

94	polybrominated bisphenyl mixture	67774-32-7			++
95	Ponceau 3R	3564-09-8	+		++
96	procarbazine HCl	366-70-1	++		++
97	progesterone	57-83-0	E		++
98	propylene oxide	75-56-9	++		++
99	reserpine	50-55-5			++
100	safrole	94-59-7	+		++
101	selenium sulfide	7446-34-6	++		++
102	streptozotocin	18883-66-4	++		++
103	testosterone	58-22-0	I		++
104	tetrachloroethylene	127-18-4	I		++
105	thioacetamide	62-55-5	I		++
106	thiourea	62-56-6	E		++
107	uracil mustard	66-75-1	++		++
108	urethane	51-79-6	I	-	++
109	1,1,2,2-tetrachloroethane	630-20-6	I	-	+
110	1,2-dichloropropane	78-87-5	++		+
111	1,2-epoxybutane	106-88-7	++		+
112	11-aminoundecanoic acid	2432-99-7	+		+
113	2,6-dichloro- <i>p</i> -phenylenediamine	609-20-1	++		+
114	2-amino-4-nitrophenol	99-57-0	++		+
115	2-amino-5-nitrophenol	121-88-0	I		+
116	2-aminofluorene	153-78-6	++		+
117	2-biphenylamine HCl	2185-92-4	I		+

118	2-nitro-p-phenylenediamine	5307-14-2	++		+
119	3-(chloromethyl)pyridine HCl	6959-48-4	++		+
120	4-amino-2-nitrophenol	119-34-6	++		+
121	4-aminoazobenzene	60-09-3	I		+
122	4-nitrobiphenyl	92-93-3	I		+
123	5-azacytidine	320-67-2	++		+
124	5-chloro- <i>o</i> -toluidine	95-79-4	I		+
125	7-bromomethyl-12-methylbenz[<i>a</i>]anthracene	16238-56-5	++		+
126	actinomycin D	50-76-0	++		+
127	allyl isothiocyanate	57-06-7	I		+
128	auramine O	2465-27-2			+
129	benzyl acetate	140-11-4			+
130	benzyl chloride	100-47-7	++		+
131	bis(2-chloro-1-methylethyl)ether	108-60-1	++		+
132	butyl benzyl phthalate	85-68-7			+
133	C.I. disperse blue 1	2475-45-8	+		+
134	C.I. solvent yellow 14	842-07-9	E		+
135	captan	133-06-2	++		+
136	chlordane	12789-03-6	++		+
137	chlornaphazine	494-03-1	++		+
138	chlorodibromomethane	124-48-1	++		+
139	chlorothalonil	1897-45-6	+		+
140	cyclopenta[<i>c,d</i>]pyrene	27208-37-3	++		+
141	cytembena	21739-91-3	++		+

142	D&C Red9	5160-02-1			+
143	decabromodiphenyl oxide	1163-19-5			+
144	di(2-ethylhexyl)adipate	103-23-1			+
145	dimethyl hydrogen phosphite	868-85-9			+
146	dimethyl morpholinophosphoramidate	597-25-1	E		+
147	D-limonene	5989-27-5	I		+
148	furosemide	54-31-9			+
149	heptachlor	76-44-8	I		+
150	ICR170	146-59-8	++		+
151	isoniazid	54-85-3	I		+
152	isophorone	78-59-1	++	+(24)	+
153	malonaldehyde, sodium salt	24382-04-5	++		+
154	melamine	108-78-1			+
155	mercaptobenzothiazole	149-30-4	+		+
156	methyl carbamate	598-55-0			+
157	methylhydrazine	60-34-4	I		+
158	monuron	150-68-5	++		+
159	<i>N,N</i> -diethylthiourea	105-55-5	++		+
160	<i>N</i> -acetoxy-2-acetylaminofluorene	6098-44-8	++		+
161	<i>p,p'</i> -DDE	72-55-9	+		+
162	pentachloroethane	76-01-7	+	+(-S9)	+
163	styrene oxide	96-09-3	++		+
164	succinic anhydride	108-30-5	I		+
165	tribromomethane	75-25-2	I		+

166	trichloroethylene	79-01-6	++		+
167	tris(2-ethylhexyl) phosphate	78-42-2			+
168	vinylidene chloride	75-35-4	+		+
169	zearalenone	17924-92-4	E	-	+
170	ziram	137-30-4	+		+
171	1,2-dichlorobenzene	95-50-1	++		-
172	2,3,5,6-tetrachloro-4-nitroanisole	2438-88-2	E		-
173	2,4-dichlorophenol	120-83-2	I		-
174	2,4-dimethoxyaniline HCl	54150-69-5	I		-
175	2,6-diaminotoluene 2HCl	15481-70-6	I		-
176	2,6-toluene diisocyanate	91-08-7	E		-
177	2-chloroethanol	107-07-3	++		-
178	4-dimethylaminoazobenzene	60-11-7	-		-
179	4-nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	E		-
180	8-hydroxyquinoline	148-24-3	+		-
181	aldicarb oxime	1646-75-9	I		-
182	anilazine	101-05-3			-
183	benzyl alcohol	100-51-6	I		-
184	C.I. acid orange 10	1936-15-8	E		-
185	C.I. acid red 14	3567-69-9	-		-
186	caprolactam	105-60-2	=		-
187	chlorpheniramine maleate	113-92-8	I		-
188	chlorpropamide	94-20-2	I		-
189	coumaphos	56-72-4			-

190	diazinon	333-41-5	I		-
191	DL-menthol	15356-70-4	I		-
192	D-mannitol	69-65-8	-		-
193	erythromycin stearate	643-22-1			-
194	ethoxylated dodecyl alcohol	9002-92-0	I		-
195	ethylenediaminetetracetic acid, trisodium salt	150-38-9	=		-
196	FD&C yellow 6	2783-94-0	=		-
197	geranyl acetate	105-87-3			-
198	hamamelis water	68919-39-2	=		-
199	HC blue 2	33229-34-4	I		-
200	L-ascorbic acid	50-81-7			-
201	malaaxon	1634-78-2	I		-
202	methoxychlor	72-43-5			-
203	methyl methacrylate	80-62-6	++		-
204	methyl parathion	298-00-0			-
205	<i>n</i> -butyl chloride	109-69-3	I		-
206	phenol	108-95-2			-
207	phenylephrine HCl	61-76-7	I		-
208	phthalamide	88-96-0			-
209	<i>p</i> -phenylenediamine HCl	624-18-0	E		-
210	sodium diethyldithiocarbamate	148-18-5	I		-
211	sulfisoxazole	127-69-5	I		-
212	tetracycline HCl	64-75-5			-
213	tetraethylthiuram disulfide	97-77-8	E		-

214	tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride	124-64-1	I		-
215	tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate	55566-30-8	I		-
216	titanium dioxide	13463-67-7			-
217	xylene	1330-20-7	I		-
218	1-naphthylamine	134-32-7	I		陰性 (制限有)
219	1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone	89-25-8	I		陰性 (制限有)
220	3-nitropropionic acid	504-88-1			陰性 (制限有)
221	benzoin	119-53-9	-		陰性 (制限有)
222	caffeine	58-08-2	I	+ (-S9)	陰性 (制限有)
223	ethanol	64-17-5	=		陰性 (制限有)
224	hycanthone methanesulfonate	23255-93-8	++		陰性 (制限有)
225	maleic hydrazide	123-33-1	I		陰性 (制限有)
226	methotrexate	59-05-2	++	+ (± S9)	陰性 (制限有)
227	piperonyl butoxide	51-03-6	+		陰性 (制限有)
228	4-hexylresorcinol	136-77-6	+		E
229	ampicillin trihydrate	7177-48-2	=		E
230	bisphenol A	80-05-7	-		E
231	C.I. acid yellow 73	518-47-8	E		E
232	chlorobenzene	108-90-7	+		E
233	diallyl phthalate	131-17-9	++		E
234	dimethyl terephthalate	120-61-6			E
235	hydrochlorothiazide	58-93-5	++		E
236	methyl DOPA sesquihydrate	41372-08-1			E
237	N-phenyl-2-naphthylamine	135-88-6	++		E

238	oxytetracycline HCl	2058-46-0	++		E
239	propyl gallate	121-79-9	++		E
240	rotenone	83-79-4	++		E
241	roxarsone	121-19-7	I		E
242	sodium(2-ethylhexyl)alcohol sulfate	126-92-1	I		E
243	stannous chloride	7772-99-8			E

Mitchell AD et al. The L5178Y/*tk*^{+/+} mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 27, 177-303 (1997) PMID: 9434856

- 1) ++, 明らかに陽性; +, 陽性 (制限有); -, 陰性; =, 細胞毒性を示さない濃度で陰性; E, equivocal; I, 結論できない; /, データなし
- 2) +, 陽性; -, 陰性; (+S9), 短時間処理代謝活性化有の条件; (-S9), 短時間処理代謝活性化無の条件; (±S9), 短時間処理代謝活性化有無両方の条件; (24), 長時間処理代謝活性化無の条件; E, equivocal

表4 1999年以降の論文(11報)に発表されたMLAデータ

	化合物名	CAS番号	+S9	-S9	24h	参考文献:PMID
	Ginkgo biloba leaf extract#		/	+	/	24595819
1	bilobalide	33570-04-6	-	-	/	24595819
2	ginkgolide A	15291-75-5	-	-	/	24595819
3	ginkgolide B	15291-77-7	-	-	/	24595819
4	ginkgolide C	15291-76-6	-	-	/	24595819
5	isorhamnetin	480-19-3	-	-	/	24595819
6	kaempferol	520-18-3	/	+	/	24595819
7	quercetin	117-39-5	/	+	/	24595819
8	quercetin-3-β-D-glucoside	21637-25-2	/	+	/	24595819
9	1,3-dimethylxanthine	58-55-9	-	-	+	10474817
10	2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ)	77094-11-2	+	-	/	26001754
11	2'-deoxycoformycine	53910-25-1	-	-	+	10474817
12	3'-azido-3'-deoxythymidine	30516-87-1	/	+	/	19237551
13	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	64091-91-4	+	-	/	26001754
14	4-aminobiphenyl*	92-67-1	+	-	/	26001754
15	5-fluorouracil	51-21-8	+	+	/	10474816
16	arsenic trioxide	1327-53-3	+	+	/	10474816
17	benzene*	71-43-2	+	-	/	10474816
18	benzo[a]pyrene*	50-32-8	+	-	/	26001754
19	bromodichloromethane	75-27-4	-	±	-	10474817
	bromodichloromethane	75-27-4	?	-	/	10474816
20	bromonitromethane	563-70-2	-	/	/	21561708
21	cadmium chloride*	10108-64-2	+	+	/	26001754
22	cadmium sulphate*	10124-36-4	+	+	/	10474816
23	caffeine*	58-08-2	/	+	/	19797863
24	carvacrol	499-75-2	/	-	-	26046975
25	chloral hydrate	302-17-0	-	/	/	21561708
26	chlorendic acid	115-28-6	?	?	+	10474817
	chlorendic acid	115-28-6	?	?	/	10474816
27	chlorodibromomethane	124-48-1	+	-	/	10474816
28	colchicine	64-86-8	-	-	+	10474817
29	cytosine arabinoside (Ara C)	147-94-4	+	+	/	10474816
30	dideoxycytidine	7481-89-2	-	-	+	10474817
	dideoxycytidine	7481-89-2	-	-	/	10474816
31	diethylstilbestrol	56-53-1	+	-	/	10474816
32	ethyl nitrosourea	759-73-9	/	+	/	12112381
33	eugenol	97-53-0	+	+	/	10474816
34	formaldehyde	50-00-0	/	+	/	11971987
36	griseofulvin	126-07-8	-	+	/	10474816
37	hexamethyl phosphoramide	680-31-9	+	+	/	10474816
38	hydroxyurea	127-07-1	+	+	/	10474816
39	isophorone	78-59-1	?	-	/	10474816
	isophorone*	78-59-1	-	-	+	10474817
40	methotrexate*	59-05-2	+	+	/	10474816
41	mitomycin C	50-07-7	/	+	/	19237551
	mitomycin C*	50-07-7	+	+	/	10474816
42	monocrotaline	315-22-0	+	+	/	10474816
43	mucobromic acid	488-11-9	+	/	/	21561708
44	mucochloric acid	87-56-9	-	/	/	21561708
45	noscopine	128-62-1	?	-	+	10474817
46	ochratoxin A	303-47-9	+	+	/	24164384
47	pentachloroethane*	76-01-7	-	+	/	10474816
48	phenacetin*	62-44-2	?	?	+	10474817
49	p-tert-butylphenol	98-54-5	-	-	+	10474817
50	taxol	33069-62-4	/	+	/	19237551
51	1,1,1,2-tetrachloroethane*	630-20-6	-	-	-	10474817
52	tetrachloroethane	79-34-5	?	-	/	10474816
53	thiabendazole	148-79-8	-	-	+	10474817
54	thymol	89-83-8	/	-	-	26046975
55	tribromoacetaldehyde	115-17-3	-	/	/	21561708
56	trichloronitromethane	76-06-2	-	/	/	21561708
57	urethane*	51-79-6	-	-	-	10474817
	urethane	51-79-6	-	-	/	10474816
58	vinblastine sulfate	865-21-4	?	?	+	10474817
59	zearalenone*	17924-92-4	-	-	-	10474817

: 1 - 8 はこの化合物の成分 ; * : 表3にデータを追記した物質

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
AOP および IATA に立脚した国際的な安全性手法の確立
平成 27 年度分担研究報告書

Bhas 42 形質転換試験のプロトコル整備

研究分担者 山影 康次 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

本研究では、Bhas42 細胞を用いる形質転換試験の形態観察による判定法を客観的方法に改良して汎用性の高いプロトコルとするため、メチレンブルー染色（核酸染色）による吸光度法を採用した。その結果、形態観察の結果と一致しないウェルにも形態観察では観察が困難であったウェル壁面に形質転換巣（フォーカス）が形成されており、吸光度の高いウェルではほぼ 100%フォーカスが形成されていることが明らかとなった。暫定的なカットオフ値を用いた 3 物質の検討結果では、これまでの過酸化水素処理による吸光度法の課題を改善する結果が得られたことから、詳細な条件検討により実現可能な客観的方法となる可能性が示された。

A. 研究目的

正常な Bhas42 細胞の特性である接触阻止能を失った形質転換細胞は、異常増殖して形質転換巣（フォーカス）を形成する。それはヌードマウスに腫瘍を形成することから、がん化した細胞と考えられる。フォーカスの判定は形態観察（塩基性染色、紡錘状、多層など）により行うため、観察者の訓練が必要となる。Bhas42 細胞を用いる形質転換試験に関するガイダンスドキュメント¹⁾が OECD から発行されたが、この試験法のガイドライン化または IATA で推奨される試験とするためには、フォーカスの客観的評価法を導入するなど、汎用性の高いプロトコルに改良し、この試験法による AOP に関連する実験データを含む多数のデータ蓄積を推進する必要がある。

観察によるフォーカスの判定は、単層状に生存している正常細胞（薄い染色）の中に紡錘状の細胞が異常増殖し、密度の高い多層状となった細胞集団（濃い染色）をギムザ染色による染色性も考慮して行う。96 ウェルプレートを用いる形質転換試験では、ギムザ染色で濃染されるフォーカスのあるウェル（陽性ウェル）を容易に判別可能であることから、細胞増殖率測定法で用いられている染色法を応用することにより、フォーカスのある陽性ウェルを客観的に判定できると考えられる。そこで、細胞増殖率測定法として古くから利用されているクリスタルバイオレット染色による吸光

度測定法を検討したが、正常細胞も染色されるため、陽性ウェルの識別が困難であった。

この問題を克服するために検討を重ねた結果、我々は、過酸化水素処理により選択的に正常な Bhas 42 細胞を死滅させることができることを見だし、この方法を応用することによって、形質転換細胞の生存率を吸光度で測定し、陽性ウェルを客観的に判定することが可能となることを示した。しかしながら、過酸化水素耐性細胞の中には形質転換していない前がん状態の細胞も含まれており、更なる改良が必要であった。

そこで、今年度は、細胞数をより正確に反映すると考えられる細胞核（厳密には核酸）を特異的に染色するメチレンブルー染色²⁾を採用することにより、吸光度測定による客観的判定法の可能性を検討した。

B. 研究方法

浅田らの方法³⁾および酒井らの方法^{4),5)}の試験プロトコルとほぼ同様に、96 ウェルプレートに Bhas 42 細胞をウェルあたり 200 細胞または 400 細胞播種し、それぞれイニシエーション試験およびプロモーション試験を実施した（図 1）。培養終了後、メタノールで固定・水洗・風燥した。固定したプレートをホウ酸バッファー（pH8.4）で洗浄し、1%メチレンブルー染色液で核酸を染色し、余分な染色液を洗浄したのち 0.1 mol/L 塩酸でメチレンブルーを抽出し、マイクロプレートリー

ダーで677 nmの吸光度を測定した。

無処理対照ないし溶媒対照プレートについて、同一プレートをクリスタルバイオレットで染色する場合には、メチレンブルー抽出の終了したプレートを水洗し、そのプレートに0.1%クリスタルバイオレット溶液を加えて染色し、余分な染色液を洗浄したのち0.02 mol/L塩酸/50%メタノール混液でクリスタルバイオレットを抽出し、マイクロプレートリーダーで570 nmの吸光度を測定した。または、同じプレートをギムザ染色し、肉眼観察によるフォーカスの有無を判定した。

メチレンブルー染色による吸光度法の有効性を調べるために、過酸化水素法で観察法と結果が不一致となったbenzo[a]pyrene、zinc chloride、L(+)-ascorbic acidを用いて試験を行った。1群につき96ウェルプレート1枚(96ウェル/群)を用いた。

フォーカスの判定は、酒井らの方法⁵⁾に従った。陰性(溶媒)対照群と化合物処理群のフォーカスを有する陽性ウェルの数について、多重性を考慮した χ^2 検定を行い、連続した2濃度で有意となった場合を陽性、1濃度のみ有意となった場合を疑陽性と判定した。また、陰性(溶媒)対照群の陽性ウェルの数が、イニシエーション試験では15ウェル以下、プロモーション試験では20ウェル以下を試験成立条件とした。

C. 研究結果

メチレンブルー染色は、細胞増殖率を測定する方法の一つであることから、細胞増殖率測定法として汎用されているクリスタルバイオレット染色との差を確認するために、同一プレートについて、2つの染色法による陽性ウェルの吸光度分布を比較した(図2)。その結果、異常増殖して細胞数が多くなっている陽性ウェルの吸光度は2つの方法ともに高い値を示す傾向が認められたが、中程度あるいは小さいフォーカスの吸光度は必ずしもフォーカスの無いウェルの吸光度よりも高い値ではなかった。また、クリスタルバイオレット染色の方が、陽性ウェルの吸光度の値は広範囲にわたり、メチレンブルー染色よりも陽性ウェルと陰性ウェルを吸光度で区別することは困難と思われる結果であった。

しかしながら、染色したプレートと染色液を抽出したプレートを比較すると、明らかに結果の一致しないウェルが存在し、そのウェル壁面には大きなフォーカスが存在して(図3)。そこで、他のウェルについても

詳細に観察した結果、かなりのウェルでフォーカスが壁面に存在することが明らかとなった(図4)。

96ウェルプレートを用いた場合には、ウェル壁面に形成されたフォーカスの評価が不十分であることが明らかとなったことから、再度、同一プレートについて、2つの染色法の陽性ウェルの吸光度分布を比較した(図5)。その結果、高い吸光度であるにもかかわらず陰性ウェルと判定していたウェルの多くが陽性ウェルであった。クリスタルバイオレット染色では、小さいフォーカスが形成された陽性ウェルの吸光度は必ずしも陰性ウェルの吸光度より高い値ではなかったが、メチレンブルー染色では、陽性ウェルと陰性ウェルは吸光度0.16で完全に分かれた。

メチレンブルー染色で陰性ウェルと陽性ウェルを吸光度の値(カットオフ値)で判定できる可能性が示されたことから、3物質の結果について、カットオフ値を0.2として結果の判定を行った(表1)。その結果、benzo[a]pyreneについては、過酸化水素法で偽陽性となったプロモーション試験がメチレンブルー染色では観察法と同じ陰性となったが、イニシエーション試験も陰性となり観察法と一致しなかった。Zinc chlorideについては、過酸化水素法で陽性となったイニシエーション試験がメチレンブルー染色では観察法と同じ陰性となり、イニシエーション試験およびプロモーション試験ともに観察法と一致した。L(+)-ascorbic acidについては、過酸化水素法で陽性となったイニシエーション試験がメチレンブルー染色では陰性となり、観察法では偽陽性であったが、この物質は非発がん物質でありイニシエーション試験およびプロモーション試験とも陰性となったメチレンブルー染色の結果は発がん性の結果と一致した。

D. 考察

我々が開発した過酸化水素法は、接触阻止作用を有する正常細胞を選択的に死滅させるが、前がん細胞やがん化した細胞は生細胞として増殖することができることから、生細胞を吸光度で測定する方法により形質転換細胞の判定を可能にした。しかしながら、前がん細胞が過酸化水素処理に対する耐性を獲得することで非発がん物質の検出力が低下したと考えられた。

そこで、前がん細胞の影響を受けない試験条件を検討するため、細胞数をより正確に反映すると考えられるメチレンブルー染色(核酸染色)を採用し、吸光度

測定による客観的判定法の可能性を検討した。その結果、これまで観察法と一致しないと判定していた高い吸光度はウェル壁面のフォーカス形成を反映した結果であることが示された。この結果を踏まえ、メチレンブルー染色の吸光度のカットオフ値を暫定的に 0.2 に設定して行った 3 物質の形質転換試験結果は、高い偽陽性率となる過酸化水素法の欠点を改善した。しかしながら、その反面、明らかに陽性となるべき結果が陰性となり、今回の判定条件が最適ではないことも判明した。

今後、Bhas 42 細胞形質転換試験をガイドライン化あるいは IATA で推奨される試験とするためには、メチレンブルー染色法を含めた様々な測定法に適用可能なプロトコルを整備し、Bhas 42 細胞形質転換試験が簡便かつ汎用性がある試験であることを示すことによって、この試験を利用した AOP に関わる発がんメカニズム解明を含む様々な実験データの蓄積を加速させる必要があると考えられる。

E. 結論

Bhas 42 細胞形質転換試験の 96 ウェルプレート法において、メチレンブルー染色（核酸染色）で高い吸光度を示すウェルはほぼ 100%フォーカスを形成した陽性ウェルであることが示唆された。したがって、適切なカットオフ値を設定することにより、観察法と同等な結果が得られる客観的方法となる可能性が示された。

F. 引用文献

1. Guidance document on the in vitro Bhas 42 cell transformation assay, [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO\(2016\)1.pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO(2016)1.pdf)
2. Pelletier, B., Dhainaut, F., Pauly, A., Zahnd, J.P.: Evaluation of growth rate in adhering cell cultures using a simple colorimetric method, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 16(1), 63-73, 1988.
3. Asada, S., Sasaki, K., Tanaka, N., Takeda, K., Hayashi, M., Umeda, M.: 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, 2005.
4. Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Hayashi K, Lim YM, Yamazaki S,

Umeda M, Tanaka N. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* 2010 Sep 30;702(1):100-22.

5. 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.: An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity, *Mutat. Res.*, 725, 57-77, 2011.

G. 研究発表（今年度のものをご記入下さい。）

1. 論文発表

1) 書籍

無し

2) 雑誌

1. Okamoto, H., Tsutsumi, Y., Watanabe, M., Yamakage, K., Ashida, M., Chen, P., Doi, H., Miura, H., Matsumura, M., and Hanawa, T.: Evaluation of release and accumulation of metal ions from titanium and nickel by accelerated dissolution test in simulated body environments. *Electrochemistry*, 83(12), 1048-1052 (2015)
2. Sato, M., Todoroki, S., Takahashi, T., Hafez, E., Takasu, C., Uehara, H., Yamakage, K., Kondo, T., Matsumoto, K., Furuta, M. and Izumi, K.: Modifications of azoxymethane-induced carcinogenesis and 90-day oral toxicities of 2-tetradecylcyclobutanone as a radiolytic product of stearic acid in F344 rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 28, 99-107 (2015)
3. Nakagawa, Y., Toyozumi, T., Sui, H., Ohta, R., Kumagai, F., Usumi, K., Saito, Y., and Yamakage, K.: *In vivo* comet assay of acrylonitrile, 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate and ethanol in rats. *Mutation*

2. 学会発表（発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入）
1. 山影 康次：遺伝子導入マウス初代肝細胞による *in vitro* 肝毒性試験、第28回日本動物実験代替法学会、P66、2015
 2. 佐々木 澄志, 若栗 忍, 榎藤 麻衣子, 遠藤 伸子, 須井 哉, 山影 康次：マウス初代肝細胞2次元培養系の Cyp 遺伝子発現及び細胞毒性作用を指標とした評価、第28回日本動物実験代替法学会、P100、2015
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）
1. 特許取得
無し
 2. 実用新案登録
無し
 3. その他

表1 メチレンブルー吸光度のカットオフ値0.2を用いた Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験結果

化合物	96ウェル法														遺伝毒性 ^{2,3)}		発がん性 ^{2,3)}
	H ₂ O ₂ (OD)										Metylen blue		観察法				
	0.09		0.1		0.11		0.12		0.13		Ini	Pro	Ini	Pro	Ames	Others	
	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro							
Benzo[a]pyrene	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	-	-	+	-	+	+	+
Zinc chloride	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
L(+)-Ascorbic acid	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	±	-	w+/-	MN+	-

Ini: Initiation, Pro: Promotion, -: 有意差なし, ±: 1濃度のみ有意, +: 連続した2濃度で有意, NS: 試験不成立

CA: 染色体異常試験, MN: in vivo小核試験

1) 多重性を考慮した χ^2 検定, 2) Sakai et al. (2010), Mutation Res., 3) Validation Report

図1 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験プロトコル

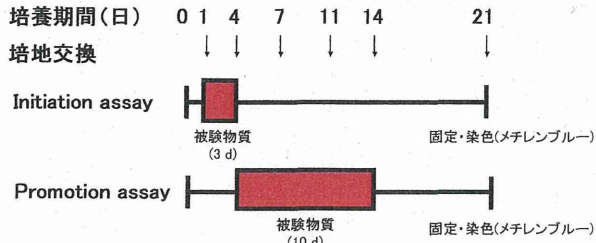
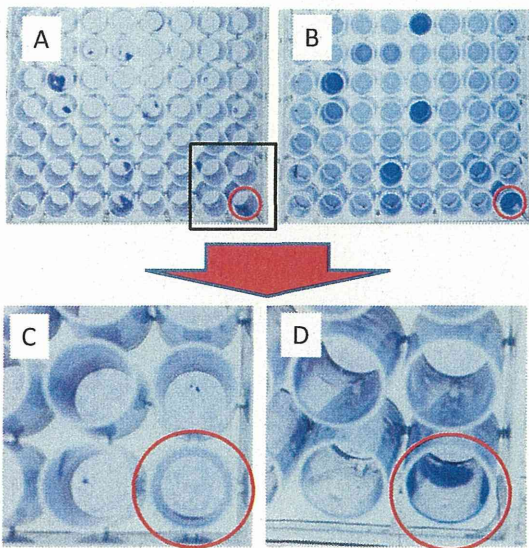


図3 メチレンブルー染色後と抽出後のプレート比較



メチレンブルー染色したプレート(A)に0.1 mol/L 塩酸を加え、メチレンブルーを抽出(B)したプレート。メチレンブルー染色したプレートの一部のウェルを、真上(C)から観察した場合と斜め上方(D)から観察した拡大ウェル。

図2 染色法の違いによる陽性ウェルの吸光度分布

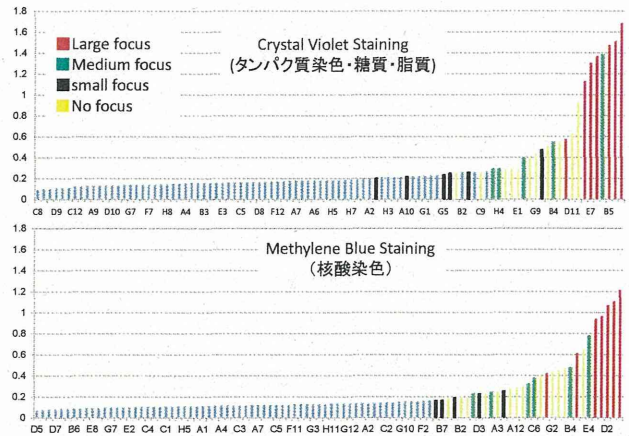
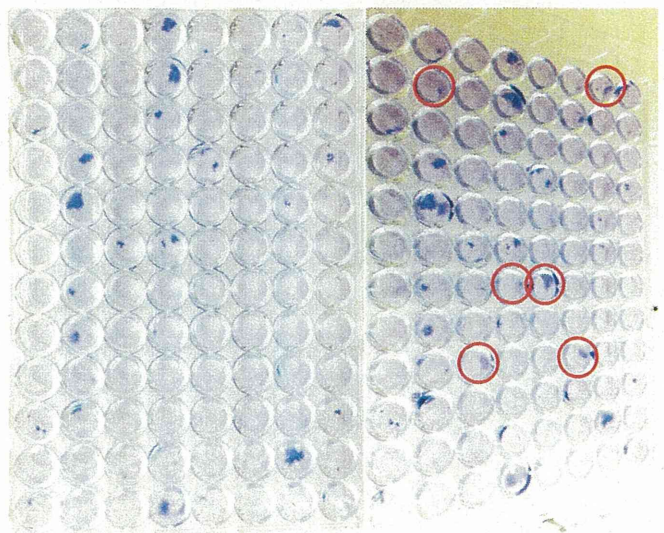
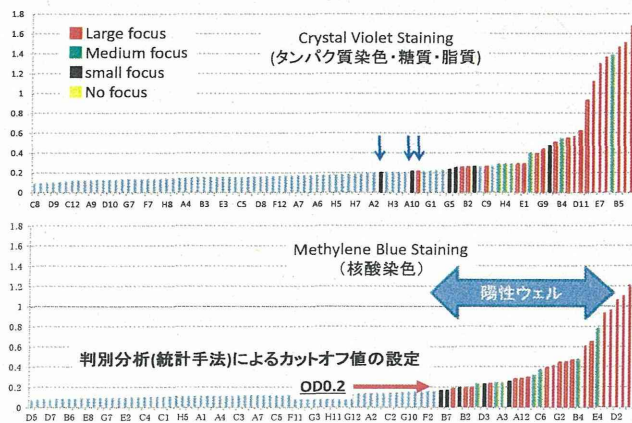


図4 ウェル壁面に形成されたフォーカス例



真上(左)からでは半閉じにくいウェル壁面のフォーカスが斜め(右)からの観察でその存在が明確となったウェル(赤丸)の例。

図5 壁面フォーカスを含めた陽性ウェルの吸光度分布



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
AOP および IATA に立脚した国際的な安全性評価手法の確立
平成 27 年度分担研究報告書

国際状況の調査

研究分担者 仲井 俊司 一般社団法人日本化学工業協会 化学品管理部 部長

研究要旨

化学物質の毒性試験法は、日本国内だけでも各種法律に基づいたさまざまな試験法ガイドラインが存在する。それらに大きく影響を及ぼすガイドラインが、経済協力開発機構(OECD)で開発される毒性試験法ガイドラインである。近年は動物実験そのものを削減する方向でガイドライン開発が進められており、ここ数年、動物を使用しない新規の試験法ガイドラインあるいは既存ガイドラインの改良が活発に行われている。日本において、新たな試験法を国際的なガイドラインにするためにも、この OECD の試験法開発の状況および傾向を知っておくことは、効率的に試験法開発を進めるうえで非常に重要である。このため、OECD の試験法ガイドラインの公定化に向けた取り組みについて最新状況を調査した。

A. 研究目的

OECD が作成する毒性試験法ガイドラインは、OECD 加盟国だけでなく、非加盟国においても当該国内の試験法に多大の影響を与えている。しかし、試験法は絶えず改良され、また、新たに上がってくる問題に対処するために新しい試験法の開発も継続的に行われている。今回は、国際機関である OECD の試験法開発の動向について調査し、最新の状況を把握する。

B. 研究方法

OECD で 8 か月ごとに開催されている化学品合同会合(Joint Meeting of Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology)の第 54 回会合(2016 年 2 月開催)の SCHEDULE OF ACTIVITIES FOR 2016 (ENV/JM(2016)21)¹⁾に記載されている試験法開発状況および Community site に記載されている Overview of all projects on the workplan²⁾を調査した。今回の報告は、人健康に重きを置いて行うが、他の特に生態毒性関連についても言及する。

C. 研究結果および考察

1. 健康影響に関する OECD 試験ガイドライン進捗状況

OECD の試験法は 3 桁の番号で作成管理されており、物化性状等に関わる試験法は 100 番台、生態毒性関連は 200 番台、環境中運命については

300 番台、人健康については 400 番台の番号となっている。中には不要となったあるいは現在は使用してはならない試験法は削除されているものもあり、必ずしも連番にはなっていない。この中で、400 番台の試験法では、使用動物が多すぎるという動物愛護の面から削除された試験法(TG401)がある。以前は使用されていた急性経口投与毒性試験法である。現在はこれに代わる複数の試験法が開発整備されている。

現在、活発に開発されているのは、主に生きた動物を使用しない in vitro 試験法である。

また、内分泌かく乱物質やナノマテリアルなどが新規政策課題(Emerging Policy Issues)として国連環境計画[United Nations Environment Programme (UNEP)]や OECD で取り上げられている。各国および OECD ではこれらに対処するために各種毒性試験ガイドラインの開発が進められている。

2. 第 52 回会合時(2014 年 11 月)から今回回会合までに作成/改訂された試験法

以下に示すようなガイドラインが第 52 回会合時(2014 年 11 月)から今回回会合(第 54 回会合: 2016 年 2 月)までの間に、新規に作成または改定されている(公開日: 2015 年 7 月 28 日)。人健康関連では、新規ガイドラインはいずれも in vitro 試験法であり、また、改定されたガイドラインにも in vitro 試験法が多く含まれる。

また、ガイドラインでは決めきれなかったよう

な特殊なケースなどに対応するために種々のガイダンスドキュメントが出版されている。この他、試験法に関する報告書や、性能標準 (Performance standards): ①試験法の主要部分の説明、②参照物質のリスト、③正確性と信頼性の水準、などの試験法評価のための基準) を示した文書が公開されている。

【ガイドライン】

・新規ガイドライン

<生態毒性関連>

- 1) TG240: Medaka Extended One-Generation Reproduction Toxicity test
- 2) TG241: Larval Amphibian Growth and Development Assay

<人健康関連>

- 1) TG490: In vitro Thymidine Kinase Gene Mutation Test (genotoxicity)
- 2) TG491: Short-Time Exposure test (eye hazard potential)
- 3) TG492: Reconstructed Human Cornea Like Epithelium test (eye hazard potential)
- 4) TG493: Estrogen-Receptor Binding Assay (endocrine disruption)

・改定ガイドライン

<人健康関連>

- 1) TG404: Acute Dermal Irritation/Corrosion
- 2) TG421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
- 3) TG422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
- 4) TG430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)
- 5) TG431: In vitro Skin corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method
- 6) TG435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
- 7) TG439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method
- 8) TG455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists
- 9) TG476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpvt

genes

- 10) TG478: Rodent Dominant Lethal Test
- 11) TG483: Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test

【ガイダンスドキュメント】

- 1) No. 211: Describing Non-Guideline In Vitro Test Methods
- 2) No. 212: Selecting a Strategy for Assessing the Ecological risk of Organometallic and Organic Metal Salt Substances based on their Environmental Fate
- 3) No. 214: In Vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay
- 4) No. 227 Medaka Histopathology Techniques and Evaluation for the Medaka Extended One-Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- 5) No. 228 Histopathology Techniques and Evaluation for the Larval Amphibian Growth and Development Assay (Lagda)
- 6) No. 231 In Vitro Bhas 42 Cell Transformation Assay (BHAS 42 CTA)

【その他】

・報告書 (試験法に関連するもの)

- 1) No. 217 Feasibility Study for Minor Enhancements of TG421/422
- 2) No. 224 Statistical Issues Related to OECD In Vitro Gene Mutation Tests Test Guidelines (TG 476)
- 3) No. 225 Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to Detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity
- 4) No. 226 Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERa)

・試験法に関する性能標準 (Performance standards) を示した文書

- 1) No. 213: Proposed Similar or Modified In Vitro Skin Sensitisation ARE-NRF2 Luciferase Test Methods
- 2) No. 216 Assessment of proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Methods for Eye Hazard
- 3) No. 218 Assessment of Proposed Similar

or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods for Skin Corrosion Testing as described in TG 430

- 4) No. 219 Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods for Skin Corrosion Testing as described in TG 431
- 5) No. 220 Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods for Skin Irritation Testing as described in TG 439
- 6) No. 222 Human Recombinant Estrogen Receptor Binding Assay

3. ガイドラインに関する 2015-2016 年の活動

【生態毒性関連 (200 番台)】

15 個のガイドライン (以下 TG) およびガイドライン (以下 GD) の開発・修正が進められているが、このうち 4 個が endocrine disruptors に関するもの、3 個が蜂類 (ミツバチ、マルハナバチ) への影響評価に関するものとなっている。また、この中の少なくとも 3 個には、脊椎動物である魚の試験評価における 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) を考慮した内容が含まれており、例えば、魚急性毒性評価 (TG203) の moribund (瀕死状態) の基準の見直し等が進められている。

なお、第 52 回会合時 (2014 年 11 月) と比べて、今回 (第 54 回会合) は 200 番台の項目として 5 個が新たに追加されている。この中には、①試験困難物質の水生物試験 GD [No. 23] の改定 (魚試験でのコントロール群の削減など)、②魚急性毒性試験の IATA の新規 GD (魚類胚毒性試験の限度試験等を用いた評価) などが含まれる。

【環境中運命関連 (300 番台)】

7 個の TG および GD の作成が行われているが、そのうち 5 個はナノ物質に関する TG および GD となっている (①Agglomeration behaviour of nanomaterials in different aquatic media の新規 TG、②同内容の新規 GD、③Dissolution rate of nanomaterials in aquatic environment の新規 TG、④Nanomaterial removal from wastewater の新規 TG、⑤Assessing the apparent accumulation potential for nanomaterials の新規 GD)。この他の 1 個もナノ物質の評価に関する内容を含んでいる (魚の濃縮度試験 : TG305)。

なお、第 52 回会合時 (2014 年 11 月) と今回 (第 54 回会合) で 300 番台の項目には変動はな

い。

【健康影響関連 (400 番台)】

32 個の TG および GD の開発・修正が進められている (以下に OECD の Test Guidelines Programme で進行中の 32 個のプロジェクトのタイトルを記載)。

このうち 11 個が endocrine disruptors に関するもの、6 個が眼/皮膚の刺激性評価に関するもの、5 個が遺伝毒性の評価に関するもの、3 個が皮膚感作性評価に関するものとなっている。この中には哺乳動物を用いた試験評価における 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) を考慮した内容を含むものも多い (例えば、以下の番号の 1, 8, 10, 12 など)。なお、このうちの 2 個は IATA に関するものである (眼の刺激/障害性や非遺伝毒性発がんの評価 : 以下の番号の 18, 22)。

日本が中心となって開発に関わっている 3 個の試験法 (以下の番号の 2, 6, 19)、およびナノ物質の評価に関わる 2 個の試験法 (開発の主体は米国または欧州; 以下の番号の 13, 23) については、その経緯と経過についても記載した。

なお、第 52 回会合時 (2014 年 11 月) と比べて、今回 (第 54 回会合) は 400 番台の項目として 19 個 (以下の番号は 14~32) が新たに追加されている。

・OECD Test Guidelines Programme におけるプロジェクト

- 1) New TG 433: Fixed Dose Procedure as Alternative to TG 403 (急性吸入代替)
 - 2) EDTA (Endocrine Disruptors Testing and Assessment) Activity - New TG: Stably Transfected Transcriptional Activation (STTA) Assay for the detection of androgenic and anti-androgenic activity of chemicals (日本)
- Draft validation report and draft TG submitted to the Secretariat in 2010;
 - Draft validation report submitted to the VMG-non animal in December 2010;
 - Peer review report available in February 2011; peer review report (with draft WNT Statement on the follow-up to the peer review) endorsed/agreed at the 2011 WNT meeting;
 - Discussion of chemicals to be included in an additional validation at the VMG-NA meeting in 2012;
 - Additional validation completed in 2013; addendum to validation report available in November 2014;

- Validation report reviewed by a subgroup of the VMG NA and circulated together with the draft TG to the WNT for comments in July 2015;
 - Comments from the WNT discussed at the meeting of the VMG NA in December 2015. Revised documents circulated for a second WNT commenting round in December 2015
 - Draft TG and validation report to be submitted to WNT for approval in April 2016.
- 3) TG for the Cytosensor Microphysiometer Test Method: an In Vitro Method for Identifying Chemicals Not Classified as Irritant, as well as Occular Corrosive and Severe Irritant Chemicals
 - 4) Revision of the introduction to the OECD TGs on genetic toxicity testing and guidance on the selection and application of the assays
 - 5) New TG: Performance-Based Test Guideline on Androgen Receptor Transactivation Assays
 - 6) New TG on human Cell Line Activation Test (h-CLAT): an in vitro method for identifying the skin sensitisation potential of chemicals (日本およびEU)
 - Validation study carried out, peer review completed in 2014 and EURL ECVAM Recommendation to follow;
 - Draft TG sent for a first WNT commenting round and its expert group on in vitro skin sensitisation in August 2014;
 - Further analysis conducted Q4-2014;
 - Revised draft TG, responses to comments and further statistical analyses of reproducibility submitted to WNT in March 2015 for discussion;
 - Second commenting round took place in July-August 2015 and a meeting of the Expert Group was organised in October at OECD to address remaining issues;
 - The revised draft Test Guideline was circulated in December 2015 for the last commenting round; it will be submitted to WNT for approval in April 2016.
 - 7) Performance-Based Test Guideline for the establishment on human-derived hepatic system to investigate biotransformation and toxicity of compounds by evaluation of CYP450 induction competence
 - 8) Feasibility study for a Guidance Document on Study Designs, to be used in revisions of Guidelines
 - 9) Updated TG 488, Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays
 - 10) Revision or replacement of TG 402 on Acute Dermal Toxicity Test
 - 11) Update of TG 455 for inclusion of Transcriptional ERalpha CALUX assay for the detection of (anti)estrogenic chemicals
 - 12) New GD on Waiving of Bridging Mammalian Acute Toxicity Tests
 - 13) Amendments to the Inhalation TGs and GD to accommodate nanomaterial safety testing (ナノ物質; United States)
 - SPSF was approved mid-2014 taking into account modifications requested at WNT-26 for softer language as regards mandatory vs. optional required measurements in the TGs.
 - Teleconference of the expert group in May 2015; the conduct of a desk/feasibility study focusing on broncho-alveolar lavage and lung burden was decided to support inclusion of the endpoints in TG 412 and TG 413;
 - A meeting of the Expert Group was held in Washington on 21-22 September 2015; followed by a WNT commenting round on the draft updated TG 412 and TG 413;
 - A teleconference was held in December 2015 to address issues raised where the lead country required discussion among experts;
 - A second commenting round is due to start in January 2016; the lead country expects submission of the draft updated TGs in April 2016 to WNT for approval.
 - 14) A new TG on SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT) for identifying chemicals not requiring a classification for eye irritation or serious eye damage under UN GHS
 - 15) In vitro Macromolecular Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage
 - 16) Histopathology as Addendum to OECD Test guideline 438 Isolated Chicken Eye Test

for the Determination of Ocular Irritation of Detergent and Cleaning Products

- 17) Proposed Revision to OECD Guidance Document No. 160 on the Isolated Chicken Eye Test (including Histopathology)
- 18) GD on IATA for Serious Eye Damage and Eye Irritation
- 19) IL-8 Luc assay: An In Vitro Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals (日本)
 - The experimental part of the IL-8 Luc assay validation study was completed in September 2014, the independent peer review by the JaCVAM started in February 2015;
 - The appropriateness of generating additional information with the IL-8 Luc assay will be contingent on the outcome of the peer review by JaCVAM. Peer review report expected 1st quarter of 2016.
- 20) Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-Sens) for identifying skin sensitization potential of chemicals
- 21) New Test Guideline for the Pig-a Assay, an in vivo Gene Mutation Assay Promoting the 3Rs Principles
- 22) IATA on Non-Genotoxic Carcinogens
- 23) Guidance Document on the Adaptation of In Vitro Mammalian Cell Based Genotoxicity TGs for Testing of Manufactured Nanomaterials (ナノ物質; European Commission)
 - Initial work on the definition of the most appropriate parameters needed for a good protocol and interlaboratory comparison study of the optimised protocol in 2015-2016. The proposal aims at developing a Guidance Document that will support the existing genotoxicity Test Guidelines by indicating where protocol modifications and special considerations should be applied when the test item is a NM.
- 24) EDTA Activity: Deletion of TG 457
- 25) EDTA Activity: Detailed Review Paper on Retinoic Acid Pathway
- 26) EDTA Activity: developing a list of reference chemicals for E-A-S metabolism
- 27) EDTA Activity: New TG on Androgen Receptor Transactivation Assay
- 28) EDTA Activity: Feasibility study for minor enhancements of TG 414 (Prenatal Developmental Toxicity Study) with ED-

relevant endpoints

- 29) EDTA Activity: Exploring the Concept of Developing Pathway-Based Test Method Performance Metrics: a Case Study Using Estrogen Receptor Signalling
- 30) EDTA Activity: Elaborating the Conceptual Framework for cross linkage between the human and ecotoxicology components: Three case studies to supplement GD 181
- 31) EDTA Activity: Species concordance and species differences considerations in extrapolation of chemical effects across species in vitro
- 32) Joint WNT-WG GLP Activity: Development of Guidance on good in vitro method practice

この他、OECDでの健康影響関連のGD関係の取り組みとして、Task Force on Hazard Assessment (HFHA)において、AOPの考え方に基づくIATAによる皮膚感作性評価のGD作成が2013年より進められている。

• OECD Task Force on Hazard AssessmentにおけるGD関連プロジェクト

Development of a guidance document on the Evaluation and Application of Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation based on the AOP concept

D. 参考資料

1. 第54回OECD Joint Meeting資料
<https://community.oecd.org/docs/DOC-92860>
(登録されたもののみアクセス可能)
2. Overview of all projects on the workplan
<https://community.oecd.org/docs/DOC-57088>
(登録されたもののみアクセス可能)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
尾上誠良, 世戸 孝樹	紫外線吸収剤の 光毒性リスク評価法	前田 憲 寿 監修	光老化科学 の最前線	シーエムシ ー出版	東京	2015	212-9