtccagat	gtgtctccct	tctctcctag	gccatttcca	ggctcctgtac	
10201	ctggccccctc	gtcagacatg	attcacacta	aaagagatca	atagacatct	
10251	ttattagacg	acgctcagtg	aatacaggga	gtgcagactc	ctgccccctc	
10301	caacagcccc	cccaccctca	tccccttcat	ggtcgctgtc	agacagatcc	
10351	aggtctgaaa	attccccatc	ctccgaacca	tcctcgtcct	catcaccaat	10
10401	tactcgcagc	ccggaaaaact	cccgtgaac	atcctcaaga	tttgcgtcct	
10451	gagcctcaag	ccaggcctca	aattcctcgt	cccccttttt	gctggacggt	
10501	agggatgggg	attctcggga	cccctcctct	tcctcttcaa	ggtcaccaga	
10551	cagagatgct	actggggcaa	cgaagaaaa	gctgggtgcg	gcctgtgagg	
10601	atcagcttat	cgatgataag	ctgtcaaaca	tgagaattct	tgaagacgaa	
10651	agggcctcgt	gatacgccta	tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	
10701	gtttcttaga	cgtcaggtgg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	
10751	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	
10801	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	
10851	attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgctg	cattttgcct	20
10901	tcctgttttt	gctcaccag	aaacgctggt	gaaagtaaaa	gatgctgaag	
10951	atcagttggg	tgcacgagtg	ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	
11001	aagatccttg	agagttttcg	cccgaagaa	cgtttttcaa	tgatgagcac	
11051	ttttaagtt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	atcccggtgt	gacgccgggc	
11101	aagagcaact	cggtcgccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	
11151	tactcaccag	tcacagaaaa	gcatcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	
11201	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaacttac	
11251	ttctgacaac	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgacaac	
11301	atgggggagc	atgtaactcg	ccttgatcgt	tgggaaccgg	agctgaatga	
11351	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgca	gcaatggcaa	30
11401	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	
11451	caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	
11501	gcgctcggcc	cttccggctg	gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	
11551	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	
11601	ccctcccgtg	tcgtagtatt	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	
11651	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgctcactg	attaagcatt	
11701	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	
11751	cttcattttt	aattttaaag	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	
11801	catgacccaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttcactga	gcgtcagacc	
11851	ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	40
11901	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	
11951	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	

【表 1 1 G】

12001	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	
12051	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	tgctaatacct	
12101	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	
12151	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	
12201	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcgca	acgacctaca	ccgaactgag	
12251	atacctacag	cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	
12301	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	
12351	agggagcttc	cagggggaaa	cgctgggtat	ctttatagtc	ctgtcggggt	10
12401	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	
12451	ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	cctttttacg	gttcctggcc	
12501	ttttgctggc	cttgaagctg	tcctgatgg	tcgtcatcta	cctgcctgga	
12551	cagcatggcc	tgcaacgcgg	gcatcccgat	gccgcgggaa	gcgagaagaa	
12601	tcataatggg	gaaggccatc	cagcctcgcg	tcgcgaacgc	cagcaagacg	
12651	tagcccagcg	cgtcggcccc	gagatgcgcc	gcgtgcggct	gctggagatg	
12701	gcggacgcga	tggatatgtt	ctgccaaggg	ttggtttgcg	cattcacagt	
12751	tctccgcaag	aattgattgg	ctccaattct	tggagtgggtg	aatccgtag	
12801	cgaggtgccg	ccctgcttca	tcccctgggc	ccgttgctcg	cgtttgctgg	
12851	cggtgtcccc	ggaagaaata	tatttgcatg	tctttagttc	tatgatgaca	20
12901	caaaccgccg	ccagcgtctt	gtcattggcg	aattcgaaca	cgcatatgca	
12951	gtcggggcgg	cgcggtccga	ggtccacttc	gcatattaag	gtgacgcgtg	
13001	tggcctcgaa	caccgagcga	ccctgcagcg	acccgcttaa	cagcgtcaac	
13051	agcgtgccgc	agatcccggg	gggcaatgag	atatgaaaaa	gcctgaactc	
13101	accgcgacgt	ctgtcgagaa	gtttctgata	gaaaagtctg	acagcgtctc	
13151	cgacctgatg	cagctctcgg	agggcgaaga	atctcgtgct	ttcagcttcg	
13201	atgtaggagg	gcgtggatat	gtcctgcggg	taaatagctg	cgccgatggg	
13251	ttctacaaag	atcgttatgt	ttatcggcac	tttgcatcgg	ccgcgctccc	
13301	gattccggaa	gtgcttgaca	ttggggaatt	cagcgagagc	ctgacctatt	
13351	gcatctcccc	ccgtgcacag	ggtgtcacgt	tgcaagacct	gcctgaaacc	30
13401	gaactgcccg	ctgttctgca	gccggtcgcg	gaggccatgg	atgcgatcgc	
13451	tgcgggccgat	cttagccaga	cgagcgggtt	cggccatttc	ggaccgcaag	
13501	gaatcgggtca	atacactaca	tggcgtgatt	tcatatgcgc	gattgctgat	
13551	ccccatgtgt	atcactggca	aactgtgatg	gacgacaccg	tcagtgcgtc	
13601	cgtcgcgcag	gctctcgatg	agctgatgct	ttgggcccag	gactgccccg	
13651	aagtccggca	cctcgtgcac	gcggatttctg	gctccaacaa	tgtcctgacg	
13701	gacaatggcc	gcataacagc	ggtcattgac	tggagcgagg	cgatgttcgg	
13751	ggattcccaa	tacgaggtcg	ccaacatctt	cttctggagg	ccgtgggttg	
13801	cttgtatgga	gcagcagacg	cgctacttctg	agcggaggca	tccggagctt	40
13851	gcaggatcgc	cgcggtctcg	ggcgtatatg	ctccgcattg	gtcttgacca	
13901	actctatcag	agcttggttg	acggcaattt	cgatgatgca	gcttggggcg	
13951	agggtcgtatg	cgacgcaatc	gtccgatccg	gagccgggac	tgtcggggcgt	

