

評価会議報告書

Bhas 42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA)

JaCVAM 評価会議

令和 2 年(2020 年)6 月 25 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
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
池田 孝則 (日本製薬工業協会) **
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)
稲若 邦文 (日本化学工業協会)
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) *
久保 文宏 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
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 病理部/済生会宇都宮病院)
西村 次平 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
平林 容子 (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)
廣田 衛彦 (日本化粧品工業連合会)
増村 健一 (日本環境変異原学会)
山本 恵子 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 日

*：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

**：令和 2 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 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。本試験法は、JaCVAM によって国際バリデーション研究が実施され、European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) により、プロトコルの完成度、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性が評価された²⁾。また、本試験法は経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) ガイダンス文書 (Guidance Document: GD)[§]として 2016 年 2 月に公表されている³⁾。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、「Bhas 42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) 評価報告書」(2019 年 10 月 31 日) を基に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：Bhas 42 細胞形質転換試験法 (*in vitro* Bhas 42 cell transformation assay)

代替する対象毒性試験：なし。現行のがん原性試験を完全に代替する試験法ではない。

試験法の概略：Bhas 42 CTA は、化学物質曝露により誘発された形質転換巣 (フォーカス) の出現頻度を指標として、その形質転換能を評価する試験法である。本試験法で用いる Bhas 42 細胞にはマウスの 17 番および 19 番染色体上に *ras* 遺伝子が組み込まれている⁴⁾。この細胞は無限増殖能を有しているが、培養容器底面全体に広がるまで増殖すると単層の状態では増殖が停止 (接触阻止) し、その状態で生存可能である。一方、形質転換により接触阻止能を失った細胞は紡錘状で、単層の正常細胞中に浸潤増殖し、多層となり塩基性色素で濃染されるフォーカスを形成する。形質転換細胞のほとんどは正常な Bhas 42 細胞と比較して、*ras* 遺伝子の発現が 2~14 倍上昇しており³⁾、このような形質転換細胞は *in vivo* で造腫瘍性を示すことが知られている。Bhas 42 CTA は、特殊な装置や試薬を必要とせず、一般的な細胞培養設備と細胞培養技術があれば実施可能な試験法である。また、シリアン・ハムスター胎仔 (Syrian Hamster Embryo : SHE) 細胞を用いる CTA とは異なり、Bhas 42 CTA は動物やフィーダー細胞を必要としない。一方、フォーカスの判定には十分な教育・訓練が必要であり、判定には画像を用いたアトラスなどが有用であると考えられる。

[§] Bhas 42 細胞は BALB/3T3 A31-1-1 細胞に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入して樹立された培養細胞である。Bhas 42 CTA に関する OECD GD231 (2016) が公表された後、Bhas 42 細胞の遺伝子型解析が SSLPs 法によって実施された。その結果、Bhas 42 細胞の起源となるマウス系統は BALB/c マウスではなく、Swiss マウスであることが示され、Bhas 42 細胞の起源と考えられていたマウス系統に誤認があったことが明らかにされた。しかしながら、もともとの BALB/3T3 A31-1-1 細胞もその起源となるマウスが Swiss 系であることも併せて報告され、*ras* 遺伝子が導入される前からマウス系統の誤認があったことが明らかになった。マウス系統の誤認があったとしても、Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験によって明らかにされたがん原性との相関データ、ガイダンス化のためのバリデーション試験等々のデータの信頼性および Bhas 42 CTA の有用性や重要性には何ら影響を及ぼすことはない判断され、Bhas 42 CTA の重要性には影響を及ぼさない旨を記した追補版 ENV/JM/MONO(2016)²⁾が 2017 年に公表された。

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、JaCVAM によって国際バリデーション研究が実施され¹⁾、EURL ECVAM により、プロトコルの完成度、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性について評価されている²⁾。これらの公表資料を基に、JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会が評価し、報告書としてまとめたものを評価資料とした。

Bhas 42 細胞は、BALB/3T3 A31-1-1 細胞に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入し、BALB/3T3 A31-1-1 細胞と同様に接触阻止能を有するクローンに由来する細胞株として 1988 年に樹立された³⁾。接触阻止能を維持している正常な Bhas 42 細胞はヌードマウスに移植しても腫瘍を形成しないが、形質転換した細胞は、ヌードマウスに対して 100%の造腫瘍性を示すことが報告されている^{4, 6, 7)}。

がん化の多段階説は現在広く受け入れられている概念であるが、その機構の解明に関しては、遺伝子導入による細胞形質転換研究に依るところが大きい。ヒト初代培養細胞は *c-Ha-ras* 遺伝子の導入のみでは形質転換しないが、*c-myc* などの遺伝子やがん原物質あるいは 12-*O*-teteradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) 曝露と組み合わせることにより形質転換することが知られている。一方、p53 遺伝子の変異等によって不死化した細胞株では *c-Ha-ras* 遺伝子の導入のみでも形質転換しうる。また、*ras* 遺伝子導入による形質転換が TPA 曝露により増強される。さらに、化学物質曝露によって誘導されたラット腫瘍細胞の *ras* 遺伝子は、突然変異することによって活性化することが見いだされている。これらの報告は、*ras* 遺伝子の活性化が細胞の形質転換に重要な役割を果たしていることを示唆している。活性型 *v-Ha-ras* 遺伝子が安定導入された Bhas 42 細胞は、不死化した細胞にさらに *ras* 遺伝子を導入している事実から、多段階的腫瘍形成過程の後期に起きる状態を反映していると考えられる。

Bhas 42 CTA が形質転換することは、がん化の過程で判明している上記のようなメカニズムとその一部が整合していることから、Bhas 42 CTA の科学的な検証はまだ十分ではないが、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試験と考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、多段階的腫瘍形成過程の後期に起きる状態の一部をカバーしている 2 つのアッセイプロトコル^{§§} から構成されている。少なくともどちらか一方のアッセイで陽性の結果が得られた場合を CTA 陽性と判定するが、89 物質 (52 のがん原物質、37 の非がん原物質) についての結果では、一致率 78%、感度 73%、特異度 84%であった¹⁾。

v-Ha-ras 遺伝子を導入したことにより、フォーカス形成を指標とする他の CTA よりも試験結果が短期間で得られる。また、本試験法より先に OECD ガイダンスとなった SHE 細胞を用いる形質転換試験 (SHE CTA)⁸⁾と比較した場合、以下の有用性があげられる。1) Bhas 42 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) 細胞バンクなどの公的機関から一定品質の細胞が容易に得られる、2) Bhas 42 CTA は株化細胞由来のクローンであり SHE CTA のように動物個体に由来するフィーダー細胞を使用する必要がないため 3Rs の要求が最大限満たされている。

一方、CTA に共通する問題として、CTA で結果が陽性であっても、化学物質の形質

§§ 細胞増殖期に化学物質を処理する方法、及び細胞が定常期にあるときに化学物質を処理する方法

転換能から、当該化学物質の *in vivo* におけるがん原性の強さ、臓器特異性、および種特異性に関する情報は得られないことがあげられる。さらに、CTA のエンドポイントである形質転換の発生機序が明らかになっていないため、発がん性物質の作用機序に関する情報も得られない。また、CTA の結果の正確性を保証するためには、標準物質で誘導された形質転換コロニー／フォーカスの画像アトラス等を利用したスキル習熟度の確認が必要である。加えて、Bhas 42 CTA の問題として、Bhas 42 細胞は外部遺伝子を導入して人工的に改変した細胞であり、CTA の結果が生体を正しく反映しているかどうかについて議論の余地が残っている。また、Bhas 42 細胞では Cyp1a1 遺伝子の発現誘導が確認されているが、初代培養細胞と比較した場合、その代謝活性化能は低い。さらに Bhas 42 細胞は、継代中にその特性(接触阻止能)が失われる可能性があることから、少ない継代数で多数の凍結細胞アンプルを作製し、細胞の適切な品質管理(導入遺伝子に関する定期的な安定性の確認など)が必要とされる。

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、一般的な細胞培養設備と細胞培養技術のみで実施可能である。フォーカスの判定には SHE CTA と同様に十分な教育と訓練が必要とされるが、画像アトラス等を用いて判定スキルの習熟度を確認できる。Bhas 42 細胞はがん遺伝子を組み込んだ株化細胞であり、JCRB 細胞バンクなどの公的機関から一定品質の細胞が容易に得られる。また本試験法は、SHE CTA 試験において実施される胚からの細胞の調製を必要としない、さらに、本試験法の適切な実施により、多数の動物を必要とするがん原性試験の実施に関する優先順位付けができることから、動物福祉へ寄与することが期待される。以上のことから、本試験法の社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法は、国際バリデーション研究¹⁾の結果、げっ歯類でのがん原性試験における結果と高い相関が認められている。一方で、本試験法では形質転換の発生機序が明らかになっていないため、発がん性の作用機序に関する情報は得られない。また、CTA では、*in vivo* におけるがん原性の強さ、種特異性または組織特異性などの情報は得られないことなどが指摘されている。したがって、本試験法は、現行のがん原性試験を代替する試験法としてではなく、がん原物質検出のスクリーニング試験の一つの方法、あるいはがん原性にかかる証拠の重み付け(Weight of Evidence: WoE)に基づく評価のための補助的な試験として利用が可能である。

参考文献（最終アクセス日：2020年6月25日）

- 1) Bhas 42 cell transformation assay validation study report, Series on Testing and Assessment No. 208, ENV/JM/MONO (2014) 24,
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)24&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)24&doclanguage=en), OECD (2014)
- 2) EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line,
https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/files-bhas/EURL_ECVAM_Recommendation_Bhas-CTA_2013.pdf
- 3) Guidance document on the *in vitro* Bhas 42 cell transformation assay, Series on Testing & Assessment No 231, ENV/JM/MONO (2016) 1,
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2016\)1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2016)1&doclanguage=en), OECD (2017)
- 4) Sasaki, K., Umeda, M., Sakai, A., Yamazaki, S. and Tanaka, N. (2015), Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 33, 1-35.
- 5) Sasaki, K., Mizusawa, H. and Ishidate, M. (1988), Isolation and characterization of *ras*-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 921-930.
- 6) Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Komori, A., Suganuma, M., Kozu, T. and Fujiki, H. (1998), Tumorigenicity of MTG8, a leukaemia-related gene, in concert with v-Ha-*ras* gene in BALB/3T3 cells, *Br. J. Haematol.*, 101, 737-742.
- 7) Suganuma, M., Kurusu, M., Okabe, S., Sueoka, N., Yoshida, M., Wakatsuki, Y. and Fujiki, H. (2001), Helicobacter pylori membrane protein 1: a new carcinogenic factor of Helicobacter pylori, *Cancer Res.*, 61, 6356-6359.
- 8) Guidance Document on the *In Vitro* Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment No 214, ENV/JM/MONO (2015) 18,
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Guidance-Document-on-the-in-vitro-Syrian-Hamster-Embryo-Cell-Transformation-Assay.pdf>, OECD (2015)