

新規試験法評価書

SHE細胞形質転換試験法 (SHE CTA)

平成30年 3 月

国立医薬品食品衛生研究所

新規試験法評価書

平成 30 年 3 月 30 日

No. 2017-05

SHE細胞形質転換試験法（SHE CTA）に関する評価

平成 30 年 2 月 21 日に川崎、国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の評価がなされた。

評価内容： SHE 細胞形質転換試験法（SHE CTA）において陽性の結果が得られた場合、その被験物質をがん原性物質と判定することは科学的にも、また行政的にも困難であり、したがって本試験をがん原性試験に置き換えることは現状では不適切である。本試験の行政上の利用にあたっては、構造活性相関などと組み合わせて補助的な試験、例えば WoE に基づく評価の際の一つの項目、あるいはがん原性試験実施の優先順位付けのためのスクリーニング試験として位置付けた上で使用されるべきである。

この評価書は、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidance Document on the In Vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment No 214等をもとに、形質転換試験資料編纂委員会により作成された「SHE 細胞形質転換試験法（SHE CTA）評価報告書」を用いて、JaCVAM 評価会議が評価および検討した結果、その位置付けが確認されたことから作成された。



大野泰雄

大野泰雄

JaCVAM 評価会議 議長



西川秋佳

西川秋佳

JaCVAM 運営委員会 委員長

JaCVAM 評価会議

- 大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団) : 座長
飯塚 尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会)
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
仲井 俊司 (日本化学工業協会)
中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
野口 真希 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
森田 健 (日本環境変異原学会)
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

*：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

**：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

JaCVAM 運営委員会

- 西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター) : 委員長
川西 徹 (国立医薬品食品衛生研究所)
大原 拓 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課)
小川久美子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)
加藤 篤 (国立感染症研究所)
諫田 泰成 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部)
小池絏一郎 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
高木 篤也 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 動物管理室)
東野 正明 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
平林 容子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部)
広瀬 明彦 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部)
廣田 光恵 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
淵岡 学 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
本間 正充 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部)
渡邊 伸一 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課)
小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部
第二室) : 事務局


JaCVAM Statement on the Syrian Hamster Embryo Cell Transformation Assay

At a meeting held on 21 February 2018 at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Kawasaki, Japan, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

Proposal: We do not consider the present Syrian Hamster Embryo Cell Transformation Assay (SHE CTA) to be suitable as a replacement for established carcinogenicity tests, nor is it suitable for predicting the carcinogenicity of a test chemical, either in a scientific or a regulatory context, even when positive test results are obtained. The SHE CTA can only be considered for regulatory use as a supplementary test in combination with structure-activity relationships, such as one item to be considered in a weight-of-evidence approach to evaluation or part of screening to determine prioritization for the implementation of carcinogenicity tests.

This statement was prepared following a review of the Guidance Document on the In Vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment No. 214 together with other materials prepared by the Cell Transformation Testing JaCVAM Editorial Committee to acknowledge that the results of a review and study by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board have failed to confirm the usefulness of this assay.


Yasuo Ohno
Chairperson
JaCVAM Regulatory Acceptance Board


Akiyoshi Nishikawa
Chairperson
JaCVAM Steering Committee

30 March 2018

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board was established by the JaCVAM Steering Committee, and is composed of nominees from the industry and academia.

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Yasuo Ohno (Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences) : Chairperson

Mr. Naofumi Iizuka (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)*

Mr. Yoshiaki Ikarashi (National Institute of Health Sciences: NIHS)

Mr. Noriyasu Imai (Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)

Mr. Tomoaki Inoue (Japanese Society of Immunotoxicology)

Mr. Yuji Ishii (Biological Safety Research Center: BSRC, NIHS)

Ms. Yumiko Iwase (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)

Mr. Takeshi Morita (Japanese Environmental Mutagen Society)

Mr. Shunji Nakai (Japan Chemical Industry Association)

Ms. Ruriko Nakamura (National Institute of Technology and Evaluation)

Mr. Akiyoshi Nishikawa (BSRC, NIHS)

Ms. Maki Noguchi (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)**

Mr. Satoshi Numazawa (Japanese Society of Toxicology)

Mr. Kazutoshi Shinoda (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)

Ms. Mariko Sugiyama (Japan Cosmetic Industry Association)

Mr. Hiroo Yokozeki (Japanese Society for Cutaneous Immunology and Allergy)

Term: From 1st April 2016 to 31st March 2018

*: From 1st April 2016 to 31st March 2017

** : From 1st April 2017 to 31st March 2018

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM Steering Committee after receiving the report from JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Akiyoshi Nishikawa (BSRC, NIHS): Chairperson
Mr. Toru Kawanishi (NIHS)
Mr. Manabu Fuchioka (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Ms. Yoko Hirabayashi (Division of Toxicology, BSRC, NIHS)
Mr. Akihiko Hirose (Division of Risk Assessment, BSRC, NIHS)
Ms. Mitsue Hirota (Pharmaceutical & Medical Devices Agency)
Mr. Masamitsu Honma (Division of Genetics and Mutagenesis, BSRC, NIHS)
Mr. Yasunari Kanda (Division of Pharmacology, BSRC, NIHS)
Mr. Atsushi Kato (National Institute of Infectious Diseases)
Mr. Kouichirou Koike (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Ms. Kumiko Ogawa (Division of Pathology, BSRC, NIHS)
Mr. Taku Oohara (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Kazutoshi Shinoda (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Atsuya Takagi (Animal Management Section of the Division of Toxicology, BSRC, NIHS)
Mr. Masaaki Tsukano (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Shinichi Watanabe (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Hajime Kojima (Division of Risk Assessment, BSRC, NIHS): Secretary

SHE 細胞形質轉換試験法 (SHE CTA)

目 次

評価会議報告書 -----	1
評価報告書 -----	7
GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO SYRIAN HAMSTER EMBRYO (SHE) CELL TRANSFORMATION ASSAY -----	33

評価会議報告書

SHE細胞形質転換試験法 (SHE CTA)

JaCVAM 評価会議

平成 30 年 (2018 年) 2 月 21 日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団): 座長
飯塚 尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会)
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
仲井 俊司 (日本化学工業協会)
中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
野口 真希 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
森田 健 (日本環境変異原学会)
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

*：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

**：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

細胞形質転換試験（Cell Transformation Assay : CTA）は、培養細胞に化学物質を曝露することで起きる「細胞の形態」や「表現形質」の変化を指標として腫瘍誘発性の有無を調べる試験法の一つである。シリアン・ハムスター胎児（Syrian Hamster Embryo : SHE）細胞を用いる CTA では、初代培養細胞を凍結・解凍した正常二倍体細胞を用いて、目的とする化学物質を曝露した後、形態形質転換コロニーの出現率によって、化学物質の形質転換能の有無を評価する。

SHE CTA については、OECD により Detailed Review Paper 31 (DRP31) で 245 の化学物質が評価されている¹⁾。European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) によるプレバリデーション研究が実施され²⁻³⁾、EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) による第三者評価が行われ⁴⁾、ガイドライン化が推奨された⁵⁾。その後、SHE CTA 専門家会議による再評価が行われ⁶⁻⁷⁾、2015 年 5 月に OECD ガイダンスとして公表されている⁸⁾。JaCVAM 評価会議は、JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会により作成された「SHE 細胞形質転換試験法 (SHE CTA) 評価報告書」⁹⁾を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称： SHE 細胞形質転換試験法 (SHE CTA)

代替する対象毒性試験： げっ歯類を用いるがん原性試験

試験法の概略： 本試験法では、胎生 13 日目のシリアン・ハムスターから調製した初代培養細胞から作製した 2 代目の細胞（正常二倍体）を用いる。一部は X 線照射により増殖能を不活化させたフィーダー細胞（支持細胞）として、他は形質転換能を調べる標的細胞として使用する。フィーダー細胞上に標的細胞を播種した後、被験物質を 7 日間曝露した後、細胞を洗浄・固定して染色し、実体顕微鏡下でコロニーの形態を調べる。細胞毒性は、コロニー形成効率とコロニーの大きさや細胞密度の減少から評価する。形質転換能は、被験物質曝露群と溶媒対照群について、それぞれコロニーの総数に対する形態形質転換コロニー数の割合を算出して比較することにより評価する。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

本試験法は、EURL ECVAM による 6 種類の化学物質を用いたプレバリデーション研究²⁻³⁾とそれに続く ESAC による第三者評価により、哺乳類を用いたがん原性試験の代替法として評価されている⁴⁾。OECD ガイダンス 34 に基づいたバリデーション研究は実施されていないが、2015 年 5 月に公表された OECD ガイダンス⁸⁾では、がん原性を評価する試験戦略の一環として、あるいはがん原性にかかる証拠の重みづけ (Weight of Evidence : WoE) に本試験の結果を利用することは有用であるとされている。JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会では、現在まで公開されている情報¹⁻⁸⁾を基に本試験法のがん原性試験代替法としての科学的妥当性について評価した。SHE 細胞の形態形質転換は、多段階発がん過程の早期に起きる現象に相当しており、形質転換細胞は、継代培養後、同系統の動物やヌードマウスに対して約 50~100%の割合で造腫瘍性を示すことが知られている¹⁰⁻¹¹⁾。DRP31 には、複数の pH の培養液

(例えば、pH 6.7、pH 7.0 あるいはそれ以上) で試験された数多くの化学物質の SHE CTA 結果がまとめられ、遺伝毒性がん原物質および非遺伝毒性がん原物質の曝露により、SHE 細胞は形態形質転換することが示されている。EURL ECVAM は、標準プロトコル、技術移転性、および施設内再現性並びに施設間再現性を評価した結果、その有用性を認めている。また、EURL ECVAM の標準的プロトコルと DRP31 に示されたプロトコルとの間には基本的な差異はなく、回顧的評価において、いずれのプロトコルにより得られたデータも、受け入れ可能であるとされた。

細胞の形質転換の正確な分子生物学的メカニズムは十分には解明されておらず、SHE 細胞の形質転換メカニズムにも不明な点が多いが、そのメカニズムを解析する論文は数多くある。細胞周期制御システム、ゲノム安定性、および分化・増殖過程での遺伝子発現の変化や異常が形質転換の主たる要因として考えられている。これらの過程に影響を及ぼす遺伝的変異は直接的な遺伝毒性作用と考えられている。さらに、DNA の高メチル化あるいは低メチル化、ヒストン修飾およびヌクレオソームリモデリングによる遺伝子発現の変化や遺伝的不安定性が、エピジェネティックな変化を誘起し、悪性形質転換へと進行させる引き金になると考えられている。非遺伝毒性がん原物質もまた、多段階発がん過程に関与し、正常細胞を形質転換させるものと考えられている。すなわち、ギャップジャンクションによる細胞間コミュニケーションを阻害する酸化的ストレス、細胞分裂回数の増加、アポトーシスの減少、チュブリン合成阻害、テロメラーゼの活性化による老化の阻害、シグナル伝達過程の阻害、また、ホルモン介在過程やペロオキシゾームの増殖に関与する受容体への結合などである。このような科学的知見の多くが、がん化過程で判明している事実とその一部が整合することなどから、SHE CTA の科学的な検証は、完全ではないものの、現在の分子生物学的水準に基づいてある程度なされていると考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、培養正常細胞が形態形質転換することを指標にして、化学物質の腫瘍誘発性の有無を予測する試験法の一つであり、他のがん原性予測試験結果とともに、WoE の一つとして SHE CTA の結果を利用することができる。本試験法は、現行のがん原性試験に完全に置き換わる試験法としての位置づけではなく、補助的な試験（例えば、がん原性試験の実施順位を決めるためのスクリーニングなど）として位置づけることは可能である。本試験法では、動物胎児から初代培養細胞を調製する必要があるが、用いる動物数は、がん原性試験に比べてはるかに少なく、3Rs の観点から有用である。また、本試験法は、初代培養細胞から作製した 2 代目の細胞（正常二倍体）を用いることから、不死化培養細胞を用いる CTA と比較して、その反応はより正常細胞に近い状態を反映した系と考えられる。

DRP31 での 245 の化学物質を評価した結果において、SHE CTA の結果とがん原性試験結果との相関が認められる。SHE CTA の正確性については、動物を用いたがん原性試験との正確度、感度、特異度、偽陰性率および偽陽性率が、がん原物質を検出する遺伝毒性試験データと概ね同等又はそれ以上の結果が得られている。すなわち、異なる培養液 pH における SHE CTA の正確性の再評価では、pH 6.7 法 (93 化学物質) は、正確度 73%、感度 72%、特異度 74% で、pH 7.0 法 (42 化学物質) は、正確度 83%、感

度 80%、特異度 92%であった。いずれの pH でも、概ね同等の結果が得られており、共にその有用性は高いと考えられる。

一方、本試験については多種類の化学物質を用いたバリデーション研究が実施されておらず、試験方法が十分に検証されたとは言い難い。また、本試験の結果が陽性であっても、その化学物質の動物におけるがん原性の強さ、臓器特異性、種特異性および作用機序（イニシエーション/プロモーション作用）に関する情報は得られない。さらに、形質転換コロニーの判別には実験者の習熟（十分な教育訓練および経験）が必要である。試験を適切に実施するには、以下の事項を考慮する必要もある：1) 調製した SHE 細胞および使用するウシ胎児血清の適切性、2) フィーダー細胞の適切性とその調製における X 線照射装置の使用、3) 試験成立基準および結果判定基準の設定。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、実施に際し種々の条件があるものの、細胞培養ならびに形質転換コロニー判別に習熟した施設であれば実施でき、培養期間も 1 週間程度と短く、また試験費用も比較的安価である。一匹の妊娠動物由来の胎児細胞から 50 回の評価が可能な培養細胞が得られるという点で、3Rs の精神に合致しており、社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法において陽性の結果が得られた場合、その被験物質をがん原性物質と判定することは科学的にも、また行政的にも困難であり、したがって本試験をがん原性試験に置き換えることは現状では不適切である。本試験の行政上の利用にあたっては、構造活性相関などと組み合わせて補助的な試験、例えば WoE に基づく評価の際の一つの項目、あるいはがん原性試験実施の優先順位付けのためのスクリーニング試験として位置付けた上で使用されるべきである。

参考文献

- 1) OECD (2007). Detailed review paper on cell transformation assays for detection of chemical carcinogens, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 31.
- 2) ECVAM - The Validation Management Team (2010). Syrian Hamster Embryonic (SHE) cell pH 6.7 Cell Transformation Assay - Prevalidation study Report.
- 3) ECVAM - The Validation Management Team (2010). Syrian Hamster Embryonic (SHE) cell pH 7.0 Cell Transformation Assay - Prevalidation study Report.
- 4) ECVAM (2011). ESAC Working Group Peer Review Consensus Report on an ECVAM-coordinated

prevalidation study concerning three protocols of the Cell Transformation Assay (CTA) for in vitro carcinogenicity testing.

- 5) EURL ECVAM (2012). Recommendation on three Cell Transformation Assays using Syrian Hamster Embryo Cells (SHE) and the BALB/c 3T3 Mouse Fibroblast Cell Line for In Vitro Carcinogenicity Testing.
- 6) OECD (2014). Results of An Analysis of The Performance of The Syrian Hamster Embryo Cell Transformation Assay at PH 6.7 and PH 7.0, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 16.
- 7) OECD (2014). Report on the Evaluation of Genotoxic or Non-genotoxic Activity of the Organic Chemicals Tested in the SHE Cell Transformation Assay, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 17.
- 8) OECD (2015). Guidance Document on the In Vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment, No 214, ENV/JM/MONO (2015)18.
- 9) JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会 : SHE 細胞形質転換試験法 (SHE CTA) 評価報告書 (2017年3月31日).
- 10) Pienta RJ et al. (1977). Morphological transformation of early passage Golden Syrian Hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int. J. Cancer*, 19, 642-655.
- 11) Watanabe M et al., (1991). Expression dynamics of transforming phenotypes in X-irradiated Syrian golden hamster embryo cells. *Mutat. Res.*, 249, 71-80.

評価報告書

SHE 細胞形質転換試験法 (SHE CTA)

形質転換試験資料編纂委員会

平成 29 年 (2017 年) 3 月 31 日

形質転換試験資料編纂委員会

委員長 浅野哲秀 (元日東電工株式会社, 現大阪信愛女学院短期大学)
委員 筒井健機 (日本歯科大学)
山影康次 (一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所)
北本幸子 (住友化学株式会社)
笠松俊夫 (花王株式会社)
山本美佳 (アステラス製薬株式会社)

目 次

1. 要旨
2. 試験方法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性
3. 試験方法のプロトコルの妥当性
4. プレバリデーション研究に用いられた物質の分類と妥当性
5. 試験の正確性を評価するために用いられた化学物質の *in vivo* 参照データならびに参照データ作成の経緯
6. 試験データと結果の利用性
7. 試験方法の正確性
8. 試験方法の信頼性
9. 試験方法のデータの質
10. 試験方法に関する他の科学的な報告
11. 3Rs への関与（動物福祉面からの妥当性）
12. 試験方法の有用性と限界
13. 結論
14. 参考文献

Abbreviations

3Rs: Reduction, Replacement, and Refinement

CTA: Cell Transformation Assay

CGM: Complete Growth Medium

CIM: Cell Isolation Medium

DB-ALM: DataBase service on Alternative Methods to Animal Experimentation

DRF: Dose Range Finding assay

DRP: Detailed Review Paper

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee

EURL ECVAM: European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing

FBS: Foetal Bovine Serum

GD: Guidance Document

IARC: International Agency for Research on Cancer

MoA: Mode of Action

MTF: Morphological Transformation Frequency

NTP: National Toxicology Program

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

SHE: Syrian Hamster Embryo

UVBCs: Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products or Biological Materials

WoE: Weight of Evidence

WNT: Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program

1. 要旨

細胞の形質転換試験（Cell Transformation Assay: CTA）は、*in vitro*において、化学物質を曝露することで起きる「細胞の形態」や「表現形質」の悪性化を指標として腫瘍誘発性の有無を調べる試験法の一つである。

JaCVAM SHE 細胞形質転換試験資料編纂委員会は、OECD ガイダンス¹⁾として2015年5月に公表されたシリアン・ハムスター胎仔（Syrian Hamster Embryo: SHE）細胞を用いる CTA が化学物質のがん原性の予測に有用か否かについて検討し、その結果をまとめた。SHE 細胞を用いる CTA の特徴としては、用いる細胞が初代培養細胞である、基本的な代謝能を維持している、培養期間は1週間程度の短期である、試験費用は比較的安価である、しかし、形質転換したコロニー（細胞集落）を見極めるには十分な教育と訓練が必要であることなどが挙げられる。

SHE CTA は、試験方法やがん原性との相関に関する論文が多く出版され、その有用性についての議論も多くなされている。European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing（EURL ECVAM）によって、その試験方法に関するプレバリデーション研究が実施された。しかし、被験物質の数が少なく、しかも試験開始時には非遺伝毒性がん原物質と考えられていた物質が一種類存在したものの、OECD による SHE CTA 専門家会議による再評価結果²⁾では、非遺伝毒性がん原物質は含まれていないとの結論を得た。最終的には被験物質の数を増やしての正式なバリデーション研究は実施されなかったため、試験方法がバリデートされたとは言い難い。

しかしながら、がん原物質および非がん原物質を用いた研究によると、SHE CTA の試験方法の正確性については、動物を用いたがん原性試験との一致率、感度、特異度、偽陰性率および偽陽性率が、概ね、がん原物質を検出する遺伝毒性試験データと同等又はそれ以上の結果が得られおり、その有用性は高いと考えられる。

なお、本質的には、細胞が形質転換するメカニズムは未だ未解明な点が多く、CTA をもって動物を用いるがん原性試験に置き換えることは現段階では不適切であると考えられる。

このように SHE CTA が持つ固有の問題点は存在するが、化学物質による発がん機構の重要なステップである細胞の形質転換能を評価できる方法であり、実際、がん原物質の曝露により形質転換コロニーの数が増えるという事実を考慮すれば、がん原物質を検出していると考えられる。特に International Agency for Research on Cancer (IARC) グループ 1 および 2A に分類される化学物質において、SHE CTA とヒトのがん原性との相関があり、構造相関などと組み合わせることにより、がん原性を疑わせる化学物質などのスクリーニング系として応用することにより、動物数の大幅な削減が可能となり、3Rs の精神にも適う試験方法であると考えられる。このような観点から、SHE CTA はさらにデータを積み重ねることにより、化学物質のがん原性予測試験の有望な一つの試験法になると考えられる。

2. 試験方法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性

1) 科学的妥当性

一般的に *in vitro* における CTA とは、化学物質の曝露により培養細胞が不可逆的に形態的变化を起こすかどうかを調べる試験である。

SHE CTA は、シリアン・ハムスター胎仔に由来する初代細胞を凍結・解凍した 2 代目の細胞（正常二倍体細胞）を用いて、目的とする化学物質を *in vitro* で曝露した後、形態形質転換コロニーの出現率によって、化学物質の形質転換能の有無を評価する試験法である。SHE 細胞の形態形質転換は、多段階的腫瘍形成過程の早期に起きる現象に相当しており、形質転換細胞は、継代培養後、同系統の動物やヌードマウスに対して約 50%~100%の割合で造腫瘍性^{3,4)}を示すことが知られている。

OECD Detailed Review Paper31⁵⁾（以下 DRP31）には、複数の pH の培養液で試験された数多くの化学物質の SHE CTA 結果がまとめられ、遺伝毒性がん原物質および非遺伝毒性がん原物質の曝露により、SHE 細胞は形態形質転換することが示されている。EURLECVAM は、標準プロトコル、技術移転性、および施設内再現性ならびに施設間再現性を評価した結果、その有用性を認めている。また、EURLECVAM の標準的プロトコルと DRP31 に示されたプロトコルとの間には基本的な差異はなく、これらの得られたデータは回顧的評価において、受け入れ可能であるとされた。

細胞の形質転換の正確な分子生物学的メカニズムは十分には解明されていないのが現状である。SHE 細胞が形質転換するメカニズムには不明な点が多いが、そのメカニズムを解析する論文は数多くあり、形質転換は単一のメカニズムで誘引されないことも明らかになってきた。すなわち、細胞周期制御システム、ゲノム安定性、および分化・増殖過程での遺伝子発現の変化や異常が形質転換の主たる要因として考えられている。これらの過程に影響を及ぼす遺伝的変異は直接的な遺伝毒性作用と考えられている。さらに、DNA の高メチル化あるいは低メチル化、ヒストン修飾およびヌクレオソームリモデリングによる遺伝子発現の変化や遺伝的不安定性が、エピジェネティックな変化を誘起し、悪性形質転換へと進行させる引き金になると考えられている。

その他の知見として、

- ・ 不死化や悪性化した形質転換細胞における後期段階では、がん遺伝子 *ras* や *myc* に広汎的もしくは部位特異的に低メチル化がみられていること。
- ・ 細胞周期チェックポイント遺伝子のメチル化による遺伝子の発現抑制や *p53* 遺伝子の突然変異と同様、不死化シリアン・ハムスター皮膚細胞において、がん抑制遺伝子 *ink4a* や *ink4b* の対立遺伝子にヘテロまたはホモの欠失が観察されていること。
- ・ 形質転換した SHE 細胞株では細胞周期の G2 チェックポイントに障害が生じていること。
- ・ 他の細胞を形質転換させるような活性化プロトオンコジーン *cph* が悪性形質転換細胞から分離されていること。

などが報告されている。

非遺伝毒性がん原物質もまた、多段階発がん過程に関与し、正常細胞を形質転換させるものと考えられている。すなわち、ギャップジャンクションによる細胞間コミュニケーションを阻害する酸化的スト

レス、細胞分裂回数の増加、アポトーシスの減少、チューブリン合成阻害、テロメラーゼの活性化による老化の阻害、シグナル伝達過程の阻害、また、ホルモン介在過程やペルオキシゾームの増殖に関与する受容体への結合などである。

このような科学的知見の多くが、がん化過程で判明している事実とその一部が整合することなどから、SHE CTA の科学的な検証は、完全ではないが、現在の分子生物学的水準に基づいてある程度なされている試験と考えられる。

2) 規制上の妥当性

SHE CTA は単一の化学物質についてのみプレバリデーション研究が実施されており、いくつかの化学物質から構成されている物質、UVCBs、或いは混合物についてはバリデーション研究が実施されていないことを留意すべきである。こうした状況を考慮した上で、OECD のガイダンスドキュメント¹⁾が明確にしていることは、がん原性を評価する試験戦略の一環として、或いはがん原性にかかる WoE (証拠の重み付け) に SHE CTA 結果を利用することは有用であるとしている。また、SHE CTA は遺伝毒性がん原物質に対して高感受性をもつが、非遺伝毒性がん原物質に対しては未だ議論の余地があり、より多くの情報が求められているのも事実である。本試験法が OECD 試験法ガイドラインとして承認されなかった理由として指摘されていることは、形質転換細胞の評価に関して本質的な問題がそこには存在すること、すなわち、形質転換に至る分子生物学的作用機構の理解が限定的であることである。また SHE CTA の正確性分析で用いた非遺伝毒性がん原物質が少なかったこと^{1,2)}、SHE CTA の結果からは、*in vivo* におけるがん原性の強さ、種特異性または組織特異性などの情報は得られないことなどが指摘されている。

本試験法は現行のがん原性試験に完全に置き換わる試験法としての位置づけではなく、化学物質等のがん原性に関しての行政的な判断が必要になった場合、補助的な試験 (例えば Weight of Evidence: WoE) として位置づけることがその利用価値を高めるものと考えられる。

3. 試験方法のプロトコルの妥当性

1) 試験法の概略

SHE 細胞は胎生 13 日目のシリアン・ハムスター胎仔の初代培養から得られた正常二倍体細胞で、薬物代謝能や p53 活性を有する。SHE 細胞は、種々のタイプの細胞型から構成されるため、SHE CTA は株細胞からなる他の CTA 法と比較して、より生体に近い正常細胞に起こる変化を捉えることができる。多種多様ながん原物質を SHE 細胞に曝露するとまず形態形質転換が誘導され、形質転換細胞は、継代培養後、大部分が造腫瘍性マーカーである足場非依存性増殖能を獲得し、感受性を持つ動物に悪性腫瘍を形成することが知られている。

SHE CTA は被験物質の曝露によって、多段階的に進行する腫瘍形成過程の初期に起こる形質転換を検出する *in vitro* 試験法である。本試験法によって、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験からは入手できない被験物質に潜在する細胞形質転換能を検出することができる。

SHE CTA で得られた結果を包括的な試験戦略の一部や WoE に活用すれば、被験物質のもつ潜在的形

質転換能の評価に使えるばかりでなく、SHE CTA は、従来の動物を用いたがん原性試験の一部置き換え（Replacement）ならびに動物数の削減（Reduction）に貢献することになり、その意義は大きい。

2) 試験法の原理

- (1) SHE 細胞は胎生 13 日目のシリアン・ハムスター胎仔細胞の初代培養から得る。酵素で胎仔組織を消化後、細胞を収集し液体窒素中で保存する。凍結細胞の一部はフィーダー細胞（支持細胞）に、他は標的細胞に使用する。X 線照射で増殖能を不活化させた細胞をフィーダー細胞に用いる。フィーダー細胞は標的細胞への栄養補給と薬物代謝活性をサポートする目的で播種され、標的細胞は形態形質転換能を調べるために播種される。
- (2) 標的細胞は形成されるコロニーの発育を考慮して、CTA の試験成立基準を満たすに必要なクローニング効率を達成できるクローン密度でフィーダー細胞層上へ播種する。播種後、被験物質を 7 日間曝露する。その後、細胞を洗浄・固定し染色する。ディッシュはコード化し、実体顕微鏡検査でコロニーの形態的表現型を記録する。
- (3) 細胞毒性はコロニー形成効率とコロニーの大きさや細胞密度の減少から評価する。記録したコロニーの総数に対する形態形質転換コロニー数の割合を各試験濃度で算出する。被験物質曝露群の総コロニー数に対する形態形質転換コロニー数の割合を溶媒対照群のその割合と比較する。なお、コロニーサイズと密度等の状態は必要に応じて記録に残し、評価の参考とするが、形質転換率には寄与しない。

3) プロトコルの妥当性

以下の項目の問題点が明確にされており、妥当性は概ね確保されている。

(1) 実験系：

一腹のシリアン・ハムスター胎仔から得られた初代培養細胞を使用する。このことは最低でも 1 匹の妊娠ハムスターの安楽死を意味するが、細胞の適切な凍結保存によって、1 匹の妊娠ハムスターから少なくとも 50 回分の CTA を実施するのに必要で十分な細胞を得ることができる。

(2) SHE 細胞とウシ胎仔血清（FBS）のロット試験：

SHE 細胞、FBS とも使用に先立って、新しいロット毎に CTA に適切かどうかをチェックする。更に、適切であると判明した細胞と FBS を組み合わせて CTA を実施し、定められた試験成立基準を満たすかどうかの試験を行う。

