

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

令和 2 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経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）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: non-genotoxic carcinogens）検出を目的とした“試験の実施と評価のための戦略的統合方式（IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment）”（OECD NGTxC・IATA）の開発が平成 28(2016)年から行われている。まず、NGTxC の MoA (mode of action) が議論された。それに基づき NGTxC・IATA 構築の方針が国際合意され、令和 2(2020)年は expert working group としてレビュー論文を公表した。MoA を構成する各 KE(Key Event) 及びそれらに対応した 13 の Assay Block において、各種試験法の選出、Assay description の作成及び評価を行っており、その中で、“Cell Transformation” (Block 3) 及び“Gap Junction”(Block 4)を担当している。“Gap Junction”では、昨年度に Inhibition of Metabolic Co-operation Assay 及び Dye Transfer Assay を提案し、本年度は 3 種の試験法について Assay description の作成及び評価を行った。“Cell Transformation”では 5 種の試験法を選択し、試験法ごとに Assay description の作成及び評価を行っている。本年度は Clonogenic soft agar Assay、SHE CTA 及び日本発の Bhas42 CTA の Assay description の作成及び評価を行い、SHE CTA 及び Bhas42 CTA は Block 3 で高評価であった。本年度も Bhas42 CTA の試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）開発に繋げる活動を行った。

**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 (Organisation for Economic Co-operation and Development)では、非遺伝毒性発がん性（NGTxC: non-genotoxic carcinogens）検出を目的としたIATA (Integrated Approaches to Testing and

Assessment)（OECD NGTxC・IATA）開発が行われており、NGTxCのMoA (mode of action)が議論されている。そこで、NGTxC・IATAのexpert working groupとしてNGTxC・IATAの構築に貢献することにより、Bhas42CTAのTG (Test Guideline) 開発に繋げる。

**B. 研究方法**

OECDのNGTxC・IATAのexpert working

groupではNGTxC・IATAのレビューをまとめ論文化するとともに、発がんモデルをもとに13のKE(Key Event)からなるMoAを構築した。KEごとに13ブロックの評価チームとしてアッセイブロックを構成し、各KEに対応する試験法を選出した。Step 1では試験法ごとに詳細な情報をとりまとめたAssay descriptionを作成し、Step 2では他のメンバーがAssay descriptionの評価案を作成した。Step 2の評価案をもとに、アッセイブロックのメンバー全体で協議し、合意したものをアッセイブロックからの提案試験法とその評価結果としてグループ全体に提案された。

大森は、Block 3の“Cell Transformation”とBlock 4の“Gap Junction”を担当した。

(倫理面への配慮)

当研究は、倫理審査及びCOIの指導・管理に該当しない。

### C. 研究結果

これまでのOECDのNGTxC・IATAのexpert working groupにおいて協議しまとめられたNGTxC・IATAのレビューは、Archives of Toxicologyから公開された。レビューに基づき、令和2(2020)年度の電話会議では、発がんモデルとAOPにもとづく13のKEについて、各ブロックは定量的に評価可能な試験法を選出し、それらの詳細な情報をとりまとめAssay descriptionを作成及び評価を行った。大森は、Bhas42細胞形質転換試験 (Bhas 42 Cell Transformation Assay: Bhas 42 CTA) が含まれる“Cell Transformation” (Block 3) 及び、約40年前からわが国で非遺伝毒性発がん物質の検出法として有用性評価が行われてきた“Gap Junction”(Block 4)を担当した。

Block 4の“Gap Junction”では、大森から提案した、Dye Transfer AssayとInhibition of

Metabolic Co-operation Assayについて、該当する試験法を選出した。Inhibition of Metabolic Co-operation Assayについては、V79細胞を用いた試験法が、かつてわが国で研究室間再現性研究が実施され評価が行われたが、評価結果は論文化には至らなかった。しかし、400を超える化合物でのデータが総説 (ATLA) として論文化されていたため、それをもとにAssay descriptionの作成を行った。Dye Transfer Assayは、ECVAM(European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing)のプロトコールによる試験法のほかに、Gap Junction Protocols (Springer Protocol)に掲載されているScrape Loading / Dye Transfer Assayを評価対象として選出した。Scrape Loading / Dye Transfer Assayは顕微鏡の画像解析を用いた定量的な試験法であるが、解析装置の感度の違いによる判定への影響等が懸念された。これら2法のDye Transfer Assayについても研究室間再現性の検証論文は存在しなかった。“Gap Junction”については、これらのInhibition of Metabolic Co-operation Assay及び2法のDye Transfer Assayについて、Block 4としてAssay description及び評価結果をグループ会議に報告した。

Block 3の“Cell Transformation”では、OECDのガイダンスドキュメント掲載試験法として組み込まれているBhas 42 CTA及びSHE Cell Transformation Assay (SHE CTA)は、各種性能及び再現性等の検証データに基づきAssay descriptionを作成し、高い評価を得た。また、Clonogenic soft agar AssayのAssay descriptionについても、作成と評価が完了した。その他、Balb c/3T3 Cell Transformation Assay及びBalb c/3T3 transformicsについては、Assay descriptionの作成と評価が進行中である。

それぞれのAssay descriptionの評価結果は、今後、各Block内及びBlock間での公平性の確認及び調整等の段階へと進むものとする。

#### D. 考察

OECDのNGTxC・IATAにおいて、わが国で1980年代から開発及び評価が行われてきた非遺伝毒性発がん物質の検出法であるGap Junction Assay (Block 4) 及びCell Transformation Assay (Block 3) について、IATAの構築に貢献することにより、日本発のBhas 42 CTAのTG開発に繋がる活動となるものとする。

#### E. 結論

これまでのOECDのNGTxC・IATAのexpert working groupにおいて協議しまとめられたNGTxC・IATAにおけるAssay法の選択及び評価方針に基づき、13のKEに対応したAssay Blockごとに、定量的に評価可能な試験法を選出し、それらの詳細な情報をとりまとめAssay descriptionを作成し評価を行った。大森は、Bhas 42 CTAが含まれる“Cell Transformation”(Block 3) 及び“Gap Junction”(Block 4)を担当し、Assay descriptionの作成及び評価を行った。日本発のBhas 42 CTAは、SHE CTAとともにBlock 3での高評価を得た。

#### F. 研究発表

##### F.1. 論文発表

- 1) Jacobs M, Colacci A, Corvi R, Vaccari M, Aguila MC, Corvaro M, Delrue N, Desaulniers D, Ertych N, Jacobs A, Luijten M, Madia F, Nishikawa A, Ogawa K, Ohmori K, Paparella M, Sharma AK, Vasseur P. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus

on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. Arch Toxicol. 2020, 94, 2899-923.

##### F.2. 学会発表

- 1) Ohmori K, Fukumitsu T, Nishi I, Tachibana K, Takeda K, Koyama S, Narita E, Miyakoshi J, Shinohara N: Tumor promoting potential and other effects of ultrahigh frequency electromagnetic waves and intermediated frequency electromagnetic waves using Bhas 42 cell transformation assay, BioEM2020 (accepted and cancel)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし