

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」 事後評価分科会

5. プロジェクトの詳細説明

5.1 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発の成果

(1)発がん性予測試験法の開発

1. OECDガイドライン化するために

- ・ 細胞の性状解析
- ・ 多検体データの集積
- ・ 国際バリデーション
- ・ ガイドライン化の手続き開始

2. ハイスループット化するために

- ・ 6ウェルプレートから96ウェルプレートへの変更
- ・ 自動化システムの開発
- ・ 機器による定量法の開発(日米欧に特許出願)
- ・ 発光細胞の開発

BALB/c 3T3細胞とBhas 42細胞の形質転換誘発

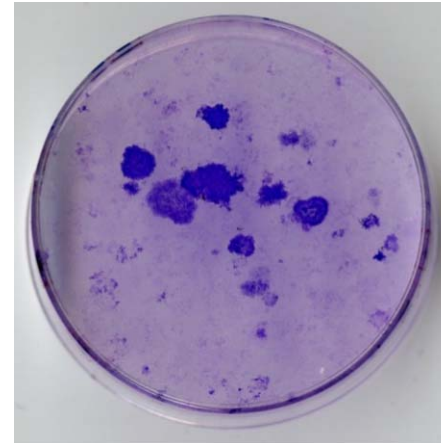
公開

Control

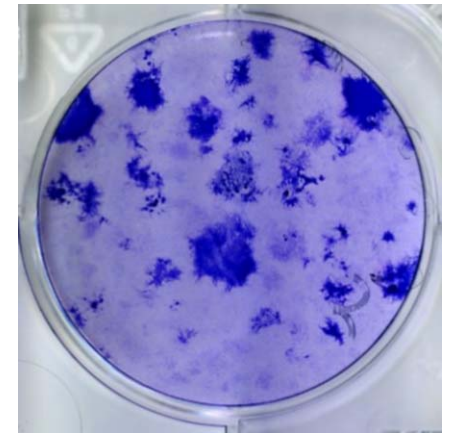
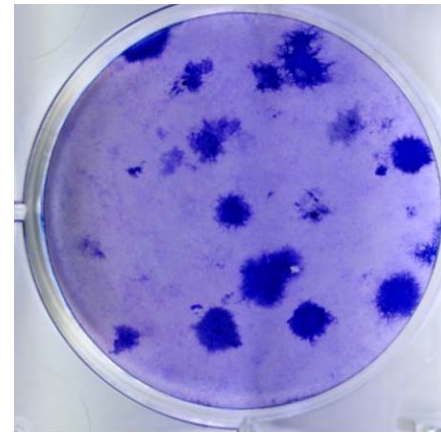
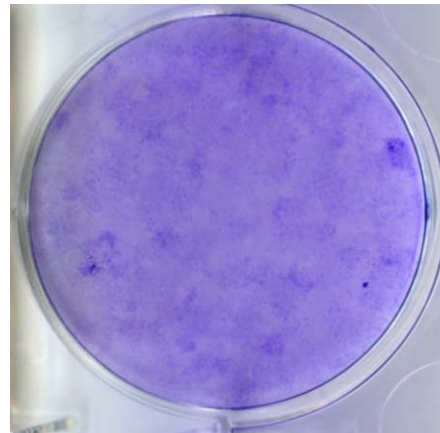
MCA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

TPA 50 ng/mL

BALB/c 3T3

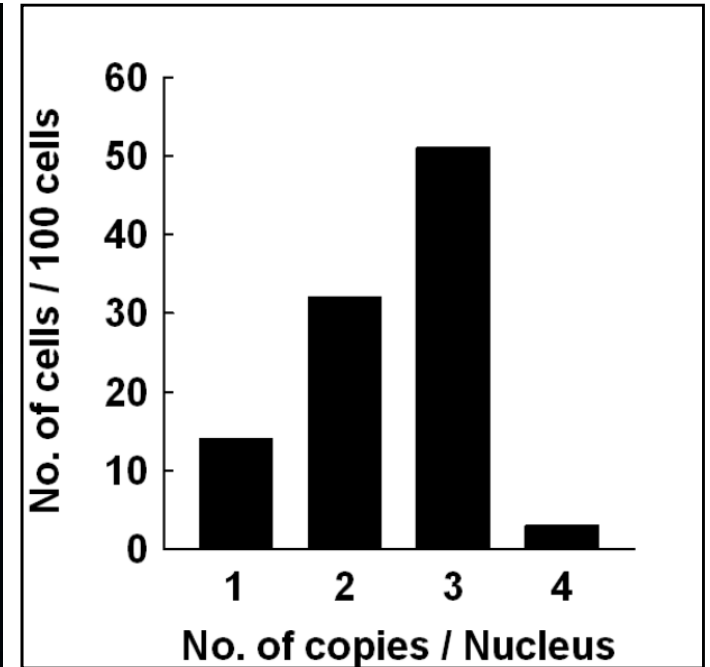
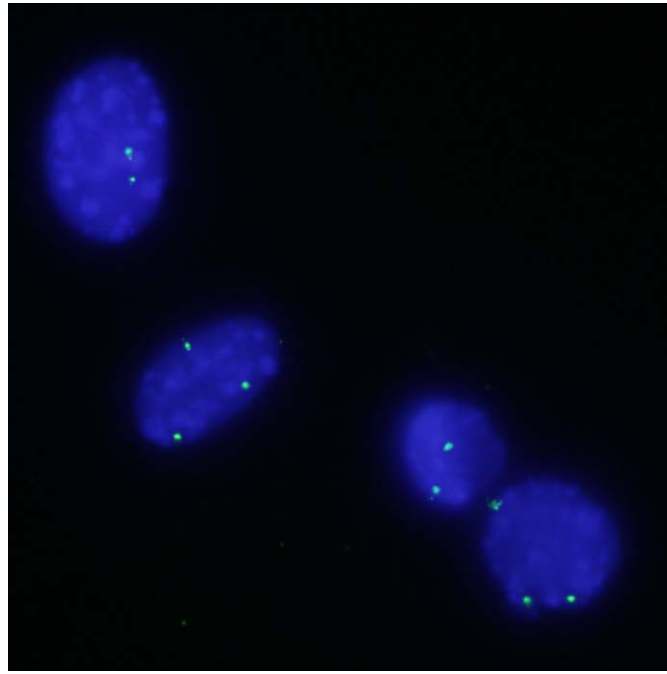
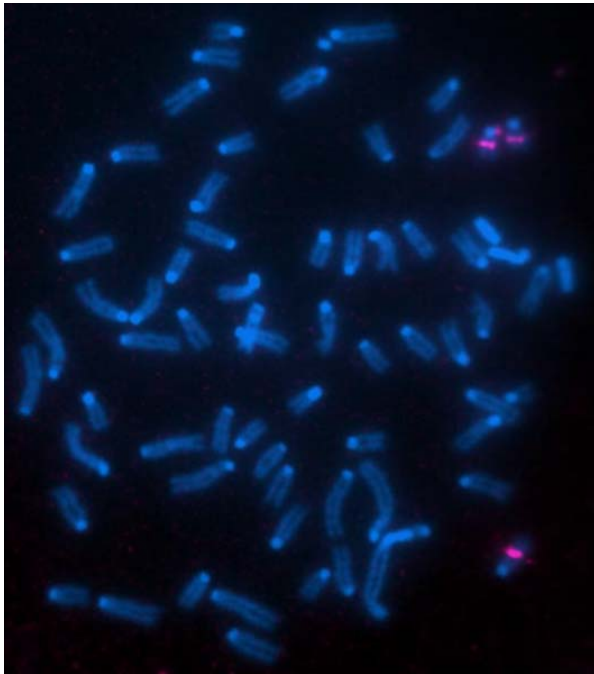