(3) 被験物質のフィーダー細胞障害性確認：

(a) CTA への使用に先立って、フィーダー細胞だけをディッシュに播種・培養し、コロニー形成能のないことを確認する。

(b) 被験物質で選択的に障害された場合を除いて、被験物質曝露群のディッシュ上のフィーダー細胞を可視できなければならない。

(4) CTA 技術の熟達度確認試験：

CTA 実施施設は定められた作用機序の異なる陽性および陰性対照物質を用いて CTA を実施し、CTA 技術の熟達度を確保する。

(5) 使用する培地の pH (pH6.7 および pH7.0)：

CTA の実施に先立ち、適用する pH 条件で前述した CTA 技術の熟達度確認試験を実施し、熟達度を証明する。

(6) 両 pH 間の SHE CTA プロトコルの差異：

培地中の FBS 濃度に差はあるが、それ以外での差は認められない。

(7) 両 pH 間における SHE CTA パフォーマンスの差の有無：

いずれの pH でも CTA の結果は、感度、特異度とも同程度であり、大きな差は認められない。

(8) 試験成立基準：

CTA の結果はプロトコルで規定している試験成立基準に従い、判定する。

(9) CTA 評価の客観性の確保：

CTA にあたっては、被験物質や得られたデータについてコード化して評価する。

(10) コロニーの主観的スコアリングによるデータの変動：

この対策として、以下のことを実施する。

(a) 施設内外の CTA 経験者によるスコアラーのトレーニング

(b) 種々の正常および形質転換コロニーの写真見本の利用 (スコアリングにあたっては、常時写真見本を参考にする)

(c) セカンドオピニオン (他のスコアラーまたはスコア経験者の意見を参考にする) や他のスコアラーによる二重スコアリング

(d) ディッシュのコード化

(11) 結果判定基準

CTA の結果をプロトコルで定めた結果判定基準に従い、判定する。

4. プレバリデーション研究に用いられた物質の分類と妥当性

プレバリデーション研究^{6,7)}に供された 6 物質のうち、4 物質ががん原物質で、そのうちの 3 物質は遺伝毒性物質、1 物質は非遺伝毒性物質であると試験開始時には評価されていたものの、SHE CTA 専門家会議による再検討結果から、4 物質は全て遺伝毒性物質であったと判断された²⁾。残る 2 物質は非遺伝毒性非がん原物質である。全体で 6 物質と化合物数は少なく、大部分が多環芳香族炭化水素と芳香族アミンで、被験物質の作用メカニズムに偏りがみられた。また、陽性物質は明らかな陽性反応を示す化合物が多く (4/6)、がん原性のあいまいな反応を示す化合物は含まれなかったものの、陰性物質も 33% (2/6) を占めており、選ばれた化合物は妥当であると考えられた。

< Genotoxic carcinogens >

- Benzo(a)pyrene
- 2,4-Diaminotoluene
- 3-Methylcholanthrene
- o-Toluidine*

*試験開始当時は equivocal または inconclusive genotoxic carcinogen を non-genotoxic carcinogen であると解釈していた。

< Non-genotoxic non-carcinogen >

- Anthracene
- Phthalic anhydride

5. 試験の正確性を評価するために用いられた化学物質の *in vivo* 参照データならびに参照データ作成の経緯

非遺伝毒性がん原物質を検出する *in vitro* 試験法の開発の重要性が指摘されたことを受け、1997年から「Non-Genotoxic Carcinogens Detection: the Performance of *In Vitro* Cell Transformation Assays」と題する Detailed Review Paper の作成が開始された。それは、SHE 細胞、BALB/c 3T3 細胞および C3H10T1/2 細胞を用いる CTA に焦点が当てられた。2001年に最初の案が The Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT) に回覧され、各国の専門家からの広範囲にわたるコメントをもとに改定版が作成されたが、最終化には至らなかった。2002年には、第2案が回覧され、再び多数のコメントが出されたことから、フランス (SHE 細胞)、日本 (BALB/c3T3 細胞)、カナダ (C3H10T1/2 細胞) の3国が、それぞれの細胞を用いた各試験法について改定作業を継続して進めた結果、2006年に第3案が提示された。第3案に対するコメントへの議論 (ワシントン会議) を経て第4案が作成された。この第4案「DETAILED REVIEW PAPER ON CELL TRANSFORMATION ASSAYS FOR DETECTION OF CHEMICAL CARCINOGENS」がいわゆる DRP31 として2007年4月に開催された WNT19 で承認され最終化された。表題が変更されていることから分かるように、この DRP31 は、がん原物質の検出における CTA の意義を主目的とし、非遺伝毒性がん原物質の *in vitro* 検出系としての分析は次の課題とされた。

CTA に関しては、上述の DRP31 作成経緯にあるように SHE 細胞以外に BALB/c 3T3 細胞あるいは C3H10T1/2 などの細胞が用いられている。これらの細胞での形質転換能と *in vivo* がん原性との相関については、DRP31 が参照し得るデータ集である。

DRP31 では、げっ歯類におけるがん原性試験データ、遺伝毒性データと3種類の CTA データがまとめられている。がん原性試験データに関しては、IARC および NTP のデータが採用されている。

DRP31 では、SHE CTA の結果とげっ歯類でのがん原性試験結果の両方が記載された化学物質の数は245である。その内訳は、がん原物質が175物質、非がん原物質が70物質である。内訳は、有機化合物が190物質 (がん原物質:127物質、非がん原物質:63物質)、無機化合物が55物質 (がん原物質:48物質、非がん原物質:7物質) であった (Appendix 1)。

SHE CTA ガイドラインの作成過程において、データの再評価が実施された。Chemical Carcinogenesis Research Information System, NTP, IARC Monographs (1-106), PubMed,および CLP/GHS のデータベースを用いて、SHE CTA のデータのみならず、遺伝毒性に関するデータおよびがん原性のデータについても再評価された。その結果、対象となった 108 物質（がん原物質 66 物質、非がん原物質 42 物質）について、再評価されたデータが示された²⁾。

6. 試験データと結果の利用性

プレバリデーション研究に用いた 6 物質（陽性 4 物質、陰性 2 物質）のデータは、試験方法の信頼性の評価に用いることが出来る。施設間再現性の評価には 6 物質全てのデータが用いられた。一方、施設内再現性の評価には陽性対照物質として使われた Benzo[a]pyrene のみの結果が用いられ、1 施設ではコード化して繰り返し 3 回実施（pH7.0 法）し、良好な結果が得られたが、他の 3 施設については、毎回コード化せずに陽性対照として実施し、得られた値を比較した結果（pH6.7 法）しか示されていない。このように、強い陽性反応を示す 1 化合物のみで施設内再現性試験が実施されていること、また、同一プロトコルで実施された試験ではないことから、施設内再現性を評価するには十分とは言い難い。

DRP31 で評価した物質のデータは、試験方法の正確性の評価に用いることが出来る。265 物質のうち、157 物質はドラフトテストガイドライン（OECD, Feb. 2013）で定められた pH や被験物質処理時間で実施されていないため、正確性の評価から除外された。残る 108 物質がドラフトテストガイドラインのクライテリアに従って再評価され、その結果が試験方法の正確性の評価⁸⁾に使われた。

7. 試験方法の正確性

DRP31 には、遺伝毒性データ、げっ歯類動物のがん原性試験データと 3 種類の *in vitro* CTA データがまとめられ、がん原性評価における CTA データの正確性について報告されている。SHE CTA の結果については、培養液の pH が異なる試験データが蓄積されていることから、pH6.7 および pH7.0 以上の 2 つに分けて解析されている（表 1、表 2）。

がん原性評価における SHE CTA および各種遺伝毒性試験データについては、DRP31 の Annex に報告されており、それを編集した表 3 に示した通り、がん原性と SHE CTA の一致率は各種の遺伝毒性試験のそれと同等以上であり、偽陽性率および偽陰性率は低いと言う結果となっている。また、表 4 に示す通り、各種遺伝毒性試験と CTA に共通する物質の試験結果についてがん原性との一致率をみても、SHE CTA は良好な結果を示している。

表1 がん原性評価における SHE CTA (pH6.7 法) の正確性

SHE CTA		<i>In vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
陽性		36	5
陰性		18	29

一致率 (Concordance) : $(36+29)/(36+5+18+29) \times 100 = 65/88 \times 100 = 74\%$

感度 (Sensitivity) : $36/(36+18) \times 100 = 36/54 \times 100 = 67\%$

特異度 (Specificity) : $29/(5+29) \times 100 = 29/34 \times 100 = 85\%$

偽陰性率 (False Negative) : $18/(36+18) \times 100 = 18/54 \times 100 = 33\%$

偽陽性率 (False Positive) : $5/(5+29) \times 100 = 5/34 \times 100 = 15\%$

表2 がん原性評価における SHE CTA (pH7.0 法) の正確性

SHE CTA		<i>In vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
陽性		131	17
陰性		11	33

一致率 (Concordance) : $(131+33)/(131+17+11+33) \times 100 = 164/192 \times 100 = 85\%$

感度 (Sensitivity) : $131/(131+11) \times 100 = 131/142 \times 100 = 92\%$

特異度 (Specificity) : $33/(17+33) \times 100 = 33/50 \times 100 = 66\%$

偽陰性率 (False Negative) : $11/(131+11) \times 100 = 11/142 \times 100 = 8\%$

偽陽性率 (False Positive) : $17/(17+33) \times 100 = 17/50 \times 100 = 34\%$

表3 がん原性評価における SHE CTA と各種遺伝毒性試験の比較

	SHE CTA		Ames	ML	HPRT	CA		MN
	pH6.7 法	pH7.0 法				<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>
一致率 (%)	74	85	52	72	78	62	60	58
感度 (%)	67	92	39.5	86	80	65	57	58
特異度 (%)	85	66	79	26	70	59	68	55
偽陰性率 (%)	33	8	60.5	14	20	35	43	42
偽陽性率 (%)	15	34	21	74	30	41	32	45
評価物質総数	88	192	315	215	135	238	110	198
非がん原物質率 (%)	39	26	29	30	22	30	29	25

Ames : 復帰突然変異試験、ML : マウスリンフォーマ TK 試験、

HPRT : 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験、CA : 染色体異常試験、MN : 小核試験

表4 共通物質のがん原性評価における SHE CTA と各種遺伝毒性試験の比較

	SHE	Ames	SHE	ML	SHE	HPRT
評価物質総数	242		166		111	
非がん原物質率 (%)	29		28		21	
一致率 (%)	86	48	86	75	92	78
感度 (%)	90.5	36	88	86	96	79
特異度 (%)	75	78	80	35	74	71
偽陰性率 (%)	10	64	12	14	4	21
偽陽性率 (%)	25	22	20	65	26	29

	SHE	CA	SHE	CA	SHE	MN
		<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>		<i>In vivo</i>
評価物質総数	180		78		154	
非がん原物質数	29		29		26	
一致率 (%)	86	62	86	66	83	56
感度 (%)	89	63	91	62.5	87	57
特異度 (%)	77	59	75	71	71	54
偽陰性率 (%)	11	37	9	37.5	13	43
偽陽性率 (%)	23	41	25	29	29	46

SHE : SHE CTA、Ames : 復帰突然変異試験、ML : マウスリンフォーマ TK 試験、HPRT : 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験、CA : 染色体異常試験、MN : 小核試験

このように、OECD は文献調査によって CTA におけるがん原物質の予測性を検証し、DRP31 としてまとめた。その結論として SHE CTA のガイドライン化が推奨された。その結果、判定法を含む試験法の標準化ならびにガイドライン化に向け、OECD ガイダンス (OECD GD34、2005)⁹⁾に従い、EURL ECVAM 主導でプレバリデーション研究が実施された。それらの結果を評価した EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) の報告書¹⁰⁾とその報告書を受けて作成された EURL ECVAM RECOMMENDATION¹¹⁾はともに、SHE CTA の OECD ガイドラインとすることを推奨した。このような経緯を経て、SHE CTA のガイドライン案が 2013 年に公表された。しかしながら、提案された試験法ガイドライン案に対して、関係各国からのコメントとして試験法ガイドライン案の判定基準と DRP31 の判定結果との整合性の再確認が求められた。

これを受けて、pH6.7 法と pH7.0 法 (pH7.0 を超える条件で実施されたデータは除外) で実施されているデータの再評価が行われた⁸⁾。すなわち、pH6.7 法では 93 物質、pH7.0 法では 42 物質について再評価が行われた (表 5、表 6)。

表5 がん原性評価における SHE CTA (pH6.7 法) の正確性 (再評価結果)

		<i>In vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
SHE CTA	陽性	42 (6)	8 (1)
	陰性	15 (1)	26 (0)
	不確定 (Equivocal)	1 (0)	1 (0)

一致率 (Concordance) : $(42+26)/(42+8+15+26+1+1) \times 100 = 68/93 \times 100 = 73\%$

感度 (Sensitivity) : $42/(42+15+1) \times 100 = 42/58 \times 100 = 72\%$

特異度 (Specificity) : $26/(8+26+1) \times 100 = 26/35 \times 100 = 74\%$

偽陰性率 (False Negative) : $15/(42+15+1) \times 100 = 15/58 \times 100 = 26\%$

偽陽性率 (False Positive) : $8/(8+26+1) \times 100 = 8/35 \times 100 = 23\%$

括弧内の数値は無機物質の評価数

表6 がん原性評価における SHE CTA (pH7.0 法) の正確性 (再評価)

		<i>In vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
SHE CTA	陽性	24 (11)	1 (0)
	陰性	6 (2)	11 (0)

一致率 (Concordance) : $(24+11)/(24+1+6+11) \times 100 = 35/42 \times 100 = 83\%$

感度 (Sensitivity) : $24/(24+6) \times 100 = 24/30 \times 100 = 80\%$

特異度 (Specificity) : $11/(11+1) \times 100 = 11/12 \times 100 = 92\%$

偽陰性率 (False Negative) : $6/(24+6) \times 100 = 6/30 \times 100 = 20\%$

偽陽性率 (False Positive) : $1/(11+1) \times 100 = 1/12 \times 100 = 8\%$

括弧内の数値は無機物質の評価数

また、2つの方法に共通の物質 (がん原物質 : 14 物質、非がん原物質 : 4 物質) についての結果が比較され、14 のがん原物質の内 1 物質 (diethylstilbestrol) のみ 2 つの試験間で結果が一致していなかったが、13 物質はすべて結果が一致 (12 物質 : 陽性、titanium dioxide の 1 物質 : 陰性) していた。また、非がん原物質の内 2 物質は 2 試験でともに陰性、残りの 2 物質のうち、Caprolactam は pH6.7 法では陰性であったが、pH7.0 法では陽性であった。また、Phthalic anhydride は pH6.7 法では試験施設間で結果に差があり、pH7.0 法では陰性の結果であった。このように、2つの方法には pH の違いはあるが、ほぼ同等の結果が得られていると考えられる。

