

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4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 Expert working group として NGTxC・IATA 構築の方針を国際合意したレビュー論文を公表した。Mode of action (MoA) を構成する各 Key event およ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 の作成および評価を実施し、Bhas 42 CTA を含む“Cell Transformation”（Block 3）および、わが国でも NGTxC 検出法として研究されてきた“Gap Junction”(Block 4) を担当し、Assay の選出および評価を行った。その結果、令和 3 年度までに Block 3 は Bhas 42 CTA を含む 3 種の Cell transformation assay (CTA) がランク A に評価され、Bhas 42 CTA のメカニズムに関する論文も公表した。Block 4 では、3 種の Assay はランク B またはランク C の評価となり、それらの Block の評価結果は NGTxC・IATA の全体会議で報告された。令和 4 年度には、NGTxC・IATA で評価された 3 種の Assay に関するメカニズムの論文が Special issue として掲載され、Bhas 42 CTA のメカニズムの論文も Article として収載された。さらには、Block 3 でランク A の 3 種 CTA（SHE CTA、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA）のレビュー論文を公表し、Bhas 42 CTA は NGTxC のメカニズム解明および NGTxC・IATA 構築における CTA の貢献を担う Assay としても重要な位置づけであることが示された。

**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 を作成および評価を行うこととした。各 Assay block における Assay の選出、Assay description の作成および評価は、以下の Step 1 および 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。なお、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

令和 3 年度に論文公表した Bhas 42 CTA の細胞形質転換過程における経時的なトランスクリプトーム解析結果では、NGTxC による処理後 4 時点の経時的な RNA 解析において、陰性対照群と比較し有意に発現増大または減少した遺伝子はそれぞれ 2000 を超えていた。それらの遺伝子をパスウェイ解析した結果、Hallmark of Cancerに関連した因子に発現変動がみられた。よって、Bhas 42 CTA の細胞形質転換過程では、がんの特徴的なイベントと共通の因子が発現変動していることを提示した。本論文は、令和 4 年度に公表された NGTxC の Special Issue に Article として掲載された。また、

Block 3 で評価済みの 3 種の CTA (SHE CTA、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA) については、レビューを共著し公表した。Bhas 42 CTA については、陽性検出が報告されている 22 種の NGTxC を提示し、そのうち 8 化合物については Bhas 42 CTA におけるメカニズムの報告も示した。22 種の NGTxC は、発がん性が証明されているもしくは発がん性の可能性のある化合物であるが、Ames 試験およびその他の遺伝毒性で陰性または明確な陽性でなかった化合物を選出した。さらにそれら以外の Bhas 42 CTA 陽性物質 10 種以上についてメカニズムの解析中であることも示した。本レビューの結論においては、CTA は腫瘍形質転換のエンドポイントを提供する唯一の in vitro モデルであり、オミックス解析による CTA の in vitro 腫瘍形質転換につながる多段階プロセスのメカニズムは、人間での多段階発がんプロセスで説明されているメカニズムと一貫性および一致性のある重要なイベントである証拠を提供するものであることを示した。

### D. 考察

令和 4 年度に公表された NGTxC の Special Issue に掲載されたメカニズムの論文は、NGTxC・IATA の Block 3 (CTA)、Block 4 (Gap junction) および Block 13 (Epigenetic mechanisms) で評価を受けた Assay を用いた NGTxC のメカニズムであり、今後は、他の Block における Assay の評価およびそれらの Assay による NGTxC のメカニズムの論文により、更なる NGTxC・IATA assay の候補の充実と NGTxC・IATA 構築が期待される。

### E. 結論

NGTxC の Special Issue には、NGTxC・IATA

の評価を受けた Block 3 (CTA) の Balb 3T3 CTA および Bhas 42 CTA、Block 4 (Gap junction) の Scrape Loading-Dye Transfer、Block 13 (Epigenetic mechanisms) におけるメカニズムの論文により、これまで black box とされてきた NGTxC のメカニズムが提示されたことは大きな進歩である。また、Block 3 で A 評価である 3 種 CTA (SHE CTA、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA) のレビューでは、CTA が腫瘍形質転換のエンドポイントを提供する唯一の *in vitro* モデルであり、CTA の多段階プロセスのメカニズムは、人間での多段階発がんプロセスと一貫性と一致性のある重要なイベントであることを提示している。これらにより、Bhas 42 CTA は、NGTxC のメカニズム解明および NGTxC・IATA 構築への CTA としての貢献において、重要な位置づけにあることが示された。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

1. Special Issue "Advances in Mechanism Based Toxicity and Hazard Assessment of NGTxC Chemicals", *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 231470603.
2. Annamaria Colacci, Raffaella Corvi, Kyomi Ohmori, Martin Paparella, Stefania Serra, Iris Da Rocha Carrico, Paule Vasseur and Miriam Naomi Jacobs, The Cell Transformation Assay: A Historical Assessment of Current Knowledge of Applications in an Integrated Approach to Testing and Assessment for Non-Genotoxic Carcinogens, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023:24(6), 5659.

### F-2 学会発表

1. 志村岳流, 福田一徹, 大森清美, 白川真一, 福田 淳二, 内田和歌奈, 小沼泰子,

紀伊宏明, 宮本健司, Deep Learning による Bhas42 細胞形質転換試験法の画像判定, 日本動物細胞工学会2022年度大会

## G. 知的財産権の出願・登録状況

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