Bhas 42



Bhas 42細胞におけるFISH法によるv-Ha-ras遺伝子の検出

公開

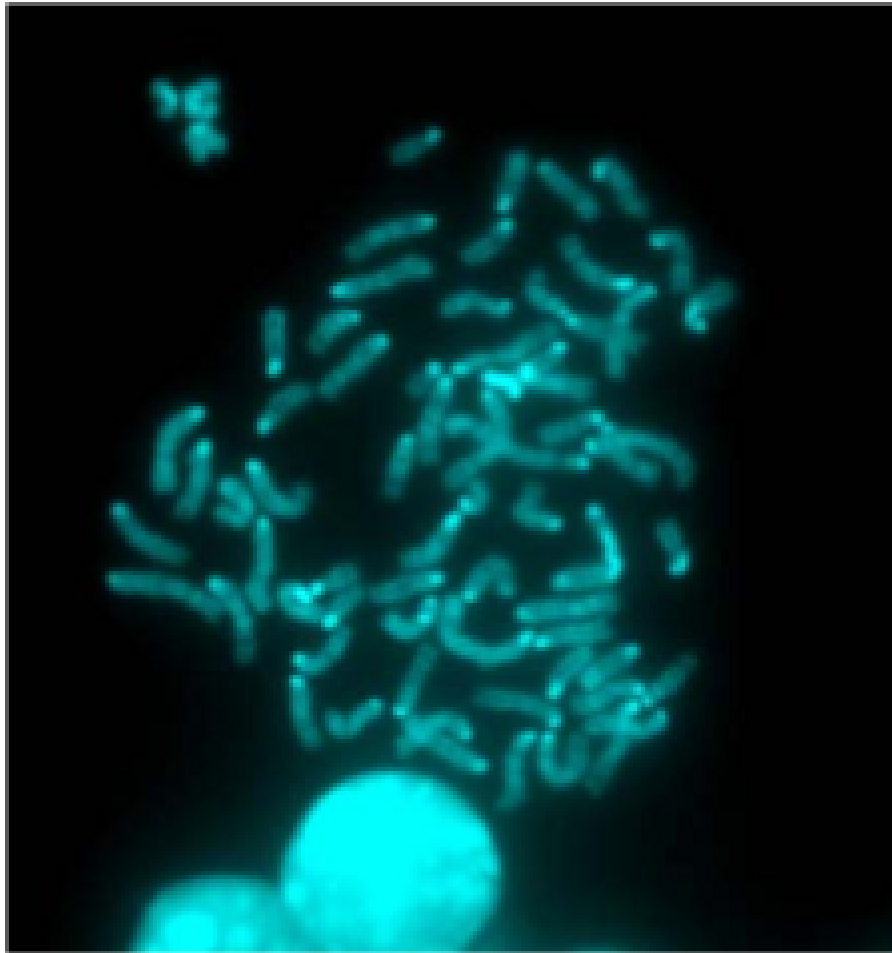


全ての細胞にv-Ha-rasが存在

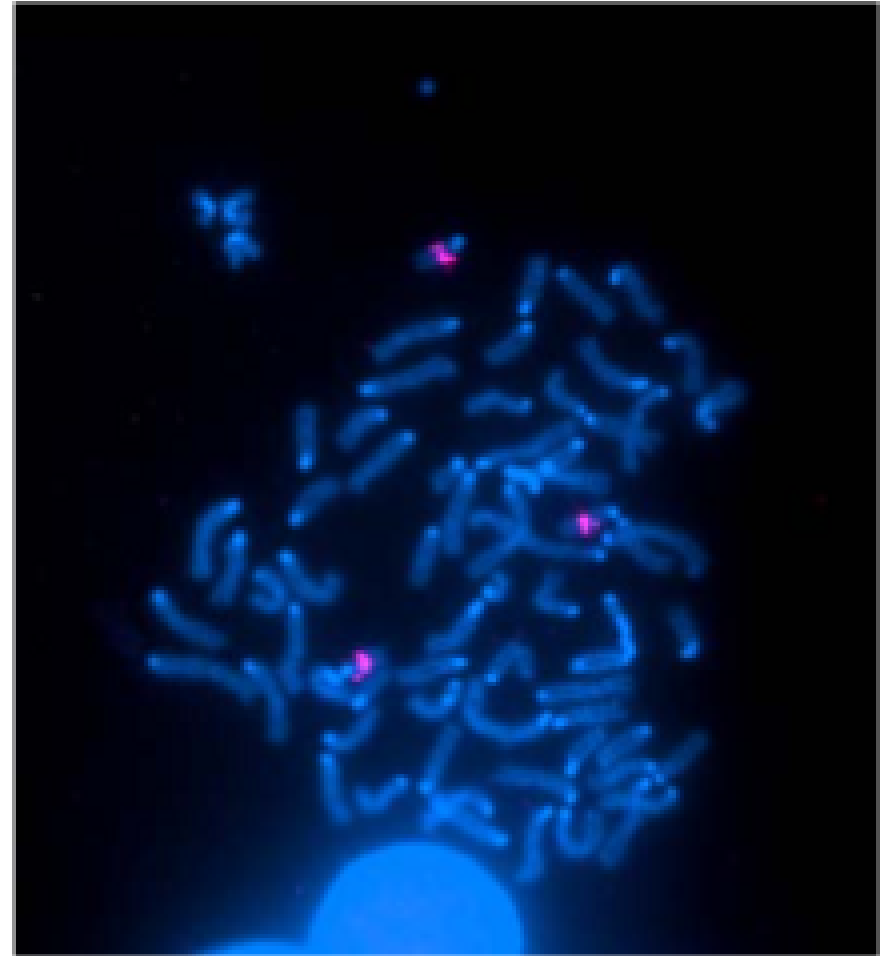
平均 = 2.4コピー/核

QHバンド法とFISH法の組み合わせ実験

公開



QHバンディング法



v-Ha-rasのFISH

Bhas 42細胞の樹立方法

公開

BALB/c 3T3細胞



v-Ha-*ras*を導入



v-Ha-*ras*導入クローンをスクリーニング



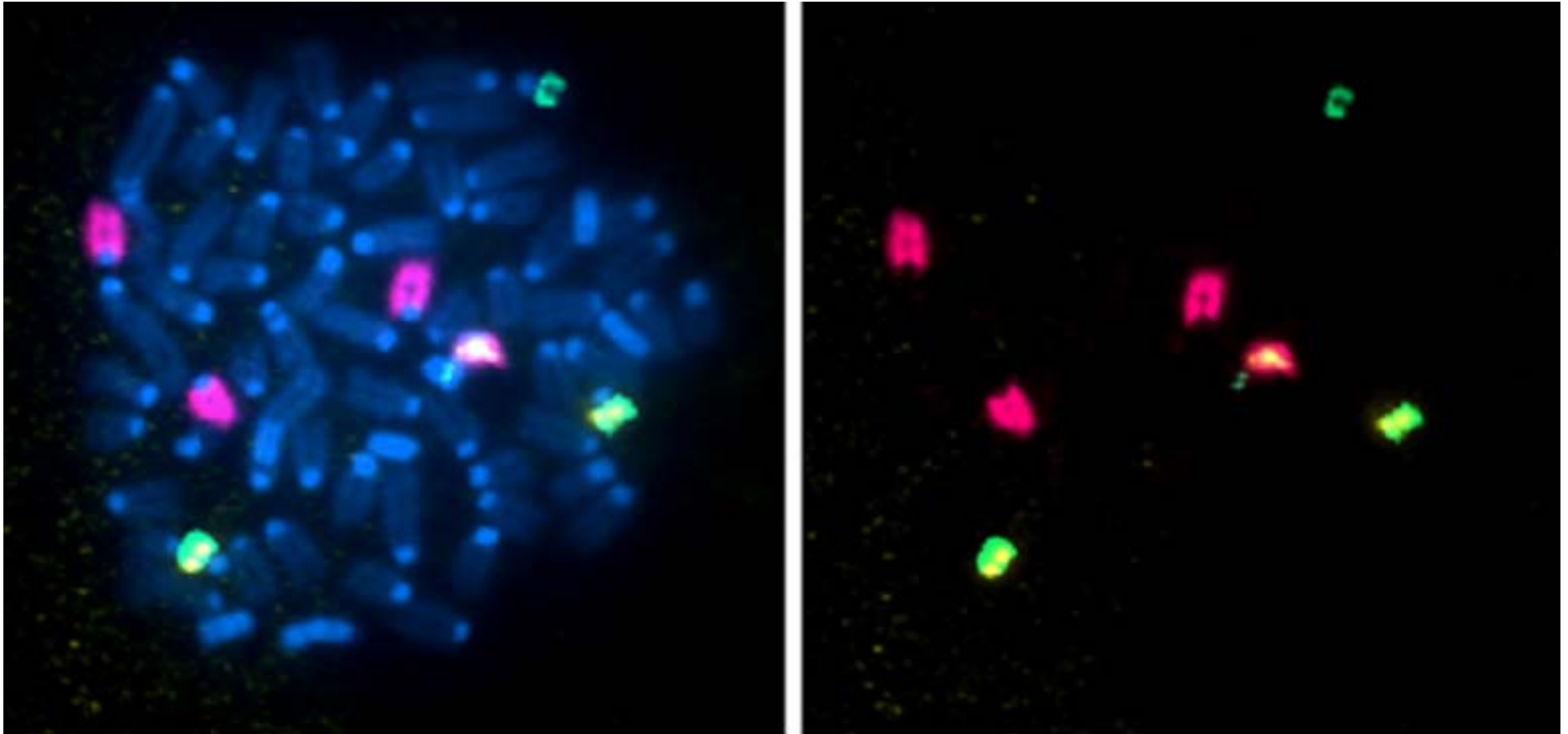
正常形態を示すが、TPAにより形質転換する
クローンをスクリーニング



Bhas 42細胞

マウス染色体特異的ペインティングプローブ および*v-Ha-ras*遺伝子を用いたFISH法

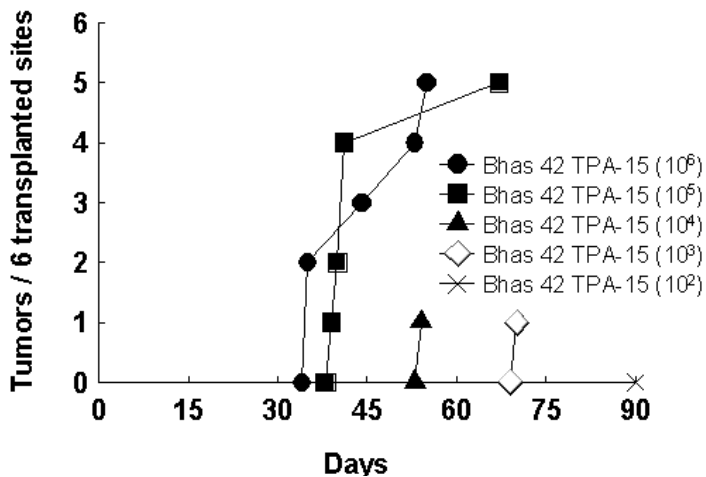
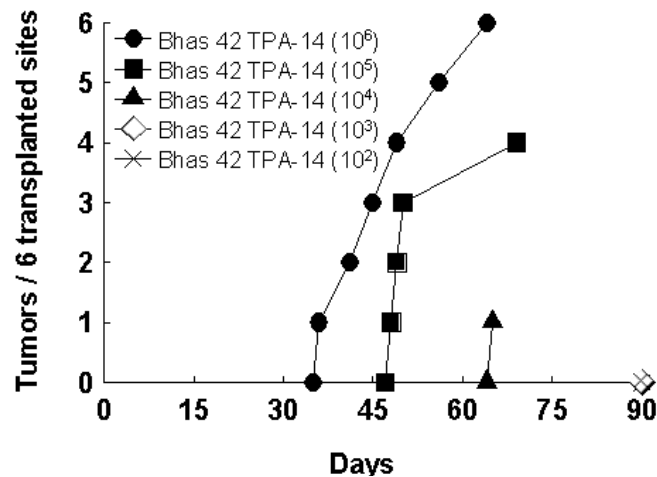
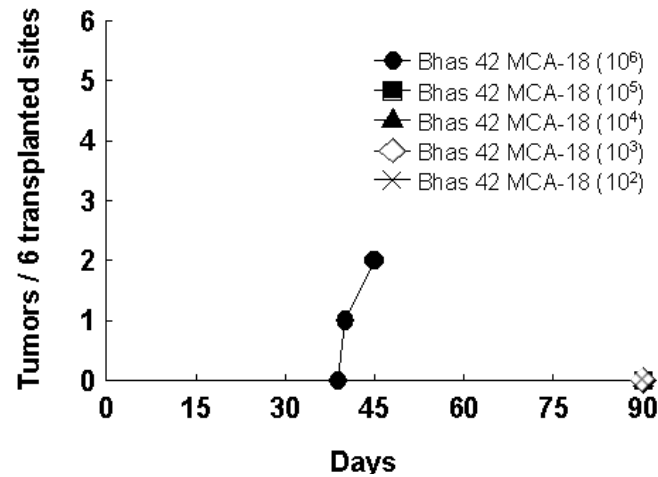
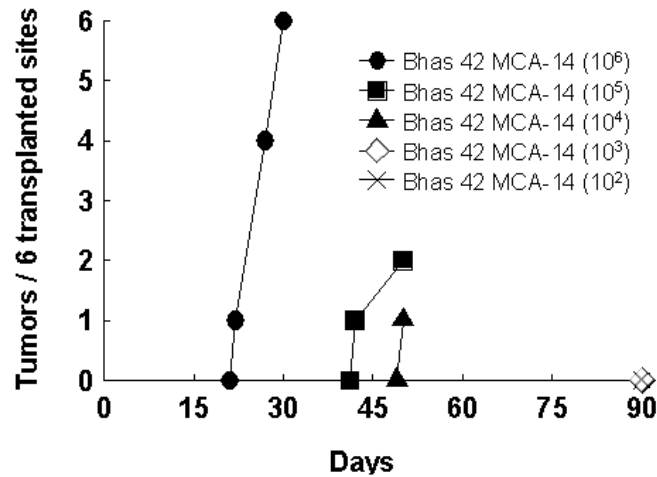
公開



17番:赤、19番:緑、DNA:青、
v-Ha-ras:黄色(17番には平均0.9個、19番には平均1.5個)

4種のBhas 42形質転換細胞の腫瘍原性 (Bhas 42及びBALB/c 3T3細胞は腫瘍を形成せず)

公開



背部の3箇所に移植/マウス、2匹/群

98物質におけるBhas 42細胞試験とIn Vivoの結果の比較

(Sakai A. *et al.*, Mutat Res. 2010 702:100-122.)

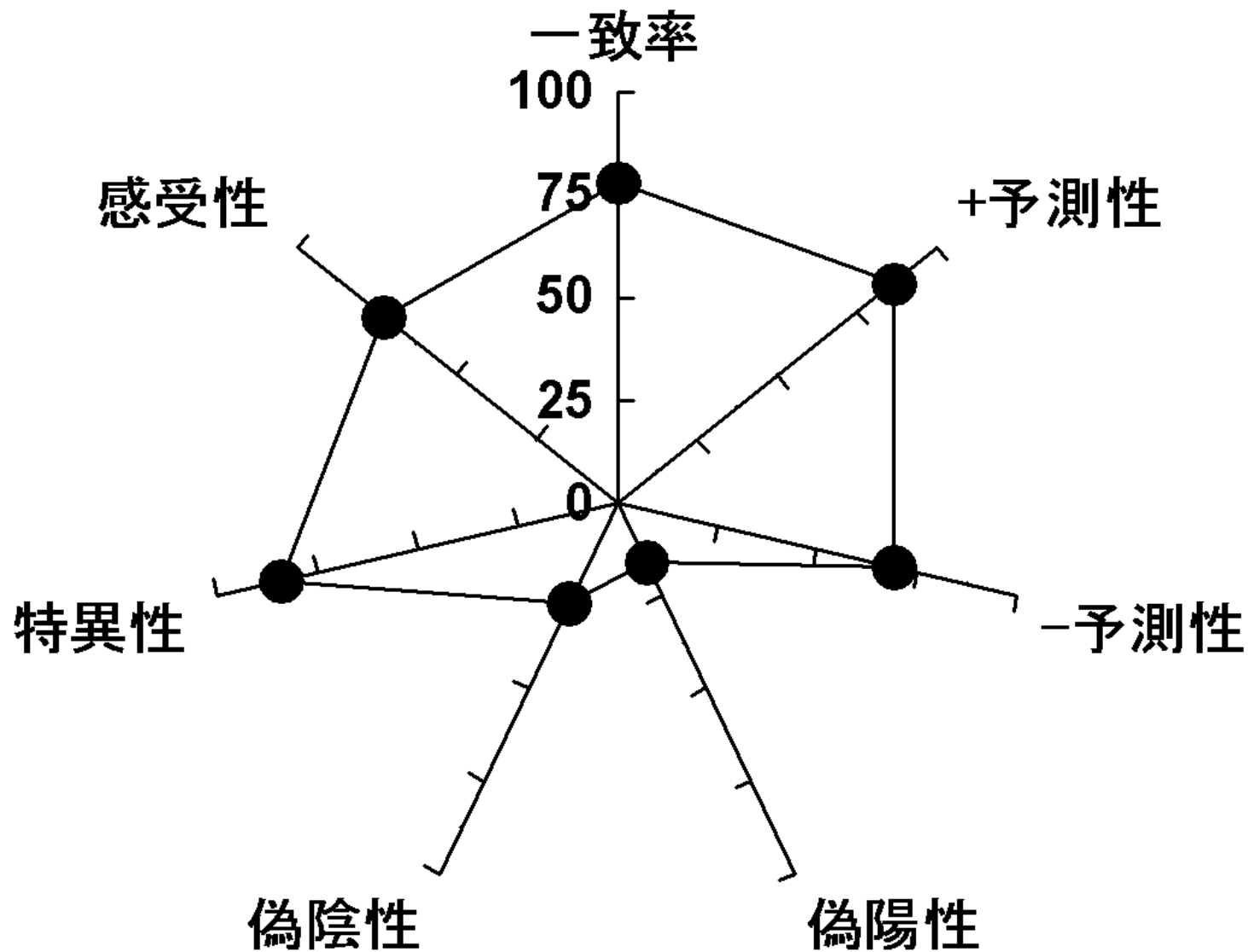
公開

| 動物または ヒトでの発癌 | Bhas 42試験 | |
|-----------------|-----------|----|
| | 陽性 | 陰性 |
| 陽性 | 38 | 14 |
| 陰性 | 6 | 31 |

| | |
|-------|--|
| 一致率 | $78\% = (38 + 31) / (38 + 14 + 6 + 31) \times 100$ |
| 感受性 | $73\% = 38 / (31 + 14) \times 100$ |
| 特異性 | $84\% = 31 / (6 + 31) \times 100$ |
| 陽性予測率 | $86\% = 38 / (38 + 6) \times 100$ |
| 陰性予測率 | $69\% = 31 / (14 + 31) \times 100$ |
| 偽陽性 | $16\% = 6 / (6 + 31) \times 100$ |
| 偽陰性 | $27\% = 14 / (38 + 14) \times 100$ |

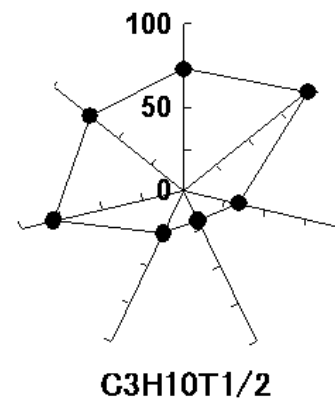
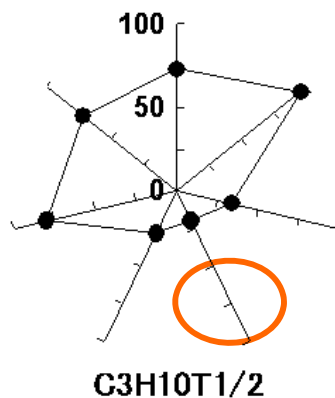
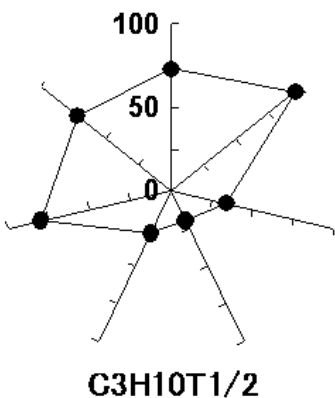
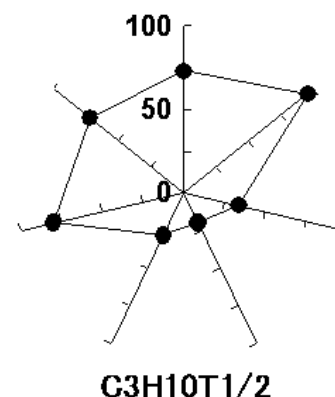
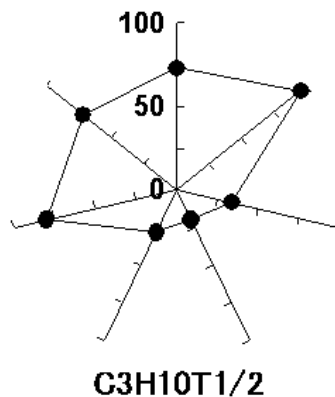
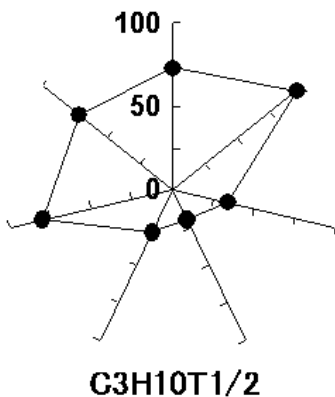
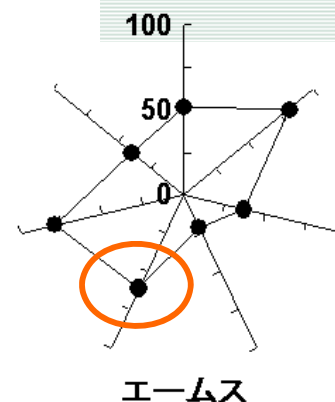
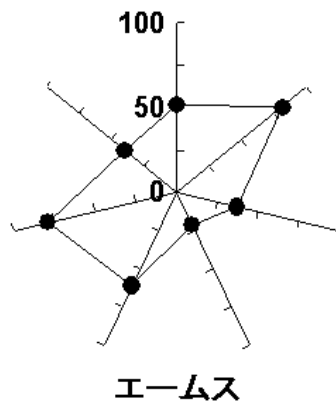
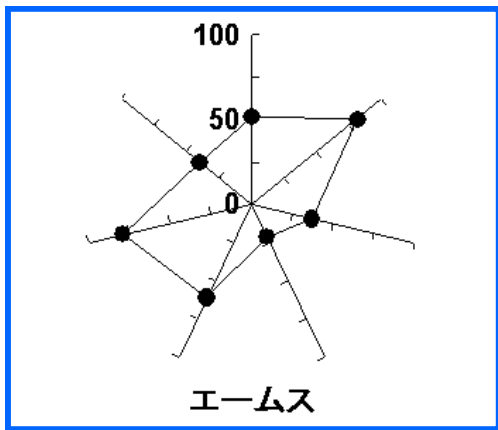
Bhas 42細胞形質転換試験のパフォーマンス

公開



種々の遺伝毒性試験とのパフォーマンスの比較

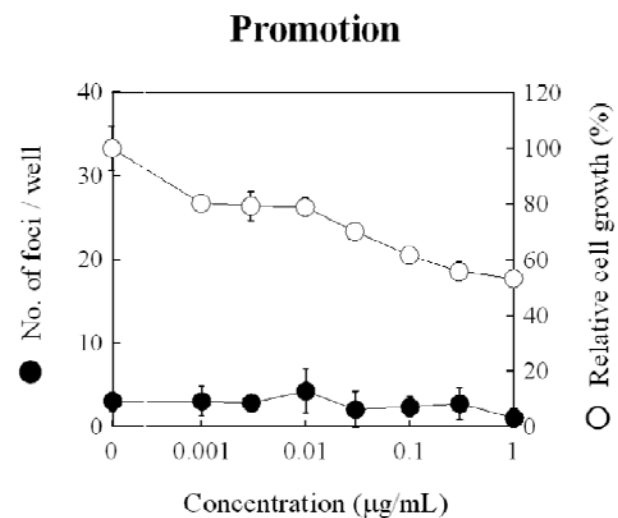
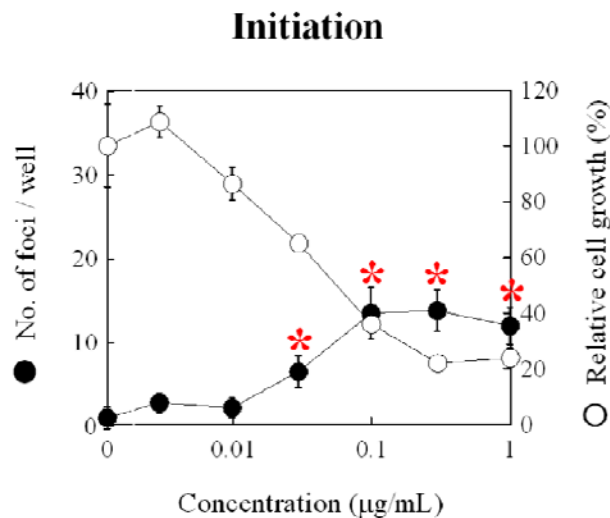
公開



