評価報告書

Bhas 42 細胞形質転換試験法（Bhas 42 CTA）

形質転換試験資料編纂委員会

令和 2 年（2020 年）2 月 25 日

形質転換試験資料編纂委員会

浅 野 哲 秀　（委員長：元日東電工株式会社、現大阪信愛学院短期大学）
笠 松 俊 夫　（元花王株式会社）
北 本 幸 子　（住友化学株式会社）
山 本 美 佳　（アステラス製薬株式会社）

略語

3Rs:	Reduction, Replacement, and Refinement
CTA:	Cell Transformation Assay
DRP	Detailed Review Paper
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
JaCVAM:	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
JCRB:	Japanese Collection of Research Bioresources
OECD:	Organization for Economic Co-operation and Development
SHE:	Syrian Hamster Embryo
VMT:	Validation Management Team
WoE:	Weight of Evidence

要　旨

細胞形質転換試験（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。

日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）形質転換試験資料編纂委員会は、経済協力開発機構（OECD）ガイダンス文書（GD）No.231[§]として2016年2月に公表されたBhas 42細胞を用いる形質転換試験（Bhas 42 CTA）[1, 2] 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。

Bhas 42 CTAの特徴としては、1）がん遺伝子v-Ha-*ras*を導入して得られた接触阻止能を有しているクローン由来細胞株（Bhas 42 細胞）を使用すること、2）接触阻止状態の細胞集団中に形成される多層の形質転換細胞集団（形質転換巣：フォーカス）の有無を指標とすること、3）*in vivo*の2段階発がん実験モデルに相当するイニシエーションアッセイとプロモーションアッセイの2つのプロトコルからなること、4）多環芳香族などの代謝活性化を必要とする物質の検出が可能であること、5）培養期間が3週間で動物実験と比較して短期であること、6）試験費用は安価であること、などがあげられる。しかし、フォーカスの判定を目視によって行うため、判定者に対する十分な教育と訓練が必須である。

Bhas 42 CTAは、JaCVAMによって国際バリデーション研究が実施された。バリデーション研究は、6ウェルプレートを用いる6ウェル法と将来の自動化のためにウェルサイズをスケールダウンした 96 ウェル法のそれぞれの方法について実施された。EURL ECVAMは、プロトコルの完成度、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性について評価した結果、その有用性を認めている[3)]。しかしながら、化学物質による発がん機構の複雑性や代謝能などの*in vitro*試験系の本質的な限界を考慮すると、動物を用いるがん原性試験を CTA 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。むしろ、構造活性相関や遺伝毒性試験結果などの他の情報と組み合わせて、がん原性を疑わせる化学物質等のスクリーニング系として利用することによって、がん原性評価スキーム全体として、使用する動物数の大幅な削減が可能となり、3Rsの精神に適う試験方法であると考えられる。また、96ウェル法におけるフォーカス判定の自動化が実現できれば、より多くの機関で実施可能な試験となる可能性がある。このような観点から、Bhas 42 CTAはさらに発がん機構などのデータを積み重ねることにより、化学物質のがん原性を予測する試験の一つとしてその有用性が増すと考えられる。

---

§ Bhas 42細胞はBALB/3T3 A31-1-1細胞にv-Ha-*ras*遺伝子を導入して樹立された培養細胞である。Bhas 42 CTAに関するOECD GDNo.231（2016）が公表された後、Bhas 42細胞の遺伝子型解析がSSLPs法によって実施された。遺伝子解析の結果は、Bhas 42細胞の起源となるマウス系統はBALB/cマウスではなく、Swissマウスであることを示していた(K.Uchio-Yamada et al. (2017) In Vitro Cell Dev Biol Anim53:225–230)。Bhas 42細胞の起源と考えられていたマウス系統に誤認があったことが明らかにされたわけである。しかしながら、もともとのBALB/3T3 A31-1-1細胞もその起源となるマウスがSwiss系であることも併せて報告され、*ras*遺伝子が導入される前からマウス系統の誤認があったことが明らかになった。マウス系統の誤認があったとしても、Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験によって明らかにされたがん原性との相関データ、ガイダンス化のためのバリデーション試験等々のデータの信頼性およびBhas 42 CTAの有用性や重要性には何ら影響を及ぼすことはないと判断され、Bhas 42 CTAの重要性には影響を及ぼさない旨を記した追補版ENV/JM/MONO(2016)[2)]が2017年に公表された。

1. 試験方法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性

1-1. 科学的妥当性

一般的に CTA とは、培養細胞に化学物質を曝露することにより不可逆的な形態的変化を起こすかどうかを調べる *in vitro* 試験である。

Bhas 42 細胞は、BALB/3T3 A31-1-1 細胞に v-Ha-*ras* 遺伝子を導入し、BALB/3T3 A31-1-1 細胞と同様に接触阻止能を有するクローンに由来する細胞株として 1988 年に樹立された [4]。Bhas 42 CTA は、化学物質曝露により接触阻止能を失った形質転換細胞が増殖することによって形成される塩基性色素に濃染する形質転換巣（フォーカス）の出現頻度を指標に化学物質の形質転換能を評価する試験法である。接触阻止能を維持している正常な Bhas 42 細胞はヌードマウスに移植しても腫瘍を形成しないが、形質転換した細胞は、ヌードマウスに対して 100%造腫瘍性を示すことが報告されている [5~7]。

Bhas 42 CTA は、イニシエーションアッセイとプロモーションアッセイの 2 つのアッセイプロトコルから構成されている。少なくともどちらか一方のアッセイで陽性の結果が得られた場合を CTA 陽性と判定するが、89 物質（52 のがん原物質、37 の非がん原物質）についての結果では、一致率 78%、偽陰性率 27%、偽陽性率 16%であった [8]。代謝活性化を必要とする多環芳香族のがん原物質 10 種のうち 8 物質で CTA の結果は陽性を示し、多環芳香族化合物 [9] 処理により Cyp1a1 の発現が誘導されること、および、2-Acetylaminofluorene（主に Cyp1a2 によって代謝）や Cyclophosphamide（主に Cyp2b10 によって代謝）のがん原物質の暴露により、CTA は陽性の結果を示していること、さらに表 1 で示した 2AAF により Cyp1a1 が誘導する事実から、その代謝活性化能が示唆される。

表 1　がん原物質で処理した Bhas 42 細胞の Cyp 遺伝子発現誘導（未発表データ）

適用物質	マウス Cyp 遺伝子の発現誘導（μg RNA あたりのコピー数）						
	mCyp 1a1	mCyp 1a2	mCyp 2b10	mCyp 2c29	mCyp 2d22	mCyp 2e1	mCyp 3a11
DMSO 0.5 vol%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2AAF 20μg/mL	4.11×10^{7}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CPD 2 mg/mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MCA 1μg/mL	2.29×10^{8}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

2AAF：2-Acetylaminofluorene、CPD：Cyclophosphamide、MCA: 3-Methylcholanthrene
N.D.: Not determined, under limit of quantification ($<5\times10^{5}$ copies/μg RNA)

EURL ECVAM は JaCVAM によって実施された Bhas 42 CTA の国際バリデーション研究結果に基づいて、そのプロトコルの完成度、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性を評価した結果、その有用性を認めている [3]。

がん化の多段階説は現在広く受け入れられている概念であるが、その分子生物学的機構に関しては、遺伝子導入による細胞形質転換研究に依るところが大きい。ヒト初代培養細胞は c-Ha-*ras* 遺伝子の導入のみでは形質転換しないが、c-*myc* などの遺伝子やがん原物質あるいは 12-*O*-Teteradecanoyl phorbol 13-acetate（TPA）曝露と組み合わせ

ることにより形質転換することが知られている。一方、p53 遺伝子の変異等によって不死化した細胞株では c-Ha-*ras* 遺伝子の導入のみでも形質転換しうる。また、*ras* 遺伝子導入による形質転換が TPA 曝露により増強される。さらに、化学物質曝露によって誘導されたラット腫瘍細胞の *ras* 遺伝子は、突然変異することによって活性化することが見いだされている。これらの報告は、*ras* 遺伝子の活性化が細胞の形質転換に重要な役割を果たしていることを示唆している。活性型 v-Ha-*ras* が安定導入された Bhas 42 細胞は、不死化した細胞にさらに *ras* 遺伝子を導入している事実から、多段階的腫瘍形成過程の後期に起きる状態を反映していると考えられる。

ras 遺伝子の変異・活性化以外の遺伝的変化やエピジェネティックな変化も細胞形質転換を引き起こす要因として考えられている。たとえば、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影響し、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-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、ホルモン作用発現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。