## 【表 1 1 H】

14001 acacaaatcg cccgcagaag cgcggccgctc tggaccgatg gctgtgtaga  
14051 agtactcgcc gatagtggaa accgacgccc cagcactcgt ccggatcggg  
14101 agatggggga ggctaactga aacacggaag gagacaatac cggaaggaac  
14151 ccgcgctatg acggcaataa aaagacagaa taaaacgcac ggggtgtggg  
14201 tcgtttgttc ataaacgcg ggttcggtcc cagggctggc actctgtcga  
14251 taccccaccg agacccatt ggggccaata cgcgcgctt tcttcctttt  
14301 cccacccca cccccaagt tcgggtgaag gcccagggt cgcagccaac  
14351 gtcggggcgg caggccctgc catagccact ggccccgtgg gttagggacg  
14401 gggccccca tggggaatgg tttatggttc gtgggggtta ttattttggg  
14451 cgttgctgg ggtcaggtcc acgactggac tgagcagaca gacctatggt  
14501 ttttgcatgg cctgggcatg gaccgcatgt actggcgca cacgaacacc  
14551 gggcgtctgt ggctgcaaaa ccccccgac ccccaaaaac caccgcgcgg  
14601 atttctggcg tgccaagcta

10

## 【0 1 7 5】

付属書 2 : 発現カセット G D 5 3 2 - G L u c の配列 ( 配列番号 2 )