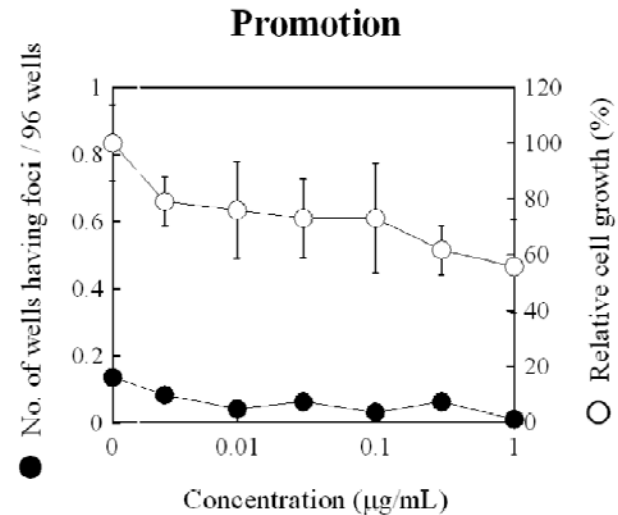
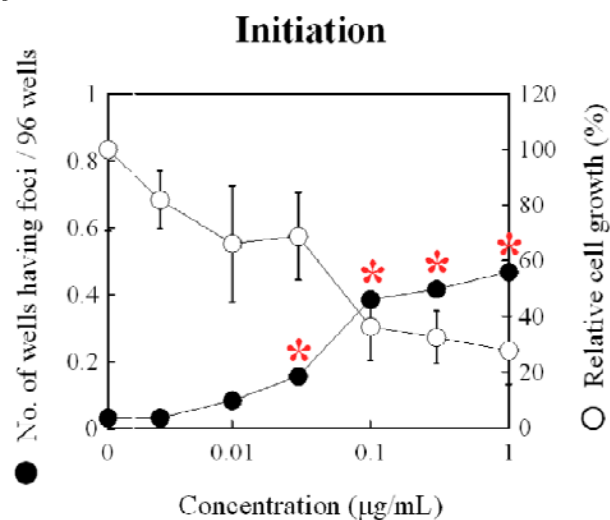
Dibenz(a,h)anthracene処理における 96ウェル法と6ウェル法との比較

公開

6
ウェル
法



96
ウェル
法



実施したBhas 42細胞形質転換試験のバリデーシオン内容

公開

| 試験番号 | プレート | 施設数 | 物質数 / 試験 | 施設数 / 物質 |
|--------------|-------|-----|----------|----------|
| プレバリデーシオン | | | | |
| 1 | 6ウェル | 6 | 9 | 3 |
| バリデーシオン | | | | |
| 2 | 6ウェル | 6 | 12 | 3 |
| 3 (Phase I) | 96ウェル | 4 | 7 | 4 |
| 3 (Phase II) | 96ウェル | 3 | 16 | 2 |

計23種の化学物質 (のべ44物質)

3回のバリデーションにおける各物質ごとの評価

公開

| 物質名 | 試験 | 試験 1 1 2 3 | 試験 2 1 2 3 | 試験 3 1 2 3 4 5 6 | 総合 評価 | In vivo |
|------------------------|------------|---|---|---|--------------------------|--------------------------|
| アルキル化剤 | | | | | | |
| MNNG | Ini Pro | <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | ■ |
| 芳香族アミン | | | | | | |
| 2-Acetylaminofluorene | Ini Pro | | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | ■ |
| o-Toluidine | Ini Pro | | <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | ▲ | ■ |
| フォルボール | | | | | | |
| TPA | Ini Pro | | | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | ■ |
| Phorbol | Ini Pro | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 芳香族炭化水素 | | | | | | |
| Benz[a]anthracene | Ini Pro | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | | | ■ | ■ |
| Benzo[a]pyrene | Ini Pro | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | ■ |
| Dibenzo[a,h]anthracene | Ini Pro | | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | ■ |
| 3-Methylcholanthrene | Ini Pro | | | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | ■ |
| Pyrene | Ini Pro | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | ■ | <input type="checkbox"/> |
| Anthracene | Ini Pro | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Phenanthrene | Ini Pro | | | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

■:陽性

□:陰性

▲:不確か

3回のバリデーションにおける各物質ごとの評価(続き)

公開

| 物質名 | 試験 | 試験 1 1 2 3 | 試験 2 1 2 3 | 試験 3 1 2 3 4 5 6 | 総合 評価 | In vivo |
|-----------------------------|------------|---------------|---------------|---------------------|----------|---------|
| ステロイド | | | | | | |
| Lithocholic acid | Ini Pro | | | | ■ | ■ |
| 無機化合物 | | | | | | |
| Cadmium chloride | Ini Pro | | | | ■ | ■ |
| Sodium arsenite | Ini Pro | | | | ▲ | ■ |
| 抗生物質 | | | | | | |
| Ampicillin sodium | Ini Pro | | | | □ | □ |
| アルカロイド | | | | | | |
| Caffeine | Ini Pro | | | | □ | □ |
| その他 | | | | | | |
| Methapyrilene hydrochloride | Ini Pro | | | | ■ | ■ |
| Mezerein | Ini Pro | | | | ■ | ■ |
| L(+)-Ascorbic acid | Ini Pro | | | | □ | □ |
| Eugenol | Ini Pro | | | | □ | □ |
| D(-)-Mannitol | Ini Pro | | | | □ | □ |
| e-Caprolactam | Ini Pro | | | | □ | □ |

■:陽性

□:陰性

▲:不確か

-:不適なデータ

VMTメンバーと参加施設

公開

バリデーションマネージメントチーム (VMT)

William Stokes (NICEATM, US),

Abigail Jacobs (NICEATM, US),

Leonard Schechtman (Innovative Toxicology Consulting, US),

Sebastian Hoffman (ECVAM, イタリア),

Raffaella Corvi (ECVAM, イタリア),

林 真 (安評センター), 小島 肇 (JaCVAM), 森田 健 (衛研)

参加施設 (試験責任者)

BioReliance (Kamala Pant, US),

Harlan RGC (Albrecht Poth, ドイツ),

バイオアッセイセンター (浅倉真澄) 安評センター (水橋福太郎)

化学 デ エンス () イナリサーチ (鈴木洋)

食品分析 ンター () 食薬 ンター (リードラ)

志)

国際バリデーションマネージメントチーム(VMT) 会議におけるVMTの結論と提言

公開

1. 施設間の再現性はある。
2. 追加試験を行う必要はない。
3. JaCVAMが主導してピアレビューを行う。

2010年10月6～7日(川崎)

OECDガイドライン化までの予定

公開

- | | | |
|-------|-----|---|
| 2010年 | 1月 | Standard Project Submission Form (SPSF) を経産省を通してOECDに提出 |
| | 3月 | WNT (ガイドラインワーキンググループ) 会議でガイドライン案として採択 |
| | 10月 | 国際バリデーションマネージメントチーム会議 |
| 2011年 | 6月 | バリデーションレポート草稿完成 |
| | 8月 | バックグラウンドレビュードキュメント (BRD) 草稿完成 |
| | 10月 | バリデーションレポートとBRDをピアレビューに提出 |
| | 12月 | OECD形質転換試験専門家会議にて、OECD提案3試験について議論 |
| 2012年 | 2月 | ピアレビュー会議 |
| | 8月 | ピアレビューレポートをWNT会議に提出 |
| 2013年 | 3月 | WNT会議 |

その他： 得られた多くの研究成果を論文としてまとめる。

ハイスループット化のための3つの試み

公開

培養期間(日)

0

4

7

11

14

21

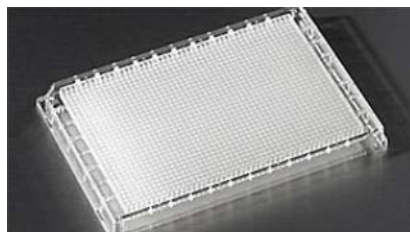


播種

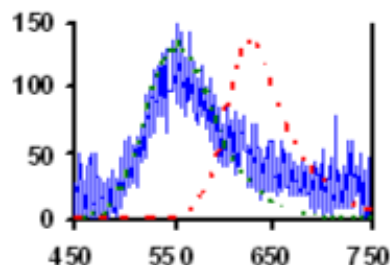
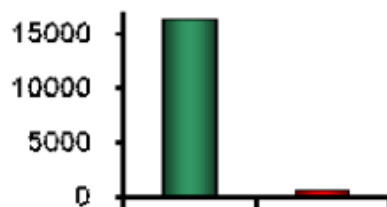
プロモーター処理

固定、染色

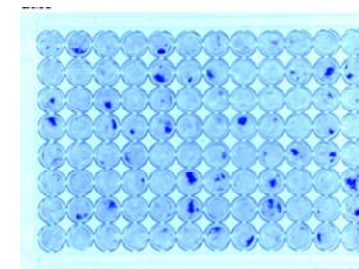
一連の作業を
自動化



遺伝子発現を
発光で測定



形質転換巣を
機器で測定



自動化システム(エイブル社開発)

公開



全体像



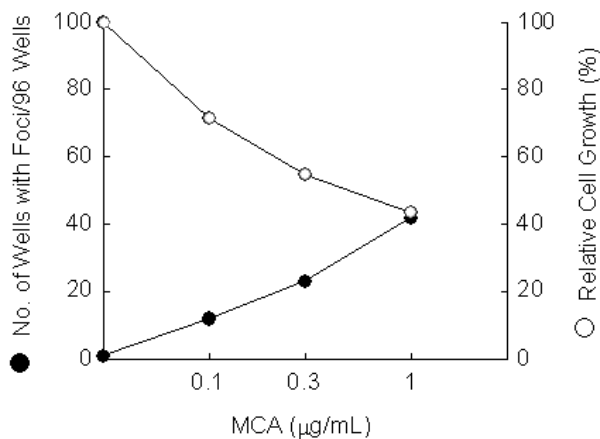
ラックに入れたプレートがインキュベーター内に入っている

手作業と自動化システムにおける形質転換率の比較

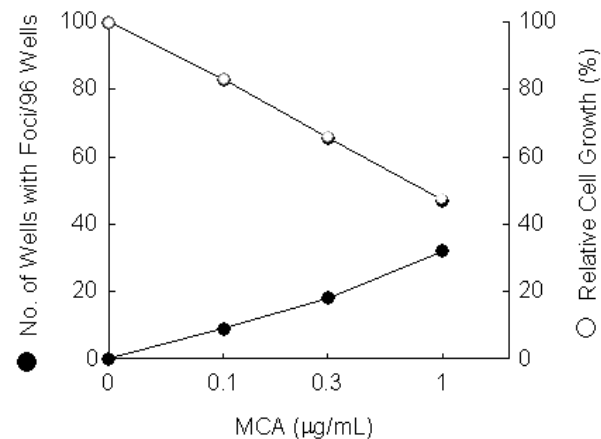
公開

イニシエーション試験 MCA

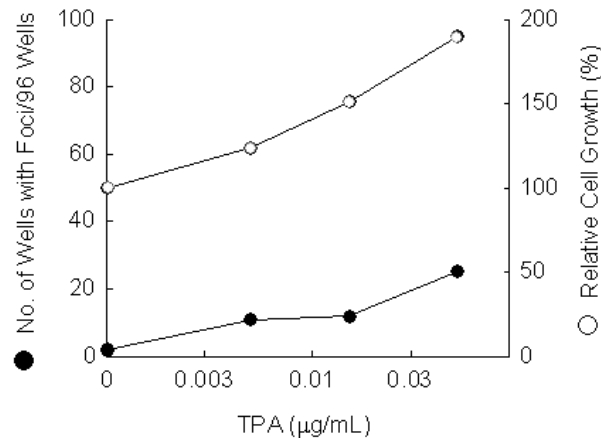
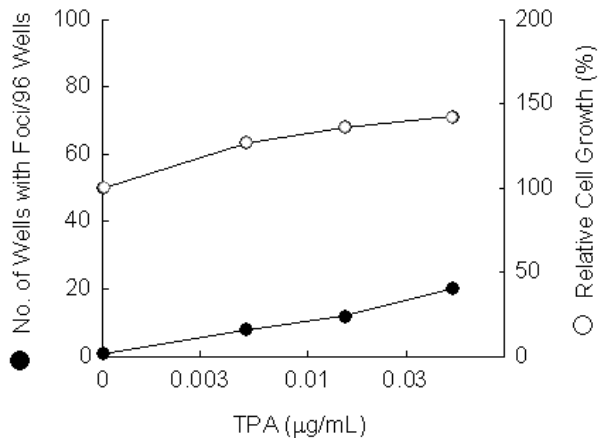
手作業



自動化システム



プロモーション試験 TPA



WST-8法により発色したウェル(上段) と形質転換巣を含むウェル(下段)

