

新規試験法提案書

**Bhas 42細胞形質転換試験法
(Bhas 42 CTA)**

令和 2 年12月

国立医薬品食品衛生研究所

新規試験法提案書

令和 2 年 12 月 2 日

No. 2020-01

Bhas 42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) に関する提案

令和 2 年 6 月 25 日に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) において以下の提案がなされた。

提案内容: 本試験法は、国際バリデーション研究の結果、げっ歯類でのがん原性試験における結果と高い相関が認められている。一方で、本試験法では形質転換の発生機序が明らかになっていないため、発がん性の作用機序に関する情報は得られない。また、細胞形質転換試験では、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。したがって、本試験法は、現行のがん原性試験を代替する試験法としてではなく、がん原物質検出のスクリーニング試験の一つの方法、あるいはがん原性にかかる証拠の重み付け (Weight of Evidence: WoE) に基づく評価のための補助的な試験として利用が可能である。

この提案書は、形質転換試験資料編纂委員会によりまとめられた文書を用いて、JaCVAM 評価会議が評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として Bhas 42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) の使用を提案するものである。

大野泰雄 

大野泰雄

JaCVAM 評価会議 議長

平林容子 

平林容子

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
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
池田 孝則 (日本製薬工業協会) **
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)
稲若 邦文 (日本化学工業協会)
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) *
久保 文宏 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
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 病理部/済生会宇都宮病院)
西村 次平 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
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)
廣田 衛彦 (日本化粧品工業連合会)
増村 健一 (日本環境変異原学会)
山本 恵子 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 日

*：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

**：令和 2 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 日

JaCVAM 運営委員会

- 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) : 委員長
石井孝司 (国立感染症研究所)
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)
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)
北嶋聡 (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)
合田幸広 (国立医薬品食品衛生研究所)
佐々木正広 (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)
杉山圭一 (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)
高橋祐次 (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)
高畑正浩 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課)
束野正明 (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)
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)
笛木修 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
横田雅彦 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
足利太可雄 (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
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 Bhas 42 cell transformation assay

At a meeting held on 25 June, 2020, at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Kanagawa, Japan, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

Proposal: As the result of international validation studies, it was confirmed that the results of this test method are highly correlated with those of a carcinogenicity test in rodents. On the other hand, since the mechanism of transformation is unknown in this test method, no information on the mechanism of action of carcinogenicity can be obtained. In addition, it has been pointed out that cell transformation tests do not provide any information on the strength of carcinogenicity, species specificity, or tissue specificity *in vivo*. Therefore, this test method cannot be a test method that replaces the current carcinogenicity test, but can be a method of a screening test for detection of carcinogens, or can be used as a supplementary test for evaluation based on Weight of Evidence (WoE) related to carcinogenicity.

This statement was prepared, following the review prepared by the Cell Transformation assay JaCVAM Editorial Committee, to acknowledge that the results of a review and study by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board have confirmed the usefulness of this assay.

Based on the above, we propose the Bhas 42 cell transformation assay as a useful means for estimating cell transformation by regulatory agencies.

Yasuo Ohno

Chairperson

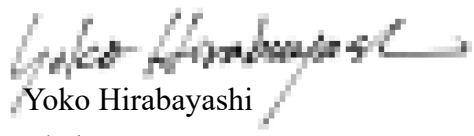
JaCVAM Regulatory Acceptance Board



Yoko Hirabayashi

Chairperson

JaCVAM Steering Committee



December 2, 2020

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

Ms. Yoko Hirabayashi (Center for Biological Safety and Research: CBSR, National Institute of Health Sciences: NIHS)

Mr. Morihiko Hirota (Japan Cosmetic Industry Association)

Mr. Yoshiaki Ikarashi (NIHS)

Mr. Takanori Ikeda (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)**

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

Mr. Kunifumi Inawaka (Japan Chemical Industry Association)

Mr. Tomoaki Inoue (Japanese Society of Immunotoxicology) *

Mr. Yuji Ishii (CBSR, NIHS)

Ms. Yumiko Iwase (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)*

Mr. Fumihiko Kubo (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)*

Mr. Kenichi Masumura (Japanese Environmental Mutagen Society)

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

Mr. Akiyoshi Nishikawa (CBSR, NIHS/ Saiseikai Utsunomiya Hospital)

Mr. Jihei Nishimura (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)

Mr. Satoshi Numazawa (Japanese Society of Toxicology)

Ms. Keiko Yamamoto (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)**

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

Term: From 1st April 2018 to 30th September 2020

*: From 1st April 2018 to 31st March 2020

** : From 1st April 2020 to 30th September 2020

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

Ms. Yoko Hirabayashi (CBSR, NIHS): Chairperson
Mr. Osamu Fueki (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Yukihiro Goda (NIHS)
Mr. Akihiko Hirose (Division of Risk Assessment, CBSR, NIHS)
Mr. Koji Ishii (National Institute of Infectious Diseases)
Mr. Yasunari Kanda (Division of Pharmacology, CBSR, NIHS)
Mr. Satoshi Kitajima (Division of Toxicology, CBSR, NIHS)
Ms. Kumiko Ogawa (Division of Pathology, CBSR, NIHS)
Mr. Masahiro Sasaki (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Keiichi Sugiyama (Division of Genetics and Mutagenesis, CBSR, NIHS)
Mr. Masahiro Takahata (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Yuhji Taquahashi (Animal Management Section of the Division of Toxicology, CBSR, NIHS)
Mr. Masaaki Tsukano (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Masahiko Yokota (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Takao Ashikaga (Division of Risk Assessment, CBSR, NIHS): Secretary
Mr. Hajime Kojima (Division of Risk Assessment, CBSR, NIHS): Secretary

Bhas 42細胞形質轉換試験法
(Bhas 42 CTA)

目 次

評価会議報告書	1
評価報告書	7
GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY	43

評価会議報告書

Bhas 42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA)

JaCVAM 評価会議

令和 2 年(2020 年)6 月 25 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
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
池田 孝則 (日本製薬工業協会) **
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)
稲若 邦文 (日本化学工業協会)
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) *
久保 文宏 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
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 病理部/済生会宇都宮病院)
西村 次平 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
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)
廣田 衛彦 (日本化粧品工業連合会)
増村 健一 (日本環境変異原学会)
山本 恵子 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 日

*：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

**：令和 2 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 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。本試験法は、JaCVAM によって国際バリデーション研究が実施され、European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) により、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が評価された²⁾。また、本試験法は経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) ガイダンス文書 (Guidance Document: GD)[§]として 2016 年 2 月に公表されている³⁾。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、「Bhas 42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) 評価報告書」(2019 年 10 月 31 日) を基に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：Bhas 42 細胞形質転換試験法 (*in vitro* Bhas 42 cell transformation assay)

代替する対象毒性試験：なし。現行のがん原性試験を完全に代替する試験法ではない。

試験法の概略：Bhas 42 CTA は、化学物質曝露により誘発された形質転換巣 (フォーカス) の出現頻度を指標として、その形質転換能を評価する試験法である。本試験法で用いる Bhas 42 細胞にはマウスの 17 番および 19 番染色体上に *ras* 遺伝子が組み込まれている⁴⁾。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は増殖が停止 (接触阻止) し、その状態で生存可能である。一方、形質転換により接触阻止能を失った細胞は紡錘状で、単層の正常細胞中に浸潤増殖し、多層となり塩基性色素で濃染されるフォーカスを形成する。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 倍上昇しており³⁾、このような形質転換細胞は *in vivo* で造腫瘍性を示すことが知られている。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 (Syrian Hamster Embryo : 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。一方、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。

[§] 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 GD231 (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。その結果、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 マウスであることが示され、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。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。

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、JaCVAM によって国際バリデーション研究が実施され¹⁾、EURL ECVAM により、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されている²⁾。これらの公表資料を基に、JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会が評価し、報告書としてまとめたものを評価資料とした。

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³⁾。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%の造腫瘍性を示すことが報告されている^{4, 6, 7)}。

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、その機構の解明に関しては、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* 遺伝子が安定導入された 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。

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。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、多段階的腫瘍形成過程の後期に起きる状態の一部をカバーしている 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%、感度 73%、特異度 84%であった¹⁾。

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。また、本試験法より先に OECD ガイダンスとなった SHE 細胞を用いる形質転換試験 (SHE CTA)⁸⁾ と比較した場合、以下の有用性があげられる。1) Bhas 42 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources (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、2) Bhas 42 CTA は株化細胞由来のクローンであり 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。

一方、CTA に共通する問題として、CTA で結果が陽性であっても、化学物質の形質

§§ 細胞増殖期に化学物質を処理する方法、及び細胞が定常期にあるときに化学物質を処理する方法

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ことがあげられる。さらに、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、発がん性物質の作用機序に関する情報も得られない。また、CTA の結果の正確性を保証するためには、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が必要である。加えて、Bhas 42 CTA の問題として、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り、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議論の余地が残っている。また、Bhas 42 細胞では *Cyp1a1* 遺伝子の発現誘導が確認されているが、初代培養細胞と比較した場合、その代謝活性化能は低い。さらに 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)が必要とされる。

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、一般的な細胞培養設備と細胞培養技術のみで実施可能である。フォーカスの判定には SHE CTA と同様に十分な教育と訓練が必要とされるが、画像アトラス等を用いて判定スキルの習熟度を確認できる。Bhas 42 細胞はがん遺伝子を組み込んだ株化細胞であり、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。また本試験法は、SHE CTA 試験において実施される胚からの細胞の調製を必要としない、さらに、本試験法の適切な実施により、多数の動物を必要とするがん原性試験の実施に関する優先順位付けができることから、動物福祉へ寄与することが期待される。以上のことから、本試験法の社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法は、国際バリデーション研究¹⁾の結果、げっ歯類でのがん原性試験における結果と高い相関が認められている。一方で、本試験法では形質転換の発生機序が明らかになっていないため、発がん性の作用機序に関する情報は得られない。また、CTA では、*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。したがって、本試験法は、現行のがん原性試験を代替する試験法としてではなく、がん原物質検出のスクリーニング試験の一つの方法、あるいはがん原性にかかる証拠の重み付け(Weight of Evidence: WoE)に基づく評価のための補助的な試験として利用が可能である。

参考文献（最終アクセス日：2020年6月25日）

- 1) Bhas 42 cell transformation assay validation study report, Series on Testing and Assessment No. 208, ENV/JM/MONO (2014) 24,
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)24&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)24&doclanguage=en), OECD (2014)
- 2) EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line,
https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/files-bhas/EURL_ECVAM_Recommendation_Bhas-CTA_2013.pdf
- 3) Guidance document on the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay, Series on Testing & Assessment No 231, ENV/JM/MONO (2016) 1,
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2016\)1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2016)1&doclanguage=en), OECD (2017)
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Komori, A., Suganuma, M., Kozu, T. and Fujiki, H. (1998), Tumorigenicity 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) Guidance Document on the *In Vitro* Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment No 214, ENV/JM/MONO (2015) 18,
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Guidance-Document-on-the-in-vitro-Syrian-Hamster-Embryo-Cell-Transformation-Assay.pdf>, OECD (2015)

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、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 の精神に合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 GDN0.231 (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 Anim*53:225–230)。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巢(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 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	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 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	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 ($<5 \times 10^5$ 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-Tetradecanoyl 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变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、ホルモン作用発現過程やペルオキシゾームの増殖に関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 GD²⁾ 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は増殖が停止(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、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。