【表 1 2 A】

tgggtggggc actttaggac tgtggttcat ttgaattggt gtaaacaata caccggttct	60	
actgtcctac agcctccatt cagatgactg aagtcattggg actttcagca tagctagctg	120	
atgacagtgc atactatttt gtcccaaaat ccagttcaag catggacata ccaataagag	180	
cctaagctct ttaaaggcaa aggaccagga attgtacagt tcttggtata gaagaagaca	240	
ggcaaaagtg tttttgaact aacgttaaatt gtgcaatatg ttagaattca tgcaatgcac	300	
aggactgcag gattctgata tcttatttaa ctctcaaatt ctattcaact caataaacct	360	10
tgactgtgct tctactaaat gcaggatttg tactaggagc tgaggacacc aaactgatga	420	
agtccttgct gtcaagaaac tcacatgatt ccctaattct ttgtcagctt gctgtgatca	480	
cattttcttc ccaagaacct ctaagaaatg cctagtggat agaaccttg agttccacgg	540	
aacatattaa caatcgccaa atgatgactc aggctagatt gtgtaattca ggttttgtct	600	
gcaaaactga aaatgcttcg gtaacctacc taaatttcaa tgttgaggaa ttctttaaga	660	
aagacatcaa atgttaagat ttaaggcata gatatgagat acatagtcac gcttaggtga	720	
attatgcact gaccatgacc atttctttac tcaaagtgtg tccatggctg acaacacagt	780	
gaaaaaatga gtgcaaaatg acaactcaaa taaatgaacc agaaaacctc tcacttttct	840	20
tttccacca attaagatca agagagctgg agaatatatt gtctagagtg ataaaaacat	900	
aagggtgcaa aacttccagg tacctttgca gaaattactt ctgtgacctt tggctgtaca	960	
gcaaccttaa taatgcaagc actgttttga atgcaagcat gtgggagcca ttttcaccac	1020	
ttttgatgac ttcagtaggt ttaagaaatg tttttgcttt tattgcataa accataaaac	1080	
aaaggaaggg acttttgaac tactcagtga gagtctatat attaaagttt gtttttcaaa	1140	
aatgtgtaac taccatttgc agtttttaaag gtctgctttc cacctacaag ttgccattat	1200	
ctcaaaggtg aaatttttagc atatgactaa aaacttccta tagttacagc ttcatgattc	1260	30
agcatctaac atcaataatt cacagtgaga tcataggagg ctctctgtgg aaggtaacga	1320	
catacatagc ttaggaaagg aagcttaggg catatcgaga gcattttgaa tttagacttg	1380	
tgggctgtgt ggggtgtcaga tggttgtctc tcagctgggtg ggcgccaga aggatccttg	1440	
tttgggcaag gctctttgag aaaggagaat ctgggttgcc agggattccc acatgtgggc	1500	
accagctccc cacgcagacc agctcacgat ttcccagtta caccgggcag gtgggaaacc	1560	
gttctgcttt ctgtggaaaa gattctaact tggttccctg ccatccctga atacaaacgg	1620	
gttgggtttt cttttttgag cttccaaccc ttgcagcttt ccaaaaataa atcaaaccag	1680	40
ccatcagggc accgaaataa tactactgct aataagcagc ttgcctaga cttagataaa	1740	
caacacttct gaggtaaact ttgccccgga ggtctggaga cactttttta atgtaacctg	1800	



【表 1 2 B】

cttactaata attactagac ttcagtgcac taaccctgga aatagatttt aatagccacc	1860
ccttaaaaca aaagacatga aaagataata agaaaaaagt gccgcaacta ttatagaaaa	1920
acacttgcca gcttgcctca gcccaagctg aggccacctc tagcctctgc taaagcccc	1980
cactcccaat ggtccccgcc aaccggataa gagtgcgcgc gggacccgcc ttccctctc	2040
ggcaccgccc ccgccccgc cccctcggtc cgctcccg gcggctcctc ccttttcgc	2100
tcctctcaac ctgactccag gagctgggtt caaattgctg gagcaggctg atttgcatag	2160
cccaatggcc aagctgcacg caaatgaggc ggaagggtgt tggctgaggg ttggcaggat	2220
aaccccgagg agcggggccc ttgtcctcc agtggctgtt aggcagtggtc tgggaggcag	2280
cggcccaatt agtgtcgtgc ggcccggtgc gaggcgaggt ccggggagcg agcgagcaag	2340
caaggcgcca ggggtggcgc gagctgcggc ggctggcaca ggaggaggag cccgggcggg	2400
cgagggcgcg ccggagagcg ccagggcctg agctgccgga gcggcgctc tgagtgagt	2460
cagaaagcag gcgcccgcgc gctagccgtg gcaggagcag ccgcacgcc gcgctctctc	2520
cctgggcgac ctgcagtttg caatatggga gtcaaatgtc tgtttgccct gatctgcac	2580
gctgtggcgc agccaagcc caccgagaac aacgaagact tcaacatcgt ggccgtggcc	2640
agcaacttcg cgaccacgga tctcgatgct gaccgcggga agttgcccgc caagaagctg	2700
ccgctggagg tgctcaaga gatggaagcc aatgcccgga aagctggctg caccaggggc	2760
tgtctgatct gcctgtccca catcaagtgc acgcccaga tgaagaagtt catcccagga	2820
cgctgccaca cctacgaagg cgacaaagag tccgcacagg gcggcatagg cgaggcgatc	2880
gtcgacattc ctgagattcc tgggttcaag gacttgagc ccatggagca gttcatcgca	2940
caggctgatc tgtgtgtgga ctgcacaact ggctgcctca aagggttgc caacgtgcag	3000
tgttctgacc tgctcaagaa gtggctgccg caacgctgtg cgaccttgc cagcaagatc	3060
cagggccagg tggacaagat caagggggcc ggtggtgact aatgcggccg cgactctaga	3120
tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc	3180
tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttatcgcg accccgataa	3240
cgtggtgttg tgctgtctgg cggcggacga ggacgacgac agagatgtgg ctctgcagat	3300
ccacttcacc ctgatccagg cgttttgcgt cgagaacgac atcaacatcc tgcgcgtcag	3360
caaccggggc cggctggcgc agctcctgct cttggagacc gacgctggcc ccgcggcgag	3420
cgagggcgcc gagcagcccc cggacctgca ctgcgtgctg gtgacggtaa gggactgggg	3480
gactgcagcc tgcagggtag agccccgga ggacgggagt caggactggg ttgcctgatt	3540
gtggatctgt gtaggtgag ggtcaggagg gtggctgcct ttgcccgact agagtgtggc	3600