公開

DMSO 0.1%

MCA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$



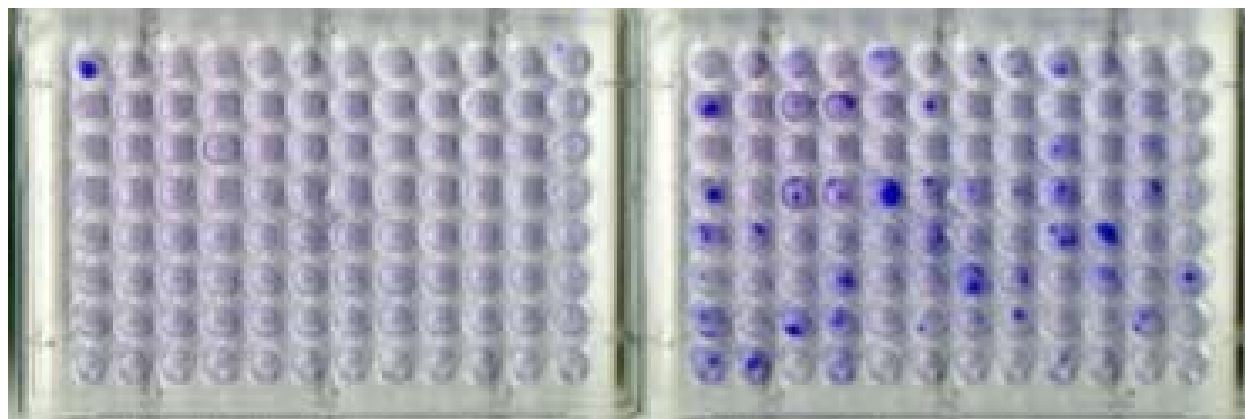
H_2O_2 + WST-8



固定



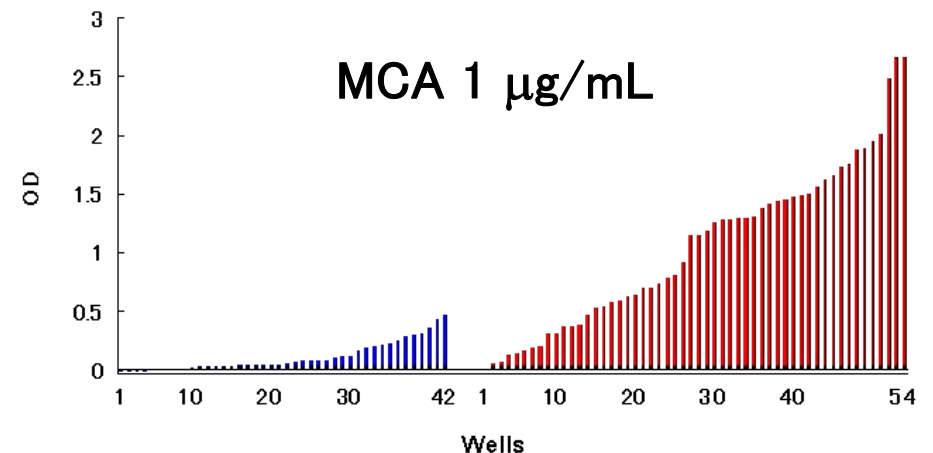
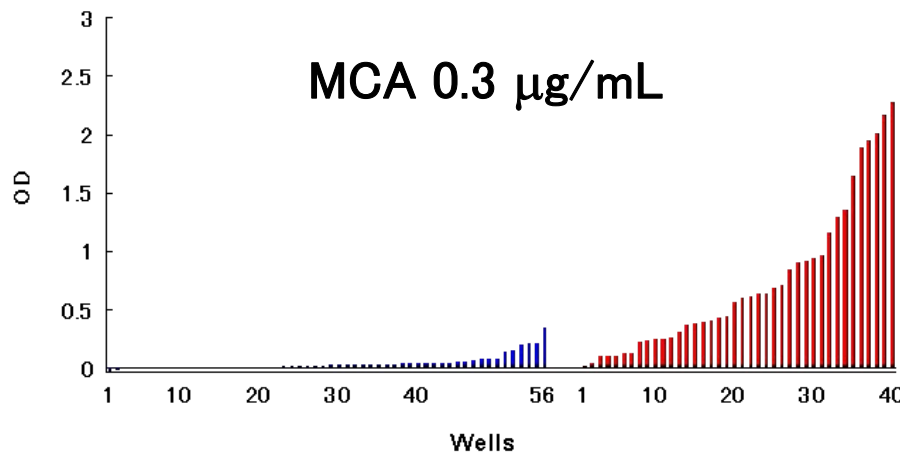
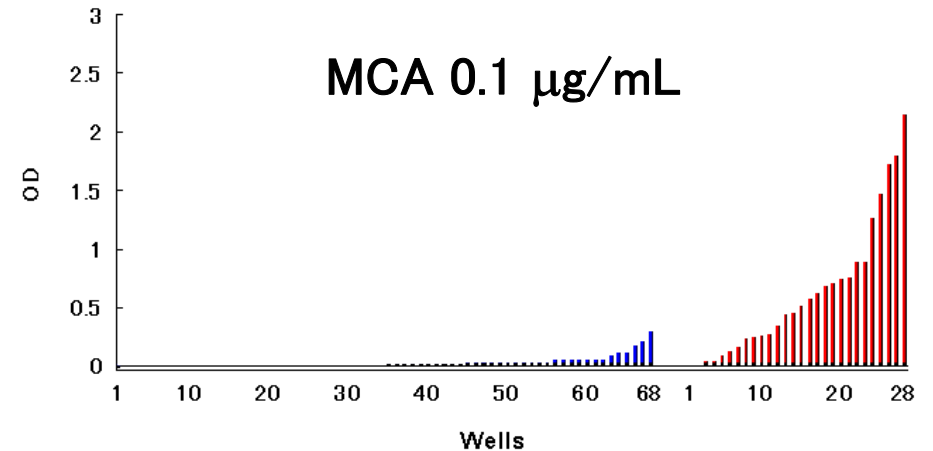
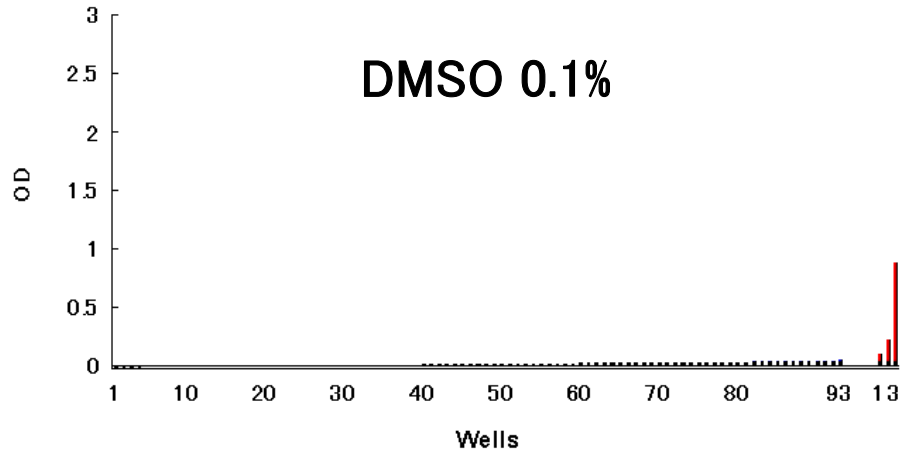
ギムザ染色