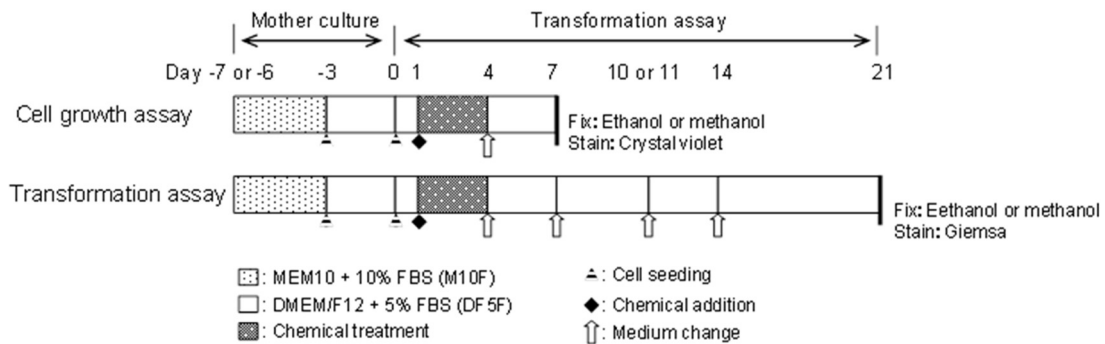


図 1 Bhas 42 CTA のイニシエーションアッセイの方法

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。

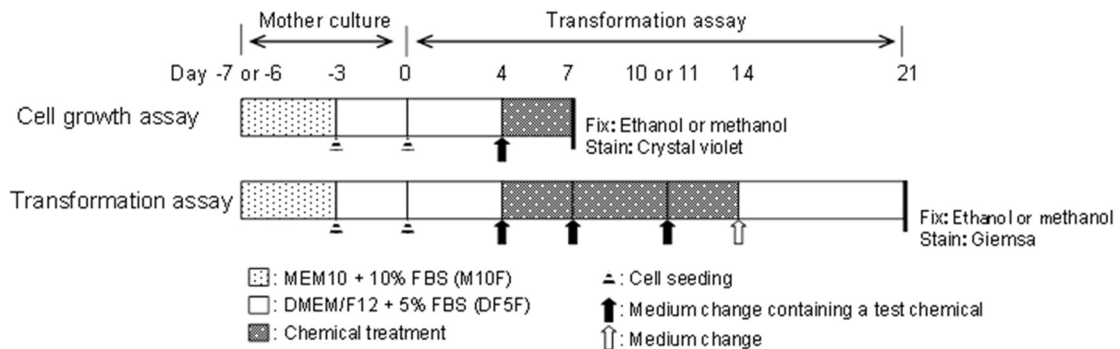


図 2 Bhas 42 CTA のプロモーションアッセイの方法

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)。

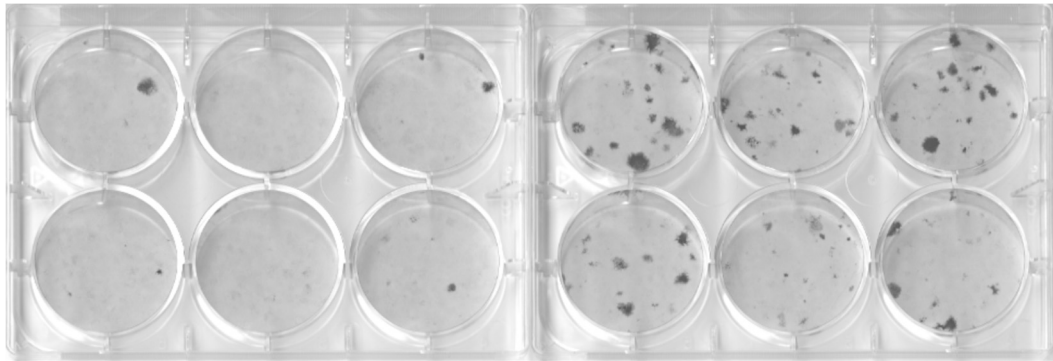


図3 6ウェル法における溶媒対照プレート(左)と陽性対照プレート(右)のCTA例

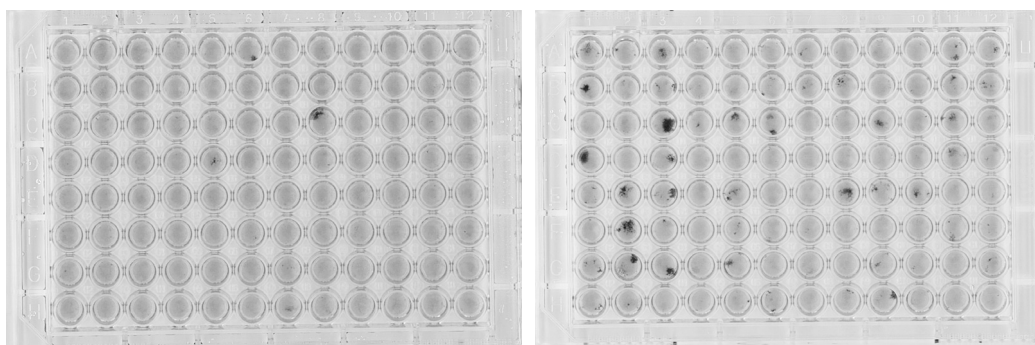


図4 96ウェル法における溶媒対照プレート(左)と陽性対照プレート(右)のCTA例

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 DRP31¹³⁾ 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な組み合わせで選択されており、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
	<i>in vitro</i>			<i>in vivo</i>		
	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	+
<i>o</i> -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
 Sodium arsenite
 Cadmium chloride
 Methapyrilene HCl
 Mezelein
 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
	<i>in vitro</i>			<i>in vivo</i>		
	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
	<i>in vitro</i>			<i>in vivo</i>		
	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 but negative 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ては 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.34¹⁹⁾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)

		<i>in vivo</i> 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) : $(8+4)/(8+0+0+4) \times 100 = 12/12 \times 100 = 100\%$

感度 (Sensitivity) : $8/(8+0) \times 100 = 8/8 \times 100 = 100\%$

特異度 (Specificity) : $4/(0+4) \times 100 = 4/4 \times 100 = 100\%$

偽陰性率 (False Negative) : $0/(8+0) \times 100 = 0/8 \times 100 = 0\%$

偽陽性率 (False Positive) : $0/(0+4) \times 100 = 0/4 \times 100 = 0\%$

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)

Bhas 42 CTA		<i>in vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
	陽性	38	6
	陰性	14	31
一致率(Concordance)	: $(38+31)/(38+14+6+31) \times 100 = 69/89 \times 100 = 78\%$		
感度(Sensitivity)	: $38/(38+14) \times 100 = 38/52 \times 100 = 73\%$		
特異度(Specificity)	: $31/(6+31) \times 100 = 31/37 \times 100 = 84\%$		
偽陰性率(False Negative)	: $14/(38+14) \times 100 = 14/52 \times 100 = 27\%$		
偽陽性率(False Positive)	: $6/(6+31) \times 100 = 6/37 \times 100 = 16\%$		

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)

Bhas 42 CTA		<i>in vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
	陽性	10	1
	陰性	2	8
一致率(Concordance)	: $(10+8)/(10+2+1+8) \times 100 = 18/21 \times 100 = 86\%$		
感度(Sensitivity)	: $10/(10+2) \times 100 = 10/12 \times 100 = 83\%$		
特異度(Specificity)	: $8/(1+8) \times 100 = 8/9 \times 100 = 89\%$		
偽陰性率(False Negative)	: $2/(10+2) \times 100 = 2/12 \times 100 = 17\%$		
偽陽性率(False Positive)	: $1/(1+8) \times 100 = 1/9 \times 100 = 11\%$		

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)。

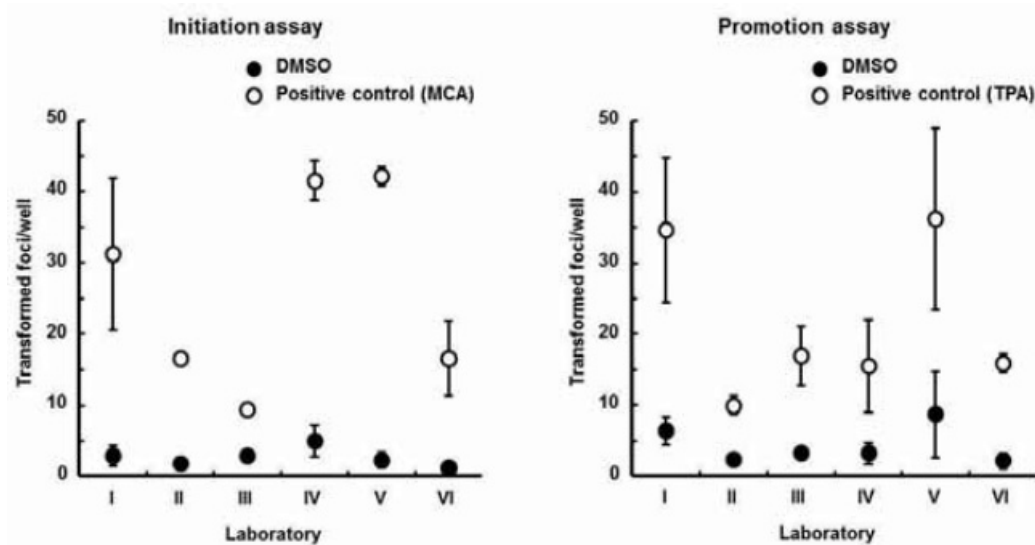


図 5 各試験施設における溶媒対照群と陽性対照群のウェル当たりの平均フォーカス数とそのバラツキ(6 ウェル法)

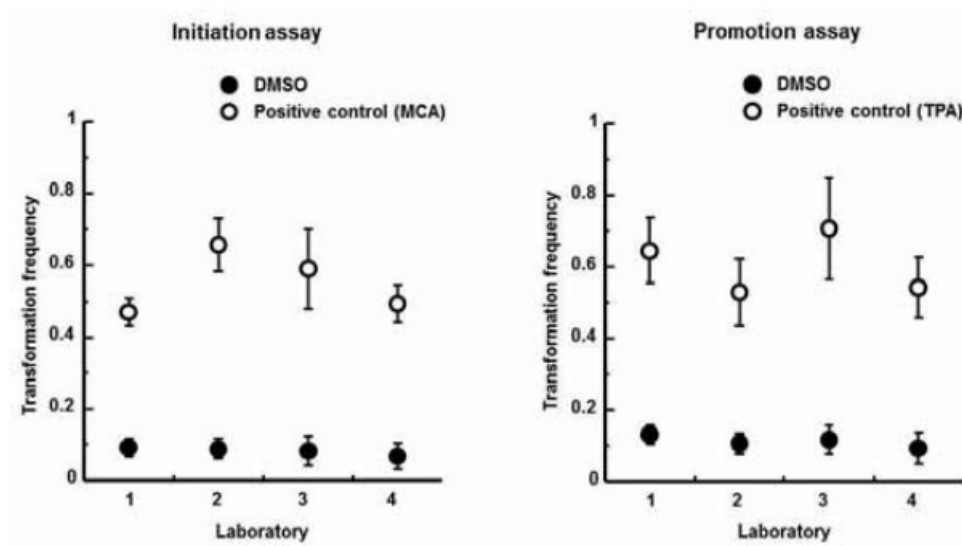


図6 各試験施設における溶媒対照群と陽性対照群のウェル当たりの平均フォーカス形成率とそのバラツキ(96ウェル法)

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](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/carcinogenicity/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), Tumorigenicity 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 Transformation 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., Toyozumi, 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	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[<i>a,h</i>]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 <i>o</i> -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[<i>a</i>]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	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	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	96 well method
38	Zinc chloride	Initiation	-	
		Promotion	+	
		Transformation	+	
39	<i>o</i> -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	96 well method
51	Phenobarbital sodium salt	Initiation	-		
		Promotion	-		
		Transformation	-		
52	<i>p</i> -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	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	96 well method
24	<i>p</i> -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	<i>m</i> -Toluidine	Initiation	-	
		Promotion	-	
		Transformation	-	
32	Triphenyltin hydroxide	Initiation	-	
		Promotion	-	
		Transformation	-	
33	Barium chloride dihydrate	Initiation	-	
		Promotion	+	
		Transformation	+	
34	<i>tert</i> -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	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

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

Cancels & replaces the same document of 08 January 2016

GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY

Series on Testing & Assessment
No. 231

[The original document was revised in its Foreword section in June 2017. Some information on the mechanisms of action addressed in the Bhas Cell Transformation Assay was added. This information is important for defining the utility of the assay in an Integrated Approach to Testing and Assessment of non-genotoxic carcinogens. Also, a correction was made with regards to the origin of the cell line (see footnote p.8)]

JT03417497

Complete document available on OLIS in its original format

This document, as well as any data and 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.



OECD Environment, Health and Safety Publications

Series on Testing and Assessment

No. 231

**GUIDANCE DOCUMENT ON THE
IN VITRO BHAS 42 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 2016**

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 2016

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 *in vitro* Bhas 42 Cell Transformation Assay (Bhas 42 CTA).

This document, as well as a similar document on the Syrian Hamster Cells Transformation Assay (SHE CTA), 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 CTAs, and the approval of draft TGs was considered premature.

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 (work underway).

The recent discussion (2016-2017) on the origin of the cell lines provides an opportunity to reconsider the role of Bhas 42 CTA within an integrated approach to testing and assessment (IATA) for strategies to explore non-genotoxic carcinogens.

Since the Bhas 42 cells were first set up, they have always been considered by the test method developers and the scientific community to be initiated cells, due to the integration of multiple copies of H-Ras, and thus a specific tool to study the promotion stage in the multistep carcinogenesis process.

With improved knowledge and new perspectives in the field of non-genotoxic carcinogenesis, it is now possible to look at other potential advantages in the use of Bhas 42 CTA. All the CTA models offer the great advantage to provide a phenotypic anchoring of onco-transformation. This phenotypic endpoint in the Bhas 42 model is very likely related to the activation of Ras-dependent signal transduction, which plays a fundamental role in the progression from hyperplastic or dysplastic lesions to malignant lesions in human cancer.

For this reason, it is important to clarify the putative role of the Bhas 42 cell line in the late initiation stage with the aim of refining and improving the use of Bhas 42 model within the integrated approach to the hazard assessment of non-genotoxic carcinogenesis. It may be recommendable to identify further molecular pathways that directly interact with the Ras-dependent signal transduction pathway, using non-genotoxic chemicals that play a role in the intermediate and late stages of carcinogenesis process, which might be identified by using the existing chemical information from the validation studies.. With more clarity on such mechanisms and processes, the regulatory utility of the assay within an IATA will be better understood.

This document has been through three WNT commenting rounds (from January to September 2015) and was approved by written procedure. In 2017, the document was updated with an annotation on the mechanisms and processes covered by the assay (see above), and a footnote on the origin of the cell line (see next page).

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 BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY

PURPOSE

1. The purpose of this Guidance Document (GD) is to allow the scientific and regulatory communities to use the described method as part of a weight of evidence approach in the testing of substances for carcinogenic potential.

Background

2. Since DNA damage and mutation are known to be initiating events for carcinogenesis, several short-term *in vitro* and *in vivo* genotoxicity tests are commonly used to predict chemical carcinogenicity. However, not all carcinogens are known to be genotoxicants. Furthermore, animal carcinogenesis studies have demonstrated that carcinogenesis is itself a multi-stage process comprised of distinct initiation, promotion and progression events (1, 2). In addition, it has long been known that cell transformation assays can simulate *in vivo* initiation and promotion stages of carcinogenesis and therefore detect chemicals known to have initiating activity (tumor initiators, most of which are genotoxic carcinogens) and/or promoting activity (tumor promoters, most of which are non-genotoxic carcinogens) (3, 4).

3. *In vitro* cell transformation refers to the induction, in cultured cells, of phenotypic alterations that have long been considered alterations associated with cells exhibiting neoplastic potential *in vivo* (5, 6). Transformed cells with the characteristics of malignant cells have the ability to induce tumors in susceptible animals (7, 8, 9); this supports the practice of using specific phenotypic alterations *in vitro* as criteria for predicting carcinogenic potential *in vivo*.

4. The Bhas 42 cell line (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank No.: JCRB0149)¹ was derived as a clone formed by the stable transfection of the *v-Ha-ras* oncogene into the BALB/3T3 A31-1-1 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank No.: JCRB0601) cell line (10). Similar to the parental BALB/3T3 A31-1-1 cells, untransformed Bhas 42 cells grow to confluence forming a density-dependent contact-inhibited monolayer and subcutaneous transplantation of isolated cell populations derived from such confluent monolayers have been shown to be non-tumorigenic in nude mice. However, after exposure to carcinogenic stimuli, such cells become morphologically altered and form discrete anchorage-independent altered colonies, referred to as transformed foci, atop the confluent monolayer. Such transformed foci are capable of producing tumors *in vivo* (11). Transformation frequency can be quantified, using morphological criteria to enumerate parameters of transformed foci among Bhas 42 cells subjected to carcinogenic insult. This measure of transformation frequency, which can be extrapolated to an assessment of carcinogenic potential, constitutes the basis of the Bhas 42 cell transformation assay (CTA).

¹ In November 2016, genotyping analysis using Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLPs) revealed that some subclones of BALB/3T3 A31 (e.g., BALB/3T3 A31-1-1 and Bhas 42) cells were not derived from BALB/c mice but Swiss mice (Uchio-Yamada et al. 2016). However, the BALB/3T3 A31 cells were confirmed as being derived from BALB/c mice. Although the lineage of BALB/3T3 A31-1-1 cells and Bhas 42 cells has now changed, their utility for the Cell Transformation Assay (CTA) remains unchanged as the physiological characteristics important for the CTA such as high sensitivity to contact inhibition and susceptibility to chemically-induced transformation are inherent properties of these cell lines, regardless of origin. Consequently, the newly established lineage of the BALB/3T3 A31-1-1 cells and Bhas 42 has no impact on the performance of these cell lines or the utility of the CTA.

Uchio-Yamada et al. (2016). "Incorrect strain information for mouse cell lines: sequential influence of misidentification on sublines", *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, Vol. 26, pp. 1-6, <http://link.springer.com/article/10.1007/s11626-016-0104-3>

5. Unlike target cells used in other CTAs, Bhas 42 cells are considered to be initiated cells since pretreatment with a tumor initiator is not needed for subsequent induction of cell transformation by promoters in the Bhas 42 CTA (10). These data suggest that the transfected *v-Ha-ras* gene elicits the initiation process that would otherwise be induced by a chemical initiator (11). Thus, the transformation response of such initiated Bhas 42 cells may represent a late stage of the carcinogenic process, whereas the transformation responses of immortalized cells (uninitiated cells, *e.g.* BALB/3T3 A31-1-1 and C3H10T1/2 cells) and primary cells (uninitiated cells having a limited *in vitro* lifespan, *e.g.* Syrian hamster embryo cells) may represent prior stages (12).
6. Although the Bhas 42 cells have undergone an initial step towards transformation, they still retain the capability to respond to single treatments with tumor initiators (13) in similar ways as other CTAs. Other advantages of the Bhas 42 CTA compared to other CTAs include: a) Bhas 42 cells are especially responsive to chemical carcinogens and are readily transformed by such agents, resulting in relatively high transformation frequencies, b) the latency period of responsiveness is relatively brief, c) the number of culture vessels necessary for a given assessment of a chemical's carcinogenic potential is reduced (14,15).
7. This GD provides an *in vitro* procedure using the Bhas 42 CTA, which can be used for hazard identification of potential carcinogenicity of chemicals with initiating and/or promoting activity. The test method described is based upon the protocols of previous reports and that published by the EURL ECVAM (16, 17, 18).
8. The current protocol for the Bhas 42 CTA consists of two test components, one for examining initiating activity and one for examining promoting activity of chemicals (16, 17, 18). The initiation and promotion tests can be performed independently and the two protocols are slightly different. It is acknowledged that mutation induced by chemical insult is fixed after several cell replication cycles (19, 20). Thus, in the initiation test the cells are treated at the beginning of growth phase to allow for several cell cycles necessary for fixation of the induced DNA damage. On the other hand, it is known that cell-to-cell communication plays a key role in promotion (21, 22). Therefore, in the promotion test the cells are repeatedly treated at stationary phase to provide a growth advantage for anomalous cells.
9. In this GD, two assay formats are described, one using 6-well plates and the other using 96-well plates (16, 17, 18). After initial development of the Bhas 42 CTA 6-well format, the assay was adapted to a 96-well format that was designed for high-throughput analyses (23). Although the number of cells plated and expression of transformation frequency differ between the 6-well and 96-well formats, the overall results obtained are similar and the formats can be used interchangeably (23).
10. Several comprehensive studies were performed to assess the reliability and predictive capacity of the Bhas 42 CTA. These included (a) an extensive analysis of 98 chemicals (24), (b) a multi-laboratory collaborative study (25), (c) a prevalidation study (26) in the 6-well format, and (d) two international validation studies (16, 17). For the latter, the Validation Advisory Committee and the Validation Management Team were comprised of international experts from the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM), the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), the NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Method (NICEATM) and the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM). EURL ECVAM reviewed these studies and addressed the transferability, reproducibility and relevance of the Bhas 42 CTA protocol (27).
11. Test results derived from the Bhas 42 CTA are expected to be used as part of a testing strategy (rather than a stand-alone assay) and/or in a weight-of-evidence approach to predicting carcinogenic potential. When employed in combination with other information such as genotoxicity data, structure-activity analysis and pharmaco-/toxicokinetic information, CTAs in general and the Bhas 42 CTA specifically can

contribute to the assessment of carcinogenic potential (28) and may provide an alternative to the use of *in vivo* testing. CTAs may be particularly useful for evaluating chemicals for which *in vivo* testing is not allowed (*e.g.* regulation on cosmetics in the European Union [Regulation (EC) 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products]), is limited, or is only required for chemicals identified as genotoxic (29).

Current knowledge and understanding about mechanisms involved in cell transformation

12. The concept that carcinogenesis is a multistage process is widely accepted (see Paragraph 4). Molecular mechanisms of the multistage process were determined through *in vitro* studies, mainly by gene transfection techniques in cell transformation assays. Transformed cells were induced by the following combinations including active *ras* genes in specific cell types: a) human c-Ha-*ras* plus *myc* genes (30) and human c-Ha-*ras* plus polyoma virus middle-T genes (31) in primary cells, b) c-Ha-*ras* gene alone in established cells but not in primary cells (32), c) c-Ha-*ras* gene in primary cells followed by treatment with carcinogens (32), and d) *ras* genes plus 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in primary and established cells (33, 34, 35). These results suggest that activation of *ras* genes is an important event in cell transformation and that other (*e.g.* chemicals) stimuli can serve to induce expression of such genes thereby resulting in the altered transformation phenotype.

13. The *ras* genes were found to be activated by mutations in chemically induced tumors *in vivo* (36). On the other hand, the *c-myc* gene was expressed following treatment with the tumor promoter TPA (37). These studies together with others in which cell transformation resulted in cells with active c-Ha-*ras* plus *myc* genes (30) suggested that cells containing integrated v-Ha-*ras* gene and which could be transformed by TPA should be able to detect suspected chemical carcinogens. It was on that basis that the Bhas 42 cells were isolated and cloned because of their potential utility in identifying chemical carcinogens (10).

14. There is a close correlation between *in vitro* transformed Bhas 42 cells, identified as such by their morphologically altered phenotype, and *in vivo* tumorigenicity. When chemically transformed Bhas 42 cells were inoculated subcutaneously into nude mice, 100% (four out of four) transformed clones formed tumors (11). In contrast, non-transformed Bhas 42 cells did not induce tumors. Almost all of the transformed Bhas 42 clones (11/12) expressed v-Ha-*ras* genes 2- to 14-fold higher than the non-transformed cells (38). Furthermore, transformed Bhas 42 cells induced by transfection with MTG8 (leukemia-related gene) (39) or HP-MP1 genes (tumor necrosis factor alpha-inducing membrane protein in *Helicobacter pylori*) (40) were also tumorigenic *in vivo*. In contrast, these genes did not induce transformation in progenitor BALB/3T3 A31-1-1 cells. These data suggest that not only carcinogens but also potential oncogenic genes work together with v-Ha-*ras* genes to induce transformation in Bhas 42 cells.

15. Not all mechanisms leading to cell transformation involve mutations of *ras* genes. Other genetic and epigenetic alterations are also associated with cell transformation (41, 42). Such alterations are also found in immortalized cells (12). In fact, alterations of p53 tumor suppressor gene have been found to have occurred in the parental BALB/3T3 A31-1-1 cells from which Bhas 42 cells were originally derived (43). Involvement of p53 and *ras* mutations suggest that similar to *in vivo* carcinogenesis, *in vitro* cell transformation is manifest through a multistage process, which may help explain why Bhas 42 cells are so responsive to chemical insult.

16. A common mechanism of tumor promotion is still not clear because of the chemical diversity of such agents. Nevertheless, cell proliferation, inflammation, dedifferentiation and inhibition of apoptosis appear

to correlate with tumor promotion. On the other hand, the principal mechanism that has been associated with tumor initiation is that of genetic alterations. Furthermore, ligand binding to receptors, gene expression, signal transduction, DNA methylation, histone tail modification and microRNA alteration have been analyzed at molecular level (44, 45). Taken together, these studies suggest that multiple signaling pathways are activated, resulting in continuous cell proliferation and subsequent tumor promotion. *Ras* signaling pathway is one of the major signal transduction cascades and constitutive activation of *ras* is an important factor in malignant growth (46). Moreover, DNA synthesis of Bhas 42 cells was found to persist longer than that of BALB/3T3 A31-1-1 cells following treatment with TPA (10), which might be due to the integration of v-Ha-*ras* gene.

17. Inhibition of gap junctional cell-to-cell communication has been known as one of early events in tumor promotion (22). When Bhas 42 cells were co-cultured with BALB/3T3 A31-1-1 cells and treated with TPA, the transformation frequency decreased depending on the numbers of BALB/3T3 A31-1-1 cells present (11). In addition, an increase of transformation frequency correlated with inhibition of cell-to-cell communication by TPA in BALB/3T3 A31-1-1 cells (47). These data suggest that the suppression and induction of Bhas 42 transformed foci are regulated by enhancement and inhibition of cell-to-cell communication, respectively.

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

18. The chromosome number of Bhas 42 cells, which are hyper-triploid, ranges from 58 to 72 and the modal chromosome number is 60 (42%). Bhas 42 cells also have marker chromosomes similar to parental BALB/3T3 A31-1-1 cells. The results of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) indicated that transfected v-Ha-*ras* genes were present in all nuclei of Bhas 42 cells examined, with an average of 2.4 copies/nucleus and that the v-Ha-*ras* genes were located on chromosome numbers 17 and 19 (11). In addition, v-Ha-*ras* genes that had become integrated into the genome of Bhas 42 cells have maintained the sequence of the original plasmid. The studies from which these data were obtained employed Bhas 42 cells that had undergone more than 18 passages (sub-cultivations) indicating that v-Ha-*ras* genes were stably transferred to daughter cells and that the integrated v-Ha-*ras* genes were not lost even after repeated sub-cultivation (11).

19. Due to their initiated state and their sensitivity to carcinogenic stimuli, Bhas 42 cells may spontaneously transform under sub-optimal culture conditions. Therefore, it is important to maintain strict quality control of cells, assay components, and test conditions, including the use of low passage target cells, maintenance of a sub-confluent cell population density ($\leq 70\%$ confluence) among cell stocks to be used for treatment, and use of suitable pre-screened lots of foetal bovine serum (FBS) (16, 17, 48). It should be noted that spontaneous transformation is a common intrinsic occurrence among the various CTAs and is expressed at different relative frequencies among the available target cell systems used in CTAs (6). Irrespective of the CTA system, those spontaneous transformation rates are moderated by adhering to the strict quality control measures described above. In this way, the spontaneous and chemically induced transformation frequencies are readily distinguishable.

20. Initiating and promoting activities of carcinogens can be distinguished in the *in vivo* carcinogenicity studies using the two-stage carcinogenesis model but this distinction is not generally pursued. In its evaluation of the relative performance of CTAs, OECD, in its DRP 31 (49), reported on CTA responsiveness to 260 carcinogens. Only 9 *in vivo* tumor promoters (3.5%) were included in the review, and all of them showed positive results in all or either of the SHE, BALB/3T3 A31-1-1 and C3H10T1/2 CTAs. As to the performance of the *in vitro* promotion test using the Bhas 42 CTA, 14 *in vivo* tumor promoters were investigated, 13 (92.9%) of which were positive in the Bhas 42 cell promotion test (17, 24,

50). These results indicate that the Bhas 42 cell promotion test can be a valuable *in vitro* system for identifying potential *in vivo* tumor promoters.

21. Eight mouse Cyp isoforms (Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c65, Cyp2d22, Cyp2e1 and Cyp3a11) were not detected in Bhas 42 cells by quantitative real-time PCR. However, when Bhas 42 cells were treated with 3-methylcholanthrene (3MC, predominantly metabolized by Cyp1a1 to active carcinogenic forms), only Cyp1a1 was found to be markedly induced from Day 1 and reached a plateau on Day 2-3 (51). These results suggest that although Cyp1a1 is not expressed in normal culture conditions, some chemicals induce Cyp1a1 and they are converted to active metabolites.

22. In the Bhas 42 CTA, 8 out of 10 (80%) carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (predominantly metabolized by Cyp1a1) examined were positive (11). These data suggest that the Bhas 42 CTA can efficiently detect carcinogens that require metabolic activation by Cyp1a1. In addition, the Cyp1a1 expression following chemical treatment for three days indicates that the three-day treatment in the initiation test (16, 17, 18) is a suitable protocol to detect carcinogens requiring metabolic activation.

23. Cyp isoforms except Cyp1a1 were not expressed, however, 2-acetylaminofluorene (2AAF, predominantly metabolized by Cyp1a2) and cyclophosphamide (CPD, predominantly metabolized by Cyp2b10) induce transformation in Bhas 42 cells. The eight mouse Cyp isoforms were selected based upon human data, *i.e.* the human CYP homologs of the mouse Cyp isoforms are mainly involved in drug metabolism *in vivo* (52, 53). Currently, about 80 mouse Cyp isoforms have been identified and almost all chemicals are metabolized by multiple enzymes. 2AAF and CPD may induce transformation due to their metabolic activation catalyzed by Cyp isoforms other than the eight that have chosen for measurement.

24. Carcinogens (including cytokines) that bind to specific receptors are thought to act through receptor-mediated pathways because tumors are not induced in knockout mice which lack the gene responsible for coding such receptors (54, 55). Some of these receptors have been identified in BALB/3T3 A31-1-1 cells where transformation has been induced (56, 57). Although similar receptors have yet to be identified in Bhas 42 cells, it is possible, given the derivation of Bhas 42 cells, that they might also be transformed through receptors similar to those of BALB/3T3 A31-1-1 cells.

25. Morphologically, various types of transformed foci are observed (48, Paragraph 60, Annex 2). For this reason, adequate training of laboratory personnel engaged in the identification and scoring of transformed foci is essential. A photo catalog of various examples of untransformed and transformed foci has been found to be a valuable tool with which to assist in the recognition of such transformed foci and in distinguishing them from non-transformed foci (Annex 2).

PRINCIPLE OF THE TEST METHOD

26. Bhas 42 cells proliferate exponentially and when they reach confluence, they form a contact-inhibited monolayer. Appropriate numbers of Bhas 42 cells are plated into each well of 6-well or 96-well plates. In the-initiation test, the cells are treated with a given test chemical at a low cell density for three days (from Day 1 to Day 4), allowed to replicate and then fixed and stained on Day 21 after plating. In the promotion test, the treatment with the test chemical is commenced at sub-confluence and continued for 10 days (from Day 4 to Day 14). The cells are then fixed and stained on Day 21 after plating. Plates are coded and scored; the resulting foci are evaluated for their morphological phenotype.

27. Transformation frequency is quantified using stereomicroscopy as follows: (a) for the 6-well format, transformed foci in each well are scored; (b) for the 96-well format, the number of wells with transformed foci are counted. The second method overcomes the difficulty in scoring multiple foci in 96-well plates. The scoring should include the foci at the bottom of the wells as well as the foci growing on the walls of each well (17, 23).

28. Cytotoxicity is evaluated colorimetrically by estimating the amount of dye (crystal violet) extracted from the treated cells (25). For this purpose, the relative optical density (OD) is obtained by calculating the ratio of the OD determined for the treated cells to the OD of solvent control cells. The transformation frequency is statistically determined from the relative increase in the number of morphologically transformed foci observed in the treated group compared to the number of such foci appearing in the solvent controls.

PROCEDURE

Culture media, reagents and solutions

29. The culture media, reagents and solutions are described in Annex 1.

Culture conditions and preparation of cell suspension

30. Minimum Essential Medium supplemented with 10% FBS (M10F) is used for population expansion of cells so as to generate master cell stocks and working cell stocks, all of which are stored frozen in a liquid nitrogen tank. Cell cultures used for cytotoxicity and transformation assays are derived from those frozen cell stocks. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 supplemented with 5% FBS (DF5F) is used for the cell growth assays and transformation assays as well as routine maintenance and subculturing of cells.

31. Bhas 42 cells are incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and air. It is important that all cell stocks and working cultures be maintained at a sub-confluent density at all times prior to use in transformation assays, such that they do not exceed 70% confluence and thereby retain their property of density- dependent inhibition of cell growth. This ensures that loss of cell-to-cell contact inhibition is the result of treatment with chemical carcinogens and not a function of failure to maintain the necessary pre-assay cell culture conditions. The necessity of this becomes clear when it is realized that those cells that are no longer contact-inhibited and exhibit unrestricted growth are those that are transformed and preferentially form altered foci atop the confluent cell monolayer.

Preparation and cryopreservation of Bhas 42 cell stocks

32. Bhas 42 cells should be obtained from a reliable source, specifically, JCRB Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO, Osaka, Japan) [<http://cellbank.nibio.go.jp/english/>] and shown to be free of adventitious contaminating agents (*e.g.* mycoplasma).

33. If the Bhas 42 cells are cultured with sufficient care using acceptable pre-screened lots of FBS and proper attention paid to maintenance of sub-confluent cell density, the cells can be passaged 2-3 times without losing the properties that make them suitable for use as a CTA target cell system. The most practical solution to ensure the uninterrupted availability of such suitable cell populations is to have available a large stock of frozen early passage cells. For this purpose, the procedure is as follows (48);

- Initial master cell stocks are generated and cryopreserved in a liquid nitrogen tank in aliquots that will eventually serve to generate working cell stocks.

- Cells are cultured with M10F in a 100- or 150-mm dish or in a 75- or 150-cm² flask to a cell density not to exceed 70% confluence.

- They are then suspended at a cell density of 5×10^5 cells/mL in cold fresh M10F containing a suitable cryoprotective agent (*e.g.* 5% dimethyl sulfoxide) to make a master cell stock from which 0.5 mL aliquots are cryopreserved and stored in liquid nitrogen.

- Cells from one master stock are thawed and cultured for 1-2 passages in M10F before a second cryopreservation step.

- From this cell population, approximately 100 aliquots are prepared and cryopreserved so as to provide sufficient working cell stocks.

- The quality of those cells is then confirmed for their ability to fulfill the acceptance criteria described in Paragraph 34.

- It is noteworthy that the same criteria need to be met to assess cell quality as those used for accepting a given lot of FBS.

34. In order to identify suitable lots of FBS for the transformation assay, several lots of FBS are checked using the cells from one master stock. The acceptance criteria for a given lot of FBS include (a) ability to support adequate plating efficiency (PE) of Bhas 42 cells ($\geq 50\%$, calculated with the formula below, generally 100 cells are plated per 60-mm dish or well of 6-well plate and cultured for 6-10 days), (b) low background of spontaneous transformation, and (c) ability to facilitate Bhas 42 cell transformation by positive controls (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MCA and 50 ng/mL TPA, refer to Paragraph 38). FBS lots that fulfill the criteria in Paragraphs 66-68 are those that are selected for use in subsequent transformation assays.

$$\text{PE (\%)} = [(\text{total number of colonies per dish})/(\text{total number of cells plated per dish})] \times 100$$

35. Freshly prepared 2-3 passage cells derived from the cryopreserved cell stocks are used for each transformation assay.

36. The cells at higher passages (within 10 passages) can be used for dose setting.

Controls

37. The solvent for a test chemical is used as the negative control. The solvent should be chosen to optimize the solubility of the test chemical without adversely affecting the conduct or outcome of the assay, *e.g.* cell growth and morphology, cell-to-cell interaction, integrity of the test material, augment or diminish the effects of the test chemical on the target cells, reaction with culture vessels.

38. For positive controls, a known tumor-initiator, 3-methylcholanthrene (MCA, final concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), is used in the initiation test, and a known tumor-promoter, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, final concentration of 50 ng/mL), is used in the promotion test. MCA and TPA are dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), which serves as the solvent for these two control agents. When the solvent for the test chemical is not DMSO, DMSO is still necessary as the negative control for MCA or TPA. The stock solutions of MCA and TPA in DMSO can be stored in frozen aliquots at -20°C for at least two years.

Preparation of test chemical solutions

39. Test chemicals are dissolved or suspended in an appropriate solvent and diluted, if appropriate, prior to the treatment of the cells. Distilled water, DMSO, acetone, and ethanol can be used to dissolve test chemicals, and the final solvent concentrations in the medium for each of these vehicles should not exceed 5%, 0.5%, 0.5% and 0.1%, respectively. Although the concentration of DMSO can be as high as 0.5%, 0.1% is recommended when possible. If solvents other than the above well-established ones are employed, their use should be supported by data indicating their compatibility with the test chemical and the test system, as well as their lack of inherent transforming activity. In such cases, untreated controls devoid of the solvent of choice should also be included against which to compare the possible transforming activity associated with the solvent. 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 that storage of test chemical is acceptable. Solutions at different concentrations of the test

chemical should be prepared under UV filtered lights or protected from exposure to ambient light for photo-sensitive chemicals.

40. Several concentrations for the transformation assay (at least four concentrations, if the test chemical is not toxic) should be tested and these are determined according to the results of the cell growth assay. Paragraphs 47, 52-55 provide further details on the top concentration that should be tested.

41. For poorly soluble test chemicals that are not cytotoxic at concentrations lower than the lowest insoluble concentration, the highest concentration analysed should produce turbidity or a precipitate visible by eye or with the aid of an inverted microscope at the end of the treatment with the test chemical. Even if cytotoxicity occurs above the lowest insoluble concentration, it is advisable to test at only one concentration producing turbidity or with a visible precipitate because artifactual effects may result from the precipitate. At the concentration producing a precipitate, care should be taken to assure that the precipitate does not interfere with the conduct of the test (*e.g.* staining or scoring). The determination of solubility in the culture medium prior to the experiment may be useful.

42. If no precipitate or limiting cytotoxicity is observed, the highest test concentration should correspond to 10 mM, 2 mg/mL or 2 µl/mL, whichever is the lowest. When the test chemical is not of defined composition *e.g.* substance of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials (*i.e.* UVCBs), environmental extracts, *etc.*, the top concentration may need to be higher (*e.g.* 5 mg/ml) in the absence of sufficient cytotoxicity, to increase the concentration of each of the components.

Experimental design

43. The 6-well and the 96-well formats are quite similar since the experimental procedures differ only in the plated cells and the calculation of the transformation frequency. In the following sections, experimental details are provided for the 6-well format, including modifications associated with the 96-well format.

44. Both formats consist of an initiation test and a promotion test components. These test components can detect initiating activity and promoting activity of carcinogens, respectively. In the initiation test, the cells are treated with chemicals in the beginning of the growth phase and in the promotion test the treatment is started at sub-confluence of cell growth. Both tests consist of two steps. In the first step, a dose range-finding assay is performed in which test chemical concentrations are selected (preliminary cell growth assay) using a broad dose range. In the second step, the transformation assay itself and a concurrent cell growth assay are performed, the latter serving to verify that the selected doses meet the acceptance criteria for the tests (Fig. 1).

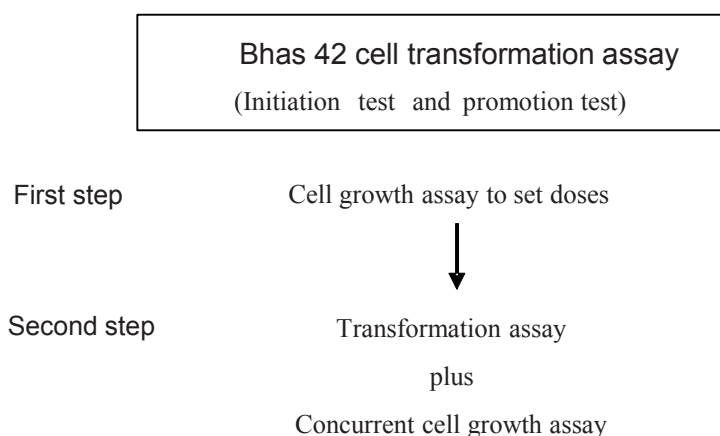


Figure 1: General scheme of the Bhas 42 CTA

Initiation test

Cell growth assay to set doses

45. The cells, at a density of $\leq 70\%$ confluence in DF5F, are trypsinized and 4,000 cells are plated into each well with 2 mL of DF5F (Day 0). Wells containing medium alone are also prepared for the blank control in the colorimetric analysis (the blank control can be shared among different assays performed simultaneously). At 20-24 hours (Day 1) after cell plating, the culture medium is replaced with fresh medium containing various concentrations of a given test chemical, or concentrated test chemical solutions are added to each well without medium replacement. The medium is changed with fresh medium on Day 4. On Day 7, the cultures are fixed with ethanol or methanol for approximately 10 min, washed and air-dried. The cells are stained with crystal violet (CV) solution for approximately 15 min, rinsed well with water and dried (Fig. 2). Three wells are prepared in each group.

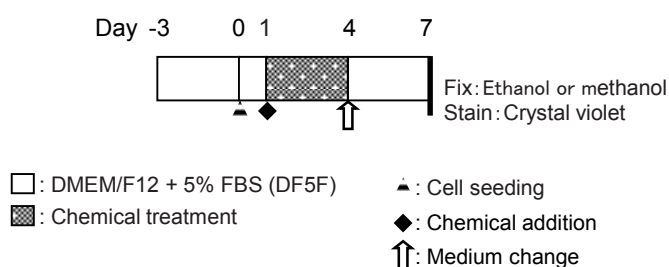


Figure 2: Time line of the cell growth assay component of the initiation test

46. The CV is extracted from the stained cells with 2 mL of dye extraction solution (see Annex 1), and the OD (optical density) is measured at a wavelength between 540-570 nm. The relative cell growth of cultures treated with a chemical is calculated as follows:

$$\text{Relative cell growth (\%)} = [(\text{Treatment} - \text{Blank}) / (\text{Control} - \text{Blank})] \times 100$$

“Treatment”, “Control” and “Blank” refer to the absorbance of the CV extracts of each treatment group, the solvent control group and the medium only group, respectively.

47. Five to nine concentrations of test chemical are set up based on the results of the cell growth assay. These concentrations cover a range from little or no toxicity to the highest acceptable level of toxicity (less than 20% survival compared to the negative control). Ideally, those concentrations include: (a) at least one concentration below the non-toxic level (around 80-120% of cell growth), (b) two concentrations between the non-toxic level and the 50% inhibitory concentration (IC50), and (c) two concentrations between the IC50 and the IC90. Subsequent concentrations should have a ratio of square root of 10 or less (Fig. 3). Some test chemicals exhibit a steep concentration–response curve. With these test chemicals, test concentrations should be spaced at much closer intervals. In addition, it may become necessary to include one or two additional test concentrations below and above the expected dose range in order to allow for possible unanticipated cytotoxic fluctuations among experiments.

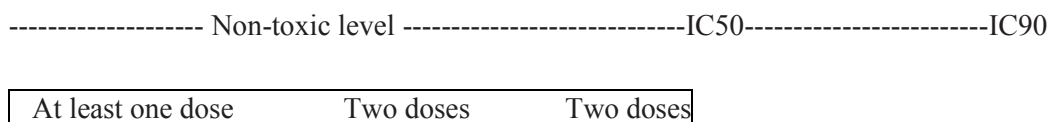


Figure 3: Dose setting for the initiation test component of the transformation assay

48. In the 96-well format, the cell growth assay is carried out in the same manner as the 6-well format except for the following conditions.

- Into each well, 200 cells are plated with 0.05 mL of DF5F (Day 0).
- The cultures in 0.05 mL of medium are treated by the addition of another 0.05 mL of medium containing a test chemical or solvent alone at two times the final desired concentrations, so that the final volume of the medium is 0.1 mL (Day 1).
- The volumes of CV solution and dye extraction solution are 0.1 mL/well.
- For each group, eight wells are prepared.

Transformation assay

49. The transformation assay is carried out as follows (Fig. 4):

- The frozen working cell stocks are rapidly thawed, suspended in M10F and cultured in 100-mm dishes in a volume of 10 mL medium. When the cells reach approximately 70% confluence, they are trypsinized, plated in DF5F at an appropriate density (70,000 to 100,000 cells) per 100-mm dish (Day -3).
- When these cells reach approximately 70% confluence, they are again trypsinized and suspended in DF5F at 2,000 cells/mL. The cell suspension is plated into each well of a 6-well plate at a volume of 2 mL (4,000 cells/well) for the transformation assay and the concurrent cell growth assay (Day 0). Twenty to 24 hours (Day 1) after seeding, the cells are treated for three days (Day 1-4) in the same way as the cell growth assay. The medium is changed with fresh DF5F on Day 4, 7, 10 (or 11) and 14.

- On Day 7, the cultures for the concurrent cell growth assay are fixed with ethanol or methanol for approximately 10 min, washed and dried. The cells are stained with CV solution for approximately 15 min, rinsed well with water and dried (Fig. 2). On Day 21, the cells for transformation assay are fixed with ethanol or methanol and stained with 5% Giemsa solution for approximately 15 min (Fig. 4). The positive control (1 µg/mL MCA) and the negative (solvent) control(s) are included in the transformation assay for each test chemical. Nine wells are prepared for each group (one plate of six wells for the transformation assay and three wells for the concurrent cell growth assay).

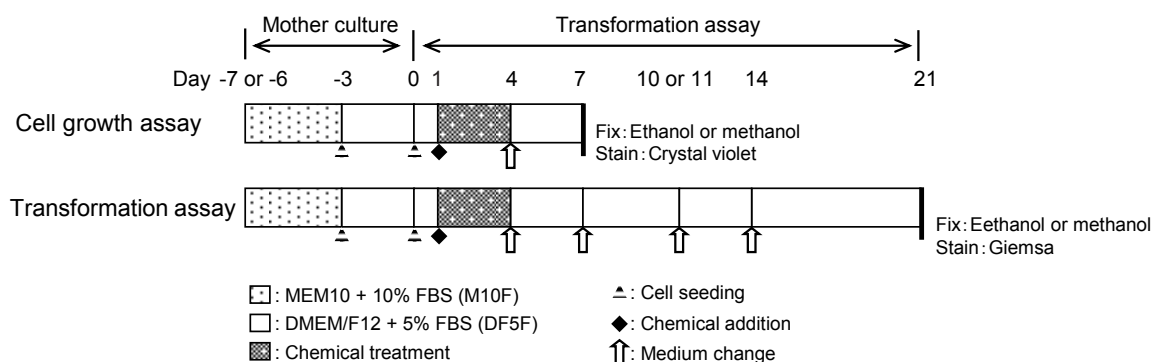


Figure 4: Time line for the initiation test component of the transformation assay

50. The transformation assay using the 96-well format is carried out in the same manner as the transformation assay using the 6-well format except that 200 cells are plated/well in 0.05mL of medium on Day 0, to which is added 0.05 mL medium containing twice the desired final concentration of test chemical on Day 1. One 96-well plate (96 wells) for each group is prepared for the transformation assay and eight wells are prepared for the concurrent cell growth assay.

Promotion test

Cell growth assay to set doses

51. The experimental procedure is basically the same as the initiation test, except for the number of cells plated and timing of chemical treatment. Cells are plated at 14,000 cells/well in 2 mL of DF5F on Day 0, and chemical treatment is started on Day 4 by exchanging existing medium with fresh medium containing the test chemical solution (Fig. 5). Three wells are prepared for each group.

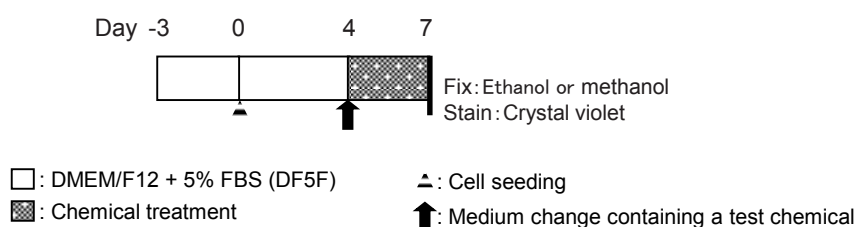


Figure 5: Time line of the cell growth assay component of the promotion test

52. There are two different types of chemicals that exhibit promoting activity. One group includes those chemicals that enhance cell growth more than 20% of that of the control. With these test chemicals, concentrations are selected to cover the range from little or no growth enhancement effect to concentrations that enhance cell growth. In practice, one concentration below the non-toxic level, three concentrations in the range of growth enhancement and one concentration in the range of weak growth inhibition are assessed (Fig. 6).

----- Non-toxic level ----- Growth enhancement----- Growth inhibition



Figure 6: Dose setting for the promotion test component of the transformation assay for chemicals that induce growth enhancement

53. The second chemical group that exhibits promoting activity is that which inhibits cell growth. For these test chemicals, concentrations are selected to cover the range from the non-toxic level to a level below the IC50. Ideally, at least two concentrations below the non-toxic level, two concentrations between the non-toxic level and the IC50 and one concentration between IC50 and IC90 are evaluated (Fig. 7).

----- Non-toxic level -----IC50----- IC90

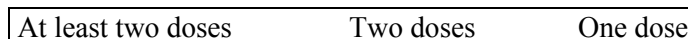


Figure 7: Dose setting for the promotion test component of the transformation assay for chemicals that inhibit growth

54. It is noteworthy that there are chemicals that cause more pronounced growth inhibition in the transformation assay than would otherwise be observed in the concurrent cell growth assay (See paragraph 59). This phenomenon can be attributed to the difference in the duration of the treatment periods for each, *i.e.* 10 days for the transformation assay versus three days for the cell growth assay (58).

55. When test chemicals exhibit a steep concentration–response curve, considerations similar to those described in the initiation test (refer to Paragraph 47) may need to be taken into account, *e.g.* inclusion of additional test concentrations and test concentration intervals, thereby ensuring an acceptable test outcome.

56. In the 96-well format, the cell growth assay is carried out in the same manner as the 6-well format except for the plating of 400 cells in 0.1 mL of DF5F (Day 0). Eight wells are prepared for each group.

Transformation assay

57. The transformation assay is carried out in the same manner as the initiation test except for the following (Fig. 8):

- The cells are suspended in DF5F at 7,000 cells/mL, of which a volume of 2 mL is plated into each well (14,000 cells/well) of a 6-well plate on Day 0. Nine wells are prepared for each group (one plate of six wells for the transformation assay and three wells for the concurrent cell growth assay).

- The cells are exposed to the test chemical for 10 days, from Day 4 to Day 14.
- Following the initial exposure of cells to test chemical on Day 4, cells are re-exposed on days 7 and 10 (or 11) by exchanging existing medium with fresh medium containing the chemical solution or solvent alone.
- On Day 14, the treatment medium is replaced with fresh medium containing neither solvent nor test chemical.
- TPA (50 ng/mL) is used for the positive control.

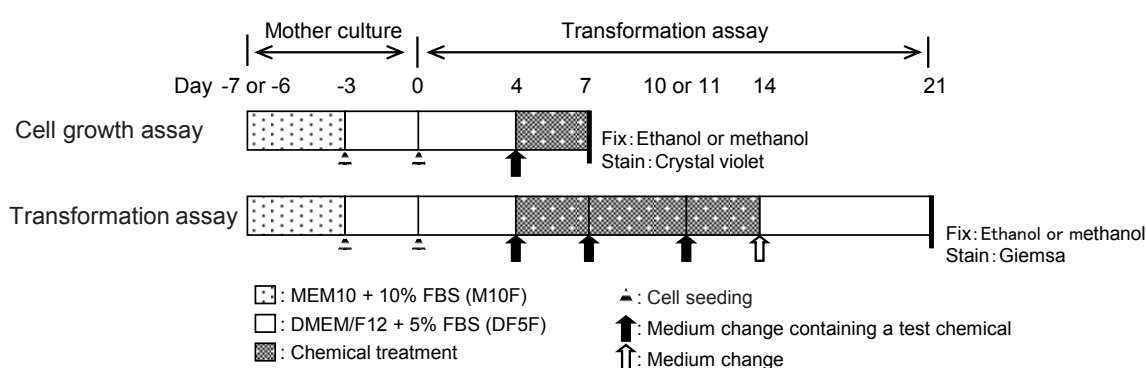


Figure 8: Time line for the promotion test component of the transformation assay

58. In the 96-well format, the transformation assay is carried out in the same manner as that for the 6-well format except for the plating of 400 cells in 0.1 mL of DF5F (Day 0). One 96-well plate (96 wells) for each group is prepared for the transformation assay and eight wells for each group are employed for the concurrent cell growth assay.

Evaluation of the results

Determination of transformation frequency

59. Transformed foci are scored using a stereomicroscope. If the cells in the transformation assay do not reach confluence at a given concentration of test chemical because of cytotoxicity, that concentration is considered unacceptable for transformation assessment and is excluded from focus-counting. In such situations, “toxicity” is recorded in the data sheet.

60. Transformed foci are characterized by the following morphological properties: (a) more than 100 cells, (b) spindle-shaped cells differing in appearance from the contact-inhibited monolayer cells, (c) deep basophilic staining, (d) random orientation of cells, especially visible at the edge of foci (criss-cross misalignment of individual cells), (e) dense multi-layering of cells (piling up), and (f) invasive growth into the surrounding confluent monolayer of contact-inhibited cells. It should be noted that all transformed foci do not necessarily need to exhibit all of these morphological characteristics, but a few of these characteristics should show clear-cut morphological alterations (see Annex 2). For quantification, the number of transformed foci in each well is recorded for each group.

61. In the 96-well format, transformed foci are judged using the same criteria as in the 6-well format. For assay scoring, the number of wells having transformed foci relative to the number of wells observed is recorded for every group. Thus, a well having one focus is counted as one and a well having two or more foci is likewise counted as one.

Statistical analysis

62. For statistical purposes, the quantifiable unit in the 6-well format is the number of transformed foci per well. Test chemical-induced transformation frequency is statistically analyzed by multiple comparison using the one-sided Dunnett's test ($p < 0.05$, upper-sided). For the positive controls, the statistical significance is evaluated by the one-sided Student's t-test or Aspin-Welch test ($p < 0.05$, upper-sided) depending on the results of the F-test for homoscedasticity (homogeneity of variance).

63. For statistical purposes, the quantifiable unit in the 96-well format is the number of wells with one or more transformed foci. Test chemical-induced transformation frequency is statistically analyzed using the Holm's test ($p < 0.05$, upper-sided). For the positive controls, the statistical significance is evaluated by the one-sided chi-square test ($p < 0.05$, upper-sided).

64. If statistical significance is obtained at only one concentration, dose dependency is analyzed by the Jonckheere test ($p < 0.05$, upper-side) for the 6-well format and by the Cochran-Armitage test for the 96-well format ($p < 0.05$, upper-side). If a bell-shaped pattern is observed, eliminating the value(s) that is lower than that of the corresponding negative control in the dose ranges showing a decrease trend is recommended (See Figure 9).

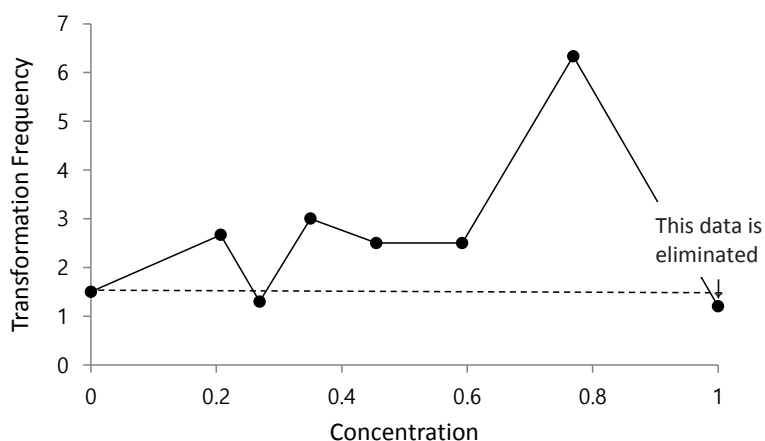


Figure 9: An example of bell-shaped response in the transformation assay

Assay acceptance criteria

65. The following criteria (Paragraphs 66-70) must be fulfilled for a given assay to be considered valid. When considered invalid, the initiation or promotion test is repeated independently, as needed, to satisfy the assay acceptance criteria.

66. The following criteria in the negative control must be fulfilled for a given assay to be considered valid:

- In the 6-well format, the number of (spontaneous) transformed foci must be ≤ 10 per well in the initiation test and ≤ 12 per well in the promotion test. The reason why the acceptability criteria for spontaneous transformation is different in the initiation and promotion assays is that a higher density of plated cells (as is used in the promotion test) increases the spontaneous transformation frequency.

- In the 96-well format, the number of wells in the negative control plates having (spontaneous) transformed foci must be ≤ 15 wells/plate in the initiation test; if damaged wells are present, the number of scorable wells with transformed foci must be $\leq 16\%$. In the promotion test, the number of wells in the negative control plates having (spontaneous) transformed foci must be ≤ 20 wells/plate; if damaged wells are present, the number of undamaged wells with transformed foci must be $\leq 21\%$.

67. The following criteria in the positive control must be fulfilled for a given assay to be considered valid:

- There must be a biologically relevant and statistically significant increase in the transformation incidence compared to the corresponding negative control.

68. When contamination or technical problems are observed, the following requirement must be fulfilled for a given assay to be considered valid:

- In the 6-well format, a minimum of two undamaged wells per group is necessary in the concurrent cell growth assay and a minimum of five undamaged wells per group is necessary in the transformation assay.

- In the 96-well format, a minimum of four undamaged wells per group is necessary in the concurrent cell growth assay and a minimum of 90 undamaged wells per group is necessary in the transformation assay.

- In cases where such technical difficulties are encountered, “contamination”, “accident”, “technical error”, *etc.* are recorded in the data sheet.

69. In the 6-well and 96-well formats, the following criteria must be fulfilled for a given assay to be considered valid:

A transformation assay is considered acceptable if at least four test chemical concentrations are available to be evaluated and the following conditions are satisfied.

- In the initiation test, the results of the concurrent cell growth assay include at least one concentration near the non-toxic level and three concentrations in the range between the non-toxic level and the IC90.

- In the promotion test showing growth enhancement, the results of the concurrent cell growth assay include at least one concentration near the non-toxic level and two concentrations in the range of growth enhancement.

- In the promotion test showing growth inhibition, the results of the concurrent cell growth assay include at least two concentrations below the non-toxic level and two concentrations between the non-toxic level and the IC50.

When test chemical properties bring about atypical test conditions such as precipitation and/or a steep concentration–response curve, and the above assay acceptance conditions cannot be satisfied, a detailed explanation along with the rationale for accepting vs. rejecting the test should be provided.

70. In the initiation and promotion tests, when cytotoxicity from chemical treatment results in an inhibition of confluence at the end of transformation assay such that at least four test chemical concentrations are not available to be evaluated, the following criteria can be invoked in deciding whether or not to repeat such an experiment:

- If a minimum of two sequential doses induces statistically significant increases in transformation frequency, then a repeat experiment is not necessary and the result is judged as positive.
- Other outcomes, *e.g.* one test chemical concentration induces a statistically significant increase in transformation frequency and dose dependency is not observed, would necessitate a repeat experiment at lower concentrations (*e.g.* those that would not inhibit confluence).
- Other experimental results in which an insufficient number of test chemical concentrations remains available for scoring should be evaluated on a case-by-case basis to determine the design for a repeat study.

Data interpretation criteria

71. The interpretation of test results relies on both statistical significance and biological relevance of data, although the latter is considered to be of requisite importance. The bell-shaped pattern observed frequently in Bhas 42 CTA have often suggested the results to be not significant in the trend tests (Jonckheere and Cochran -Armitage), although transformation frequencies were clearly positive. Therefore, use of the trend tests in the results showing the significant difference in multiple doses is not recommended. The concentration(s) of test chemical that increase the transformation frequency is carefully considered, taking into account the range of cytotoxic/non-cytotoxic concentrations.

72. The results of initiation and promotion tests in the 6-well and 96-well formats are evaluated independently and judged as follows:

- The results are judged positive when there are two or more sequential doses that induce statistically significant increase in the transformation frequencies compared with the solvent control and at least one of these doses exceeds the distribution range of the historical negative control data (*e.g.* 95% confidence interval).
- The results are judged positive when a statistically significant increase in the transformation frequencies compared with the solvent control is observed at only one dose and that one dose exceeds the distribution range of the historical negative control data (*e.g.* 95% confidence interval), and further statistical analysis is suggestive of a dose-related response.

- The results are judged negative when there is no dose showing a statistically significant increase in the transformation frequencies.
- When the statistically significant increase occurs at only one dose and the response is not dose dependent, the test result is regarded as equivocal, in which case the initiation and/or promotion test(s) should be repeated. The repeat test should employ modified experimental conditions in which test chemical concentrations are adjusted so as to employ a broader or narrower range, as appropriate, in order to preclude the probability of such equivocal results.
- When results are positive in the initiation and/or promotion test(s) based upon the above criteria, the test chemical is considered to have transforming activity in this test system. Positive results in either the initiation or promotion tests may be considered as indicative of *in vivo* carcinogenic potential.
- Negative results in both tests are taken to mean that the test chemical does not possess potential carcinogenic activity.

Laboratory Proficiency

73. In order to assure the proficiency of a given laboratory, the laboratory should perform tests using two negative chemicals and four positive chemicals, each of the latter acting via different mechanisms of action in both the initiation and promotion test(s). Those chemicals recommended for this purpose are listed in Table 2. All such tests should also include the appropriate negative (untreated and solvent) controls as described in Paragraph 39, above. When negative and positive results are obtained within the ranges in the validation reports (16, 17), those results are considered as acceptable. During the course of these tests, the laboratory should establish:

- A historical response range and distribution for both untreated controls and solvent controls.
- A historical response range and distribution for positive controls.

Even if laboratory competency has already been established as described, if major changes to experimental conditions are introduced into the assay (*e.g.* modifications in methodology, use of assay materials other than those described, use of automated instead of manual scoring techniques), re-evaluation of laboratory proficiency is recommended. Additionally, changes in laboratory personnel responsible for the conduct of the assay may warrant re-evaluation of adeptness.

Before utilizing this GD for regulatory assessment purposes, it is recommended that personnel be trained in a qualified laboratory with acknowledged experience in this assay. Furthermore, the laboratory expecting to generate data for such purposes should be able to demonstrate prowess in conducting the assay.

Table 2: Chemicals for Assessing Laboratory Proficiency (see reference 16)

Category	Chemical	CAS number
1.	Positive chemicals in initiation test of the Bhas42 CTA (genotoxic carcinogens)	
	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNNG)	70-25-7
	3-Methylcholanthrene (MCA)	56-49-5
2.	Positive chemicals in promotion test of the Bhas 42 CTA (non-genotoxic carcinogens)	
	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)	16561-29-8
	Mezerein	34807-41-5
3.	Negative chemicals in both tests of the Bhas 42 CTA (non-carcinogens)	
	Caffeine (CFN)	58-08-2
	Mannitol (MAN)	69-65-8

REPORTING

Test report

74. 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 and mixtures:

- characterized to the extent possible by chemical identity (see above), quantitative occurrence and relevant physicochemical properties of the constituents.

Solvent (if appropriate)

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

Cells and media

- source of cells
- number of cell subcultures (passage number): cryopreserved cell stocks, working cell stocks
- maintenance of cell cultures
- absence of cell culture contamination, especially mycoplasma
- identification of media and serum (provider and lot number) used for cell culture cryopreservation, maintenance, and assays

Test conditions

- rationale for selection of test chemical concentrations, including cytotoxicity data and solubility limitations
- composition of media
- serum concentration, origin, quality, selection criteria
- concentrations of test chemicals
- volume of solvent and test chemical added
- duration of treatment
- incubation temperature
- incubation atmosphere: percent CO₂ and air
- number of cells plated for cell growth assays, concurrent cytotoxicity tests and transformation assays
- positive and negative controls: identification, CAS numbers, concentrations
- criteria for scoring morphologically altered foci

Results

- results of the dose range finding test
- results of the concurrent cell growth assay
- solubility of test chemical, pH and signs of precipitation in medium at the beginning and the end of the treatment
- number of total valid (quantifiable) wells, number of wells lost and the reason(s) for the loss
- number of total foci (6-well format)
- transformation frequency: transformed foci/well (6-well format), the number of wells with transformed foci/total number of wells (96-well format)
- dose-response relationship, if any
- statistical analyses: statistical test(s) employed, statistical analysis of results
- concurrent negative (solvent) control data, untreated control data where appropriate, and positive control data
- historical negative (solvent) and positive control data, with ranges, means and standard deviations
- consistency of concurrent negative (solvent and/or untreated) and positive control data relative to historical control data

Data should be presented in tabular form (see Annex 3). The following values should be presented for each group (treated group, solvent and positive control groups):

- i. results of the concurrent cell growth assay
- ii number of total valid (quantifiable) wells
- iii number of total foci (6-well format) or the number of wells with transformed foci (96-well format)
- iv transformation frequency
- v statistical test(s) employed, statistical analysis of results

*Discussion of results**Conclusion*

REFERENCES

1. Foulds, L. (1969), *Neoplastic Development*, Academic Press, New York, NY.
2. Berenblum, I. (1975), Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin, In: Becker, F.F. ed. *Cancer: A Comprehensive Treatise, Vol. 1*, 323-344, Plenum Press, New York, NY.
3. Lasne, C., Gentil, A. and Chouroulinkov, I. (1974), Two-stage malignant transformation of rat fibroblasts in tissue culture. *Nature*, 247, 490-491.
4. Tsuchiya, T., Umeda, M., Tanaka, N., Sakai, A., Nishiyama, H., Yoshimura, I., Ajimi, S., Asada, S., Asakura, M., Baba, H., Dewa, Y., Ebe, Y., Fushiwaki, Y., Hagiwara, Y., Hamada, S., Hamamura, T., Iwase, Y., Kajiwara, Y., Kasahara, Y., Kato, Y., Kawabata, M., Kitada, E., Kaneko, K., Kizaki, Y., Kubo, K., Miura, D., Mashiko, K., Mizuhashi, F., Muramatsu, D., Nakajima, M., Nakamura, T., Oishi, H., Sasaki, T., Shimada, S., Takahashi, C., Takeda, Y., Wakuri, S., Yajima, N., Yajima, S. and Yatsushiro, T. (2010), Application of the improved BALB/c 3T3 cell transformation assay to the examination of the initiating and promoting activities of chemicals: the second interlaboratory collaborative study by the non-genotoxic carcinogen study group of Japan, *Altern. Lab. Anim.*, 38, 11-27.
5. 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.
6. Kakunaga, T. and Yamasaki, H. eds. (1985), *Transformation Assay of Established Cell Lines: Mechanisms and Application*, IARC Scientific Publications No. 67, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
7. Berwald, Y. and Sachs, L. (1963), In vitro cell transformation with chemical carcinogens, *Nature*, 200, 1182-1184.
8. Newbold, R.F., Overell, R.W. and Connell, J.R. (1982), Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens, *Nature*, 299, 633-635.
9. Elias, Z., Poirot, O., Pezerat, H., Suquet, H., Schneider, O., Danière, M.C., Terzetti, F., Baruthio, F., Fournier, M. and Cavelier, C. (1989), Cytotoxic and neoplastic effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 10, 2043-2052.
10. 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.
11. 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.
12. Stepanenko, A.A. and Kavsan, V.M. Immortalization and malignant transformation of eukaryotic cells, (2012), *Cytol. Genet.*, 46, 36-75.
13. Asada, S., Sasaki, S., Tanaka, N., Takeda, K., Hayashi, M. and Umeda, M. (2005), Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutat. Res.*, 588, 7-21.
14. Ohmori, K., Sasaki, K., Asada, S., Tanaka, N. and Umeda, M. (2004), An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutat. Res.*, 557, 191-202.
15. Muramatsu, D., Sasaki, K., Kuroda, S., Hayashi, K., Tanaka, N. and Sakai, A. (2009), Comparison of sensitivity to arsenic compounds between a Bhas 42 cell transformation assay and a BALB/c 3T3 cell transformation assay, *Mutat. Res.*, 675, 66-70.
16. 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.

17. Hayashi, M., Kojima, H., Corvi, R., Stokes, W., Jacobs, A., Morita, T., Schechtman, L. and Suzuki, M. (2012), Bhas 42 cell transformation assay validation study report, *EURL ECVAM Recommendations*, Ispra, Italy.
18. EURL ECVAM DataBase service on Alternative Methods to Animal Experimentation (DB-ALM) protocol No.156 on in vitro Bhas 42 cell transformation assay (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>)
19. Chu, E.H. and Malling, H.V. (1968), Mammalian cell genetics. II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 61, 1306-1312.
20. Duncan, M.E. and Brookes, P. (1973), The induction of azaguanine-resistant mutants in cultured Chinese hamster cells by reactive derivatives of carcinogenic hydrocarbons, *Mutat. Res.*, 21, 107-118.
21. Mondal, S., Brankow, D.W. and Heidelberger, C. (1976), Two-stage chemical oncogenesis in cultures of C3H/10T1/2 cells, *Cancer Res.*, 36, 2254-2260.
22. Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R.F., Nguyen-Ba, G., Parodi, S., Rivedal, E., Schiffmann, D., Simons, J.W. and Vasseur, P. (1996), Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project, *Mutat. Res.*, 353, 47-63.
23. Arai, S., Sakai, A., Hayashi, K., Sasaki, K., Muramatsu, D., Endou, N., Umeda, M. and Tanaka, N. (2013), A high-throughput cell transformation assay applicable to automation for detecting potential chemical carcinogens using Bhas 42 cells, (2013), *AATEX*, 18, 1-18.
24. 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.
25. Ohmori, K., Umeda, M., Tanaka, N., Takagi, H., Yoshimura, I., Sasaki, K., Asasda, S., Sakai, A., Araki, H., Asakura, M., Baba, H., Fushiwaki, Y., Hamada, S., Kitou, N., Nakamura, T., Nakamura, Y., Oishi, H., Sasaki, S., Shimada, S., Tsuchiya, T., Uno, Y., Washizuka, M., Yajima, S., Yamamoto, Y., Yamamura, E. and Yatsushiro, T., Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in the Environmental Mutagen Society of Japan (2005), An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, *Altern. Lab. Anim.*, 33, 619-639.
26. 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.
27. EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line 1. EURL ECVAM Recommendation, ESAC Opinion and ESAC WG Report, https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/files-bhas/EURL_ECVAM_Recommendation_Bhas-CTA_2013.pdf.
28. Creton, S., Aardema, M., Carmichael, P.L., Harvey, J.S., Martin, F.L., Newbold, R.F., O'Donovan, M.R., Pant, K., Poth, A., Sakai, A., Sasaki, K., Scott, A.D., Schechtman, L.M., Shen, R.R., Tanaka, N. and Yasaei, H. (2012), Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: state of the science and future research needs, *Mutagenesis*, 27, 93-101.
29. Vanparys, P., Corvi, R., Aardema, M.J., Gribaldo, L., Hayashi, M., Hoffmann, S. and Schechtman, L. (2012), Application of in vitro cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals, chemicals, food products and cosmetics, *Mutat. Res.*, 744, 111-116.
30. Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983), Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, *Nature*, 304, 596-602.
31. Ruley, H.E. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture, *Nature*, 304, 602-606.
32. Newbold, R.F. and Overell, R.W. (1983), Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene, *Nature*, 304, 648-651.

33. Hsiao, W.L., Gattoni-Celli, S. and Weinstein, I.B. (1984), Oncogene-induced transformation of C3H 10T1/2 cells is enhanced by tumor promoters, *Science*, 226, 552-555.
34. Dotto, G.P., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1985), Specific growth response of ras-transformed embryo fibroblasts to tumour promoters, *Nature*, 318, 472-475.
35. Hsiao, W.L., Wu, T. and Weinstein, I.B. (1986), Oncogene-induced transformation of a rat embryo fibroblast cell line is enhanced by tumor promoters, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 1943-1950.
36. Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. (1985), Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats, *Nature*, 315, 382-385.
37. Müller, R., Bravov R., Burckhardt, J. and Curran, T. (1984), Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc, *Nature*, 312, 716-720.
38. Lim, Y.M., Sasaki, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N., Sakai, A., S., Umeda, M. and Tanaka, N. (in preparation), Enhancement of expression of v-Ha-ras gene in chemically induced transformed Bhas 42 cells. .
39. Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Komori, A., Sukanuma, 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.
40. Sukanuma, 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.
41. Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002), Rules for making human tumor cells, *N. Engl. J. Med.*, 347, 1593-1603.
42. Futscher, B.W. (2013), Epigenetic changes during cell transformation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 754, 179-194.
43. Harvey, D.M. and Levine, A.J. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts, (1991), *Genes Dev.*, 5, 2375-2385.
44. Rundhaug, J.E. and Fischer, S.M. (2010), Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion, *Cancers*, 2, 436-482.
45. Bustaffa, E., Stocco, A., Bianchi, F. and Migliore, L. (2014), Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity, *Arch. Toxicol.*, 88, 1043-1067.
46. Zenonos, K. and Kyprianou, K. (2013), RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer, *World J. Gastrointest. Oncol.*, 5, 97-101.
47. Enomoto, T. and Yamasaki, H. (1985), Phorbol ester-mediated inhibition of intercellular communication in BALB/c 3T3 cells: relationship to enhancement of cell transformation, *Cancer Res.*, 45, 2681-2688.
48. Sasaki, K., Huk, A., El Yamani N., Tanaka, N. and Dusinska, M. (2014), Bhas 42 cell transformation assay for genotoxic and non-genotoxic carcinogens, In: Sierra, L.M. and Gaivão, I. eds. *Genotoxicity and DNA Repair -A Practical Approach-*, *Methods in Pharmacology and Toxicology*, 343-362, Springer, New York, NY.
49. 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 ENV/JM/MONO(2007)18, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/37863750.pdf>
50. Sakai, A., Iwase, Y., Nakamura, Y., Sasaki, K., Tanaka, N. and Umeda, M. (2002), Use of a cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumour promoters: a review, *Altern. Lab. Anim.*, 30, 33-59.
51. Sasaki, K., Wakuri, S., Gondoh, M., Endou, N., Tanaka, N. and Yamakage, K. (in preparation), Effects of carcinogens on cytochrome P450 isoenzymes induction in v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells).
52. Kashuba, A.D.M. and Bertino, J.S. Jr. (2001), Mechanisms of drug interactions I. In: Piscitelli, S.C. and Rodvold, K.A. eds. *Drug Interactions in Infectious Diseases, Second Edition*, Humana Press Inc., 13-39, Totowa, NJ.

53. Paine, M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E. and Zeldin, D.C. (2006), The human intestinal cytochrome P450 "pie", *Drug. Metab. Dispos.*, 34, 880-886.
54. Dickson, R.B. and Stancel, G.M. (2000), Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 27, 135-145.
55. Shimada, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (2004), Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1, *Cancer Sci.*, 95, 1-6.
56. Chida, K., Hashiba, H., Sasaki, K. and Kuroki T. (1986), Activation of protein kinase C and specific phosphorylation of a Mr 90,000 membrane protein of promotable BALB/3T3 and C3H/10T1/2 cells by tumor promoters, *Cancer Res.*, 46, 1055-1062.
57. Zhang, L., Zhao, R., Ye, S.Q., Zhou, L., Wu, Y.N. and Zeng, Y. (2013), Synergistic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and N-nitrosodiethylamine on cell malignant transformation, *Biomed. Environ. Sci.*, 26, 323-330.
58. Hayashi, K., Sasaki, K., Asada, S., Tsuchiya, T., Hayashi, M., Yoshimura, I., Tanaka, N. and Umeda, M. (2008), Technical modification of the Balb/c 3T3 cell transformation assay: the use of serum-reduced medium to optimise the practicability of the protocol, *Altern. Lab. Anim.*, 36, 653-665.
59. Arai, S., Tanaka, N., Sasaki, K. and Sakai, A. (2010), A study on the dose setting of test chemicals for the promotion assay in Bhas 42 cell transformation assay, *AATEX.*, 15, 6-13.