10

20

30

40

【表 1 2 C】

tggactttca gccgagatgt gctagtttca tcatcaggat tttctgtggt acagaacatg	3660
tctaagcatg ctggggactg ccagcagcgg aagagatccc tgtgagtcag cagtcagccc	3720
agctactccc tacctacatc tgcactgcct cccgtgacta attccttttag cagggcagat	3780
tagataaagc caaatgaatt cctggctcac ccctcattaa ggagtcagct tcattctctg	3840
ccagtcagag ctaaaaatag aaattgtgta ggagacaaac ctgtttaatt ccctagaaat	3900
acattaagag gatagagtgg aatttttttt ctctgcaatc ttgcattttt ttaatggctc	3960
tttttttttt tcttgataaa aaccttttgg aggtagggaa gttatgtttt caggggtaaa	4020
tgtgctactt ttgtcttcta aattttgtct ttttttgact ggtctagtca agtgacagcc	4080
cgattatttt gctactcctt aaaagtacta ttctgtctct tggagtatgg ttgatggcaa	4140
ttccagttaa ctgctgtgca gctctcatct cattgtgcac acagcatgga aatctttctc	4200
aaaactgttt cactcaggtc agggtaacaa gtttggtaga gcaaaccggt gaatgatact	4260
ctcatgcaaa actgaacaga tatgcaaaca tatgtatgtg gttcagcttg ggttgcatgg	4320
gttcagactt tgcaatgtgt agtttaatag gtaattacc ttaacgcttt tgcagggaac	4380
ccaactacct tgaagaaact ttaatttttt tgtgcttcta atttgtctcc atgtcacata	4440
gccaaaatat agaatgttca agtgttttct cctcaaaagt ataattacta gaatatactg	4500
gttttttaaa taagtattatt tttataaatt tgtttcaga atccacattc atctcaatgg	4560
aaggatcctg ccttaagtca acttatttgt ttttgccggg aaagtcgcta catggatcaa	4620
tgggttcag tgattaatct ccctgaacgg tgatggcatc tgaatgaaaa taactgaacc	4680
aaattgcact gaagtttttg aaataccttt gtagttactc aagcagttac tccctacact	4740
gatgcaagga ttacagaaac tgatgccaag gggtgagtg agttcaacta catgttctgg	4800
gggcccggag atagatgact ttgcagatgg aaagaggtga aaatgaagaa ggaagctgtg	4860
ttgaaacaga aaaataagtc aaaaggaaca aaaattacaa agaaccatgc aggaaggaaa	4920
actatgtatt aatttagaat ggttgagtta cattaaaata aaccaaatat gttaaagttt	4980
aagtgtgcag ccatagtttg ggtatttttg gtttatatgc cctcaagtaa aagaaaagcc	5040
gaaagggta atcatatttg aaaaccatat tttattgtat tttgatgaga tattaaattc	5100
tcaaagtttt attataaatt ctactaagtt attttatgac atgaaaagtt atttatgcta	5160
taaatttttt gaaacacaat acctacaata aactggtatg aataattgca tcatt	5215

