

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プロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和3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（Bhas 42 CTA）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（GD231）である。OECD では、化学物質の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 2016 年から行われており、2020 年には Expert working group として NGTxC・IATA 構築の方針が国際合意され、レビュー論文を公表した。その国際合意のレビューに従い、Mode of action (MoA) を構成する各 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いる。その中で、Bhas 42 CTA が含まれる“Cell Transformation”（Block 3）及び、わが国でも NGTxC 検出法として研究されてきた“Gap Junction”（Block 4）について、NGTxC・IATA の Assay の選出及び評価を行った。その結果、本年度は NGTxC・IATA の Block 3 及び Block 4 での Assay の選出、Assay description の作成ならびに評価が完了し、Block 3 は Bhas 42 CTA を含む 3 種の Cell transformation assay がランク A に評価された。Block 4 については、2 種の Assay がランク B、1 種がランク C の評価となり、それらの Block 3 及び Block 4 の評価結果は NGTxC・IATA の全体会議で報告された。

**A. 研究目的**

Bhas 42 CTA は、神奈川県政策局の重点基礎研究事業として開発した細胞形質転換試験法であり、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（GD231）である。OECD では、非遺伝毒性発がん性検出を目的とした IATA（OECD NGTxC・IATA）開発が行われており、NGTxC のメカニズムをもとに MoA が議論されている。そこで、NGTxC 検出を目的として開発した Bhas 42 CTA の NGTxC・IATA 構築への貢献に基づき、Bhas 42 CTA の OECD テスト

ガイドライン（TG）の開発に繋げることを目的とする。

**B. 研究方法**

OECD では、NGTxC・IATA の開発が 2016 年から行われている。NGTxC・IATA では MoA の議論に基づき IATA 構築の方針が国際合意され、2020 年は Expert working group としてレビュー論文を公表した。NGTxC・IATA のレビューに従い、発がんモデルと AOP にもとづく 13 の Key event に対応する 13 の Assay block を立ち上げ、各 Block は定量的に評価可能な Assay

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うこととした。各 Assay block における Assay の選出、Assay description の作成及び評価は、以下の Step 1 及び Step 2 により行った。

Step 1 ではメンバーにより提案された Assay の中から定量的に評価可能な Assay を選出し、Assay ごとに詳細な情報をとりまとめた Assay description を作成した。続いて Step 2 では作成者以外のメンバーが Assay description の評価案を作成し、その評価案をもとに、Assay block のメンバー全体で協議し、合意したものを Assay block からの提案 Assay とその評価結果として Expert working group の全体会議に報告した。

担当した Block 3 の“Cell transformation”と Block 4 の“Gap Junction”において、Block 3 では Bhas 42 CTA の Assay description を他のメンバー1名とともに作成し、その他のメンバー2名が評価案を作成した。また、Balb c/3T3 cell transformation assay (Balb 3T3 CTA) については、Block 3 のメンバー2名により作成された Assay description の評価案作成者として他のメンバー1名とともに評価を行った。SHE cell transformation assay (SHE CTA) についても、同様に2名のメンバーが Assay description を作成し、その他のメンバー2名が評価案を作成した。それらの3種の Cell transformation assay について、Block 3 全体で協議し評価結果とした。

Block 4 では、予てからわが国でも NGTxC 検出法として研究されてきた Dye transfer assay と Inhibition of metabolic co-operation assay を提案するとともに、Inhibition of metabolic co-operation assay である Metabolic cooperation assay with (HGPRT+&-) V79 cells (using 6-TG)の Assay description を作成した。2種の Dye transfer

assay は、他のメンバー2名がそれぞれ Assay description を作成し、相互に Assay の評価案を作成した。それらの評価案は Block 4 全体で協議し評価結果とした。

以上の Block 3 及び Block 4 の評価結果は、Expert working group の全体会議で報告された。

なお、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

Block 3 の“Cell Transformation”では、SHE Cell Transformation Assay (SHE CTA)、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA、Balb c/3T3 transformics assay が評価対象となった。SHE CTA 及び Bhas 42 CTA のみが、NGTxC・IATA の全ての Assay 候補の中で OECD のガイドンスドキュメントとして掲載済みの Assay である。Bhas 42 CTA 及び 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 が作成され、評価案の担当者により各評価項目において A 評価を得た後、Block 3 メンバーの全会一致でランク A の合意を得た。一方、Balb 3T3 CTA については、2 step assay と 1 step assay が開発されていることから、いずれのプロトコルを Assay description に記載し評価を行うかについて議論した。その結果、かつて ECVAM から OECD に提案され評価が中断された 1 step assay が評価プロトコルとなった。同プロトコルに基づくトランスクリプトミクス解析法の Balb c/3T3 transformics assay も、当初は Balb 3T3 CTA とは別に Assay description が作成されたが、検証等の完成度が低いことから最終的には Balb 3T3 CTA の optional assay として Balb 3T3 CTA の Assay description に組み込まれ、Balb 3T3 CTA として評価が行われた。Balb 3T3 CTA では、NGTxC 対象化合物で

のデータ、性能評価及び再現性検証の化合物数も限定的であることなどから、各評価項目は A と B が混在し、ランキング評価についても Block メンバー内での議論を要したが、最終的には Balb 3T3 CTA (Balb c/3T3 transformics assay 含む) はランク A で合意された。したがって、3 種の Cell transformation assay は全てランク A の評価となり、10 月に開催された Expert working group の全体会議での報告に至った。

Block 4 の“Gap Junction”では、提案した Dye transfer assay と Inhibition of metabolic co-operation Assay について、該当する 3 種の Assay (Metabolic cooperation assay with (HGPRT+&-) V79 cells (using 6-TG)、Gap junction dye transfer assay – combined、Gap junction multiparametric scrape loading-dye transfer assay (mSLDT)) を他のメンバーと共に選出した。Metabolic cooperation assay with (HGPRT+&-) V79 cells (using 6-TG) は、467 化合物で結果と 166 化合物での性能評価について総説 (ATLA) が我が国から報告されており、それをもとに Assay description の作成を行った。他の 2 種の Assay は、他の 2 名のメンバーが 1 種ずつ Assay description を作成した。それらの評価結果は、Metabolic cooperation assay with (HGPRT+&-) V79 cells (using 6-TG) については、感度 (49%) 及び特異性 (63%) が十分でなく室間再現性評価の結果が未投稿のためランク B となった。Gap junction dye transfer assay – combined は、ECVAM のプロトコールではあるが、17 化合物のデータのみで検証データが無いいためランク C となった。mSLDT は 328 化合物での結果と IARC グループ 1 及び 2 の 72 化合物での性能評価が報告されており、感度は 75% 以上であるが特異性が 45% と低値であることに加え、室間再現性評価が未実施であるこ

とからランク B となった。これら Block 4 の 3 種 Gap junction assay の評価結果についても、10 月の Expert working group の全体会議での報告に至った。

#### D. 考察

Block 3 (Cell transformation assay) 及び Block 4 (Gap junction assay) での Assay の選出、Assay description の作成ならびに評価を行った結果、Bhas 42 CTA を含む Block 3 の Cell transformation assay は 3 種ともランク A の高評価を得た。一方、Block 4 の Gap junction assay は OECD での Assay 性能評価に対応した検証データが不足しており、ランクは B または C の評価となった。今後は、他の Block からも多数の NGTxC・IATA assay の候補について評価結果が報告される計画であるが、Assay の各種検証及び性能評価の完成度は Block 内のみならず、Block 間においても格差が生じるものと考えられることから、すべての Block での Assay 評価が一通り完了した時点で、13 の Block 間での評価の一貫性を確認し整合性を図る工程が重要になると考えられた。

#### E. 結論

NGTxC・IATA の Block 3 (Cell transformation assay) 及び Block 4 (Gap junction assay) での Assay の選出、Assay description の作成ならびに評価が完了し、Block 3 は Bhas 42 CTA を含む全てランク A として Expert working group の全体会議に報告された。Block 4 は、2 種の Assay がランク B、1 種がランク C であり、これらについても全体会議に報告された。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

1. Minami Masumoto, Ittetsu Fukuda, Suguru Furihata, Takahiro Arai, Tatsuto Kageyama, Kiyomi Ohmori\*, Shinichi Shirakawa, Junji Fukuda\*, Deep neural network for the determination of transformed foci in Bhas 42 cell transformation assay, Sci. Rep. 2021, 2;11(1):23344.
2. Kiyomi Ohmori\*, Asuka Kamei, Yuki Watanabe, Keiko Abe, Gene Expression Over Time During Cell Transformation Due to Non-Genotoxic Carcinogen Treatment of Bhas 42 Cells, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 3216.

### F.2 学会発表

1. 西以和貴, 大森清美; Aryl hydrocarbon receptor(AhR) アゴニストの発がんプロモーション活性, 日本薬学会 142 年会 (2022.03.25-28, 名古屋 (Web 開催) )

## 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