がん原物質を有機化合物と無機化合物に分けてその検出率についても検討している。pH6.7 法については無機化合物が 1 物質であり、有用な情報とは考えられない。一方、pH7.0 法については有機化合物が 17 物質、無機化合物が 13 物質あり、検出率はそれぞれ 76.5% および 84.6% であった。

更に、SHE CTA における非遺伝毒性がん原物質の検出率についても評価している¹²⁾ (表 7)。

表7 SHE CTA における非遺伝毒性がん原物質の検出率

		非遺伝毒性がん原物質	検出率 (%)
SHE CTA (pH6.7 法)	陽性	14 (1)	58
	陰性	10 (0)	42
	計	24 (1)	
SHE CTA (pH7.0 法)	陽性	8 (4)	67
	陰性	4 (1)	33
	計	12 (5)	

括弧内の数値は無機物質の評価数

この結果は、遺伝毒性物質の定義を「いずれかの遺伝毒性試験で陽性（ただし、マウスリンフォーマ TK 試験のみで陽性の場合を除く）の物質」とし、非遺伝毒性物質を以下のいずれかに該当する物質と定義してがん原物質を分類した場合の結果である¹²⁾。

- Ames 試験（復帰突然変異試験）が陰性で *in vivo* 遺伝毒性試験データが無い。
- Ames 試験（復帰突然変異試験）データが得られないが、他の遺伝毒性試験で陰性である。
- 得られているすべての遺伝毒性試験で陰性である。

しかしながら、遺伝毒性の評価は Ames 試験のみで評価されていないことから、遺伝毒性物質および非遺伝毒性物質の定義を以下のように変更し^{2,12)}、遺伝毒性とがん原性の文献を再調査し、有機化合物を再分類した。

<遺伝毒性物質>

- *In vitro* 試験データが陽性であり、それが *in vivo* 遺伝毒性試験で確認されている。
- *In vivo* 試験データが利用できない場合には、*in vitro* 試験結果が使われる。

<非遺伝毒性物質>

- Ames 試験（復帰突然変異試験）で陰性であり、培養細胞を用いる試験（染色体異常試験/小核試験/遺伝子突然変異試験/マウスリンフォーマ TK 試験については ICH による現行の基準で判断）で陰性、あるいは標準的 *in vivo* 試験で陰性（同じエンドポイントの場合、*in vivo* 試験結果を採用する）である。

その結果、再評価された有機化合物は pH6.7 法では 85 物質、pH7.0 法では 32 物質であり、それらは遺伝毒性がん原物質、非遺伝毒性がん原物質および非がん原物質に分類され、それらの SHE CTA 結果は表 8 に示したように、非遺伝毒性がん原物質の検出率は、pH6.7 法では 56.5%、pH7.0 法では 83.3%であった²⁾。

表 8 SHE CTA における非遺伝毒性がん原物質の検出率

		遺伝毒性がん原物質		非遺伝毒性がん原物質		非がん原物質	
		物質数	検出率 (%)	物質数	検出率 (%)	物質数	検出率 (%)
SHE CTA (pH6.7 法)	陽性	20	71.4	13	56.5	3	8.8
	陰性	3	10.7	10	43.7	26	76.5
	Equivocal	5	17.9	0	0.0	5	14.7
	計	28		23		34	
SHE CTA (pH7.0 法)	陽性	9	64.3	5	83.3	1	8.3
	陰性	4	28.6	1	16.7	11	91.7
	Equivocal	1	7.1	0	0.0	0	0.0
	計	14		6		12	

DRP31 では、文献調査した化学物質について、IARC が報告しているヒトに対するがん原性リスク分類を記載しているが、その分類と CTA 結果の相関性についての詳細は記載されていない。

そこで、当資料編纂委員会では、DRP31 の Table 11~13 に記載されている物質のうち、ヒトに対するがん原性リスク分類の記載があり、しかも SHE CTA の結果が明らかな 169 物質について、SHE CTA 結果とヒトがん原性との相関を調査した。なお、IARC の分類については、Benigni ら¹³⁾ の報告も参考にした。その結果、グループ 1 (ヒトに対してがん原性がある) およびグループ 2A (ヒトに対しておそらくがん原性がある) をヒトがん原物質とした場合、SHE CTA (pH6.7 法または pH7.0 法のいずれか一方でも陽性の場合を SHE CTA 陽性と判定) における一致率は 55.0%、感度は 93.7%、特異度は 32.1%とヒトがん原物質の検出感度の高い結果であった (Appendix II)。

さらに、IARC 分類毎、SHE CTA およびがん原性試験結果の試験法毎にそれらの相関を表 9-1 に示した。

表 9-1 ヒトにおけるがん原性リスク分類 (IARC 分類) と SHE CTA およびがん原性試験結果との相関性

アッセイ系	判定	ヒトに対するがん原性			
		グループ 1	グループ 2A	グループ 2B	グループ 3
SHE CTA (pH 6.7 法)	陽性	6 (66.7%)	6 (100.0%)	12 (75.0%)	8 (36.4%)
	陰性	3 (33.3%)	0 (0.0%)	4 (25.0%)	14 (63.8%)
	計	9	6	16	22
SHE CTA (pH 7.0 法)	陽性	43 (95.6%)	13 (92.9%)	40 (87.0%)	24 (51.1%)
	陰性	2 (4.4%)	1 (7.1%)	6 (13.0%)	23 (48.9%)
	計	45	14	46	47
実験動物 における がん原性試験	陽性	48 (100.0)	16 (94.1%)	50 (94.3%)	22 (39.3%)
	陰性	0 (0.0)	1 (5.9%)	3 (5.7%)	34 (60.7%)
	計	48	17	53	56

これら物質には、げっ歯類のがん原性試験で陽性の 136 物質（有機化合物：94 物質、無機化合物：42 物質）と陰性の 38 物質（有機化合物：34 物質、無機化合物：4 物質）が含まれているが、さらに有機化合物と無機化合物に分類して表 9-2 に示した。

表 9-2 ヒトにおけるがん原性リスク分類 (IARC 分類) と SHE CTA およびがん原性試験結果との相関性 (有機化合物)

アッセイ系	判定	ヒトに対するがん原性			
		グループ 1	グループ 2A	グループ 2B	グループ 3
SHE CTA (pH 6.7 法)	陽性	3 (50.0%)	6 (100.0%)	10 (76.9%)	7 (33.3%)
	陰性	3 (50.0%)	0 (0.0%)	3 (23.1%)	14 (66.7%)
	計	6	6	13	21
SHE CTA (pH 7.0 法)	陽性	11 (84.6%)	12 (92.3%)	34 (87.2%)	21 (50.0%)
	陰性	2 (15.4%)	1 (7.7%)	5 (12.8%)	21 (50.0%)
	計	13	13	39	42
実験動物 における がん原性試験	陽性	15 (100.0)	15 (93.8%)	43 (93.5%)	21 (41.2%)
	陰性	0 (0.0)	1 (6.2%)	3 (6.5%)	30 (58.8%)
	計	15	16	46	51

(無機化合物)

アッセイ系	判定	ヒトに対するがん原性			
		グループ 1	グループ 2A	グループ 2B	グループ 3
SHE CTA (pH 6.7 法)	陽性	3 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (66.7%)	1 (100.0%)
	陰性	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)
	計	3	0	3	1
SHE CTA (pH 7.0 法)	陽性	32(100.0%)	1 (100.0%)	6 (85.7%)	3 (60.0%)
	陰性	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	2 (40.0%)
	計	32	1	7	5
実験動物 における がん原性試験	陽性	33 (100.0)	1 (100.0%)	7 (100.0%)	1 (20.0%)
	陰性	0 (0.0)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (80.0%)
	計	33	1	7	5

グループ 1 における物質での SHE CTA の有機化合物の陽性率は、pH 6.7 法では 50.0%、pH 7.0 法では 84.6%であり、実験動物におけるがん原性試験の結果 (100.0%) と比較すると例数が少ないものの低い値であった。一方、無機化合物については、SHE CTA およびがん原性試験ともに 100.0%の陽性率であった。

グループ 2A における有機化合物の陽性率は、pH 6.7 法では 100.0%、pH 7.0 法では 92.3%であり、がん原性試験の結果 (93.8%) と同等であった。無機化合物については 1 物質のみであるが、いずれの pH でも陽性であった。

グループ 2B (ヒトに対してがん原性の可能性がある) における有機化合物の SHE CTA の陽性率 (76.9

および 87.2%) は、がん原性試験の結果 (93.5%) よりわずかに低下した。無機化合物も同様に、SHE CTA の陽性率 (66.7 および 85.7%) はがん原性試験の結果 (100.0%) より低下した。

グループ 3 (ヒトに対する発癌性が分類できない) における有機化合物の SHE CTA の陽性率 (偽陽性率と同じ) は、pH 6.7 法では 33.3%、pH 7.0 法では 50.0% であり、がん原性試験の結果 (41.2%) とほぼ同等であった。その陰性率 (特異度と同じ) も、pH 6.7 法では 66.7%、pH 7.0 法では 50.0% で、がん原性試験 (58.6%) とほぼ同等であった。

8. 試験方法の信頼性

1) 施設間変動

(1) ECVAM のプレバリデーション研究

SHE CTA の施設間の再現性は、pH6.7 および pH7.0 法のどちらも、表 10 に示すように 4 つのがん原物質と 2 つの非がん原物質、計 6 物質を用いて検証された (Benzo[a]pyrene は陽性対照物質としての評価) ^{6,7)}。

表 10 ECVAM プレバリデーション研究で検討された被験物質

化学物質	CAS 番号	げっ歯類がん原性 (出典)
Benzo[a]pyrene	50-32-8	あり (IARC, 2009)
Anthracene	120-12-7	なし (IARC, 2009)
2,4-Diaminotoluene	95-80-7	あり (IARC, 2009)
3-Methylcholanthrene	56-49-5	あり (Gold and Zeiger, 1997)
o-Toluidine HCl	636-21-5	あり (NTP)
Phthalic anhydride	85-44-9	なし (NTP)

pH7.0 法については、4 施設にて試験を行い、評価した結果、Phthalic anhydride を除く全ての被験物質について判定結果が一致し、動物がん原性の結果とも合致した。Phthalic anhydride については、1 施設にて 1 濃度のみ形質転換コロニーの有意な増加があり、傾向検定でも有意な傾向を示したことから陽性との判定になったが、他の施設では動物がん原性の評価結果と同じく、陰性と判定された。

pH6.7 法については、3 施設にて試験を行い、評価した結果、全ての被験物質の判定結果が一致し、Phthalic anhydride を除いては動物がん原性試験結果とも合致した。Phthalic anhydride の SHE CTA の評価結果は各施設とも陽性と判定したが、動物がん原性を示さないとする NTP の報告と矛盾し、また上記の pH7.0 法の SHE CTA における評価結果とも異なる。この理由として Phthalic anhydride の異なる pH での安定性の違いが指摘されている。つまり Phthalic anhydride は水環境下で速やかに加水分解し、非遺伝毒性の Phthalic acid に変化するが、SHE CTA では使用する緩衝液が異なり、より低い pH では Phthalic anhydride の半減期が長くなることから、異なった試験結果が得られた可能性が示されている。

上記の施設間の試験結果を総合的に評価した結果、各施設での SHE CTA の評価結果は基本的に一致す

るものであり、pH6.7法およびpH7.0法ともその施設間再現性は高いと判断された。

判定結果に関して、コロニーのカウントが主観的であることによる判定のばらつきが懸念されていたが、写真標本の提供が判定のばらつきの抑制に大きく寄与していると考えられた。

(2) その他の文献報告との一致性

pH7.0法については、類似プロトコルによる再現性を評価した文献報告¹⁴⁾ならびに2機関以上で評価された物質の87.7% (57/65) が一致するとしたDRP31を参照した。またpH6.7法については、類似プロトコルによる再現性を評価した文献報告^{15,16)}および上記DRP31を参照した。これらの報告から、良好な施設間再現性を示すと考えられた。

2) 施設内変動

施設内再現性については、pH6.7法およびpH7.0法の両方について、プレバリデーション研究が行われ評価されているが、陽性対照として使用した1化合物 (Benzo[a]pyrene) の結果のみの評価となっている^{6,7)}。

pH6.7法では、コード化せずに実施した結果とコード化して実施した3施設の結果を比較して評価している。その結果、1施設でコントロールの形質転換率が他の2施設と異なる値が得られているが、陽性対照物質であるBenzo[a]pyreneの結果はほぼ同様の値が得られている。一方、pH7.0法ではコード化したBenzo[a]pyreneを用いて1施設のみが3回の繰り返し実験を行い、良好な結果が得られている。

ESACの報告¹⁰⁾にあるように、プレバリデーション研究では施設内再現性を調べるための適切な実験デザインが組み立ておらず、現在の評価基準で考えた場合、施設内再現性については十分な評価が行われているとは結論できない。

9. 試験方法のデータの質

- ・プレバリデーション報告書によると、プレバリデーション研究の施設内再現性の確認を複数の化合物で実施しなかったなど方法に不十分な点があったものの、試験実施に必要なスキルの訓練を受けた施設での施設内/施設間再現性は確保されており、データの質は担保されていると考えられる。
- ・評価上最も重要なデータは、形質転換コロニーの計測値である。画像アトラスにより標準化されているものの、形質転換コロニーは目視で判別するため、判別法の客観性に乏しい。このため、データの質の担保には、コード化して取得されたデータであることが重要となる。プレバリデーション研究の化合物はコード化され、形質転換コロニーの計測はコード化して行われた。従って、取得されたデータの質は担保されていると考えられる。
- ・試験の妥当性を担保するためのもう一つの重要なDRP31で採用されたデータはコード化して取得されたものではない。しかしながらプレバリデーション研究の判定基準を以てDRP31データを再評価した結果、感度や特異度に大差がなかったことから、これらについてもデータの質は担保されていると考えられる。

10. 試験方法に関する他の科学的な報告

SHE CTA と同様に細胞の CTA には以下の方法が開発されている。

- 1) 細胞株 BALB/c3T3 を用いる CTA
- 2) 細胞株 Bhas42 を用いる CTA[※]
- 3) 細胞株 C3H10T1/2 を用いる CTA
- 4) JB6 細胞を用いる CTA