10

20

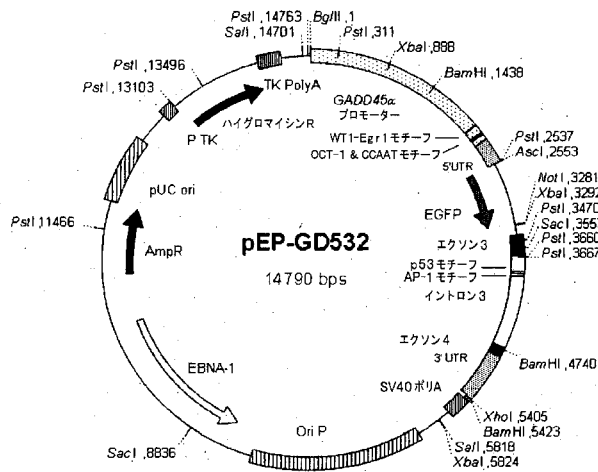
30

40

【 図 1 A 】

Figure 1: page 1

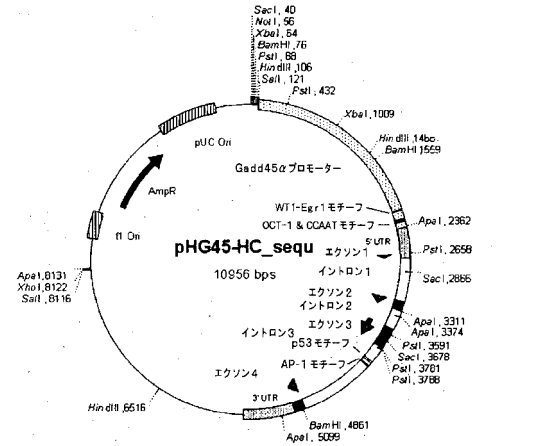
(A)



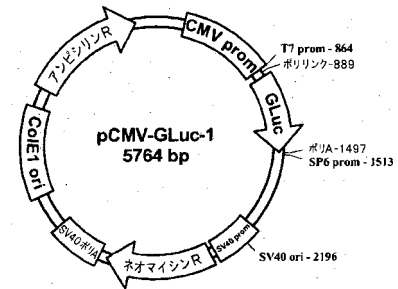
【 図 1 B 】

Figure 1: page 2

(B)



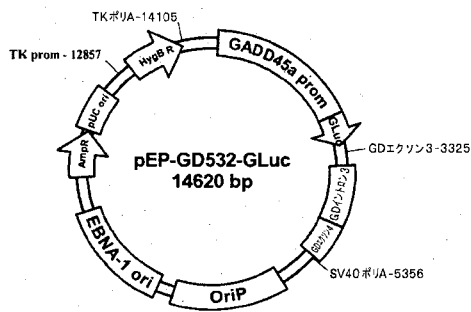
(C)



【 図 2 A 】

Figure 2: page 1

(A) pEP-GD532-GLuc



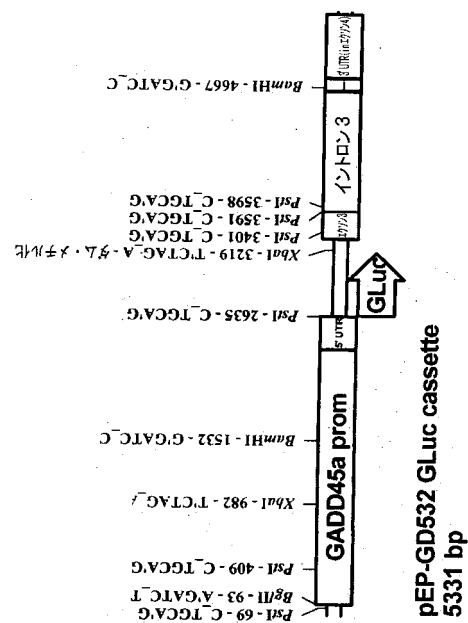
## 重要語:

GADD45a prom=GADD45αプロモーター領域  
 GLuc=ガウシア・ルシフェラーゼ・オープンリーディングフレーム (ヒト化)  
 GDエクソン3=GADD45αエクソン3  
 GDイントロン3=GADD45αイントロン3  
 GDエクソン4=GADD45αエクソン4  
 SV40ポリA=SV40ポリA配列  
 OriP=OriP複製起源  
 EBNA-1 ori=EBNA-1潜在性EBV複製起源  
 AmpR=アンピシリン耐性付与オープンリーディングフレーム  
 pUC ori=pUCベクターからの複製起源  
 TK prom=チミジンキナーゼ・プロモーター  
 HygR=ハイグロマイシンB耐性付与オープンリーディングフレーム  
 TKポリA=チミジンキナーゼポリA配列

【 図 2 B 】

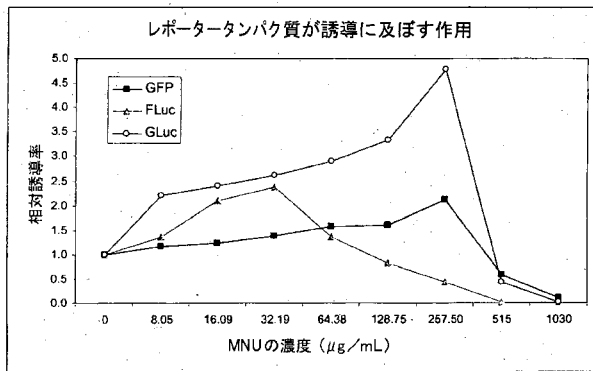
Figure 2: page 2

(B) GD532-GLuc発現カセット



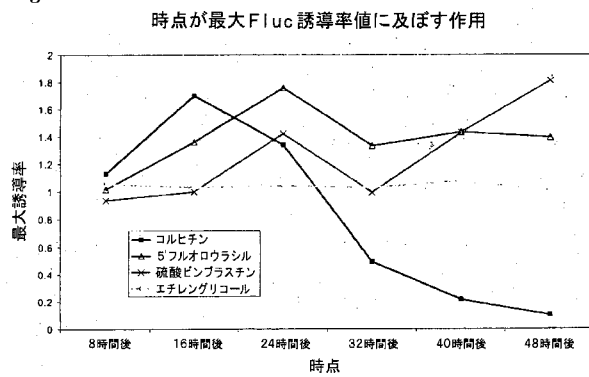
【図 3】

Figure 3



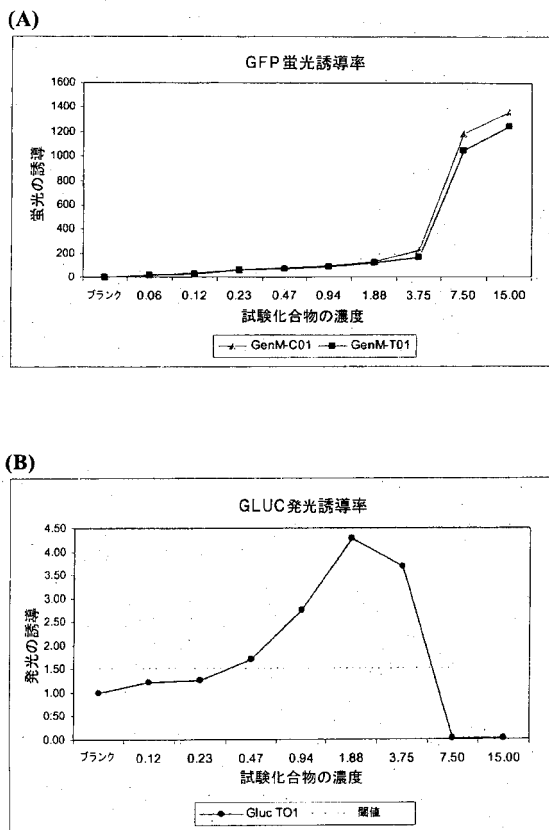
【図 4】

Figure 4



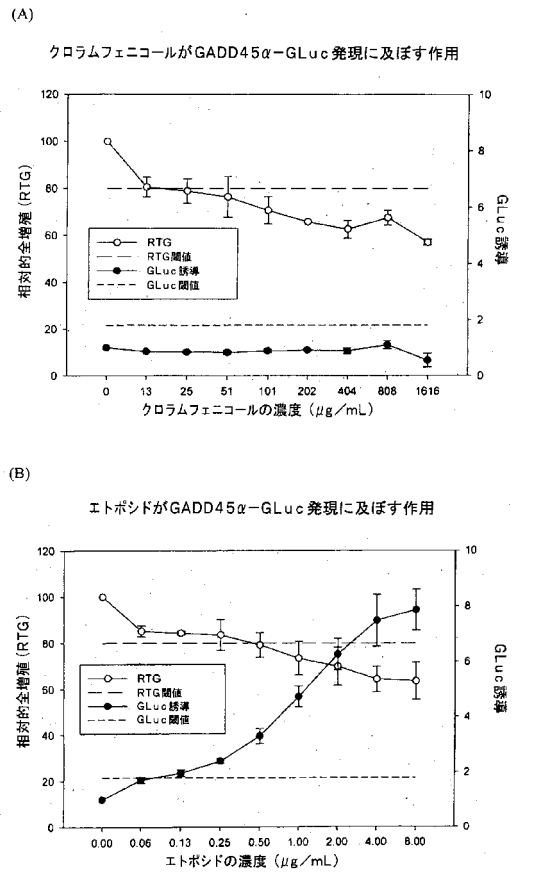
【図 6】