Bhas 42 CTA が形質転換することは、がん化の過程で判明している上記のようなメカニズムとその一部が整合していることから、Bhas 42 CTA の科学的な検証は、まだ十分ではないが、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。

1-2. 規制上の妥当性

Bhas 42 CTA は単一の化学物質についてのみ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、Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials（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 GD[2)] 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、あるいはがん原性にかかる証拠の重み付け（WoE）に基づく評価を行う際に Bhas 42 CTA 結果を利用することは有用であるということである。

Bhas 42 CTA のみならず、CTA は遺伝毒性がん原物質に対する検出感度が高いことが知られているが、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。CTA が OECD テスト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、CTA の正確性分析で用いた非遺伝毒

性がん原物質ないし *in vivo* 発がんプロモーターが少なかったこと [10,11]、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を完全に代替す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、例えば WoE に基づく評価のための補助的な試験として位置づけることが適切であると考えられる。

2. 試験方法のプロトコルの妥当性

2-1. 試験法の概略

Bhas 42 CTA は、特殊な装置や試薬を必要とせず、一般的な細胞培養設備と細胞培養技術があれば実施可能な試験法である。また、シリアン・ハムスター胎仔（SHE）細胞を用いる CTA とは異なり、Bhas 42 CTA は動物やフィーダー細胞を必要としない。

Bhas 42 細胞に導入した *ras* 遺伝子はマウスの 17 番および 19 番染色体上に組み込まれており、平均 2.4 コピー保持している [5]。この細胞は無限増殖能を有しているが、培養容器底面全体に広がるまで増殖すると単層の状態で増殖が停止（接触阻止）し、その状態で生存可能である。一方、接触阻止能を失った形質転換細胞は、紡錘状の細胞で、単層の正常細胞中に浸潤し、互いに交差した状態で増殖し、多層となり塩基性色素で濃染される形質転換巣（フォーカス）を形成する。また、形質転換細胞のほとんどは正常な Bhas 42 細胞と比較して、*ras* 遺伝子の発現が 2～14 倍上昇していることが報告されている [2]。 このような形質転換細胞はすべて *in vivo* で造腫瘍性を示す。

Bhas 42 CTA は、化学物質曝露により誘発されたフォーカスの有無を指標として、その形質転換能を評価する試験法である。フォーカスの判定には十分な教育・訓練が必要であり、判定には画像を用いたアトラスなどが有用であると考えられる。

2-2. 試験法の原理

Bhas 42 CTA は、イニシエーションアッセイ（細胞増殖期に化学物質を処理する方法）とプロモーションアッセイ（細胞が定常期にあるときに化学物質を処理する方法）の 2 つのプロトコルから構成されている（図 1、図 2）。

Bhas 42 CTA は 6 ウェルプレートを用いる方法が最初に開発され、続いて自動化への応用可能な 96 ウェルプレートを用いる方法が開発されたため、2 つの方法に対するバリデーション研究がそれぞれ実施された。2 つの方法は、基本的に同じプロトコルであり、播種細胞数がウェルサイズに合わせてスケールダウンされていることが異なる点である。

2-2-1. イニシエーションアッセイ

イニシエーションアッセイは、細胞増殖期に化学物質曝露を行い、その後 DNA 合成を経ることができるように、低密度で細胞を播種し、播種翌日から化学物質を 3 日間曝露し、培養開始 4 日目に新鮮培地に交換して、3 ないし 4 日毎に 2 回培地交換しながら 10 日間培養を継続する。

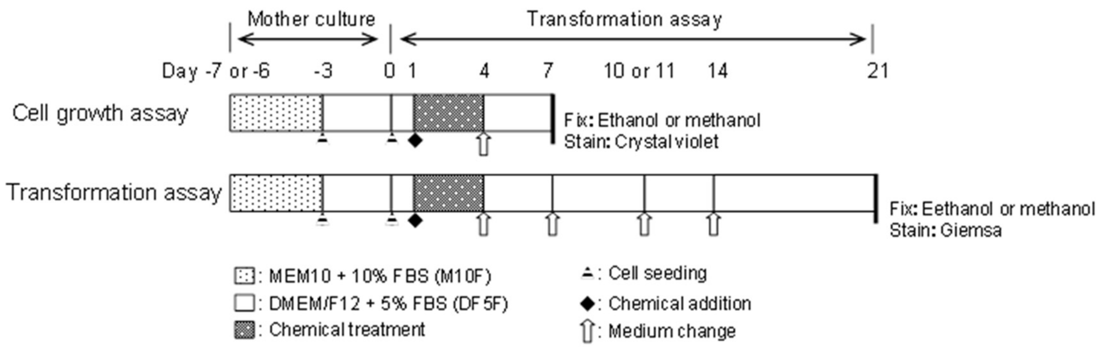

図 1 Bhas 42 CTA のイニシエーションアッセイの方法

2-2-2. プロモーションアッセイ

プロモーションアッセイは、接触阻止能によって増殖が停止している単層状態の細胞に化学物質を曝露するため、イニシエーションアッセイの 2 倍の細胞を播種する。増殖が停止しはじめるサブコンフルエントの時期から化学物質を含む培地を 3 ないし 4 日毎に 2 回交換しながら 10 日間化学物質を曝露する。

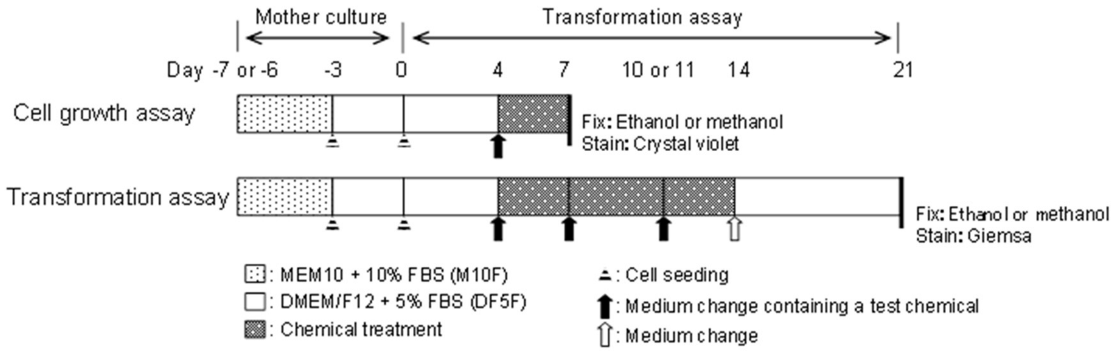

図 2 Bhas 42 CTA のプロモーションアッセイの方法

2-2-3. 培養期間

両アッセイともに、培養開始 14 日目に新鮮培地に交換して以降、培地交換せずに 7 日間培養する。

2-2-4. 細胞の固定と染色

培養開始 21 日目に細胞を固定し、ギムザ染色を行う。

2-2-5. フォーカスの判定

1) 判定は全てコード化して実施する。
2) 各ウェルについてフォーカスの有無を観察する。
3) 6 ウェル法は各ウェルのフォーカス数を数え、ウェルあたりの平均フォーカス数を溶媒対照と比較する（図 3）。
4) 96 ウェル法はフォーカスのあるウェル数を数え、有効ウェル数（通常は 96 ウェル）

あたりのフォーカスのあるウェル数を溶媒対照と比較して判定を行う（図 4）。

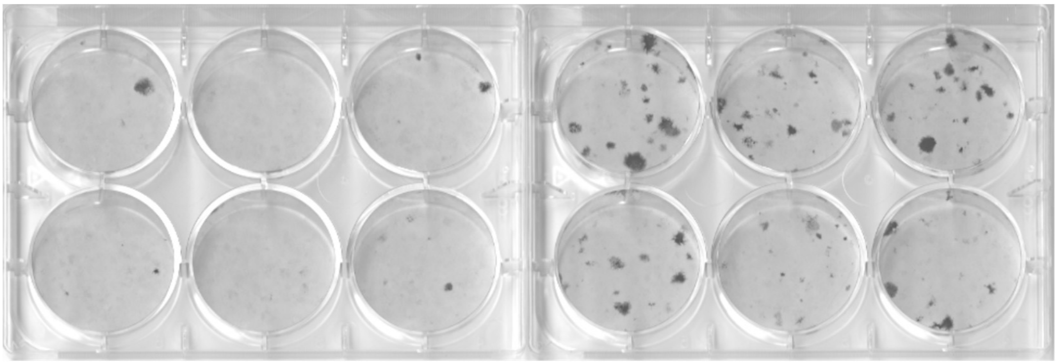

図 3　6 ウェル法における溶媒対照プレート（左）と陽性対照プレート（右）の CTA 例

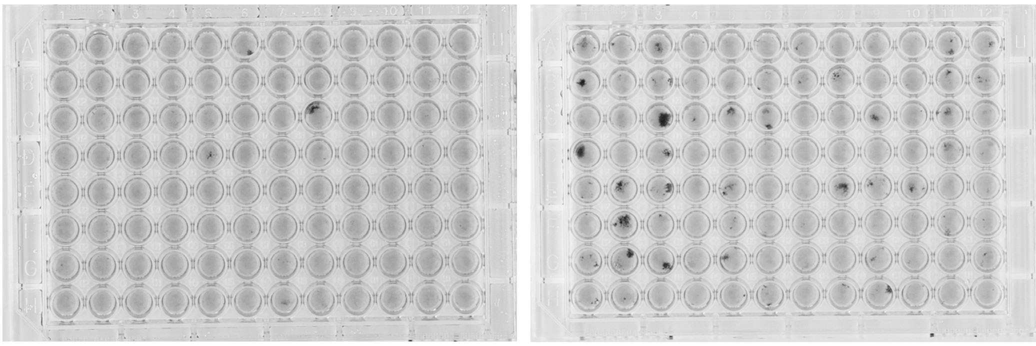

図 4　96 ウェル法における溶媒対照プレート（左）と陽性対照プレート（右）の CTA 例

2-2-6. 細胞毒性

細胞毒性については、同じプロトコルで細胞播種および化学物質曝露を行う。培養開始 7 日目に細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色後、クリスタルバイオレット抽出液の吸光度（540-570 nm）を吸光度計で測定し、溶媒対照群に対する化学物質曝露群の増殖の割合を算出する。細胞毒性試験は、化学物質の処理濃度を設定および CTA における化学物質の細胞毒性の評価のために実施する。ただし、細胞毒性により接触阻止状態に達していない化学物質曝露群については毒性ありと判断し、フォーカスの評価には使用しない。

2-3. プロトコルの妥当性

GD No.231 では、以下の項目に対する対応が明確にされており、プロトコルは妥当であると判断された。

2-3-1. 実験系

Bhas 42 細胞は、日本細胞バンク（JCRB）（Cell Bank No.: JCRB0149）から入手可能である。また、ストックする凍結細胞の作製方法の詳細についても情報が提供されている。

2-3-2. ウシ胎仔血清（FBS）のロット試験

新たに用いる FBS については 50%以上のコロニー形成率を示し、自然形質転換率が低く、陽性対照物質処理によるフォーカス出現率が試験成立基準を満たしているロッ

トを選択する。

2-3-3. CTA 技術の習熟度確認試験

CTA 実施施設は、定められた陽性および溶媒対照物質を用いて、定期的に技術熟達のための CTA を実施し、CTA を実施するための技術の習熟度を確保する。

2-3-4. イニシエーションアッセイとプロモーションアッセイの結果の判断

イニシエーションアッセイおよびプロモーションアッセイは独立して評価を行う。当該化学物質の形質転換誘発性については、いずれか一方または両アッセイで陽性結果が得られた場合には陽性、両アッセイ共に陰性結果が得られた場合には陰性と判定する。

2-3-5. 6 ウェル法と 96 ウェル法のプロトコルの差異

6 ウェル法と 96 ウェル法ではウェルサイズが異なるが、ウェルの単位面積あたりの播種細胞数は同じである。その他の基本的実験プロトコルは同じであるが、判定法が異なる。6 ウェル法は 6 ウェルプレートのウェルごとにフォーカス数を計数し、ウェルあたりの平均フォーカス数と溶媒対照群のフォーカス数を比較する。96 ウェル法はフォーカスのあるウェル数を計数し、有効ウェル数(通常は 96 ウェル)とフォーカスのあるウェル数を溶媒対照と比較して判定する。

2-3-6. Bhas 42 CTA における 6 ウェル法と 96 ウェル法のパフォーマンスの差

2 つの方法のバリデーション研究において、共通に用いられた物質が 16 物質あり、それらの物質のうち、適切に実施された 14 物質で得られた結果は、方法間での差が認められなかったことから、両方法は同等と評価されている。

2-3-7. 試験成立基準

CTA の結果は、GD No.231 の試験成立基準に基づいて判断する。

2-3-8. CTA 評価の客観性の確保

CTA の判定は、6 ウェル法と 96 ウェル法ともに、被験物質およびそれぞれのプレートはコード化して評価する。

2-3-9. 主観的スコアリングによるデータの変動の防止(客観性の確保)

以下のことを実施する。

1) 施設内外の CTA 経験者によるスコアラーの適切なトレーニング
2) 正常細胞および種々のフォーカスの写真見本(画像アトラス)の利用(スコアリングにあたっては、常時フォーカスアトラスなどを利用する)
3) 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
4) ディッシュもしくはプレートのコード化

2-3-10. 結果判定基準

CTA の結果は、GD No.231 で規定した判定基準に従って判定する。

3. バリデーション研究に用いられた物質の分類と妥当性

バリデーション研究は、6 ウェル法と 96 ウェル法について実施されている[12]。それらの試験に用いられた化学物質のがん原性および遺伝毒性に関する情報については、OECD DRP31[13] を参照し、DRP31 にそのデータが記載されていない化学物質については原著論文[14~16] を参照している。

3-1. 6 ウェル法

6 ウェル法では、下記の 8 つのがん原物質と 4 つの非がん原物質の計 12 物質が用いられている。

評価された 12 物質は、*in vitro* 遺伝毒性試験、*in vivo* 遺伝毒性試験、国際がん研究機関（IARC）の評価、およびがん原性の評価結果を様々に組み合わせて選択されており、その物質選択は妥当であると考えられる。

＜がん原物質＞
2-Acetylaminofluorene
Cadmium chloride
Dibenz[a,h]anthracene
Lithocholic acid
Methapyrilene HCl
Mezerein
Sodiumu arsenite
o-Toluidine HCl

<非がん原物質>
Anthracene
L-Ascorbic acid
Caffeine
D-mannitol

表 2　6 ウェル法のバリデーション研究に用いられた物質の遺伝毒性、IARC グループおよびがん原性

Chemicals	Genotoxicity				IARC Group	Carcinogenicity
	in vitro			*in vivo*		
	Ames	MLA	CA	MN		
2-Acetylaminofluorene	+	+	+	+		+
Cadmium chloride	−	+	+/−	−	1	+
Dibenz[a,h]anthracene	+	+	+		2A	+
Lithocholic acid	−	+/−	−			TP
Methapyrilene HCl	−	+/−	+			+, TP
Mezerein	−					TP
Sodium arsenite	−	+		+	1	+
***o*-Toluidine HCl**	+/−					+
Anthracene	+/−	+	−		3	−
L-Ascorbic acid	+w/−		−	+		−
Caffeine	−		+	+	3	−
D-mannitol	−	−	−	−		−

Carcinogenicity;　+: carcinogen, −:non-carcinogen, TP: Tumor promoter
Ames: Ames test, MLA: Mouse lymphoma test, CA: Chromosomal aberration test,
MN: Micromucleus test
+: positive, −: negative , +/−: positive and negative results in DRP31, +w:weakly positive

なお、SHE CTA の専門家会議において、Methapyrilene HCl と *o*-Toluidine HCl は遺伝毒性およびがん原性の分類が再評価された。その結果、Methapyrilene HCl は Ames 試験と *in vitro* 染色体異常試験が陽性の遺伝毒性がん原物質、*o*-Toluidine HCl は明確な遺伝毒性を示すデータが存在しないことから、非遺伝毒性がん原物質と評価された [11]。また、*o*-Toluidine については、遺伝毒性がん原物質と評価されている。このように、遺伝毒性試験結果の評価は必ずしも確定しておらず、バリデーション研究実施時点での遺伝毒性試験データを適切に判断して物質選択が行われたと考えられる。

3-2. 96 ウェル法

96 ウェル法でのバリデーション研究は、フェーズ I（7 物質）とフェーズ II（16 物質）が行われている。

フェーズ　I

＜がん原物質＞

3-Methylcholanthrene
Benzo[a]pyrene
2-Acetylaminofluorene
TPA
o-Toluidine

<非がん原物質>

Anthracene
Phenanthrene

フェーズ　II

＜がん原物質＞

MNNG
Benzo[a]pyrene
Dibenz[a,h]anthracene
Sodiumu arsenite
Cadmium chloride
Methapyrilene HCl
Mezerein
Lithocholic acid
Phorbol