※2) Bhas42 を用いる CTA が 2016 年 1 月 OECD ガイダンス¹⁷⁾となった。

上記の 1) ~3) については、SHE CTA と同様に形質転換した細胞についての評価であるが、形成されたコロニー中の形質転換したコロニー数を数えるのではなく、単層の正常細胞中で増殖した形質転換細胞が形成するフォーカス（形質転換細胞の集合体）の数を計測するものである。4) の JB6 細胞については、軟寒天培地での増殖能（足場依存性の喪失）を指標とする試験である。

11. 3Rs への関与（動物福祉面からの妥当性）

SHE CTA ではシリアン・ハムスターの胎仔から得た初代培養細胞を用いるため、動物を犠牲にする必要がある。そのため、他の培養細胞（Bhas42, BALB/c 3T3）を用いる CTA と比較して、動物福祉面では不利であることは否めない。しかしながら、一匹の妊娠動物由来の胎仔細胞で約 50 回の CTA が実施可能であること、および本試験を含む CTA はがん化過程における生物学的プロセスを評価するため、適切に実施することによって、多数の動物を使用するがん原性試験および関連試験を回避、あるいは省略することが期待できるため、動物福祉への寄与は大きいと考えられる。

12. 試験方法の有用性と限界

1) 有用性

(1) CTA

- ・がん化の過程を説明する多段階説によれば、変異原物質によりイニシエーション作用を受けた細胞は、更にその後さまざまな要因によって悪性形質を獲得すると考えられている。CTA は、培養正常細胞或いは株細胞が形態形質転換することを指標にして、化学物質の形質転換能の有無を予測する *in vitro* 試験法の一つとしての特徴がある。
- ・他のがん原性予測試験結果とともに、WoE の一つとして CTA の結果を利用することができる。本試験法は現行のがん原性試験に完全に置き換わる試験法としての位置づけではなく、補助的な試験（例えば、がん原性試験の実施順位を決めるためのスクリーニング、がん原性試験が要求されないカテゴリーの医薬品のがん原性関連情報の取得など）として位置づけることは可能である。
- ・3Rs の観点からも有用である。

(2) SHE CTA

CTA の有用性に加えて以下の有用性を認める。

- DRP31 の 245 化学物質で評価された結果において、SHE CTA の結果とがん原性試験結果との相関が認められる。
- SHE CTA の細胞調製は凍結保存した初代二倍体細胞を用いるが、必要とする動物数はがん原性試験に用いる動物数に比べはるかに少ない。
- 3Rs の観点から有用であることに加えて、不死化培養細胞を用いる CTA と比較して、初代培養細胞を用いることから、より正常細胞に近い状態を維持した実験系であると考えられる。

2) 問題点（限界、不利点、適用限界）

(1) CTA

- CTA で結果が陽性であっても、化学物質の形質転換能から、その化学物質の *in vivo* におけるがん原性の強さ、臓器特異性、および種特異性に関する情報は得られない。
- CTA のエンドポイントである形質転換の発生機序が明らかになっていないため、非遺伝毒性がん原物質の作用機序に関する情報は得られない。
- 一般的な *in vitro* 試験と同様に、結果の妥当性は標準化されたプロトコルに従って一連の試験操作が正確に行われることによって保証される。CTA の結果の正確性を保証するため、試験操作はもちろん、形質転換コロニー/フォーカスの判別スキルの習熟が重要である。標準物質で誘導された形質転換コロニー/フォーカスの画像アトラス等を利用したスキル確認は重要である。
- 形質転換コロニー/フォーカスの自動判別法の開発が進んでいないため、現時点での多検体高速スクリーニングの報告数は少ない。広範な化学物質の形質転換能を CTA で一次スクリーニングするためには、試験系の更なる改良、或いは、形質転換コロニー/フォーカスの革新的判別方法の開発が必要である。

(2) SHE CTA

CTA における問題点に加えて以下の問題点を認める。

- SHE CTA には、イニシエーションとプロモーション作用とを区別する試験法が記載されていないため、イニシエーション/プロモーション作用といった観点での被験物質の作用機序を明らかにすることはできない。
- SHE CTA では、プレバリデーション研究が行われた 6 物質（但し、選択された物質には、作用メカニズムに偏りがあるとされている）については、がん原性試験結果との相関（感度、特異度、偽陽性・偽陰性の識別の結果）は確認されているが、選択された物質には、作用機作に偏りがあり、化学物質の数や種類も十分ではない。評価された化学物質には遺伝毒性を有するがん原物質が多く含まれ、非遺伝毒性がん原物質（“真の (*bona fide*) 非遺伝毒性がん原物質” の定義には議論の余地がある）が少ないため、非遺伝毒性がん原物質の検出系という観点での有用性の検証は不十分である。

3) 今後の課題

細胞が形質転換する作用機構の解明が重要である。しかし、この課題はハードルが高い。

- ・ ヒト細胞でも起こりうるかを再現するためには、ヒト細胞を用いた CTA が開発されることが望ましい。(In vivo における、動物からヒトへの外挿と同じ問題を含んでいる。)
- ・ 形態形質転換コロニーの判定の客観性の確保が実務上必要である。
- ・ 真の (*bona fide*) 非遺伝毒性がん原物質の数を増やして CTA を多く実施し、多くのデータを収集する。プレバリデーション研究で用いた被験物質には真の非遺伝毒性がん原物質の数が遺伝毒性がん原物質と比較して極めて少なかったことなどが、OECD の試験法ガイドラインとして承認 (同意) されなかった理由の一つと言われている。これらの科学的・技術的な問題点が克服され、また正式なバリデーション研究が実施されれば、CTA がテストガイドライン化される可能性はある。
- ・ SHE CTA では、基本的な薬物代謝機能を保持している細胞を用いることから、代謝活性化を必要とする様々な化学物質の形質転換能が検出可能である。また、外部代謝活性化系を適用することにより、形質転換能の増強や新たな形質転換能を持つ化学物質を検出できるとした報告¹⁸⁻²¹⁾ が少数ではあるが公表されている。すなわち、通常の形質転換試験で陰性の結果が得られた物質に関しても、外部代謝活性化系を適用することにより、更にこの試験系の正確性が高まる可能性がある。

13. 結論

- 1) CTA は *in vitro* において、化学物質を曝露することで起きる「細胞の形態」や「表現形質」の悪性化を指標として腫瘍誘発性の有無を調べる試験法の一つである。
- 2) 形質転換した細胞が悪性化することで、ヌードマウスや同系統の動物への造腫瘍性が認められるため、がん原性とは何らかの関係があることが推察される。
- 3) 化学物質を用いた CTA の結果と、げっ歯類がん原性試験の結果には相関があることが報告されている。
- 4) SHE CTA の結果とげっ歯類でのがん原性試験との一致率、感度、特異度などの数値、および IARC のグループ別のがん原物質から判断すると、SHE CTA はがん原性試験の代替法としての位置づけではなく、がん原物質検出のスクリーニング試験法の一つとして位置づけることができる。

14. 参考文献

- 1) Guidance Document on the In Vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment No 214, ENV/JM/MONO (2015)18,OECD (2015), Paris
- 2) Report on the Evaluation of Genotoxic or Non-genotoxic Activity of the Organic Chemicals Tested in the SHE Cell Transformation Assay, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 17
- 3) Pienta, R. J., J. A. Poiley, and W. B. Leberz III. Morphological transformation of early passage Golden Syrian embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying divers carcinogens. *Int. J. Cancer*: 19, 642-655 (1977)
- 4) Watanabe, Masami and Keiji Suzuki, Expression dynamics of transforming phenotypes in X-irradiated Syrian golden hamster embryo cells. *Mutat. Res.*, 249:71-80 (1991)
- 5) Detailed review paper on cell transformation assays for detection of chemical carcinogens, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 31 OECD (2007)
- 6) Report of the Validation Management Team on the ECVAM prevalidation study concerning the SHE pH6.7 Cell Transformation Assay, EC-ECVAM (2010a)
- 7) Report of the Validation Management Team on the ECVAM prevalidation study concerning the SHE pH7.0 CTA, EC-ECVAM (2010b)
- 8) Results of An Analysis of The Performance of The Syrian Hamster Embryo Cell Transformation Assay at PH 6.7 and PH 7.0, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 16
- 9) Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 34 OECD (2005)
- 10) ESAC Working Group Peer Review Consensus Report on an ECVAM-coordinated prevalidation study concerning three protocols of the Cell Transformation Assay (CTA) for in vitro carcinogenicity testing (2011)
- 11) EURL ECVAM Recommendation on three Cell Transformation Assays using Syrian Hamster Embryo Cells (SHE) and the BALB/c 3T3 Mouse Fibroblast Cell Line for In Vitro Carcinogenicity Testing (2012)
- 12) Draft Summary Record of a Meeting on Cell Transformation Assay, 14-16th January 2014, Paris, France, ENV/JM/TG/M(2014)1/REV2
- 13) Benigni R, Bossa C, Battistelli CL, Tcheremenskaia O, IARC Classes 1 and 2 carcinogens are successfully identified by an alternative strategy that detects DNA-reactivity and cell transformation ability of chemicals. *Mutat. Res.*, 758 56– 61 (2013)
- 14) Isfort RJ, Kerckaert GA, LeBoeuf RA, Comparison of the standard and reduced pH Syrian Hamster Embryo (SHE) cell in vitro transformation assays in predicting the carcinogenic potential of chemicals. *Mutat. Res.*, 356: 11-63 (1996)

- 15) LeBoeuf RA, Kerckaert KA, Poiley JA and Raineri R, An interlaboratory comparison of enhanced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells cultured under conditions of reduced bicarbonate concentration and pH. *Mutat. Res.*, 222: 205-18 (1989)
- 16) Engelhardt G, Schwind KR and Mußler B, The testing of chemicals in Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay for assessment of carcinogenic potential. *Toxicol. in vitro*, 18: 213-8 (2004)
- 17) Guidance Document on the In Vitro Bhas42 cells Transformation Assay. Series on Testing & Assessment No 231, ENV/JM/MONO (2016) 1, OECD (2016)
- 18) Tsutsui T, Suzuki N, Maizumi H and Barrett J C, Characterization of an unscheduled DNA synthesis assay with Syrian hamster embryo cells, *Mutat. Res.*, 129:111-7 (1984)
- 19) Tsutsui T, Suzuki N, Maizumi H, McLachlan, J A and Barrett J C, Alteration in diethylstilbestrol-induced mutagenicity and cell transformation by exogenous metabolic activation, *Carcinogenesis*, 7:1415-8 (1986)
- 20) Tsutsui T, Watanabe E and Barrett J C, Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 14: 611-8 (1993)
- 21) Hayashi N, Hasegawa K, Komine A, Tanaka Y, McLachlan J A, Barrett J C and Tsutsui T, Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Mol Carcinogenesis*, 16:149-56 (1996)

Unclassified

ENV/JM/MONO(2015)18

Organisation de Coopération et de Développement Économiques
Organisation for Economic Co-operation and Development

22-May-2015

English - Or. English

**ENVIRONMENT DIRECTORATE
JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND
THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY**

**GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO SYRIAN HAMSTER EMBRYO (SHE) CELL
TRANSFORMATION ASSAY**

**Series on Testing & Assessment
No. 214**

JT03376959

Complete document available on OLIS in its original format
This document and any map included herein are without prejudice to the status of or sovereignty over any territory, to the delimitation of international frontiers and boundaries and to the name of any territory, city or area.



ENV/JM/MONO(2015)18
Unclassified

English - Or. English

OECD Environment, Health and Safety Publications

Series on Testing and Assessment

No. 214

**GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO SYRIAN HAMSTER EMBRYO (SHE) CELL
TRANSFORMATION ASSAY**

IOMC

INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS

A cooperative agreement among **FAO, ILO, UNDP, UNEP, UNIDO, UNITAR, WHO, World Bank and OECD**

Environment Directorate
ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT
Paris 2015

About the OECD

The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) is an intergovernmental organisation in which representatives of 34 industrialised countries in North and South America, Europe and the Asia and Pacific region, as well as the European Commission, meet to co-ordinate and harmonise policies, discuss issues of mutual concern, and work together to respond to international problems. Most of the OECD's work is carried out by more than 200 specialised committees and working groups composed of member country delegates. Observers from several countries with special status at the OECD, and from interested international organisations, attend many of the OECD's workshops and other meetings. Committees and working groups are served by the OECD Secretariat, located in Paris, France, which is organised into directorates and divisions.

The Environment, Health and Safety Division publishes free-of-charge documents in eleven different series: **Testing and Assessment; Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring; Pesticides; Biocides; Risk Management; Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology; Safety of Novel Foods and Feeds; Chemical Accidents; Pollutant Release and Transfer Registers; Emission Scenario Documents; and Safety of Manufactured Nanomaterials.** More information about the Environment, Health and Safety Programme and EHS publications is available on the OECD's World Wide Web site (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/>).

This publication was developed in the IOMC context. The contents do not necessarily reflect the views or stated policies of individual IOMC Participating Organisations.

The Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC) was established in 1995 following recommendations made by the 1992 UN Conference on Environment and Development to strengthen co-operation and increase international co-ordination in the field of chemical safety. The Participating Organisations are FAO, ILO, UNDP, UNEP, UNIDO, UNITAR, WHO, World Bank and OECD. The purpose of the IOMC is to promote co-ordination of the policies and activities pursued by the Participating Organisations, jointly or separately, to achieve the sound management of chemicals in relation to human health and the environment.

This publication is available electronically, at no charge.

Also published in the Series on Testing and Assessment link

**For this and many other Environment,
Health and Safety publications, consult the OECD's
World Wide Web site (www.oecd.org/chemicalsafety/)**

or contact:

**OECD Environment Directorate,
Environment, Health and Safety Division
2 rue André-Pascal
75775 Paris Cedex 16
France**

Fax: (33-1) 44 30 61 80

E-mail: ehscont@oecd.org

© OECD 2015

Applications for permission to reproduce or translate all or part of this material should be made to: Head of Publications Service, RIGHTS@oecd.org, OECD, 2 rue André-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France

FOREWORD

This document presents guidance for conducting the Syrian Hamster Embryo Cells Transformation Assay (SHE CTA).

This document was preceded by the development of the Detailed Review Paper (DRP) 31 on “Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens” (OECD, 2007), pre-validation study led by ECVAM, ESAC peer review, and then from 2011 by work aimed at the development of a Test Guideline. Despite support from some countries, concerns were expressed by others regarding the SHE CTA and the approval of the draft TG at the April 2013 WNT meeting was considered premature. Efforts were undertaken to try to address remaining scientific, technical issues, but nevertheless the draft Test Guideline did not reach the stage of regulatory acceptance.