質を有するウェルは一する

過酸化水素法におけるMCAの用量依存性

公開



■ : 正常細胞のみのウェル、■ : 形質転換巣を含むウェル

過酸化水素法の特徴

公開

通常の方法

主観的

観察に時間がかかる

固定、染色が必要

自動化しにくい



過酸化水素法

客観的

短時間で測定

添加のみのため、作業時間が短縮

単純作業のため自動化しやすい

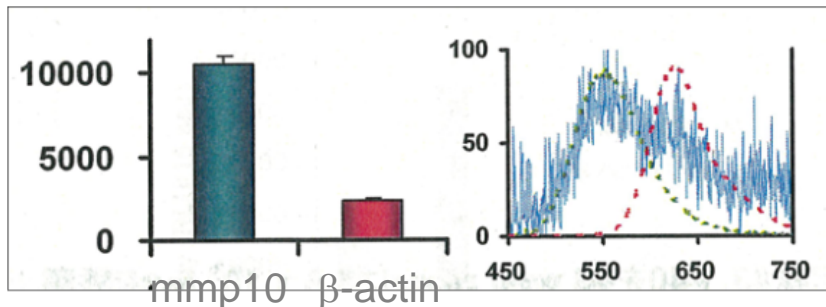


発光Bhas 42細胞のルシフェラーゼ活性と発光スペクトル

公開

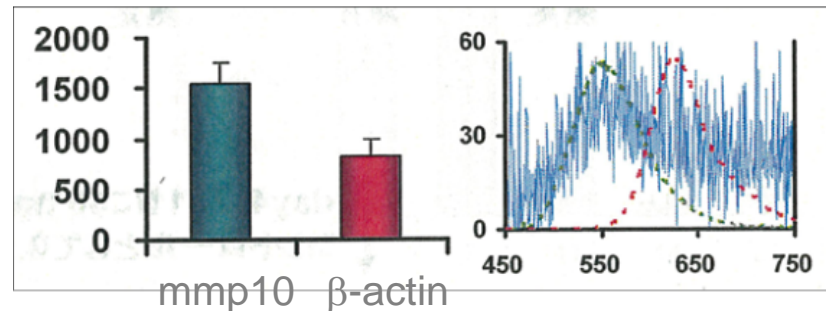
ルシフェラーゼ活性 発光スペクトル

Clone 3

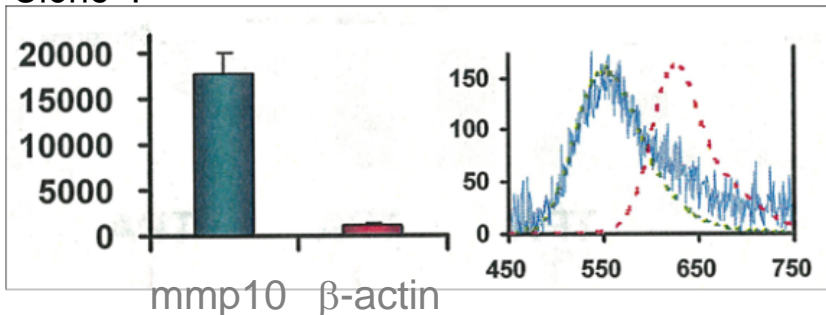


ルシフェラーゼ活性 発光スペクトル

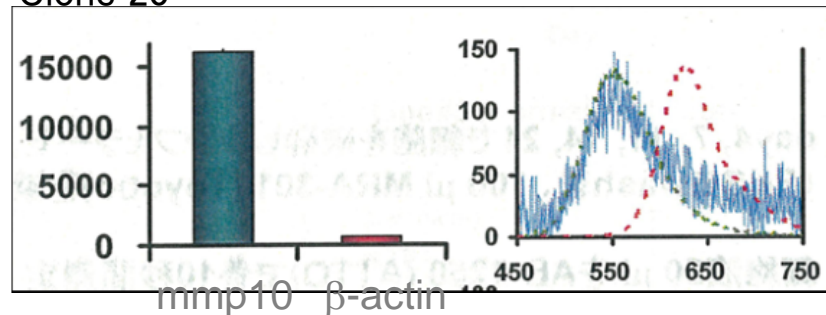
Clone 15



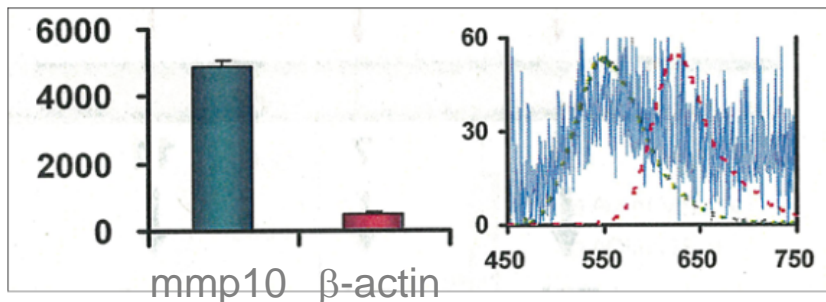
Clone 4



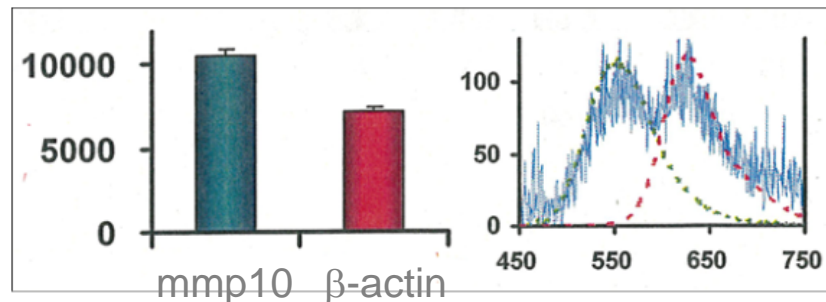
Clone 20



Clone 8

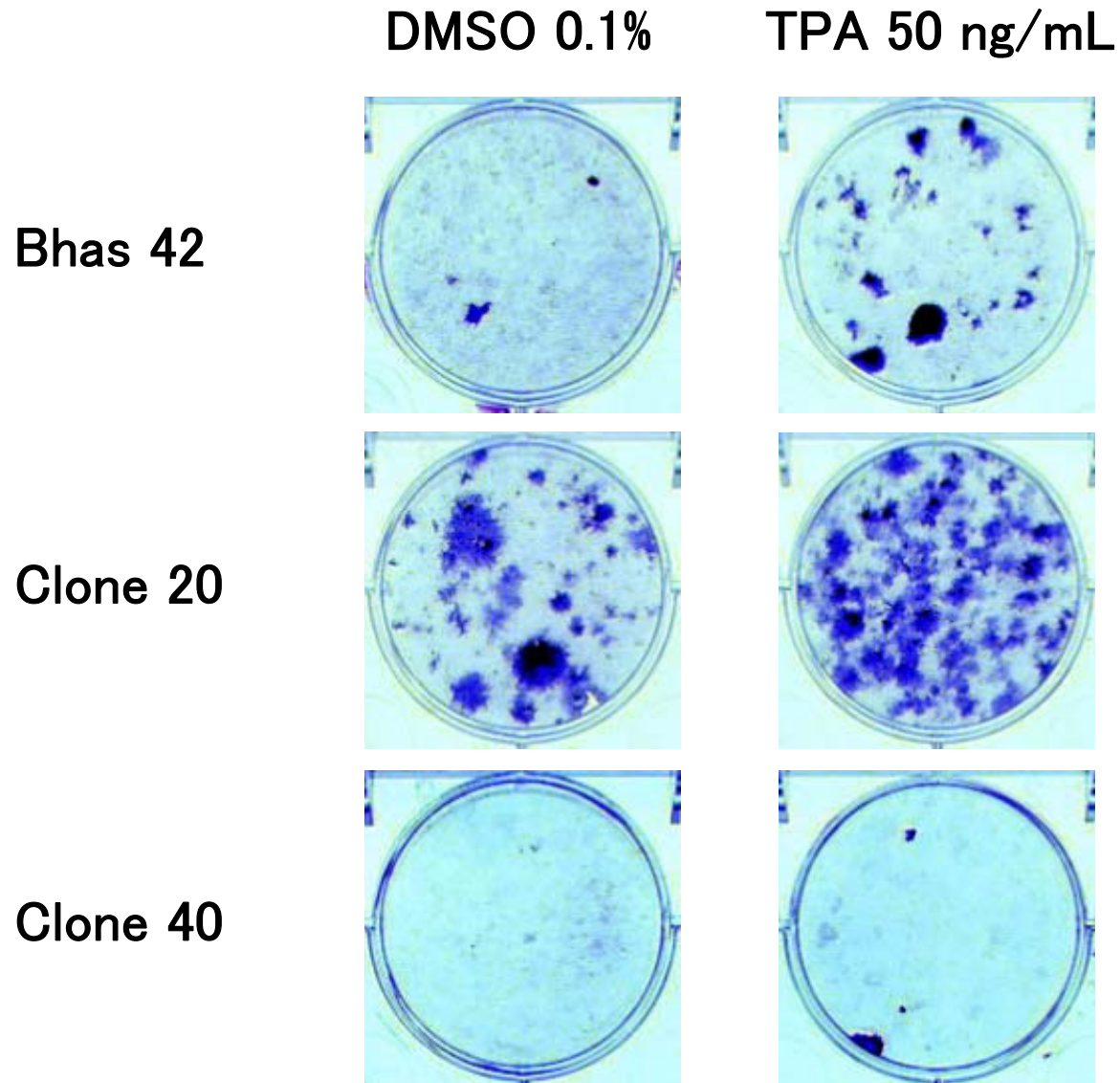


Clone 40



6クローンを評価した結果、クローン20は有望と考えられた

公開



本研究で得られた業績

公開

論文

1. Asada S, et al. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using *v-Ha-ras*-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat Res.* 2005 588:7-21.
2. Umeda M. Detection of non-genotoxic carcinogens using *ras*-transfected Bhas 42 cells. *ALTEX.* 2006 23 Special Issue:450-455.
3. Sakai A. BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity. *AATEX.* 2007 14 Special Issue:367-373.
4. Hayashi K, et al. Technical modification of the Balb/c 3T3 cell transformation assay: the use of serum-reduced medium to optimise the practicability of the protocol. *Altern Lab Anim.* 2008 36:653-665.
5. Muramatsu D, et al. Comparison of sensitivity to arsenic compounds between a Bhas 42 cell transformation assay and a BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutat Res.* 2009 675:66-70.
6. Tanaka N, et al. An Interlaboratory collaborative study on a cell transformation assay using Bhas 42 cells. *AATEX.* 2009 14:831-848.
7. Arai S, et al. A study on the dose setting of test chemicals for the promotion assay in Bhas 42 cell transformation assay. *AATEX.* 2010 15:6-13.

本研究で得られた業績(続き)

公開

論文

8. Sakai A, et al. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* 2010 702:100–122.
9. Sakai A, et al. An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* in press
10. Arai S, et al. A high through-put cell transformation assay applicable to automation for detecting potential chemical carcinogens using Bhas 42 mouse target cells. in preparation
11. Sasaki K, et al. Transformation assay of Bhas 42 cells: using a model of initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenicity of chemicals. in preparation

特許

1. 佐々木澄志. 哺乳動物形質転換細胞の選択方法. (国内優先) 特願 2009-206686 (2009)
2. Sasaki K. A method for selecting mammal transformed cells. US Patent Application No.: 12/554,133 (2009)
3. Sasaki K. A method for selecting mammal transformed cells. European Patent Application No.:09 169 631.0 (2009)

最終目標と達成状況

公開

| 研究開発項目 | 最終目標(平成22年度末) | 最終目標の達成状況 | 達成度 |
|--|---|--|-----|
| A 発がん性予測試験法の開発 ①Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法の開発 | 遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、試験期間1か月程度で発がん性を予測評価できる試験方法を開発し、標準的な試験プロトコルを取りまとめる。 | Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法について、1)98物質を調べin vivoのデータと比較した、2)6ウェル法と96ウェル法の同等性を確認した、3)バリデーションを実施した。さらに、Bhas 42細胞の性状解析を行った。その結果、OECD-TG収載のためのデータが十分に揃ったことから、OECDにSPSFを提出した。 また、Bhas 42細胞形質転換試験のハイスループット化を目指し、1)自動化システムを開発した、2)形質転換をマイクロプレートリーダーで客観的にかつ迅速に定量できる過酸化水素法を開発した(日米:特許審査中、欧:特許取得)。 | ◎ |
| A 発がん性予測試験法の開発 ②発光Bhas 42細胞を用いた試験法の開発 | | 発がんプロモーター処理により発現が増加する遺伝子としてマトリックスメタロプロテイナーゼ10遺伝子を見出した。次にこの遺伝子のプロモーターをBhas 42細胞に導入し、TPA処理により、形質転換巣が明瞭に誘発される発光クローンを1株選んだ。 | ○ |

◎大幅達成 ○達成 △達成見込み ×未達