<非がん原物質>

Pyrene
Caprolactam
Ampicillin sodium
L-Ascorbic acid
D-Mannitol
Caffeine
Eugenol

96 ウェル法におけるバリデーション研究のフェーズ I およびフェーズ II では、がん原物質および非がん原物質ともに遺伝毒性試験結果との組み合わせを考慮し、しかも 6 ウェル法との比較も併せて考慮した物質の選択が行われており、その物質選択は妥当であると考えられる。表 3 および表 4 はそれぞれの遺伝毒性試験等の結果との組み合わせを示している。

表 3　96 ウェル法（フェーズ I）バリデーション研究に用いられた物質の遺伝毒性、IARC グループおよびがん原性

Chemicals	Genotoxicity				IARC Group	Carcinogenicity
	in vitro			*in vivo*		
	Ames	MLA	CA	MN		
3-Methylcholanthrene	+	+	+			+
Benzo[a]pyrene	+	+	+	+	**2A**	+
2-Acetylaminofluorene	+	+	+	+		+
TPA	−		+			+, TP
o-Toluidine	+/−	+/−	+	−	**2A**	+
Anthracene	+w/−	+	−		**3**	−
Phenanthrene	+w/−		−		**3**	−

Carcinogenicity;　+: carcinogen, −: non-carcinogen, TP: Tumor promoter
Ames: Ames test, MLA: Mouse lymphoma test, CA: Chromosomal aberration test,
MN: Micronucleus test
+: positive, −: negative , +/−: positive and negative results in DRP31, +w: weakly positive
TPA: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

表 4　96 ウェル法（フェーズ II）バリデーション研究に用いられた物質の遺伝毒性、IARC グループおよびがん原性

Chemicals	Genotoxicity				IARC Group	Carcinogenicity
	in vitro			*in vivo*		
	Ames	MLA	CA	MN		
MNNG	+	+	+	+		+
Benzo[a]pyrene	+	+	+	+	2A	+
Dibenz[a,h]anthracene	+	+	+		2A	+
Sodium arsenite	−	+		+	1	+
Cadmium chloride	−	+	+/−	−	1	+
Methapyrilene HCl	−	+/−	+			+, TP
Mezerein	−					TP
Lithocholic acid	−	+/−	−			TP
Pyrene	−	+	−		3	−
Caprolactam	−	−	−	−	4	−
Ampicillin sodium	−	−	−		3	−
L-Ascorbic acid	+w/−		−	+		−
D-Mannitol	−	−	−	−		−
Caffeine	−		+	+	3	−
Phorbol						@
Eugenol	−	+	+	+/−	3	−

Carcinogenicity;　+: carcinogen, −: non-carcinogen, TP: Tumor promoter
Ames: Ames test, MLA: Mouse lymphoma test, CA: Chromosomal aberration test,
MN: Micronucleus test
+: positive, −: negative , +/−: positive and negative results in DRP31, +w: weakly positive
@: Carcinogenicity in mice (leukaemogenic action) is positive or negative depending on the strains [Berenblum and Lonai, 1970; Armuth, 1976]. Tumor-promoting activity in mouse skin is positive in a sensitive strain butnegative in other strains [Baird and Boutwell, 1971; Slaga et al., 1976 and 1980]. These strains are mentioned in the text.

なお、がん原性が不確実である Phorbol については、最高用量を限定して実験を行ったため、評価に必要な毒性が得られず、評価不能という結果となっている。

4. 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

Bhas 42 CTA のバリデーション研究に用いる物質選定に DRP31 のがん原性データ* が利用された。DRP31 に記載の無いデータについては、個々の原著文献データに基づいている。In house データである 98 物質の Bhas 42 CTA の結果 [9] が採用されているが、この論文も基本的には DRP31 の情報に基づいて 98 物質を分類している。不足情報については、Chemical Carcinogenesis Research Information System (CCRIS) および IARC Monograph からデータを得、それらに存在しないデータについては、原著論文などを参照している。

* SHE CTA のガイドライン作成に際して、CTA 専門家グループによる DRP31 のがん原性データの見直しが行われたが、39 物質（がん原物質：19、非がん原物質：19、がん原性不明：1）中 1 物質（非がん原物質）のみがこれまでの評価と異なる結果であった。

5. 試験データと結果の利用性

6 ウェル法のプレバリデーション研究は Tanaka ら[17] による共同研究の結果が利用されている。また、6 ウェル法のバリデーション研究結果についは Sakai ら(2011)[18] が報告している。さらに、正確性のデータの一部として利用されている 98 物質のデータについては、Sakai ら(2010)[9] が報告している。

6 ウェル法および 96 ウェル法のバリデーション研究は OECD の GD No.34[19] に準拠して実施されている。化合物は全てコード化され、GLP 精神に基づいて実施されたデータはマネージメントチームの調査を受けている。これらの結果は、バリデーション報告書[13] としてまとめられ、再確認可能な状態で公表されている。

6. 試験方法の正確性

バリデーション研究結果をがん原性試験の結果と比較することによって、一致度、感度、特異度など試験方法の正確性が評価されている。なお、Bhas 42 CTA は 2 つのプロトコル(イニシエーションアッセイとプロモーションアッセイ)からなるが、少なくとも一方が陽性の場合を CTA 陽性と判定し、両アッセイともに陰性の場合を CTA 陰性と判定している。バリデーション報告書では各アッセイ結果について詳細に記載されているが、ここでは CTA 判定とがん原性試験結果を比較している。また、同一物質について複数施設の判定結果が存在する場合、一致数の多い判定結果をその物質の最終判定とし、その結果とがん原性試験結果を比較している(Appendix 1 参照)。

6-1. 6 ウェル法

6 ウェル法のバリデーション研究では 12 物質(がん原物質：8、非がん原物質：4)の評価を行ったが、12 物質すべてががん原性試験結果と一致している(表 5)。

表 5　Bhas 42 CTA の正確性(6 ウェル法)

		in vivo がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
Bhas 42 CTA	陽性	8	0
	陰性	0	4

一致率(Concordance)　：(8+4)/(8+0+0+4)×100＝12/12×100＝100%
感度(Sensitivity)　：8/(8+0)×100＝8/8×100＝100%
特異度(Specificity)　：4/(0+4)×100＝4/4×100＝100%
偽陰性率(False Negative)　：0/(8+0)×100＝0/8×100＝0%
偽陽性率(False Positive)　：0/(0+4)×100＝0/4×100＝0%

その詳細を見ると、施設間で CTA 判定が異なった物質は、*o*-Toluidine HCl と Anthracene であり、*o*-Toluidine については 1 施設が陰性、2 施設が陽性で、最終判定は陽性となり、がん原性試験結果と一致した。また、Anthracene は 2 施設が陰性、1 施設が陽性で、最終判定は陰性となり、がん原性試験結果と一致している。

6 ウェル法については、98 物質の in house データ[9] が報告されているが、がん原性の明らかな 89 物質についてコード化せずに実施した結果では、一致率は 78%、感度

は 73％および特異度は 84％であった（表 6）。バリデーション研究に用いた物質数が少ないとはいえ、コード化した試験での正確度が高いことは注目できる。また、バリデーション研究では *o*-Toluidine HCl が使用され、in house データでは *o*-Toluidine が使用されたが、バリデーション研究の最終判定はすべて in house データと一致した。

表 6　Bhas 42 CTA の正確性（6 ウェル法、in house データ）

		in vivo がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
Bhas 42 CTA	陽性	38	6
	陰性	14	31

一致率（Concordance）　：(38+31)/(38+14+6+31)×100＝69/89×100＝78％
感度（Sensitivity）　：38/(38+14)×100＝38/52×100＝73％
特異度（Specificity）　：31/(6+31)×100＝31/37×100＝84％
偽陰性率（False Negative）：14/(38+14)×100＝14/52×100＝27％
偽陽性率（False Positive）：6/(6+31)×100＝6/37×100＝16％

6-2. 96 ウェル法

96 ウェル法のバリデーション研究では、フェーズ I で 7 物質（がん原物質：5、非がん原物質：2）、フェーズ II で 16 物質（がん原物質：8、非がん原物質：7、がん原性が不確かな物質：1）の評価が行われた。フェーズ I とフェーズ II に共通の物質が 1 物質（B(a)P）存在することから、96 ウェル法のバリデーション研究で使用された物質は計 22 物質である。しかしながら、1 物質（Phorbol）についてはがん原性が不確かであることから、21 物質について正確性が評価されている（表 7）。

その結果、一致率は 86％、感度および特異度はそれぞれ 83％ および 89％であり、6 ウェル法の in house データよりも良好であった。

表 7　Bhas 42 CTA の正確性（96 ウェル法）

		in vivo がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
Bhas 42 CTA	陽性	10	1
	陰性	2	8

一致率（Concordance）　：(10+8)/(10+2+1+8)×100＝18/21×100＝86％
感度（Sensitivity）　：10/(10+2)×100＝10/12×100＝83％
特異度（Specificity）　：8/(1+8)×100＝8/9×100＝89％
偽陰性率（False Negative）：2/(10+2)×100＝2/12×100＝17％
偽陽性率（False Positive）：1/(1+8)×100＝6/37×100＝16％

その詳細を見ると、施設間で CTA の結果判定が異なった物質は 1 物質（Phenanthrene、4 施設中 1 施設のみで陽性と判定）で、それ以外は、最終判定ががん原性試験結果と異なった 3 物質（Sodium arsenite、*o*-Toluidine、Pyrene）も含め施設間の CTA の結果判定はすべて一致している。

7. 試験方法の信頼性

Bhas 42 CTA バリデーション研究報告書 [12) によると、共同研究実施のためのバリデーション実行委員会（VMT）が編成されているが、バリデーション実施前のプレバリデーションは VMT が主導していないため、参考資料と考えられる。しかしながら、同報告書によると、VMT が精査した結果、プレバリデーション研究の質はバリデーション研究と同等であるとされており、その有効性については十分な評価がなされている。

7-1. 技術移転性

方法論的には、Bhas 42 CTA は一般的な細胞培養設備と細胞培養技術のみで実施可能な試験法である。フォーカスの判定については SHE CTA と同様に十分な教育と訓練が必要とされる試験方法であると考えられる。バリデーション研究実施前には、バリデーション参加施設に対する試験方法およびフォーカス判定のためのワークショップが実施されている。

6 ウェル法では Bhas 42 CTA 国際共同研究 [17) に国内 4 施設と海外 2 施設が参加している。96 ウェル法については、6 ウェル法に参加した国内試験施設が参加し、陽性対照物質を用いたプレバリデーション研究を実施してからバリデーション研究を開始している。

6 ウェル法プレバリデーション研究：海外 2 施設は Bhas 42 CTA 未経験であったため、溶媒対照と陽性対照物質（MCA、TPA）を用いたプレバリデーション研究を実施している。

96 ウェル法プレバリデーション研究：国内 4 施設に対してのみに陽性対照物質（MCA、TPA）を用いたプレバリデーション研究を実施している。

6 ウェル法のバリデーション研究結果から判断すると、教育と訓練が十分になされていれば、試験の精度は十分に確保されており、技術移転性に困難はないと考えられた。

7-2. 施設内再現性

本報告で評価した Bhas 42 CTA 試験では、すべての試験で溶媒対照群および陽性対照群を設定している。プレバリデーション研究、バリデーション研究、あるいは in house 試験における陽性対照、溶媒対照および各試験の共通物質のデータを参照すると、6 ウェル法については、すべての試験施設において陽性対照群は、溶媒対照群と比較して有意に増加しており、試験受入条件を満たしている。ただし、施設 I および V ではプロモーションアッセイにおける陽性対照物質のフォーカスの計数値にバラツキが認められる（図 5）。

施設内再現性は、Bhas 42 CTA 国際共同研究 [17)、バリデーション研究および in house データにおける同一物質でのフォーカス計数値を比較することによって評価されている。バリデーション研究と in house データまたは共同研究から得られたデータを比較すると、11 物質で結果が一致している（11/12、92%）。共通の 4 物質について施設間において評価した結果、Anthracene の結果以外はすべて同等であり、6 ウェル法の施設内再現性は良好であると判断されている。

96 ウェル法については、すべての試験施設において陽性対照群のフォーカス形成率の増加に統計学的な有意差が認められ、施設内再現性は良好であり、4 試験施設のバラツキについても良好であると判断されている(図 6)。

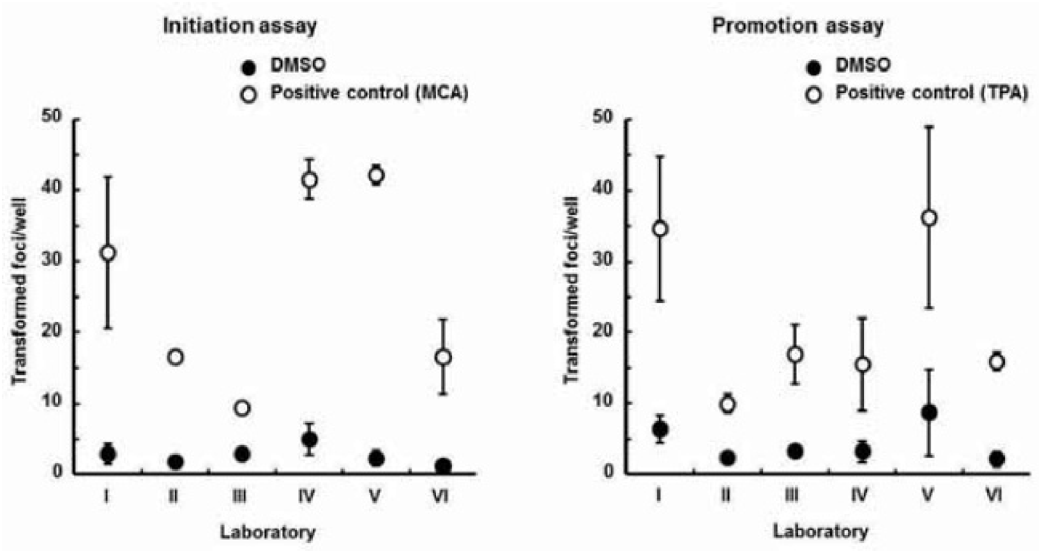

図 5 各試験施設における溶媒対照群と陽性対照群のウェル当たりの平均フォーカス数とそのバラツキ(6 ウェル法)

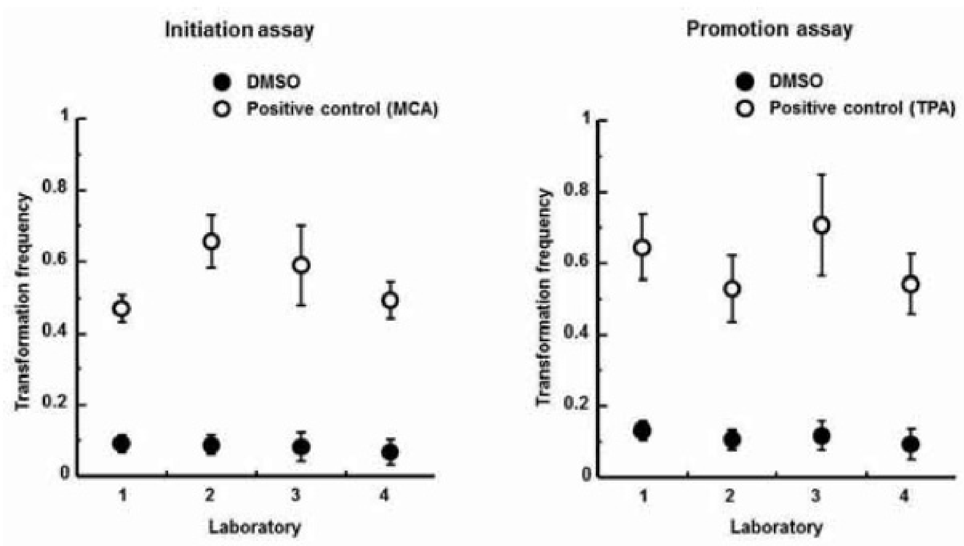

図6 各試験施設における溶媒対照群と陽性対照群のウェル当たりの平均フォーカス形成率とそのバラツキ(96ウェル法)

プレバリデーション研究とフェーズ I バリデーション研究における共通コード化物質(MCA および TPA)、およびフェーズ I バリデーション研究とフェーズ II バリデーション研究における共通コード化物質(B(a)P)を用いて施設内再現性を評価した結果は、全ての参加施設で 3 物質の最終評価が一致しており、その反応性も同等であることが報告されている。したがって、Bhas 42 CTA の施設内再現性は良好であると判断される。

7-3. 施設間再現性

施設間再現性については、プレバリデーション研究、バリデーション研究、および in house 試験における溶媒対照群および陽性対照群の結果および試験した物質の最終判定結果を比較することによって評価されている。

6 ウェル法では、全ての溶媒対照群のフォーカス出現数と陽性対照群の出現数を比較した場合、統計学的有意差が認められており、溶媒対照群および陽性対照群の出現数の施設間再現性については評価できるとしている。試験に用いた 12 物質に関して見れば、3 施設間の一致率は、83%(10/12)であり、施設間再現性は良好である。なお、イニシエーションアッセイの Mezerein と Caffeine については、不完全な結果(判定不能とされているが再現性試験は行われていなかった)であると判断されており、施設間再現性の評価から除かれている。

96 ウェル法では溶媒対照群および陽性対照群の出現数の値およびばらつきともほぼ同等であること(図 6)、および溶媒対照群と比較した時、陽性対照群の値はすべて統計学的に有意に増加していることから、溶媒対照群と陽性対照群の出現頻度に関する施設間再現性は良好であると評価されている。また、がん原性の有無が確認されている 22 物質に関しては、3 施設での一致率が、95%(21/22)と非常に高く、CTA 陽性物質の多くは類似の陽性反応性を示し、施設間再現性は良好であった。

8. 試験方法のデータの質

以下の点から 6 ウェル法および 96 ウェル法ともにデータの質は担保されていると考えられる。

- プレバリデーションおよびバリデーション試験では、新規参入海外施設に対して溶媒対照および陽性対照物質を用いた繰り返し実験を実施していないが、得られたデータは許容基準範囲から大きく逸脱するものではなく、また、そのデータは試験成立基準をみたしている。
- イニシエーションアッセイおよびプロモーションアッセイともに溶媒対照群および陽性対照群のフォーカスの出現数(出現頻度)、細胞毒性データおよび試験成立に必要な最低ウェル数に対しても許容基準が設定されているので、試験データの質は担保されていると考えられる。
- フォーカスの判定は CTA にとって重要なファクターである。画像アトラスにより観察判定が標準化されているものの、フォーカスの判定は目視で判別するため、客観性の確保には困難を伴うと考えられる。しかしながら、現時点ではフォーカスの判定は目視以外に方法がなく、そのためにデータの客観性を担保するにはコード化して得られたデータであることが特に重要となる。Bhas 42 CTA のバリデーション研究においては、化合物や試験プレートはコード化されているので、得られたデータは客観性が確保されており、そのデータの質は確保されていると考えられる。

9. 試験方法に関する他の科学的な報告

Bhas 42 CTA と同様に培養細胞を用いる 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 C3H10T1/2 を用いる CTA††
3) SHE 由来正常 2 倍体細胞を用いる CTA‡‡
4) 細胞株 JB6 細胞を用いる CTA§§

10. 3Rs への関与（動物福祉面からの妥当性）

Bhas 42 CTA に使用される細胞は株化細胞にがん遺伝子を組み込んだ株化細胞である。SHE CTA のようにたとえ少数といえども胎仔を犠牲にするような試験法ではない。また、CTA を適切に実施することにより、多数の動物を必要とするがん原性試験においては、試験の省略或いは一部省略によって動物数の大幅な削減などが可能である。動物福祉へ大きく寄与することが期待される。

11. 試験方法の有用性と限界

11-1. 有用性

11-1-1. CTA

- がん化の過程を説明する多段階説によれば、遺伝毒性がん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、培養正常細胞あるいは株化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。
- CTA は現行のがん原性試験を完全に代替する試験法としての位置づけではなく、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、あるいは、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他のがん原性予測試験結果とともに WoE の一つとしてその結果を利用することができる。
- 3Rs の観点からも有用である。

11-1-2. Bhas 42 CTA

CTA の有用性に加えて以下の有用性を認める。

- 約 90 物質で評価された結果[8)]において、Bhas 42 CTA の結果とがん原性試験結果との高い相関が認められている。
- v-Ha-*ras* 遺伝子を導入したことにより、フォーカス形成を指標とする他の CTA よりも試験結果が短期間で得られる。

SHE CTA と比較した場合、以下の有用性が認められる。

** Bhas 42 CTA と同様に形質転換した細胞のフォーカスを評価する試験である。

†† Bhas 42 CTA と同様に形質転換した細胞のフォーカスを評価する試験である。

‡‡ SHE 細胞を用いる CTA が 2015 年 5 月 OECD ガイダンス[10)]となった。

§§ 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。

- Bhas 42 細胞は、JCRB 細胞バンクなどの公的機関から一定品質の細胞が容易に得られる。
- Bhas 42 CTA は株化細胞由来のクローンであるため、SHE CTA のように動物個体に由来するフィーダー細胞を使用する必要がないため、3Rs の要求が最大限満たされている。
- Bhas 42 CTA では、他の CTA にはない 96 ウェル法が確立されており、アッセイ自動化の可能性が高いと考えられる。
- Bhas 42 CTA はイニシエーションアッセイおよびプロモーションアッセイの両方が試験できる試験系であるため、2 段階のがん化過程の一部を *in vitro* で再現することが可能である。たばこ成分[20-25]、ナノマテリアル[26-28]や薬剤など[29-35]の形質転換能の研究に利用することが可能である。
- 厚生労働省が進める「職場で使用される化学物質のがん原性評価を加速化」政策により、現在、遺伝毒性試験およびラット肝中期発がん性試験等によるがん原性試験のスクリーニングの仕組みが導入されている。遺伝毒性試験陰性の高生産量化学物質について、ラット肝中期発がん性試験の対象化学物質選定のためのスクリーニング試験法の一つとして Bhas 42 CTA（プロモーションアッセイ）の活用が開始されている[36-42]。

11-2. 問題点（限界、不利点、適用限界）

11-2-1. 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、当該化学物質の *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実施さ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、試験操作および形質転換コロニー／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習熟度の確認は重要である。
- 形質転換コロニー／フォーカスの自動判別法の開発が進展していない。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の有無を CTA によってスクリーニングするためには、試験系の更なる改良ならびに形質転換コロニー／フォーカスの革新的判別方法の開発が必要である。

11-2-2. Bhas 42 CTA

SHE CTA と比較した場合、以下の限界あるいは適用限界が認められる。

- Bhas 42 細胞は外部遺伝子を導入して人工的に改変した細胞であるので、CTA の結果が生体を正しく反映しているかどうかについては、議論の余地は残る。
- Bhas 42 細胞では Cyp1a1 の発現誘導が確認されてはいるが、初代培養細胞と比較

した場合、その代謝活性化能は低い。

- Bhas 42 細胞は、継代中にその特性（接触阻止能）が失われる可能性があることから、少ない継代数で多数の凍結細胞アンプルを作製し、細胞の適切な品質管理（導入遺伝子に関する定期的な安定性の確認など）が求められる。

11-3. 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確認するためには、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。）。
- 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、多くのデータを蓄積し、評価する必要性がある。それらのデータと科学的・技術的な課題が克服されれば、CTA が OECD 試験法ガイドライン化される可能性はある。
- Bhas 42 CTA の 96 ウェル法は将来のアッセイ自動化を目的として開発された経緯があるが、自動判定技術の開発が進展していないのが現実である。自動判定技術の確立が急がれる。
- 多環芳香族などに関わる代謝機能を保持していることから、代謝活性化を必要とする化学物質の形質転換能を検出することが可能であり、更に外部代謝活性化系を適用することにより、この試験系の正確性が高まる可能性がある。
- Bhas 42 CTA では、2 つのプロトコル（イニシエーションアッセイおよびプロモーションアッセイ）を利用できるので、更なる発がん機構に関するデータの蓄積が必要である。

12. 結論

1) CTA は *in vitro* において、化学物質を曝露することによる「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、ヌードマウスにおいて造腫瘍性が認められることから、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) Bhas 42 CTA の結果とげっ歯類でのがん原性試験との一致率、感度、特異度などの数値から判断すると、Bhas 42 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の一つの方法として位置づけることが可能である。
5) Bhas 42 CTA を含めて CTA はがん原性に関するスクリーニング試験としての利用に期待が高まっている。しかしながら、イニシエーション過程とプロモーション過程を含めて発がんのメカニズムの詳細は依然として不明である。スクリーニング試験としての有用性を高めるためには、発がんと CTA の相関に関するデータの更なる蓄積が必要と考える。

13. 利益相反

特になし

謝辞

本評価報告書を編纂するに当たり、山影康次博士（一般財団法人食品薬品安全センター・秦野研究所）より Bhas 42 CTA に関する開発の経緯および試験実施に関する具体的な方法などを詳細に解説いただきました。ここに深く感謝申し上げます。

14. 参考文献（最終アクセス：2020 年 2 月 25 日）

1) Guidance document on the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay, Series on Testing & Assessment No 231, ENV/JM/MONO (2016)

2) Guidance document on the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay, Series on Testing & Assessment No 231, ENV/JM/MONO (2016), Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2016)1&doclanguage=en, OECD (2017)

3) EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line, Available at: https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/carcinogenity/bhas-42

4) Sasaki, K., Mizusawa, H. and Ishidate, M. (1988), Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, Jpn. J. Cancer Res., 79, 921-930.

5) Sasaki, K., Umeda, M., Sakai, A., Yamazaki, S. and Tanaka, N. (2015), Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev., 33, 1-35.

6) Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Komori, A., Suganuma, M., Kozu, T. and Fujiki, H. (1998), Tumourigenicity of MTG8, a leukaemia-related gene, in concert with v-Ha-ras gene in BALB/3T3 cells, Br. J. Haematol., 101, 737-742.

7) Suganuma, M., Kurusu, M., Okabe, S., Sueoka, N., Yoshida, M., Wakatsuki, Y. and Fujiki, H. (2001), Helicobacter pylori membrane protein 1: a new carcinogenic factor of Helicobacter pylori, Cancer Res., 61, 6356-6359.

8) Misaki, K., Takamura-Enya, T., Ogawa, H., Takamori, K. and Yanagida, M. (2016), Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives, Mutagenesis; 31, 205-213.

9) Sakai, A., Sasaki, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N., Kuroda, S., Hayashi, K., Lim, Y.M., Yamazaki, S., Umeda, M. and Tanaka, N. (2010), A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity, Mutat. Res., 702, 100-122.

10) Guidance Document on the *In Vitro* Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Tansformation Assay, Series on Testing & Assessment No 214, ENV/JM/MONO (2015)18

11) 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

12) Bhas 42 cell transformation assay validation study report, Series on Testing and Assessment No. 208, ENV-JM-MONO(2014)24, Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Text_Bhas_Validation_Study_Report.pdf, OECD (2014)

13) 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, ENV/JM/MONO(2007)18

14) Reddy B.S., Narisawa T., Maronpot R., Weisburger J.H., and Wynder E.L. (1975) Animal models for the study of dietary factors and cancer of the large bowel, Cancer Res. 35, 3421-3426.

15) Lijinsky W., Kovatch R.M. and Thomas, B.J. (1992) The carcinogenic effect of methapyrilene combined with nitrosodiethylamine given to rats in low doses. Carcinogenesis, 13, 1293-1297.

16) Kirkland D., Aardema M., Henderson L. and Müller L. (2005) Evaluation of the ability of

a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. Mutat. Res., 584, 1-256.

17) Tanaka, N., Sasaki, K., Hayashi, K., Sakai, A., Asada, S., Muramatsu, D, Kuroda, S, Mizuhashi, F., Nagai, M., Suzuki, H., Imamura, T., Asakura, M., Satoh, H., Sakamoto, A., Nakao, R., Hirose, H., Ishii, N. and Umeda, M. (2009), An international collaborative study on a cell transformation assay using Bhas 42 cells, AATEX., 14, 831-848.

18) Sakai, A., Sasaki, K., Hayashi, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N., Kuroda, S., Poth, A., Bohnenberger, S., Kunkelmann, T., Asakura, M., Hirose, H., Ishii, N., Mizuhashi, F., Kasamoto, S., Nagai, M., Pant, K., Bruce, S.W., Sly, J.E., Yamazaki, S, Umeda, M, and Tanaka, N. (2011), An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity, Mutat. Res., 725, 57-77.

19) 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, ENV/JM/MONO(2005)14

20) Fujiki, H., Takeuchi, H., Nishitani, N., Yamanaka, H., Suzuki, K., Kurusu, M. and Suganuma, M. (2004), Carcinogenic potential of tobacco tar-resistant Staphylococcus aureus in buccal cavity, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 130, 301-305.

21) Weisensee, D., Poth, A., Roemer, E., Conroy, L. L. and Schlage, W. K. (2013), Cigarette smoke-induced morphological transformation of Bhas 42 cells *in vitro*, Altern. Lab. Anim., 41, 181-189.

22) Han, S. G., Pant, K., Bruce, S. W. and Gairola, C. G. (2016), Bhas 42 cell transformation activity of cigarette smoke condensate is modulated by selenium and arsenic, Environ. Mol. Mutagen. 57, 220-228.

23) Breheny, D., Oke, O., Pant, K., and Gaça, M. (2017), Comparative tumor promotion assessment of e-cigarette and cigarettes using the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay, Environ. Mol. Mutagen., 58, 190-198.

24) Thorne, D., Breheny, D., Proctor, C. and Gaca, M. (2018), Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 7: Comparative *in vitro* toxicological evaluation, Regul. Toxicol. Pharmacol., 93, 71-83.

25) Crooks, I., Neilson, L., Scott, K., Reynolds, L., Oke, T., Forster, M., Meredith, C., McAdam, K. and Proctor, C. (2018), Evaluation of flavourings potentially used in a heated tobacco product: Chemical analysis, *in vitro* mutagenicity, genotoxicity, cytotoxicity and *in vitro* tumour promoting activity, Food Chem. Toxicol., 118, 940-952.

26) Hasegawa, G., Shimonaka, M. and Ishihara, Y. (2012), Differential genotoxicity of chemical properties and particle size of rare metal and metal oxide nanoparticles, J. Appl. Toxicol., 32, 72-80.

27) Seidel, C., Kirsch, A., Fontana, C., Visvikis, A., Remy, A., Gaté, L., Darne, C. and Guichard, Y. (2017), Epigenetic changes in the early stage of silica-induced cell transformation, Nanotoxicology, 11, 923-935.

28) Fontana, C., Kirsch, A., Seidel, C., Marpeaux, L., Darne, C., Gaté, L., Remy, A. and Guichard, Y. (2017), *In vitro* cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles, Mutat. Res., 823, 22-27.

29) Goto, S., Asada, S., Fushiwaki, Y., Mori, Y., Tanaka, N., Umeda, M., Nakajima, D. and Takeda, K. (2004), Tumor-promoting activity and mutagenicity of 5 termiticide compounds, J. UOEH. , 6, 423-430.

30) Nakajima, D., Asada, S., Kageyama, S., Yamamoto, T., Kuramochi, H., Tanaka, N., Takeda, K. and Goto, S. (2006), Activity related to the carcinogenicity of plastic additives in the benzophenone group, J. UOEH., 28, 143-156.

31) Sakai, A., Suzuki, C., Masui, Y., Kuramashi, A., Takatori, K. and Tanaka, N. (2007), The activities of mycotoxins derived from Fusarium and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells), Mutat

Res., 630, 103-111.

32) Ohmori, K. and Kawamura, Y. (2009), Cell transformation activities of abietic acid and dehydroabietic acid: safety assessment of possible contaminants in paper and paperboard for food contact use, Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess, 26, 568-573.

33) Ohmori, K., Sato, Y., Nakajima, D., Kageyama, S., Shiraishi, F., Fujimaki, T. and Goto, S. (2013), Characteristics of the transformation frequency at the tumor promotion stage of airborne particulate and gaseous matter at ten sites in Japan, Environ. Sci. Process Impacts, 15, 1031-1040.

34) Yamakage, K., Sui, H., Ohta, R., Toyoizumi, T., Kawakami, K., Matsumoto, H., Takahashi, T., Sasaki, K., Ikezumi, M., Negishi, S., Izumi, K., Todoriki, S., Takashi, K. and Furuta, M. (2014), Genotoxic potential and *in vitro* tumour-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, two radiolytic products of fatty acids, Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ .Mutagen., 770, 95-104.

35) 厚生労働省：平成 27 年度第 1 回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料 4-2 Bhas 形質転換試験結果一覧（日本バイオアッセイ研究センター実施分）Available at: https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/0000087325.pdf

36) 厚生労働省：平成 27 年度第 1 回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料 4-2 Bhas 形質転換試験結果一覧（食品薬品安全センター秦野研究所実施分）Available at: https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/0000087326.pdf

37) 厚生労働省：平成 28 年度第 1 回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料 1-2 Bhas 形質転換試験結果一覧（日本バイオアッセイ研究センター実施分）Available at: https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/iden28_1_siryou1-2.pdf

38) 厚生労働省：平成 28 年度第 1 回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料 1-3 Bhas 形質転換試験結果一覧（食品薬品安全センター秦野研究所実施分）Available at: https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/iden28_1_siryou1-3.pdf

39) 厚生労働省：平成 28 年度第 3 回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料 1-2 Bhas42 形質転換試験結果一覧（日本バイオアッセイ研究センター実施分）Available at:https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/iden28_3_siryou1-2.pdf

40) 厚生労働省：平成 28 年度第 3 回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料 1-3 Bhas42 形質転換試験結果一覧（食品薬品安全センター秦野研究所実施分）Available at:https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/iden28_3_siryou1-3.pdf

41) 厚生労働省：平成 29 年度第 1 回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料 1-2 Bhas42 形質転換試験結果一覧（日本バイオアッセイ研究センター実施分）Available at:https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/iden29_1_siryou1-2.pdf

42) 厚生労働省：平成29年度第1回遺伝毒性評価ワーキンググループ資料、資料1-3 Bhas42形質転換試験結果一覧（株式会社ボゾリサーチセンター実施分）Available at: https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11201000-Roudoukijunkyoku-Soumuka/iden29_1_siryou1-3.pdf

Appendix 1

Appendix 1　Bhas 42 CTA の正確性評価に用いられた物質とその結果

No. Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
< Carcinogen >				
1 2-Acetylaminofluorene	Initiation	+	+(3/3)	+(3/4)
	Promotion	+	+(3/3)	+(3/4)
	Transformation	+	+(3/3)	+(4/4)
2 Cadmium chloride	Initiation	-	- (3/3)	- (2/2)
	Promotion	+	+(3/3)	+(2/2)
	Transformation	+	+(3/3)	+(2/2)
3 Dibenz[*a,h*]anthracene	Initiation	+	+(3/3)	+(2/2)
	Promotion	-	-(3/3)	- (2/2)
	Transformation	+	+(3/3)	+(2/2)
4 Lithocholic acid[TP]	Initiation	-	- (3/3)	- (2/2)
	Promotion	+	+(3/3)	+(2/2)
	Transformation	+	+(3/3)	+(2/2)
5 Methapyrilene HCl[TP]	Initiation	-	- (3/3)	NT
	Promotion	+	+(3/3)	
	Transformation	+	+(3/3)	
6 Mezerein[TP]	Initiation	-	(±)(2/3)	+(2/2)
	Promotion	+	+(3/3)	+(2/2)
	Transformation	+	+(3/3)	+(2/2)
7 Sodium arsenite	Initiation	-	?(1/3)	- (2/2)
	Promotion	+	+(3/3)	- (2/2)
	Transformation	+	+(3/3)	- (2/2)
8 *o*-Toluidine HCl	Initiation		+(2/3)	NT
	Promotion		+(2/3)	
	Transformation		+(2/3)	
(*o*-Toluidine)	Initiation	-	NT	- (4/4)
	Promotion	-		- (4/4)
	Transformation	-		- (4/4)
9 Benzo[a]pyrene	Initiation	+	NT	+(4/4), +(2/2)
	Promotion	-		- (4/4), - (2/2)
	Transformation	+		+(4/4), +(2/2)
10 3-Methylcholanthrene	Initiation	+	NT	+(4/4), +(4/4)
	Promotion	-		- (3/4), - (3/4)
	Transformation	+		+(4/4), +(4/4)
11 MNNG	Initiation	+	NT	+(2/2)
	Promotion	-		- (2/2)
	Transformation	+		+(2/2)

Appendix 1 Bhas 42 CTAの正確性評価に用いられた物質とその結果（続き）

No. Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
12 TPATP	Initiation	±	NT	- (4/4), - (4/4)
	Promotion	+		+(4/4), +(4/4)
	Transformation	+		+(4/4), +(4/4)
13 Benz[a]anthracene	Initiation	+		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
14 IQ	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
15 5-Azacytidine	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
16 Barium chromate	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
17 Cyclophosphamide	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
18 Cyclosporin A	Initiation	+(±, +)		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
19 2,4-Diaminotoluene	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
20 Melphalan	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
21 Mitomycin C	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
22 Sterigmatocystin	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
23 Thio-TEPA	Initiation	+		
	Promotion	-		
	Transformation	+		
24 Chenodeoxycholic acid	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		

Appendix 1　Bhas 42 CTAの正確性評価に用いられた物質とその結果（続き）

No. Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
25 4-Chloro-o-toluidine	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
26 Cholic acid	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
27 Deoxycholic acid	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
28 Dichlorvos	Initiation	-		
	Promotion	+(±，±)		
	Transformation	+		
29 Epichlorohydrin	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
30 D-Limonene	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
31 Methylarsonic acid	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
32 2-Naphthylamine	Initiation	±		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
33 Phorbol 12,13-didecanoate	Initiation	+		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
34 Quercetine	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
35 Sodium arsenate	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
36 Sodium saccharin	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
37 Styrene oxide	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		

Appendix 1　Bhas 42 CTAの正確性評価に用いられた物質とその結果（続き）

No. Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
38 Zinc chloride	Initiation	-		
	Promotion	+		
	Transformation	+		
39 *o*-Anisidine	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
40 Benzene	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
41 Cobalt sulfate heptahydrate	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
42 Diethylstilbestrol	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
43 Dimethylarsinic acid	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
44 1,4-Dioxane	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
45 Ethyl carbamate	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
46 Formaldehyde	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
47 Furylfuramide (AF-2)	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
48 Methyl carbamate	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
49 Nickel (II) chloride	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
50 Nickel monoxide	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		

Appendix 1　Bhas 42 CTAの正確性評価に用いられた物質とその結果(続き)

No.	Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
51	Phenobarbital sodium salt	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
52	*p*-Toluidine	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
<Non-carcinogen>					
1	Anthracene	Initiation	-	- (3/3)	- (4/4)
		Promotion	-	- (2/3)	- (4/4)
		Transformation	-	- (2/3)	- (4/4)
2	L-Ascorbic acid	Initiation	-	- (3/3)	- (2/2)
		Promotion	-	- (3/3)	- (2/2)
		Transformation	-	- (3/3)	- (2/2)
3	Caffeine	Initiation	-	- (2/3)	- (2/2)
		Promotion	-	- (3/3)	- (2/2)
		Transformation	-	- (2/3)	- (2/2)
4	D-Mannitol	Initiation	-	- (3/3)	- (2/2)
		Promotion	-	- (3/3)	- (2/2)
		Transformation	-	- (3/3)	- (2/2)
5	Ampicillin sodium	Initiation	-	NT	- (2/2)
		Promotion	-		- (2/2)
		Transformation	-		- (2/2)
6	Caprolactam	Initiation	-	NT	- (2*/2)
		Promotion	-		- (2/2)
		Transformation	-		- (2/2)
7	Eugenol	Initiation	-	NT	- (2/2)
		Promotion	-		- (2/2)
		Transformation	-		- (2/2)
8	Phenanthrene	Initiation	-	NT	- (4/4)
		Promotion	-		- (3/4)
		Transformation	-		- (3/4)
9	Pyrene	Initiation	NT	NT	+(2/2)
		Promotion			+(2/2)
		Transformation			+(2/2)
10	4-Acetylaminofluorene	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		

Appendix 1　Bhas 42 CTAの正確性評価に用いられた物質とその結果(続き)

No. Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
11 Acid red 14	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
12 Aspartame	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
13 Benzoin	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
14 2-Chloroethanol	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
15 Chromium (III) chloride	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
16 2,6-Diaminotoluene	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
17 Diazepam	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
18 N,N-Dimethylformamide	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
19 HC Blue no.2	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
20 Hydrocortisone	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
21 Methotrexate	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
22 1-Naphthylamine	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		
23 Phenol	Initiation	-		
	Promotion	-		
	Transformation	-		

Appendix 1　Bhas 42 CTAの正確性評価に用いられた物質とその結果(続き)

No.	Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
24	*p*-Phenylenediamine dihydrochloride	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
25	Phthalic anhydride	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
26	Rotenone	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
27	Sodium chloride	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
28	Sodium nitrite	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
29	Sunset yellow FCF	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
30	Thiabendazole	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
31	*m*-Toluidine	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
32	Triphenyltin hydroxide	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
33	Barium chloride dihydrate	Initiation	-		
		Promotion	+		
		Transformation	+		
34	*tert*-Butylhydroquinone	Initiation	-		
		Promotion	+		
		Transformation	+		
35	8-Hydroxyquinoline	Initiation	-		
		Promotion	+		
		Transformation	+		
36	Propyl gallate	Initiation	+		
		Promotion	+		
		Transformation	+		

Appendix 1 Bhas 42 CTAの正確性評価に用いられた物質とその結果（続き）

No.	Chemical		in house data (6 well method)	Validation Study 6 well method	Validation Study 96 well method
37	Sodium fluoride	Initiation	-		
		Promotion	+		
		Transformation	+		
38	Tetracycline hydrochloride	Initiation	-		
		Promotion	+		
		Transformation	+		
<Carcinogenicity is unknown>					
1	Phorbol	Initiation	NT	NT	i (2/2)
		Promotion			i (2/2)
		Transformation			i (2/2)

-：陰性、+：陽性、±：擬陽性、?：判定不能、NT：試験せず、TP：tumor promoter
括弧内の数：分子は判定の一致した施設数、分母は施設数（データ数）
括弧内の判定記号：繰り返された個々の実験の判定