

評価会議報告書

SHE細胞形質転換試験法 (SHE CTA)

JaCVAM 評価会議

平成 30 年 (2018 年) 2 月 21 日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団): 座長
飯塚 尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会)
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
仲井 俊司 (日本化学工業協会)
中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
野口 真希 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
森田 健 (日本環境変異原学会)
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

*：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

**：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

細胞形質転換試験（Cell Transformation Assay : CTA）は、培養細胞に化学物質を曝露することで起きる「細胞の形態」や「表現形質」の変化を指標として腫瘍誘発性の有無を調べる試験法の一つである。シリアン・ハムスター胎児（Syrian Hamster Embryo : SHE）細胞を用いる CTA では、初代培養細胞を凍結・解凍した正常二倍体細胞を用いて、目的とする化学物質を曝露した後、形態形質転換コロニーの出現率によって、化学物質の形質転換能の有無を評価する。

SHE CTA については、OECD により Detailed Review Paper 31（DRP31）で 245 の化学物質が評価されている¹⁾。European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing（EURL ECVAM）によるプレバリデーション研究が実施され²⁻³⁾、EURL ECVAM Scientific Advisory Committee（ESAC）による第三者評価が行われ⁴⁾、ガイドライン化が推奨された⁵⁾。その後、SHE CTA 専門家会議による再評価が行われ⁶⁻⁷⁾、2015 年 5 月に OECD ガイダンスとして公表されている⁸⁾。JaCVAM 評価会議は、JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会により作成された「SHE 細胞形質転換試験法（SHE CTA）評価報告書」⁹⁾を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称： SHE 細胞形質転換試験法（SHE CTA）

代替する対象毒性試験： げっ歯類を用いるがん原性試験

試験法の概略： 本試験法では、胎生 13 日目のシリアン・ハムスターから調製した初代培養細胞から作製した 2 代目の細胞（正常二倍体）を用いる。一部は X 線照射により増殖能を不活化させたフィーダー細胞（支持細胞）として、他は形質転換能を調べる標的細胞として使用する。フィーダー細胞上に標的細胞を播種した後、被験物質を 7 日間曝露した後、細胞を洗浄・固定して染色し、実体顕微鏡下でコロニーの形態を調べる。細胞毒性は、コロニー形成効率とコロニーの大きさや細胞密度の減少から評価する。形質転換能は、被験物質曝露群と溶媒対照群について、それぞれコロニーの総数に対する形態形質転換コロニー数の割合を算出して比較することにより評価する。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

本試験法は、EURL ECVAM による 6 種類の化学物質を用いたプレバリデーション研究²⁻³⁾とそれに続く ESAC による第三者評価により、哺乳類を用いたがん原性試験の代替法として評価されている⁴⁾。OECD ガイダンス 34 に基づいたバリデーション研究は実施されていないが、2015 年 5 月に公表された OECD ガイダンス⁸⁾では、がん原性を評価する試験戦略の一環として、あるいはがん原性にかかる証拠の重みづけ（Weight of Evidence : WoE）に本試験の結果を利用することは有用であるとされている。JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会では、現在まで公開されている情報¹⁻⁸⁾を基に本試験法のがん原性試験代替法としての科学的妥当性について評価した。SHE 細胞の形態形質転換は、多段階発がん過程の早期に起きる現象に相当しており、形質転換細胞は、継代培養後、同系統の動物やヌードマウスに対して約 50~100%の割合で造腫瘍性を示すことが知られている¹⁰⁻¹¹⁾。DRP31 には、複数の pH の培養液

(例えば、pH 6.7、pH 7.0 あるいはそれ以上) で試験された数多くの化学物質の SHE CTA 結果がまとめられ、遺伝毒性がん原物質および非遺伝毒性がん原物質の曝露により、SHE 細胞は形態形質転換することが示されている。EURL ECVAM は、標準プロトコル、技術移転性、および施設内再現性並びに施設間再現性を評価した結果、その有用性を認めている。また、EURL ECVAM の標準的プロトコルと DRP31 に示されたプロトコルとの間には基本的な差異はなく、回顧的評価において、いずれのプロトコルにより得られたデータも、受け入れ可能であるとされた。

細胞の形質転換の正確な分子生物学的メカニズムは十分には解明されておらず、SHE 細胞の形質転換メカニズムにも不明な点が多いが、そのメカニズムを解析する論文は数多くある。細胞周期制御システム、ゲノム安定性、および分化・増殖過程での遺伝子発現の変化や異常が形質転換の主たる要因として考えられている。これらの過程に影響を及ぼす遺伝的変異は直接的な遺伝毒性作用と考えられている。さらに、DNA の高メチル化あるいは低メチル化、ヒストン修飾およびヌクレオソームリモデリングによる遺伝子発現の変化や遺伝的不安定性が、エピジェネティックな変化を誘起し、悪性形質転換へと進行させる引き金になると考えられている。非遺伝毒性がん原物質もまた、多段階発がん過程に関与し、正常細胞を形質転換させるものと考えられている。すなわち、ギャップジャンクションによる細胞間コミュニケーションを阻害する酸化的ストレス、細胞分裂回数の増加、アポトーシスの減少、チュブリン合成阻害、テロメラーゼの活性化による老化の阻害、シグナル伝達過程の阻害、また、ホルモン介在過程やペルオキシゾームの増殖に関与する受容体への結合などである。このような科学的知見の多くが、がん化過程で判明している事実とその一部が整合することなどから、SHE CTA の科学的な検証は、完全ではないものの、現在の分子生物学的水準に基づいてある程度なされていると考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、培養正常細胞が形態形質転換することを指標にして、化学物質の腫瘍誘発性の有無を予測する試験法の一つであり、他のがん原性予測試験結果とともに、WoE の一つとして SHE CTA の結果を利用することができる。本試験法は、現行のがん原性試験に完全に置き換わる試験法としての位置づけではなく、補助的な試験（例えば、がん原性試験の実施順位を決めるためのスクリーニングなど）として位置づけることは可能である。本試験法では、動物胎児から初代培養細胞を調製する必要があるが、用いる動物数は、がん原性試験に比べてはるかに少なく、3Rs の観点から有用である。また、本試験法は、初代培養細胞から作製した 2 代目の細胞（正常二倍体）を用いることから、不死化培養細胞を用いる CTA と比較して、その反応はより正常細胞に近い状態を反映した系と考えられる。

DRP31 での 245 の化学物質を評価した結果において、SHE CTA の結果とがん原性試験結果との相関が認められる。SHE CTA の正確性については、動物を用いたがん原性試験との正確度、感度、特異度、偽陰性率および偽陽性率が、がん原物質を検出する遺伝毒性試験データと概ね同等又はそれ以上の結果が得られている。すなわち、異なる培養液 pH における SHE CTA の正確性の再評価では、pH 6.7 法 (93 化学物質) は、正確度 73%、感度 72%、特異度 74% で、pH 7.0 法 (42 化学物質) は、正確度 83%、感

度 80%、特異度 92%であった。いずれの pH でも、概ね同等の結果が得られており、共にその有用性は高いと考えられる。

一方、本試験については多種類の化学物質を用いたバリデーション研究が実施されておらず、試験方法が十分に検証されたとは言いがたい。また、本試験の結果が陽性であっても、その化学物質の動物におけるがん原性の強さ、臓器特異性、種特異性および作用機序（イニシエーション/プロモーション作用）に関する情報は得られない。さらに、形質転換コロニーの判別には実験者の習熟（十分な教育訓練および経験）が必要である。試験を適切に実施するには、以下の事項を考慮する必要もある：1) 調製した SHE 細胞および使用するウシ胎児血清の適切性、2) フィーダー細胞の適切性とその調製における X 線照射装置の使用、3) 試験成立基準および結果判定基準の設定。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、実施に際し種々の条件があるものの、細胞培養ならびに形質転換コロニー判別に習熟した施設であれば実施でき、培養期間も 1 週間程度と短く、また試験費用も比較的安価である。一匹の妊娠動物由来の胎児細胞から 50 回の評価が可能な培養細胞が得られるという点で、3Rs の精神に合致しており、社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法において陽性の結果が得られた場合、その被験物質をがん原性物質と判定することは科学的にも、また行政的にも困難であり、したがって本試験をがん原性試験に置き換えることは現状では不適切である。本試験の行政上の利用にあたっては、構造活性相関などと組み合わせて補助的な試験、例えば WoE に基づく評価の際の一つの項目、あるいはがん原性試験実施の優先順位付けのためのスクリーニング試験として位置付けた上で使用されるべきである。

参考文献

- 1) OECD (2007). Detailed review paper on cell transformation assays for detection of chemical carcinogens, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 31.
- 2) ECVAM - The Validation Management Team (2010). Syrian Hamster Embryonic (SHE) cell pH 6.7 Cell Transformation Assay - Prevalidation study Report.
- 3) ECVAM - The Validation Management Team (2010). Syrian Hamster Embryonic (SHE) cell pH 7.0 Cell Transformation Assay - Prevalidation study Report.
- 4) ECVAM (2011). ESAC Working Group Peer Review Consensus Report on an ECVAM-coordinated

prevalidation study concerning three protocols of the Cell Transformation Assay (CTA) for in vitro carcinogenicity testing.

- 5) EURL ECVAM (2012). Recommendation on three Cell Transformation Assays using Syrian Hamster Embryo Cells (SHE) and the BALB/c 3T3 Mouse Fibroblast Cell Line for In Vitro Carcinogenicity Testing.
- 6) OECD (2014). Results of An Analysis of The Performance of The Syrian Hamster Embryo Cell Transformation Assay at PH 6.7 and PH 7.0, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 16.
- 7) OECD (2014). Report on the Evaluation of Genotoxic or Non-genotoxic Activity of the Organic Chemicals Tested in the SHE Cell Transformation Assay, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 17.
- 8) OECD (2015). Guidance Document on the In Vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment, No 214, ENV/JM/MONO (2015)18.
- 9) JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会 : SHE 細胞形質転換試験法 (SHE CTA) 評価報告書 (2017年3月31日).
- 10) Pienta RJ et al. (1977). Morphological transformation of early passage Golden Syrian Hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int. J. Cancer*, 19, 642-655.
- 11) Watanabe M et al., (1991). Expression dynamics of transforming phenotypes in X-irradiated Syrian golden hamster embryo cells. *Mutat. Res.*, 249, 71-80.