In November 2014, the Joint Meeting discussed options for moving forward in the area of non-genotoxic carcinogenicity under the Test Guidelines Programme. The Joint Meeting advised 1) to proceed with the development of guidance documents on the SHE CTA and Bhas-42 CTA, mainly to describe the test procedures, and 2) to develop a guidance document at the OECD level outlining a conceptual framework for the identification of non-genotoxic carcinogens for priority setting.

The draft document has been through two WNT commenting rounds in July and in December 2014. Since all countries who commented either indicated approval or indicated that their comments did not impede approval of the document and were only of editorial nature, this document was approved by written procedure.

This document is published under the responsibility of the Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology.

GUIDANCE DOCUMENT ON THE *IN VITRO* SYRIAN HAMSTER EMBRYO (SHE) CELL TRANSFORMATION ASSAY

PURPOSE

1. The purpose of this Guidance document is to allow the regulatory community to use the described method as part of a weight of evidence approach in the testing of substances for carcinogenic potential. There are a number of issues which have impeded consensus on the approval of the Test Guideline; these issues mainly include the subjective nature of evaluating transformed phenotypic morphology, the limited understanding of causal molecular mechanisms leading to the transformed SHE colonies, the relatively small number of bona fide non-genotoxic carcinogens, as compared to genotoxic carcinogens, that have been tested in the SHE cell transformation assay, and the way the assay might be used in a regulatory framework.

Background

2. *In vitro* cell transformation refers to the induction of phenotypic alterations in cultured cells. Cell transformation is an event in the multi-step process of tumour induction (1) (2). Transformed cells are phenotypically different from normal cells and have the ability to induce tumours in susceptible animals (3) (4) (5). It has been shown that SHE cells can be morphologically transformed by treatment with genotoxic and non genotoxic carcinogens (6) (7) (8). Exposure results in an increase of morphologically transformed (MT) colonies, which are characterised by disorganised growth patterns and mimicking an early stage in the carcinogenic process.

3. The performance of the Syrian Hamster Embryo (SHE) cell transformation assay conducted at a variety of pHs to detect transforming activity has been established on a large set of substances and has been reviewed in a database summarized in the OECD Detailed Review Paper (DRP) 31 (6) (9). In addition, the European Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) study (10) (11) addressed the availability of standardized protocols, their transferability, within- and between-laboratories reproducibility. The EURL ECVAM work also included the analysis of the degree of similarity between protocols. It concluded that there are no elements suggesting that the EURL ECVAM experiments differ notably from the experiments reported in the OECD DRP 31, thus making these data acceptable for use in a retrospective evaluation.

4. When SHE CTA results are used as part of a testing strategy (not as results from a stand-alone assay) and/or in a weight of evidence approach, they may contribute to the assessment of carcinogenic potential of test chemicals (12). While the available data (see paragraph 14) would suggest that the SHE CTA has greater sensitivity for carcinogens acting via genotoxic mechanisms, for non-genotoxic carcinogens the added value of the SHE CTA is still debated and more information is required.

5. This Guidance Document (GD) provides an *in vitro* procedure of the SHE cell transformation assay, as specified in Maire et al. (13) or in the EURL ECVAM DB-ALM protocol on SHE CTA (14), conducted at pH 6.7 and 7.0. The assay can be performed at either pH 6.7 or 7.0 (see paragraphs 14) provided proficiency has been demonstrated at the chosen pH (see paragraph 54-55). The morphology of the normal colonies differs slightly at physiological pH compared to acidic pH, however, the conduct of the assay at either pH has been shown to give similar results. Other than the difference in the pH, the experimental protocol for both versions of the assay is the same.

Current knowledge and understanding about mechanisms involved in cell transformation/

6. The exact molecular mechanisms involved in cell transformations are only partially understood (15) (16) (17). Although there are uncertainties regarding the causal mechanisms leading to the transformed SHE colonies, the following paragraphs review current knowledge and understanding based on the literature.

7. Evidence indicates that cell transformation results from alterations and changes in the expression of genes involved in cell cycle control, genomic stability, proliferation and differentiation. Genetic changes affecting these processes may result from direct genotoxic mechanisms. Also, disturbances of gene expression and genomic stability through hyper- or hypomethylation of DNA, histone modifications and nucleosomal remodelling are epigenetic mechanisms considered as fundamental in triggering a carcinogenic process (18). Consistent with these diverse mechanisms, some SHE cell transformants have been shown to harbour biallelic, inactivated p53 tumour suppressor genes (19). Carcinogens such as DES can suppress DNA methylation in short-term treatments (20). The initial transformants induced by polycyclic aromatic hydrocarbons frequently display DNA methylation-associated suppression of gene expression known to be associated with embryonic differentiation and engineered re-expression suppresses the transformed phenotype (21). SHE cell transformation by diethanolamine is driven by altered choline metabolism, an important methyl donor in one-carbon metabolism leading to DNA methylation (22). Introduction of an activated oncogene (v-Ha-ras), by transfection, will morphologically transform normal SHE cells (23). Increased frequency of acentric chromosome disjunction occurs during the growth of the initial transformants (24) which could contribute to the aneuploid characteristic of immortalized clones arising from such populations (reviewed in Ahmadzai et al., 2012 (25)).

8. Among later stage immortal and malignantly transformed descendents, global DNA hypomethylation and site specific hypomethylation in ras and myc oncogenes have been observed (20) (26). Also, methylation-associated suppression of cell cycle checkpoint gene expression, or mono- or biallelic losses of these genes (ink4a, ink4b), as well as mutations in p53 have been found in immortal Syrian hamster dermal cells (27). In morphologically transformed SHE cell lines, cell cycle checkpoint control (G2) is often compromised (28). An activated proto-oncogene (cph) capable of transforming other cells has been isolated from malignantly transformed SHE cells (29).

9. Non-genotoxic carcinogens have been postulated to act via a number of mechanisms such as inhibition of gap junction intercellular communication oxidative stress, increased mitogenesis, decreased apoptosis, interference with tubulin polymerization, inhibition of senescence through activation of telomerase, interference with signal transduction pathways, and binding to receptors involved in hormone-mediated processes, and in peroxisome proliferation. Instances of several of these mechanisms have been demonstrated in SHE cell transformation. Oxidative stress was shown to be causally involved in morphological transformation (30) (31). Imbalance of cell proliferation via an inhibition of apoptosis has been related to cell transforming effects of some hepatic peroxisome proliferators and other transforming agents in SHE cells (32) (33). Growth factor treatments of SHE cells, presumably acting through signal transduction pathways, can also drive transformation (34) and gap junctional cell-to-cell communication is frequently impaired by non-genotoxic carcinogens (35).

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

10. The SHE cells are normal diploid, metabolically and p53-competent primary cells, which retain the ability to biotransform a wide range of xenobiotics as evidenced by studies with substances requiring metabolic activation (6) (9) (36) (37) (38). From a 3Rs perspective, the use of primary cells means that a

small number of pregnant hamsters are euthanized; one hamster provides sufficient cells to perform at least 50 to 100 CTAs providing the cells are adequately preserved for future use. The metabolic capability of the cells should be considered and discussed in the light of interpretation of test results. This is particularly important when the test chemical requires metabolic activation. Exposure to test chemicals with transforming capacity results in an increased number of morphologically transformed (MT) colonies, which are characterised by disorganised growth patterns.

11. Transformation of primary, diploid SHE cells appears to follow a staged process. The transformation assay in the SHE cells is based upon identifiable colonies of morphologically transformed cells with irregular growth patterns. The transformants are thought to be stem cells with blockages in their differentiation pathways (39). Upon further passages *in vitro*, transformed colonies clonally isolated from treated cultures frequently generate cells with an infinite cellular lifespan or an ability to form tumours in syngenic hosts. Untransformed clones become senescent (40) (41) (42). High frequencies of progression to immortality and anchorage independence were also observed in bulk cultures of SHE cells (4).

12. Although conducted blindly, identification of morphologically transformed colonies by microscopic scoring is subjective, as for any cytohistochemical endpoint. This subjectivity may, to some extent, be overcome with appropriate training, and the use of photo catalogues (43) (44). However, to improve the reliability of the scoring a second opinion or duplicate independent scoring is highly recommended, especially for ambiguous colonies/or borderline pictures.

13. The assay would be improved by the development of objective measures for scoring transformation, when these are validated. Some examples include biospectroscopy, which is being explored to provide an objective determination of transformed colonies (45). In addition, molecular tools such as gene expression changes promise to provide useful molecular markers for morphological transformation, like those associated with cytoskeleton effects in the SHE cells (38).

14. To date comparative sensitivity and specificity of the pH 6.7 and 7.0 versions of the assay are limited to a small chemical database (see annex to DRP 31(7)). An analysis of the sensitivity and specificity of the assay for genotoxic and non-genotoxic carcinogens that were fully tested in *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays was performed in 2014 and is available in an annex to the DRP.

15. When planning the experiment, careful choice of the optimum pH needs to be taken into account. Parameters might include ionisable nature of the compounds as affecting the differences in reactivity or bioavailability. The historical experience of the laboratory with the scoring at either pH should also be considered. This needs to be taken into account until a wider chemical database has been generated.

16. At this time, the assay conducted as described in this Guidance Document does not provide information on *in vivo* potency, or species-specificity or tissue-specificity of the cell transformations.

17. It should be noted that this method has been validated for mono-constituent substances only and not multi-constituent substances, UVCBs (substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials) or mixtures. Before use of the assay for the testing of a mixture intended for a regulatory purpose, it should be considered whether, and if so why, it may provide adequate results for that purpose. Such considerations are not needed, when there is a regulatory requirement for testing of the mixture.

PRINCIPLE OF THE TEST METHOD

18. SHE cells are obtained from primary cultures of Syrian hamster embryos at 13 days of gestation. After enzymatic tissue digestion, cells are collected, grown for 24 to 48 hours and then cryopreserved, and stored in liquid nitrogen. One part of cryopreserved SHE cells is used as feeder cells, the other part as

target cells. The feeder cells are x-ray irradiated to inactivate their capability to replicate, and seeded as nutrient base and support of metabolic activity. The target cells are used to assess morphological transformation of colonies.

19. SHE cells (target cells) are seeded at clonal density onto a feeder layer of x-ray-irradiated cells in culture conditions allowing for the development of colonies, and achieving the necessary cloning efficiency for fulfilling the acceptability criteria for the CTA (paragraph 60). After plating the cells, they are exposed to the test chemical for 7 days. Thereafter, cells are washed, fixed and stained. Dishes are coded and colonies are scored for their morphological phenotype by stereomicroscopy.

20. Cytotoxicity is evaluated by inhibition of cloning efficiency and reduction in size/density of the colonies. The number of morphologically transformed (MT) colonies relative to the total number of scorable colonies is calculated for each concentration tested. The frequency of morphologically transformed colonies relative to total number of colonies in the test chemical-treated groups is compared to the frequency of MT colonies in the solvent control group.

DESCRIPTION OF THE METHOD

Preparations

Culture media, reagents and solutions

21. The culture medium, reagent and solutions used for cell preparation are described in [Annex 1](#).

Culture conditions and counting of viable cells

22. Cell cultures are incubated in a humidified incubator at 37°C and 10 ± 0.5 % CO₂. All centrifugation steps are carried out at 180-250 g for 10 minutes at 4°C. Viable cells are counted using the trypan blue dye exclusion test using 0.4% to 0.5% (w/v) trypan blue in buffered saline.

Preparation and cryopreservation of SHE cell stocks

23. SHE cells are isolated from 13-days gestation embryos of pregnant healthy female(s) humanely euthanized. Embryos are washed, transferred into sterile culture dishes containing wash solution, and the differentiated organs (head, viscera, and limbs) are discarded from each embryo. Cells can be prepared from single embryos, embryos pooled from a single dam or embryos pooled from different dams sacrificed at the same time.

24. The remainder of the embryo is minced and dissociated by enzymatic digestion in dissociation solution under gentle stirring for 10 min at room temperature or at 37°C. The first wash is discarded, and the dissociation is repeated 2-4 times. Cell suspensions are collected, centrifuged (at 4°C) and re-suspended in cell isolation medium (CIM). Viable cells are counted and seeded (2×10^6 /100 mm diameter culture dish, or 0.133×10^6 cells/cm² area of 150 or 225 cm² culture flasks) in CIM and incubated (37°C and 10 ± 0.5 % CO₂) until 60-80% cell growth confluency is achieved (usually within 24 to 48 hours). Then, cells are rinsed with buffered saline, detached with the appropriate detachment solution, and collected by centrifugation.

25. The cell pellet is suspended in CIM, viable cells are counted and pelleted by centrifugation. Cells are re-suspended in cryopreservation medium, dispensed into storage vials (1.0 or 2.0×10^6 cells/vial), step frozen (i.e., successively for 30 minutes at 4°C, 4 hours at -20°C and one night at -80°C), and kept frozen under liquid nitrogen until use.

Checking of the SHE cells/FBS suitability

26. Before use, each new cell batch should be checked for spontaneous transformation rate, plating efficiency (colony forming ability) and morphological transformation using a positive control chemical. Likewise, any new batch of foetal bovine serum (FBS) should be checked for suitability. The combination “cell batch/FBS batch” should fulfil the acceptability criteria described in paragraph 60.

Preparation of feeder (irradiated) SHE cells

27. Cryopreserved SHE cells in frozen vials are thawed at 37°C, pelleted by centrifugation and re-suspended in fresh cell growth medium (CGM). This also eliminates most of the dimethylsulfoxide (DMSO) used in the cryopreservation medium. Ten or 40 mL aliquots of cells are transferred to respectively 100 mm culture dishes or T225 culture flasks (2.0×10^6 cells/dish or 8.0×10^6 cells in T225 culture flask) and cultured in a humidified incubator at 37°C and 10 ± 0.5 % CO₂ for 2-4 days to achieve 50-90% confluence.

28. On the day of x-ray irradiation, cells are rinsed, detached and immediately re-suspended in CGM. Cells are exposed to irradiation (5000 rads or 50 grays) so that they remain viable, but no longer capable of replication. . Before and after irradiation, cells should be maintained on ice, and preferably also during irradiation.

29. These freshly irradiated cells can be directly used for the experiments soon after irradiation. In case of cryopreservation of the irradiated cells, cells are centrifuged and the supernatant is removed. The pellet is re-suspended in an appropriate volume of cold (hold on wet ice) cryopreservation medium. The viable cells are counted and dispensed into storage vials (5×10^6 cells/vial) on wet ice, and step frozen (as described in paragraph 25) prior to being stored frozen under liquid nitrogen. The cryopreservation step is a good way of keeping irradiated cells for a longer period if an x-ray machine is not readily available.

Preliminary cytotoxicity and dose range finding (DRF) assay

30. The maximum dose of the test chemical should be determined taking into account the solubility and any relevant cytotoxicity information available for the test chemical. In the DRF, a range of at least 10 concentrations to achieve a wide toxicity range should be tested in parallel to the solvent control. At least five, preferably ten dishes should be seeded per concentration tested. The number of target cells seeded is the same in all treatment groups. The conditions of testing (test medium, incubation conditions and time) are the ones described for the main experiment for cell transformation (see paragraphs 41-44).

Test conditions***Solvent use***

31. The solvent should be chosen to optimize the solubility of the test chemical without adversely impacting the assay conduct, e.g. cell growth, integrity of the test material, reaction with culture vessels. It is recommended that, wherever possible, the use of an aqueous solvent should be considered first. Well established solvents are for example water, cell culture medium, and dimethyl sulfoxide. Generally the final concentration of organic solvents in the tissue culture medium should not exceed 0.2% (v/v). This may be achieved by diluting concentrated solutions (500 x) of the test chemical in CGM to prepare ultimate dosing solutions at a concentration 2 x, so as to obtain the final concentration (1 x) in the test medium after addition of an equal volume of the test medium (see [Table 1](#) and paragraph 33 as examples). If other than well-established solvents are used, their use should be supported by data indicating their compatibility with the test chemical, the test system, and their lack of transforming potency. In such cases, untreated controls should also be included.

Selection of test concentrations

32. The maximum concentrations to be tested in cell transformation assay depend on test chemical solubility and cytotoxicity. For test chemicals of defined composition the highest dose level should be 0.01 M, 2 mg/mL or 2 µL/mL, whichever is the lowest. For test chemical of non-defined composition, e.g. complex mixtures (plant extracts, tars, environmental extracts etc.), the top concentration should be at least 5 mg/mL. Poorly soluble chemicals should be tested up to the first concentration producing a visible opacity in the final test medium observable by the unaided eye.

33. In addition to the controls, at least 5 test chemical concentrations should be used in the main experiment. These are deducted from the range finding study and should include:

- A high test concentration inducing no more than 50% cytotoxicity expressed by decrease in relative plating efficiency and/or reduction in relative colonies density/size (by visual appearance). If the test chemical does not show a cytotoxic effect, the highest dose is selected as indicated in paragraph 32 above for soluble test chemicals, or as the visible solubility limit in the final test medium for insoluble test chemicals;
- At least one concentration which has no apparent effect on plating efficiency;
- 3 or 4 intermediate concentrations.

Table 1: Recommended concentrations of the test chemical in the intermediate solutions and in the final test medium

	Solvent*	Intermediate solution (4 mL test medium)	Final test medium (8 mL= 4mL intermediate solution+4mL GCM)
Concentration of the test chemical	500x	2x	1x
Concentration of the solvent	100%	0.4%	0.2%

*For water insoluble test chemicals, concentrated solutions (500x) may be prepared in Dimethyl sulfoxide (DMSO). For water soluble test chemicals, an aqueous solvent is recommended.

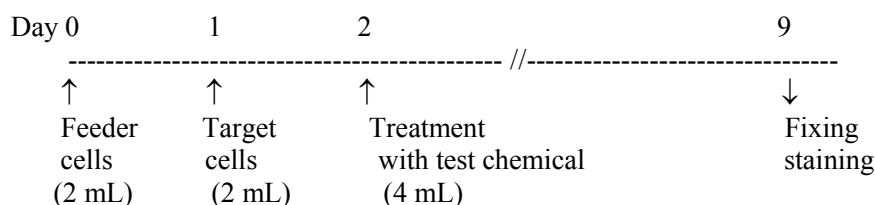


Figure 1: Timeline of the SHE CTA assay (the volumes are per each 60 mm culture dish)

Preparation of test cultures

Feeder layer

34. On day 0 (feeder cells day), the irradiated SHE cells are seeded. The cell concentration is adjusted to 20,000 – 30,000 cells/mL in CGM, and 2 mL of the cell suspension are added into each 60 mm culture dish (4 to 6 x 10⁴ feeder cells/dish). In case of cryopreservation of irradiated cells, cryopreserved cells are thawed at 37°C, and pelleted by centrifugation. The cell pellet is re-suspended in fresh CGM and the viable cells are counted. Freshly irradiated cells can also be used for seeding of the feeder layer.

35. The culture dishes are incubated in a humidified incubator at 37°C and 10 ± 0.5% CO₂ for 24 hours before adding the target cells. For each test, at least 5 dishes filled with feeder cells only will be used concurrently as controls for the inability of the feeder cells to replicate and to form colonies. No colony should form in these dishes.

Target cells

36. Cryopreserved SHE cells are thawed at 37°C and seeded for growth in culture flasks. After an incubation period (usually of 24 hours although shorter duration e.g. 5 hours can be used), the target cells are detached, counted and the cell concentration is adjusted with CGM to a concentration where approximately 25 - 45 colonies/dish can be obtained at the end of the test (see paragraph 60). Two mL of the target cell suspension will be added to each culture dish containing feeder cells. Dishes will be incubated in a humidified incubator at 37°C and 10 ± 0.5% CO₂ for 24 hours prior to treatment with the test and control chemicals.

37. At cytotoxic dose levels, as determined in the Dose Range Finding (DRF) experiment, the target cell number should be adjusted in order to yield the recommended number of 25 to 45 colonies per dish at the end of the test to fulfil acceptance criteria (see paragraph 60). The adjustment of target cell number is explained in paragraph 37.

Treatment of cultures

38. For practicality, one way of preparing dosing solution is to start with a concentration representing twice (2x) the final concentration (Table 1). Each dosing solution (4 mL) will be transferred to individual culture dishes (60 mm) already containing the CGM (4 mL) with feeder and target cells (final volume 8 mL) (Table 1). The cultures will be incubated in a humidified incubator at 37°C and 10 ± 0.5% CO₂ for 7 days without disturbance.

PROCEDURE

Preparation of test solutions

39. The test chemical solutions are prepared on the day of treatment. Solid test chemicals should be dissolved in appropriate solvents and diluted, if appropriate, prior to treatment of the cells. Liquid test chemicals may be added directly to the final test medium and/or diluted prior to treatment. Gaseous or volatile chemicals should be tested by appropriate methods, determined on a case by case basis. Fresh preparations of the test chemical should be used unless stability data demonstrate the acceptability of storage. A series of solutions at different concentrations of the test chemical should be prepared under UV filtered lights or protected from light.

Description of the cell transformation assay

40. A sufficient number of target cells (around 150 cells/dish, but the number of target cells is dependent on the cell batch/FBS batch) to produce an average of 25 - 45 colonies at the end of the test will be dispensed in 2 mL of complete medium per 60 mm culture dish, each of which was seeded approximately 24 hours earlier with $4-6 \times 10^4$ feeder cells in 2 mL of CGM. For cytotoxic concentrations, the number of target cells seeded should be increased so as to maintain the target range of 25-45 colonies per dish (paragraph 60). For instance, an approximate 30 % reduction in the number of colonies may require to adjust the number of target cells to 1.5x the number of cells seeded in the cytotoxicity assay; an approximate 50 % reduction, would lead to seed twice (2x) the number of target cells seeded for cytotoxicity.

41. Twenty four hours after the seeding of the target cells, test and control chemical treatment will be initiated by addition to the test media (4 mL) of the appropriate dosing solution (4 mL) so as to obtain the final concentration of 0.2% (Table 1).

42. The treated cell cultures should be incubated for a period of 7 days in a humidified incubator (37°C , $10 \pm 0.5\%$ CO_2) following treatment initiation to allow colony development. The culture dishes should be labelled as appropriate for identification. The relative cytotoxicity of each treatment group should be measured by the reduction in plating efficiency and/or colony density and size of the treated SHE cells compared to the solvent control.

43. After the incubation period of 7 days, the medium should be discarded from the dishes by aspiration, and the cells attached to the dishes should be rinsed with buffered saline. After removal of the buffered saline, cells should be covered with fixing solution (ethanol or methanol) and kept for at least 10 minutes at room temperature. The fixative is removed and the dishes are stained for approximately 20 minutes with 3-5 mL Giemsa solution. The stain is poured off and the dishes are rinsed with tap water before the stained colonies are air-dried.

Morphological cell transformation

44. All dishes, including those of positive and negative controls, should be coded before microscopic analysis. The stained colonies are evaluated and scored under stereomicroscope for plating efficiency (PE) and morphological transformation (MT). The scorer should be unaware of the coding. Morphologically transformed colonies are characterized by a criss-cross pattern of growth and piling up of cells. Individual cells within the colony are more basophilic relative to their normal counterparts, and have a decreased cytoplasm-to-nucleus ratio. Pictures of normal and morphologically-transformed colonies obtained at pH 6.7 and 7.0, which can be found in the photo catalogue of Bohnenberger et al. (43) and Maire et al. (44), respectively, should be used routinely.

45. Sparse colonies are not scored for MT (i.e. if a colony contains less than 50 cells, it is not counted); however, they are included in the total number of colonies for plating efficiency determination.. Colonies at the edge of the dishes should be scored for MT if clearly morphologically transformed. Generally, for each treatment group ≥ 1000 colonies should be evaluated for morphological cell transformation (MT).

46. For each treatment group, normal (non-transformed) colonies and transformed colonies will be enumerated to evaluate the plating efficiency (PE), the relative plating efficiency (RPE) and the morphological transformation frequency (MTF) criteria detailed in paragraphs 56-58.

Controls

Solvent control

47. In case the test chemical is not water soluble, an appropriate solvent control should be used. If DMSO or other organic solvents are selected, they should be used at a final concentration that does not exceed 0.2% (see paragraph 31). The final concentration of any solvent should be the same in all solvent control and treated dishes.

Positive control

48. Because of the high amount of data on Benzo[a]pyrene (B[a]P), it should be used as positive control at the recommended concentrations of 1.0 to 5.0 $\mu\text{g/mL}$ in dimethyl sulfoxide (DMSO) to demonstrate the sensitivity of the assay. However, if justified, other chemicals can also be considered as positive controls. Each laboratory should establish the performance of the positive control under their own laboratory conditions (see paragraph 49).

Feeder cells control

49. For each test, at least 5 dishes with feeder cells only should be used concurrently to confirm the inability of these cells to replicate and to form colonies. For a valid test, no colony should be formed in these dishes at the end of the test period.

Solubility, pH, and osmolality

50. The solubility/precipitation of the test chemical in the solvent and in the test culture (medium) should be visually assessed and documented in the test report.

51. The pH of the test chemical dosing solutions should be measured at the time of preparation of the treatment medium and after at least four hours of undisturbed incubation in an incubator, in humidified atmosphere at 37°C and $10 \pm 0.5\%$ CO₂. In case of deviation from the expected pH at any time point, the pH of the medium should be adjusted to the selected pH. Any deviation should be reported and considered in the interpretation of the results.

52. The osmolality of the treatment medium should be measured prior to or at the time of performing the preliminary cytotoxicity determination or the main experiment. Osmolality of the treatment medium should be compared to the control medium, and any change used in the interpretation of results.

Proficiency of the laboratory

53. In order to demonstrate proficiency, a laboratory should perform tests with the four positive chemicals acting via different mechanisms, and two negative chemicals, included in [Table 2](#). Proficiency

should be demonstrated at the pH the assay will be conducted, i.e. pH 6.7 and/or pH 7.0. The choice of the negative chemicals will depend of the version of the assay the laboratory demonstrates proficiency with. During the course of these tests, the laboratory should establish:

- A historical negative (untreated, solvent) control range and distribution
- A historical positive control range and distribution.

54. Re-evaluation of laboratory proficiency is recommended if major changes to the experimental conditions are proposed for the assay (e.g. use of automated instead of manual scoring techniques). Before starting to use this method, it is recommended that personnel are trained in a laboratory experienced in the performance of this assay.

Table 2: Substances for Assessing Laboratory Proficiency

Category	Substance	CASRN
1. Carcinogens¹ (responsive in the SHE CTA (pH 6.7 and pH 7.0))		
	Benzo[a]pyrene	50-32-8
	2,4-diaminotoluene	95-80-7
	o-toluidine	636-21-5
Non-genotoxic carcinogen	Di (2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP)	117-81-7
2. Non carcinogens² (non-responsive in the SHE CTA ((pH 6.7 and pH 7.0))		
	Anthracene	120-12-7
	d-manitol (only for pH 6.7)	
	1 naphthylamine (only for pH 6.7)	69-65-8
	Benzoin (only for pH 7.0)	119-53-9

¹ Rodent carcinogen: sufficient evidence in animals.

²Rodent non-carcinogen: inadequate or no evidence in animals.

DATA AND REPORTING

Morphological transformation

55. The morphological transformation frequency (MTF) should be calculated for each treatment group, using the data of one trial, as follows:

$$\text{MTF} = \frac{\text{total number of transformed colonies}}{\text{total number of scorable colonies}} \times 100$$

Cytotoxicity

56. The average number of colonies per dish, the plating efficiency (PE) and the relative plating efficiency (RPE) should be determined for each treatment group.

57. The plating efficiency (% PE) and the relative plating efficiency (% RPE) should be calculated as follows:

$$PE = \frac{\text{total number of colonies per dish}}{\text{total number of target cells seeded per dish}} \times 100$$

$$RPE = \frac{\text{PE of treatment group}}{\text{PE of the solvent control group}} \times 100$$

58. In addition to the RPE, the colony size and density (number of cells per colony) should be recorded as parameters of cytotoxicity. The size and density is observed and recorded as three categories:

- Normal (+)
- Slightly reduced (++; 20 – 39 % reduction)
- Greatly reduced (+++; 40 – 60 % reduction)

Acceptability Criteria and historical controls

59. The following criteria have to be fulfilled for the validity of the assay:

- At least 1000 colonies per experimental group should be available for morphological transformation scoring. Occasionally, in case of a significant increase in morphological transformation rate, less than 1000 colonies are acceptable. However the average number of colonies per dish should normally not be less than 25.
- An average of 25-45 colonies per dish should be available (46). Occasionally, in case of a negative result, dishes with less than 25 colonies per dish are acceptable. Likewise, in case of a positive result, dishes with more than 45 colonies are acceptable.
- Cloning efficiency of the negative/solvent control is $\geq 20\%$.
- No colony formation should be observed in the feeder cell dishes. Feeder cells should be visible in the chemical treatment groups except if they are affected selectively by the test chemical. If the feeder cells are affected by the test chemical, then this observation should be recorded, reported, and considered in the interpretation of the results.
- Transformation frequency in the negative controls (untreated and solvent) is within the distribution of historical control data of the laboratory (e.g. 95% confidence interval). Based on historical data from experienced laboratories and data from the EURL ECVAM validation study, the upper limit of transformation frequency in the negative controls (untreated and solvent) is 0.6%.
- The positive control chemical should induce a biologically relevant and statistically significant increase in morphological cell transformation compared to the solvent control.