Figure 6: 高蛍光性化合物を使用したアッセイデータ



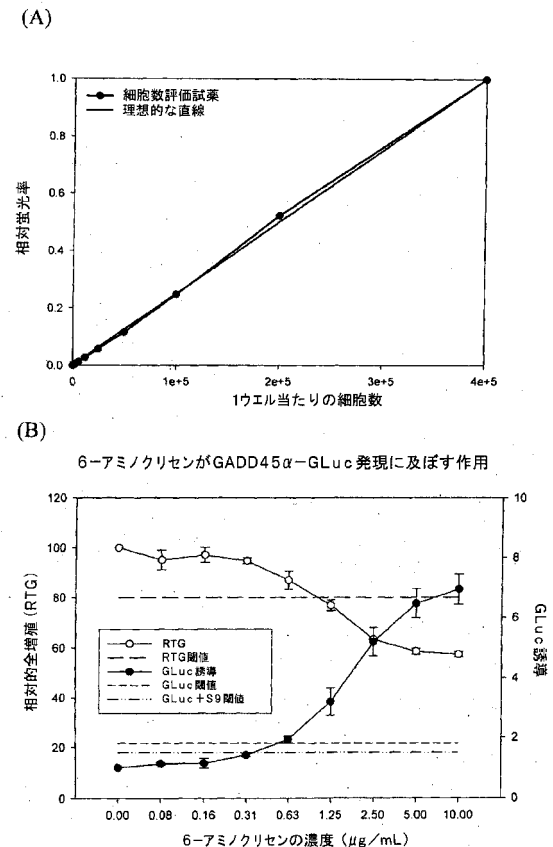
【図 5】

Figure 5-GLucアッセイを使用した典型的データ



【図 7】

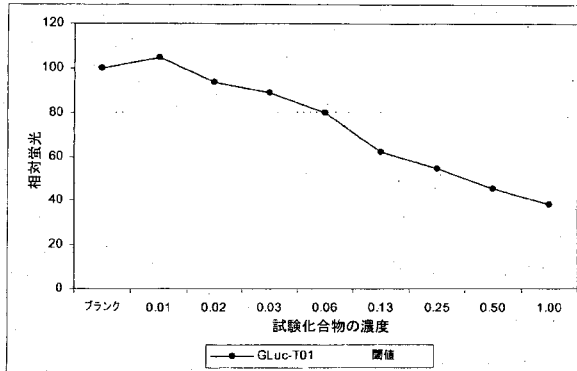
Figure 7: S9抽出物を用いたGLucアッセイ



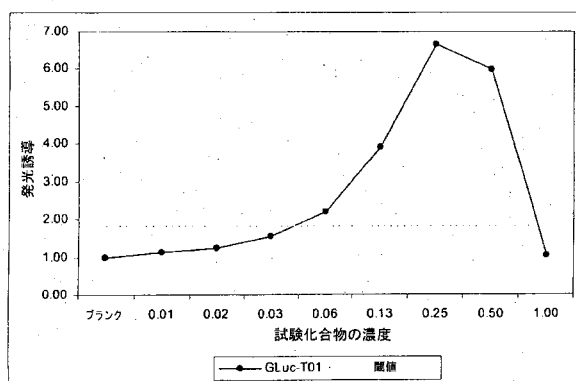
## 【図 8】

Figure 8: 384 ウェルフォーマットの原理証明

(A)



(B)