Annex 1: Culture media, reagents and solutions

Media and supplements:

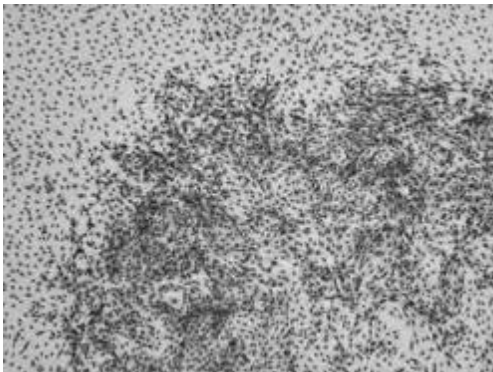
- MEM: Minimum essential medium with 2.2 g/L NaHCO₃ and 0.292 g/L L-glutamine.
- DMEM/F12: Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 with 1.2 g/L NaHCO₃.
- FBS: Fetal bovine serum, selected based upon its ability to support a low frequency of spontaneous transformed focus formation and its ability to induce a high frequency of transformed focus formation in the positive control.
- PS: Penicillin G sodium (10,000 units/mL) and streptomycin sulfate (10 mg/mL).
- M10F: MEM + 10% FBS + 1% PS (500 mL MEM + 56 mL FBS + 5 mL PS): used for cell population expansion, cell storage, and the first culture after thawing.
- DF5F: DMEM/F12 + 5% FBS + 1% PS (500 mL DMEM/F12 + 26.5 mL FBS + 5 mL PS): used for routine subculturing of cells, cell growth assays and transformation assays.

Fixatives and staining solutions:

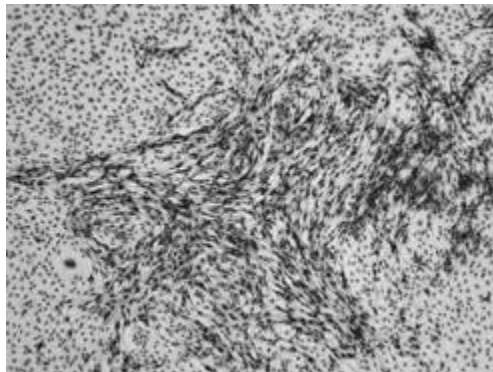
- Formalin (37% formaldehyde): used for fixing cells.
- Ethanol: used for fixing cells.
- Methanol: used for fixing cells.
- 0.1% crystal violet (CV) solution: used for staining cells in cell growth assays. CV, 1 g, is dissolved in 50 mL of ethanol, and the total volume is adjusted to 1 L with distilled water/ultra-pure water.
- Extraction solution: 0.02 mol/L HCl and 50% ethanol (480 mL distilled water/ultra-pure water + 500 mL ethanol + 20 mL 1 M HCl) used for extracting CV in cell growth assays.
- 5% Giemsa solution: used for staining cells in transformation assays.

Annex 2: Photo catalog of foci in Bhas 42 CTA (see * below for definitions of abbreviations used)

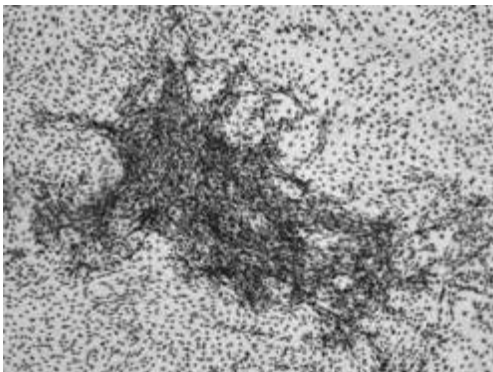
<Negative (Non-transformed) Foci>



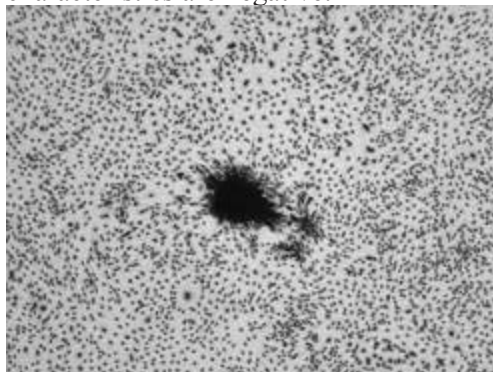
B- S- M- R- I-
The cells simply gather together (cluster).



B+/- S+ M- R- I-
The morphology of the cells changes to spindle-shaped. However, all other characteristics are negative.

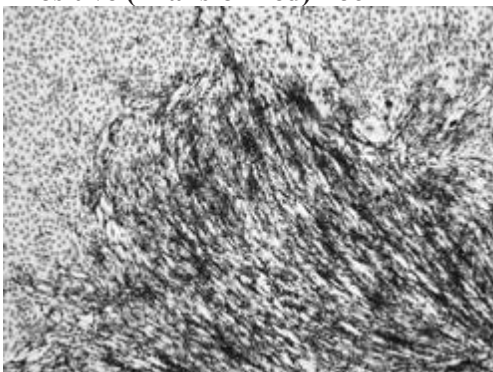


B+/- S+ M+/- R- I+
Piling up is scarcely observed and other positive characteristics are barely discernible.

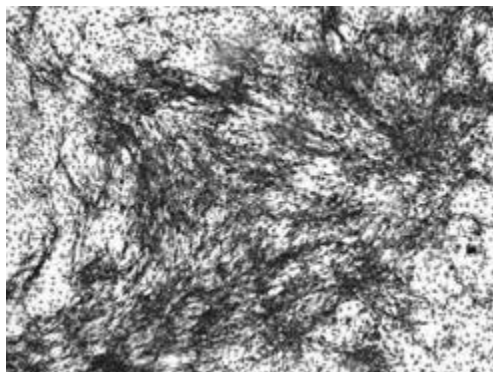


B+ S+ M+ R+ I+
Morphological characteristics resembling transformation are observed but the focus is exceedingly small.

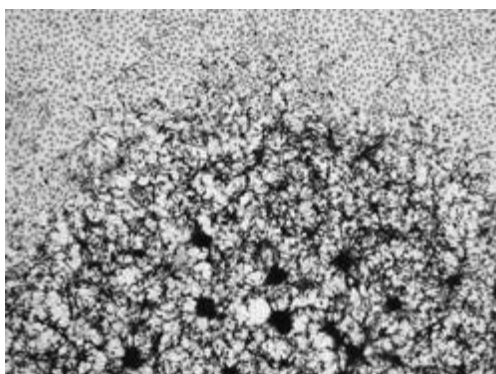
<Positive (Transformed) Foci>



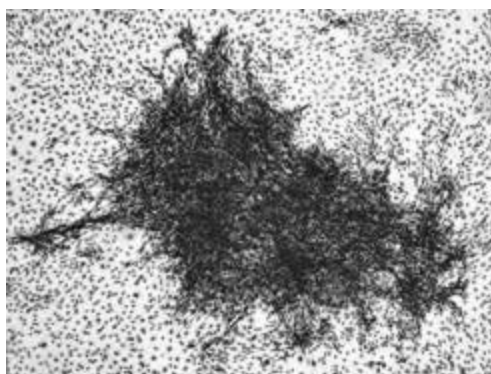
B+ S++ M+/- R+ I+
Piling up is limited. The cells comprising the Focus are markedly spindle-shaped (tapered and elongated), displaying a swirling parallel arrangement.



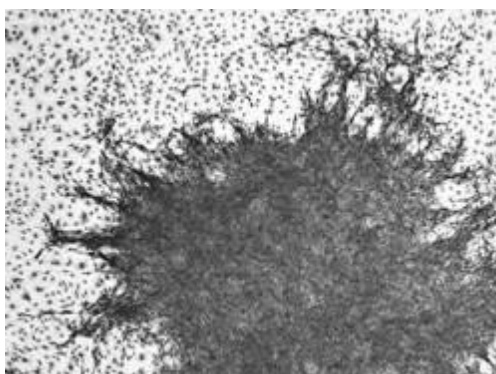
B+ S++ M+ R+ I+
Some areas of piling up are observed within the focus. Foci consist of markedly spindle-shaped (tapered and elongated) cells generally aligned relative to each other.



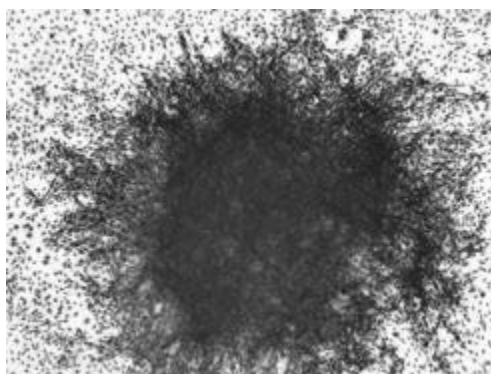
B+ S++ M+/- R++ I+
 Scattered areas of piling up and knotting (dense clustering) of cells are observed. Cells are exceedingly spindle-shaped (tapered and elongated) and randomly orientated.



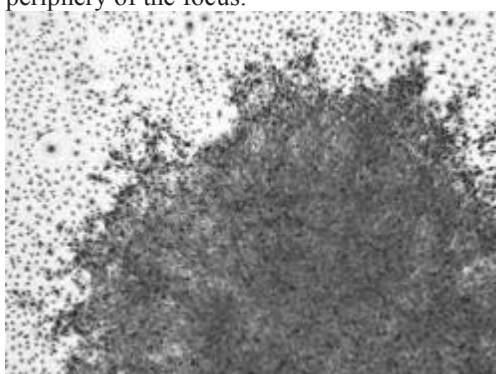
B+ S+ M+ R+ I+
 All properties that are characteristic of the transformed phenotype are moderately expressed.



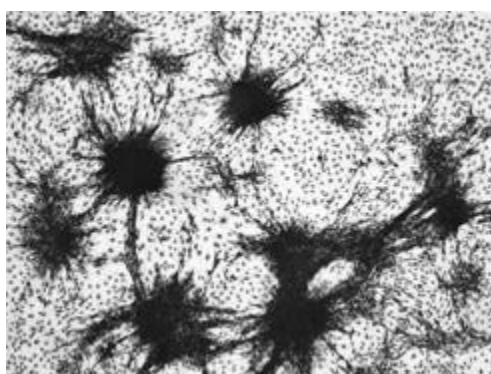
B+ S++ M++ R++ I+
 All aberrant phenotypic characteristics are clearly visible. With the exception of multilayered areas, which are too dense to discern individual cell morphology, the atypical properties of the transformed focus are readily observed at the periphery of the focus.



B+ S+ M++ R+ I+
 The cells comprising the periphery of the focus are less densely packed and their spindle-shape and random orientation, although apparent, are less striking. The interlaced cells at the edge of the focus invade the surrounding monolayer.



B+ S- M++ R- I+
 The multi-layering and density of cells are apparent throughout the focus. The cells comprising the periphery of the focus are not obviously spindle-shaped or randomly orientated but do invade the contact-inhibited monolayer.



B+ S++ M++ R++ I+
 Daughter (secondary) foci originating from a single parent focus and exhibiting typical and uniform transformed morphology. These are found in close proximity, are often connected by cellular appendages, and are scored as one transformed focus.

*Abbreviations: B, basophilic; S, spindle-shaped; M, multilayer; R, random orientated; I, invasive.

Annex 3: Data collection forms for the Bhas 42 CTA (Example)

Data Sheet for Cell Growth Assay for 6-well Format

Cell growth assay	Well No.	Blank	Solvent (%)	Concentrations (mM)							
OD	1										
	2										
	3										
	Average										
	SD										
Relative cell growth (%)	Average - Blank										

Data Sheet for Cell Transformation Assay for 6-well Format

Cell growth assay	Well No.	Blank	Solvent (%)	Concentrations (mM)								Negative control	Positive control
												0.1% DMSO	MCA (1 ug/mL)
OD	1												
	2												
	3												
	Average												
	SD												
Relative cell growth (%)	Average - Blank												

TTransformation assay	Well No.	Blank	Solvent (%)	Concentrations (mM)								Negative control	Positive control
												0.1% DMSO	MCA (1 ug/mL)
Foci/Well	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
	Average												
	SD												
Transformation frequency (foci/well)													

Data Sheet for Cell Growth Assay for 96-well Format

Cell growth assay	Well No.	Blank	Solvent (%)	Concentrations (mM)											
OD	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
	8														
	Average														
SD															
Relative cell growth (%)	Average - Blank														

Data Sheet for Cell Transformation Assay for 96-well Format

Cell growth assay	Well No.	Blank	Solvent (%)	Concentrations (mM)												Negative control	Positive control
															0.1% DMSO	MCA (1 ug/mL)	
OD	1																
	2																
	3																
	4																
	5																
	6																
	7																
	8																
	Average																
SD																	
Relative cell growth (%)	Average - Blank																