Data interpretation criteria

60. Although biological relevance of the results should be considered first, both statistical significance and biological relevance of data are considered in the interpretation of the negative and positive results. The level of concentration(s) increasing the MTF is carefully considered, taking into account the range of cytotoxic/non-cytotoxic concentrations.

61. Providing that all acceptability criteria are fulfilled, the following criteria are considered for the evaluation of results:

- (1) the increase in MT colonies is concentration-related,
- (2) at least one of the test concentration exhibits a statistically significant increase compared to the concurrent negative control,
- (3) the statistically significant result is outside the distribution range of the historical negative control data (e.g. 95% confidence interval).

62. A result can be considered clearly biologically relevant and a test chemical is considered a clear positive if all the above criteria are met.

63. A test chemical is considered as a clear negative if none of the criteria above (paragraph 62) are met.

64. Results are statistically analysed using the one-sided Fisher's exact test to determine if an increase in morphological transformation occurred at each concentration level compared to the concurrent solvent control. A $p < 0.05$ level of significance indicates a treatment related effect on MTF. The Cochran-Armitage trend test can be used to contribute to the evaluation of positive concentration-related response.

65. When results do not meet the criteria for a clear positive or a clear negative call, the test chemical should be evaluated by expert judgement and/or the experiment should be repeated. Modification of study parameters over an extended or narrowed range of concentrations, as appropriate, should be considered in follow-up experiments. In rare cases, even after further investigations, the data set will preclude making a conclusion of positive or negative results, and will therefore be concluded as equivocal.

Test report

66. The test report should include the following information:

Test chemical

Mono-constituent substance:

- physical appearance, water solubility, and additional relevant physicochemical properties;
- chemical identification, such as IUPAC or CAS name, CAS number, SMILES or InChI code, structural formula, purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc.

Multi-constituent substance, UVBCs and mixtures:

- characterised as far as possible by chemical identity (see above), quantitative occurrence and relevant physicochemical properties of the constituents.

Solvent (if appropriate)

- justification for choice of solvent
- concentrations tested and preparation of the dosing solutions
- signs of precipitation (absence or presence)

Cells

- source of cells
- number of cell subcultures
- maintenance of cell cultures
- absence of mycoplasmas

- identification of serum (provider and batch number)

Test conditions

- rationale for selection of concentrations, including cytotoxicity data and solubility limitations
- composition of the media, CO₂, pH
- serum concentration, origin and quality
- concentrations of test chemicals
- volume of solvent and test chemical added
- duration of treatment
- incubation temperature
- number of cells plated
- positive and negative controls
- criteria for scoring MT colonies

Results

- cytotoxicity results
- signs of precipitation
- pH, osmolality of culture media after addition of the test chemical
- number of total scorable colonies
- relative cloning efficiency
- concurrent feeder cell control
- dose-response relationship, where possible
- statistical analyses
- concurrent negative (solvent) and positive control data
- historical negative (solvent) and positive control data, with ranges, means, standard deviation, and confidence interval (e.g. 95%)

67. Data should be presented in tabular form. The following values should be presented for each group (treated and untreated groups, solvent and positive controls):

- total number, and average number per dish of scorable colonies for each group
- plating and relative plating efficiency %
- cloning efficiency
- colony size/density
- number of transformed colonies
- morphological transformation frequency (MTF %)
- Fisher's exact test p-value (one-sided)

Discussion of the results

Conclusion

REFERENCES

1. Barrett J.C. and Ts'o P.O.P. (1978). Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75: 3761-3765.
2. Kakunaga T.H. and Kamasaki H. (1985). Transformation Assay of Established Cell Lines: Mechanisms and Application. IARC Scientific Publications No 67. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 225p.
3. Berwald Y. and Sachs L. (1963). *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature*, 200, 1182-1184.
4. Newbold R.F., Overell R.W., Connell J.R. (1982). Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature* 299: 633-635.
5. Elias Z. *et al.* (1989). Cytotoxic and neoplastic effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 10 (11): 2043-2052.
6. OECD (2007). Detailed Review Paper on Cell transformation assays for detection of chemical carcinogens, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 31. OECD, Paris
7. Jacquet N. *et al* (2012). Carcinogenic potency of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Arch. Toxicol.* 86, 2, 305 – 314.
8. Jacquet N. *et al* (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA) acts as a tumor promoter on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Environ Sci Pollut Res* 19, 2537–2549.
9. Vasseur P. and Lasne C. (2012). OECD Detailed Review Paper (DRP) number 31 on “Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens”: main results and conclusions. *Mutat. Res.* 744, 8-11.
10. Corvi R. *et al* (2012). ECVAM prevalidation study on *in vitro* cell transformation assays: general outline and conclusions of the study. *Mutat. Res.* 744, 12–19.
11. ECVAM (2011). Recommendation concerning the cell transformation assays using Syrian hamster embryo cells (SHE) and the BALB/c 3T3 mouse fibroblast cell line for *in vitro* carcinogenicity testing. Annex I: ESAC opinion on the ESAC peer review of an ECVAM-coordinated prevalidation study concerning three protocols of the cell transformation assay (CTA) for *in vitro* carcinogenicity testing. [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our activities/alt-animal-testing/](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our%20activities/alt-animal-testing/).
12. Creton S. *et al* (2012). Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: state of the science and future research needs, *Mutagenesis*, 27,. 93–101.
13. Maire M.-A. *et al.* (2012). Recommended protocol for the Syrian hamster embryo (SHE) Cell Transformation Assay, *Mutat. Res.* 744, 76– 81.
14. EURL ECVAM DataBase service on Alternative Methods to Animal Experimentation (DB-ALM) protocol No. 136 on *in vitro* Syrian embryo hamster cell transformation assay (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>).

15. Combes R. *et al.* (1999). Cell Transformation Assays as Predictors of Human Carcinogenicity – The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 39, *ATLA* 27, 745-767.
16. LeBoeuf R.A. *et al.* (1999). Use of Syrian hamster embryo and BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals, in *The Use of Short and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*. D.B. McGregor, J.M. Rice and S. Venitt, eds. IARC Scientific Publications No. 146, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 409-425.
17. Adler S. *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010, *Arch. Toxicol.* 85, 367–485.
18. Baylin S.B. and Ohm J.E. (2006), Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6:107–116.
19. Albor, A. *et al.* (1994). 3-Methylcholanthrene inactivates the p53 gene in syrian hamster embryo fibroblasts by inducing a specific intronic point mutation, *Cancer Research*, 54 (16), pp. 4502-4507.
20. Schiffmann, D. *et al.* (1996). Diethylstilbestrol induces stable, inheritable DNA-hypomethylation in Syrian hamster embryo cells throughout multistage neoplastic transformation. *In Vitro Toxicol.*, 9 (2) 167-172.
21. Isfort, R.J. *et al.* (1997). Role of the H19 gene in Syrian hamster embryo cell tumorigenicity, *Molecular Carcinogenesis*, 20 (2), pp. 189-193.
22. Lehman-McKeeman LD and Gamsky EA (2000). Choline supplementation inhibits diethanolamine-induced morphological transformation in syrian hamster embryo cells: evidence for a carcinogenic mechanism. *Toxicological Science*; 55(2), pp.303-10.
23. Thomassen, D.G. *et al.* (1985). Evidence for multiple steps in neoplastic transformation of normal and preneoplastic Syrian hamster embryo cells following transfection with Harvey murine sarcoma virus oncogene (v-Ha-ras), *Cancer Research*, 45 (2), pp. 726-732.
24. Kirchner, S. *et al.* (1993). Cytogenetic changes in primary, immortalized and malignant mammalian cells, *Toxicology Letters*, 67 (1-3), pp. 283-295.
25. Ahmadzai, A.A. *et al.* (2012). The Syrian hamster embryo (SHE) assay (pH 6.7): Mechanisms of cell transformation and application of vibrational spectroscopy to objectively score endpoint alterations *Mutagenesis*, 27 (3), pp. 257-266.
26. Takahashi, M., Barrett, J.C., Tsutsui, T. (2002). Transformation by inorganic arsenic compounds of normal Syrian hamster embryo cells into a neoplastic state in which they become anchorage-independent and cause tumors in newborn hamsters, *International Journal of Cancer*, 99 (5), pp. 629-634.
27. Yasaei, H. *et al.* (2013). Carcinogen-specific mutational and epigenetic alterations in INK4A, INK4B and p53 tumour-suppressor genes drive induced senescence bypass in normal diploid mammalian cells *Oncogene*, 32 (2), pp. 171-179.
28. Ashra, H., and Rao, K.V.K. (2006). Elevated phosphorylation of Chk1 and decreased phosphorylation of Chk2 are associated with abrogation of G2/M checkpoint control during

- transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by Malachite green, *Cancer Letters*, 237 (2), pp. 188-198.
29. Notario, V. *et al.* (1990). Frequent activation of non-ras transforming sequences in neoplastic Syrian hamster cells initiated with chemical carcinogens, *Oncogene*, 5 (9), pp. 1425-1430.
 30. Zhang H. *et al.* (2000a). Acrylonitrile-induced morphological transformation in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 21, 727-733.
 31. Zhang H. *et al.* (2000b). Morphological transformation by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicol. Sci.*, 56, 303-31.
 32. Maire, M.A., Rast, C., Vasseur, P. (2005). Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) increases Bcl-2/Bax ratio and modifies c-myc expression in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicology Letters*, 158 (3), pp. 237-245.
 33. Alexandre, S. *et al.* (2003). ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, *Toxicology Letters*, 142 (1-2), pp. 77-87.
 34. Isfort, R.J. (2000). Mechanisms of cell transformation in the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 919, pp. 86-96.
 35. Rivedal E., Yamasaki H., and Sanner T. (1994). Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis*, 15: 689-694.
 36. Pienta R.J., Poiley J.A. and W.B. Leberz III (1977). Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int. J. Cancer*, 19, 642-655
 37. Schechtman L.M. (1985). Metabolic activation of procarcinogens by subcellular enzyme fractions in the C3H 10T1/2 and BALB/c 3T3 cell transformation systems. In *Transformation Assay of Established Cell Lines: Mechanisms and Application*. T. Kakunaga & H. Yamasaki, eds. IARC Scientific Publications No 67, International Agency for Research on Cancer, Lyon, p 137-162
 38. Landkocz Y. *et al.* (2011). Transcriptomic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in Syrian hamster embryo cells: an important role of early cytoskeleton disturbances in carcinogenesis? *BMC Genomics* 12:524.
 39. LeBoeuf R.A. *et al.* (1999). Use of Syrian hamster embryo and BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals. IARC Scientific Publications No. 146, Lyon, 409-425.
 40. LeBoeuf, R.A. *et al.* (1990). Multistage neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.70. *Cancer Research*, 50 (12), pp. 3722-3729.
 41. Pienta, R.J., Poiley, J.A., Leberz III., W.B. (1977). Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens, *International Journal of Cancer*, 19 (5), pp. 642-655.

42. Watanabe, M. and Suzuki, K. (1991). Expression dynamics of transforming phenotypes in X-irradiated Syrian golden hamster embryo cells, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 249 (1), pp. 71-80.
43. Bohnenberger S. *et al* (2012). Photo catalogue for the classification of cell colonies in the Syrian hamster embryo (SHE) Cell Transformation Assay at pH 6.7, *Mutat. Res.* 744, 82– 96.
44. Maire M.-A., C. Rast C., P. Vasseur P. (2012). Photo catalogue for the classification of cell colonies in the Syrian hamster embryo (SHE) Cell Transformation Assay at pH 7.0, *Mutation Research* 744 97– 110.
45. Ahmadzai A.A. *et al.* (2012). Classification of test agent-specific effects in the Syrian hamster embryo assay (pH 6.7) using infrared spectroscopy with computational analysis. *Mutagenesis* 27(3):375-382.
46. Kerckaert, G.A. *et al.* (1996). A comprehensive protocol for conducting the Syrian hamster embryo cell transformation assay at pH 6.70 (1996), *Mutat. Res. – Fund. Mol. Mech. Mutagen* 356, 1, 65-84.

ANNEX 1:

Culture medium, reagent and solutions used for cell preparation

The culture medium is **DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium** containing 1g/L glucose, 4 mM glutamine and 110 mg/L sodium pyruvate, with or without phenol red. The media can be purchased readymade from the vendors and should be stored according to the parameters (time, temperature) provided with the batch media.

If powder media is used, depending on the pH selected, the DMEM medium is adjusted to pH 7.0 with 1.5 g/L NaHCO₃ or to pH 6.7 with 0.75 g/L NaHCO₃ and sterilized by membrane filtration (0.1 µm porosity). The culture medium can be stored at 4° C during a period not exceeding 2 weeks.

This culture medium serves to prepare the following media:

- Complete growth medium (CGM)

The complete culture medium is prepared with addition of fetal bovine serum (FBS) at a concentration of 15% or 20% (v/v) for the SHE pH 7.0 and the SHE pH 6.7 CTAs, respectively.

- Cryopreservation medium

The cryopreservation medium is the pH-adjusted DMEM, added with 10% FBS and 10% DMSO or with 20% FBS and 7.5% DMSO (recommended if the test is carried out at pH 6.7).

- Cell isolation medium (CIM)

The cell isolation medium is the pH-adjusted DMEM added with 15% FBS and antibiotics penicillin 100 U/mL and streptomycin 100 µg/mL).

The solutions used for cell preparation and assay protocol are as follows:

- Buffered saline (e.g. calcium- and magnesium-free Hank's balanced solution (CMF- HBSS) or calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline (CMF-PBS))

- Colony staining solution: 10% (v/v) Giemsa in aqueous buffer

- Cell staining solution (e.g. 0.4% to 0.5% (w/v) trypan blue in buffered saline)

- Fixing solution: ethanol or methanol

- Detachment solution (e.g. 0.25% (w/v) trypsin in buffered saline or [0.05% (w/v) trypsin + 0.02% (w/v) Na₂EDTA-H₂O] in buffered saline)

- Dissociation solution (e.g. dispase 2 U/mL in buffered saline or [1.25% (v/v) Enzar-T, 2.5% (v/v) pancreatin with 200 U/mL of penicillin and 200 µg/mL streptomycin] in buffered saline)

- Wash solution: buffered saline with 200 U/mL of penicillin and 200 µg/mL streptomycin