## 【配列表】

2012524523000001.xml

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2010/000581

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/68 G01N33/50 C12N15/79 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/113802 A2 (GENTRONIX LTD [GB]; HASTWELL PAUL [GB]; WALMSLEY RICHARD [GB]) 1 December 2005 (2005-12-01) claims 1-35 page 8, lines 1-7	1-25
Y	TANNOUS B A ET AL: "Codon-Optimized Gaussia Luciferase cDNA for Mammalian Gene Expression in Culture and in Vivo" MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US LNKD- DOI:10.1016/J.YMTHE.2004.10.016, vol. 11, no. 3, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 435-443, XP004757251 ISSN: 1525-0016 * abstract page 439, column 2, line 24 - page 442, column 1, line 11	1-25
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 August 2010		17/09/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Behrens, Joyce

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2010/000581

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TARGETING SYSTEMS: "Gaussia Luciferase Assay System"</p> <p>INTERNET CITATION</p> <p>1 January 2005 (2005-01-01), XP002392448</p> <p>Retrieved from the Internet:</p> <p>URL: <a href="http://www.targetingsystems.com/gaussia_luciferase_product_brochure20_05.pdf">http://www.targetingsystems.com/gaussia_luciferase_product_brochure20_05.pdf</a></p> <p>[retrieved on 2006-01-01]</p> <p>page 2</p>	1-25
Y	<p>WU CHUN ET AL: "Dual-reporter assay using two secreted luciferase genes"</p> <p>BIOTECHNIQUES, INFORMA LIFE SCIENCES PUBLISHING, WESTBOROUGH, MA, US,</p> <p>vol. 42, no. 3, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 290-292, XP009136932</p> <p>ISSN: 0736-6205</p> <p>page 292</p>	1-25
Y	<p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>7 August 2008 (2008-08-07), "Humanized Gaussia princeps luciferase (hGLuc) coding sequence, SEQ.ID 3."</p> <p>XP002594519</p> <p>retrieved from EBI accession no. GSN:ARW46012</p> <p>Database accession no. ARW46012</p> <p>the whole document</p>	1-25
Y	<p>DATABASE EMBL [Online]</p> <p>21 September 2002 (2002-09-21), "Luciferase, fluorescent protein, nucleic acids encoding luciferase and fluorescent protein and utilization thereof in diagnosis, high-process screening and novel item."</p> <p>XP002594520</p> <p>retrieved from EBI accession no. EMBL:BD137234</p> <p>Database accession no. BD137234</p> <p>the whole document</p>	1-25

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2010/000581

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HASTWELL P W ET AL: "High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: Validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay"</p> <p>MUTATION RESEARCH. GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTALMUTAGENESIS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.MRGENTOX.2006.04.011, vol. 607, no. 2, 5 September 2006 (2006-09-05), pages 160-175, XP025175734 ISSN: 1383-5718 [retrieved on 2006-09-05] * abstract</p>	1-25
A	<p>LIEBERMANN DAN A ET AL: "Gadd45 in stress signaling"</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR SIGNALING, BIOMED CENTRAL LTD, LO LNKD- DOI:10.1186/1750-2187-3-15, vol. 3, no. 1, 12 September 2008 (2008-09-12), page 15, XP021045430 ISSN: 1750-2187 * abstract</p>	1-25



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2010/000581

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005113802 A2	01-12-2005	AU 2005245661 A1	01-12-2005
		CA 2566925 A1	01-12-2005
		CN 1961080 A	09-05-2007
		EP 1747287 A2	31-01-2007
		JP 2007537745 T	27-12-2007
		US 2007224609 A1	27-09-2007

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100142996  
弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100154298  
弁理士 角田 恭子

(74)代理人 100162330  
弁理士 広瀬 幹規

(74)代理人 100166268  
弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379  
弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100161001  
弁理士 渡辺 篤司

(72)発明者 ラビノウィッツ, アダム  
イギリス国, ロンドン エヌダブリュー4・1エルピー, ホルダーズ・ヒル・ロード, フリーランド・パーク 23

(72)発明者 ウォームズリー, リチャード  
イギリス国, マーブル エスケイ6・6エイジェイ, ステーション・ロード 55

(72)発明者 テイト, マシュー  
イギリス国, ウェスト・ヨーク ダブリューエフ2・6エルエフ, ウェイクフィールド, ウォルトン, シェイ・レイン 141 ビー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 AA11 CA01 DA03 EA04 FA02 GA11 HA08  
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ16 QQ17 QQ20 QQ61 QQ91 QR51 QR77  
QR80 QS03 QS28 QS36 QS38 QS39 QX01 QX02  
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA46