

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

平成30年度 分担研究報告書

Bhas42細胞形質転換試験法のTG開発

研究分担者 大森 清美

神奈川県衛生研究所 理化学部 主任研究員

研究要旨

Bhas42 細胞形質転換試験法 (Bhas42CTA) は、化学物質の非遺伝毒性発がん性を遺伝毒性発がん性と区別して検出できる OECD 唯一の試験法 (ガイダンスドキュメント掲載) である。OECD では、非遺伝毒性発がん性 (NGTxC) 検出を目的とした IATA (OECD NGTxC・IATA) 開発が行われており、NGTxC の mode of action (MoA) が議論されている。そこで、NGTxC・IATA の expert working group として、Bhas42CTA における非遺伝毒性発がん性発現の機序解析データを NGTxC・IATA に提供したところ、Simplified NGTxC AOP flow」が組み立てられ、NGTxC・IATA における有害性発現経路 (AOP: Adverse Outcome Pathway) の構築と Bhas42CTA の Test Guideline (TG) 開発に繋がり得る活動となった。

A. 研究目的

Bhas42細胞形質転換試験法 (Bhas42CTA) は、化学物質の非遺伝毒性発がん性を遺伝毒性発がん性と区別して検出できる OECD 唯一の試験法 (ガイダンスドキュメント掲載) である。OECD では、非遺伝毒性発がん性 (NGTxC) 検出を目的とした IATA (OECD NGTxC・IATA) 開発が行われており、NGTxC の MoA が議論されている。そこで、NGTxC・IATA の expert working group として、Bhas42CTA における非遺伝毒性発がん性発現の機序解析データを NGTxC・IATA に提供することにより、Bhas42CTA の TG 開発に寄与する。

B. 研究方法

OECD の NGTxC・IATA の専門家メンバー間で実施された電話会議等での打ち合わせ

を行うとともに、IATA に関わる Assay template の作成を行った。2018年6月には、OECD にて開催された専門家会議に参加し、Assay template として提出した Bhas42細胞形質転換試験法 (Bhas42CTA) の研究背景と研究状況について報告するとともに、NGTxC・IATA の構築に向けた調整を行った。また、TG 及び AOP 作成に資する情報を得るため、OECD の分子スクリーニングとトキシコゲノミクスに関する専門家会議に参加した。

(倫理面への配慮)

当研究は、倫理審査および COI の指導・管理に該当しない。

C. 研究結果

OECD の NGTxC・IATA の専門家メンバー間で実施された電話会議等では、6月の

OECDでの対面会議に向けての調整および Assay templateの作成についての説明が行われた。日本に対しては、Bhas42CTAのプロモーション試験について Assay templateの作成が依頼されたため、Bhas 42 Cell transformation assay template (Promotion test)を提出した。6月の対面会議では、非遺伝毒性発がん物質の検出法に関わる情報提供として、「Bhas 42 cell transformation assay (Bhas 42 CTA)」のプレゼンテーションを行い、Bhas42CTA研究の背景と機序解析の進捗状況を報告した。その結果、複数のKey Eventで構成された「Simplified NGTxC AOP flow」が組み立てられ、各Key Eventに関わる試験法の取りまとめを行うため、13ブロックの reviewing teamsを各専門家メンバーが分担した。6月の対面会議後にも電話会議で調整を行い、各試験法の Assay template作成法および評価法についての調整を行った。

また、IATA構築やTG開発に関連するAOP作成の情報を得るため、6月にOECDでの分子スクリーニングとトキシコゲノミクスに関する専門家会議に参加し、NGTxCのAOP作成に資する情報を得ることができた。

D. 考察

今後も Bhas42CTA の機序解析結果を NGTxC ・ IATA に提供することは、Bhas42CTAのTG開発に繋がる活動となるものと考えられる。

E. 結論

OECDのNGTxC・IATAの専門家会議の活動および分子スクリーニングとトキシコゲノミクスに関する専門家会議への参加は、NGTxC・IATAにおけるAOPの構築とBhas42CTAのTG開発に繋がり得る活動となった。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

G.1. 特許取得

なし

G.2. 実用新案登録

なし

G.3.その他

なし

H. 添付資料

Bhas 42 cell transformation assay

Bhas 42 CTA

Bhas 42 cell transformation assay

Bhas 42 CTA

Kiyomi Ohmori

Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

Bhas 42 Cell Transformation Assay (Bhas 42 CTA)

Development of “Bhas Promotion Assay; cell transformation assay for the detection of **non-genotoxic carcinogen** using Bhas 42 cells* ”
(in 2000 by research grants of Kanagawa Prefecture)

* derived as a clone formed by the stable transfection of the v-Ha-ras oncogene into the BALB/3T3 A31-1-1 established by Sasaki *et al.* in 1989

An Inter-laboratory Collaborative Study by the **Non-Genotoxic Carcinogen Study Group** in Japan, on “Bhas Promotion Assay”
(from 2001 to 2004 by research grants of Japan Chemical Industry Association)

Framework of the protocol on Bhas 42 CTA

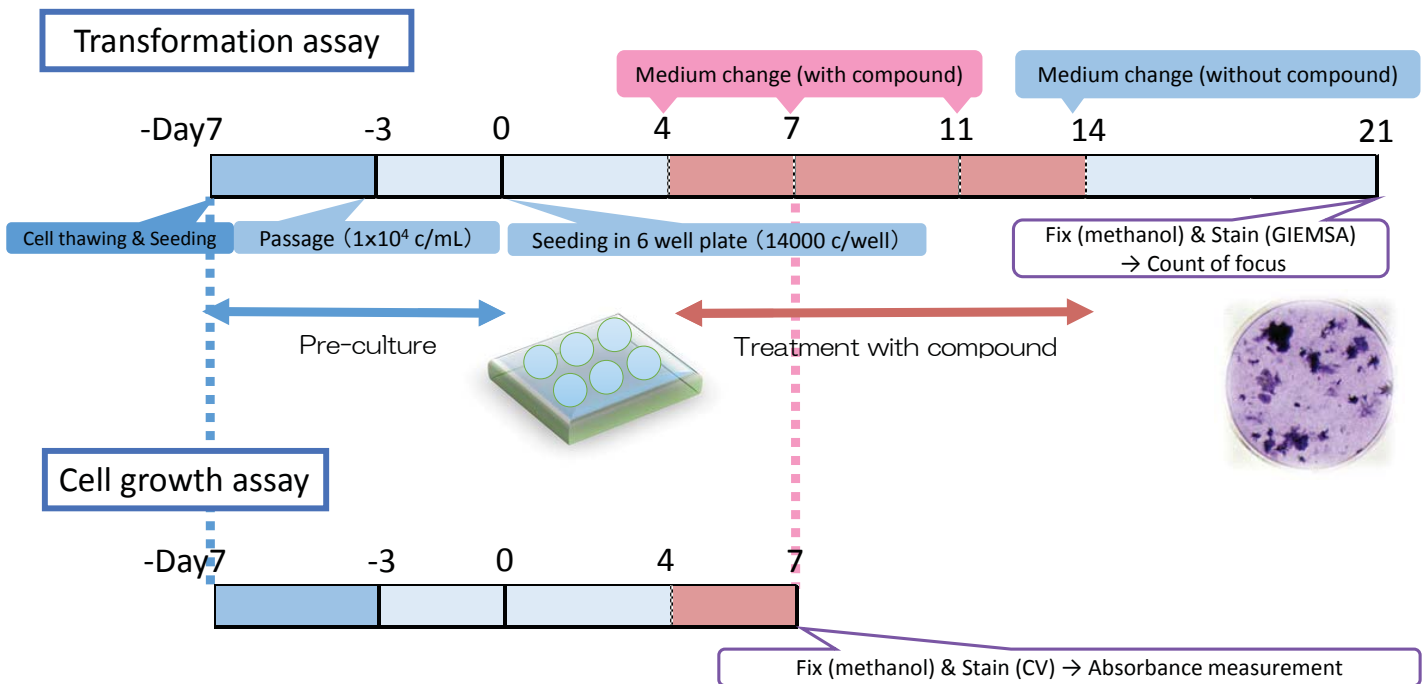
Added an initiation test by Food and Drug Safety Center (in 2005)

New proposal to OECD by Ministry of Economy, Trade and Industry in Japan and JaCVAM

EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)
EURL ECVAM RECOMMENDATION on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line
Nov-2013

GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY
Series on Testing & Assessment No. 231
08-Jan-2016, revised 20-Jul-2017

Bhas 42 Cell Transformation Assay (Bhas 42 CTA) for the detection of NGTxC



Advantage of Bhas 42 Cell Transformation Assay (Bhas 42 CTA)

Bhas 42 CTA does not require special facilities, equipment and technology.

Strengths of Bhas 42 CTA

- (1) a phenotypic anchoring of **onco-transformation**.
- (2) treatment with an **initiating agent** and subsequent cultivation for the expression period **can be omitted**.
- (3) the latency period of responsiveness is relatively brief: the experimental period with the focus formation is shortened from 4-6 weeks to 3 weeks after cell inoculation.
- (4) Bhas 42 cells are especially responsive to chemical carcinogens and are readily transformed by such agents, resulting in relatively high transformation frequencies
- (5) the number of culture vessels necessary for a given assessment of a chemical's non-genotoxic carcinogenic potential is reduced; formation frequency is high, so that only six wells of 6-well plates in transformation assay.

Further studies on Bhas 42 CTA

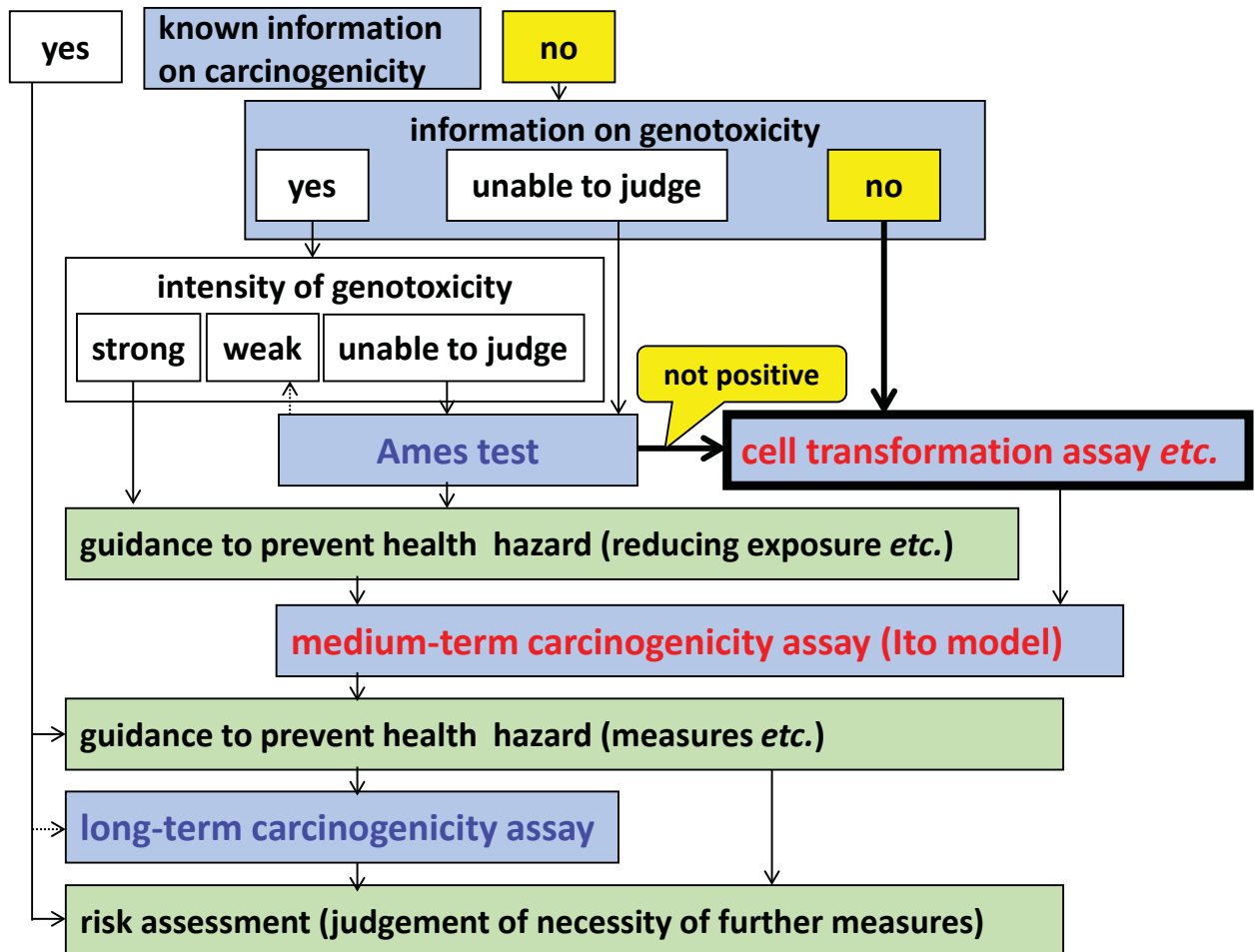
Analysis	Method	Sample	Status
Transcriptomics analysis	Affymetrix mouse Genome 430 2.0 Array	TPA	Almost ready for submission
Transcriptomics analysis	nAnT-iCAGE	23 Compounds	Under analysis
Phosphorylated proteomics analysis	titania-beads method and LC/MS/MS	8 Compounds	Under analysis
Metabolism in Bhas 42 CTA	Expression and activity of CYP enzymes	3-methyl corantherene	Preparation for submission
Metabolism in Bhas 42 CTA	Co-culture with human hepatocyte		Under development

Metabolism of Bhas 42 CTA

- Analysis of CYP enzymes in Bhas 42 cells
 - Expression of the protein
 - Activity of the enzyme

- Development of the Bhas 42 CTA added with the metabolic system in human hepatocyte

Flowchart of carcinogenicity assessment of work place chemical by MHLW



Collaborative research institution and Grants

Research grants of Kanagawa Prefecture

- Transcriptomics analysis by microarray analysis
Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology
- Transcriptomics analysis by nAnT-iCAGE method
RIKEN Yokohama
- Phosphorylated proteomics analysis using LC/MS/MS
Yokohama City University

Research grants of Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology

- Metabolism in Bhas 42 CTA
Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology

Research grants of Ministry of Health, Labor and Welfare

- Cooperation in the AOP construction of NGTxC using Bhas42CTA
National Institute of Health Sciences