

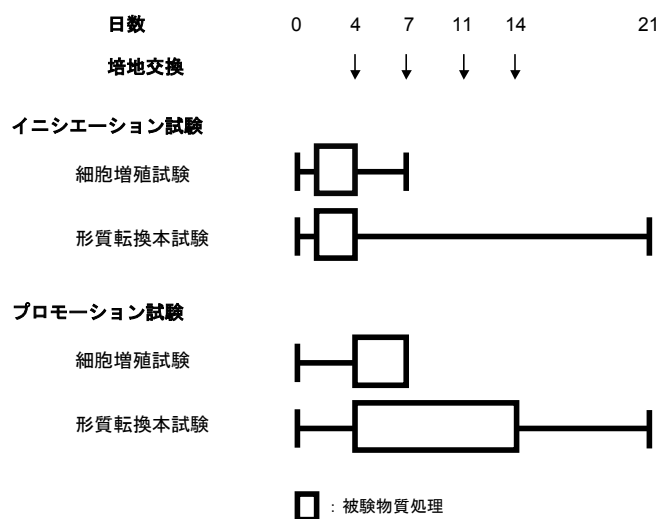
Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準(案)

1 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験の種類

- (1) Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は、試験の目的により、被験物質を細胞の増殖期に処理するイニシエーション試験と定常期に処理するプロモーション試験がある。
- (2) イニシエーション試験は遺伝毒性発がん物質を、プロモーション試験は非遺伝毒性発がん物質を検索するための試験とする。
- (3) イニシエーション試験とプロモーション試験は、同時に行う必要は無く、それぞれ独立して行うことが可能である。
- (4) イニシエーション試験及びプロモーション試験は、細胞増殖試験と形質転換巣を観察する形質転換本試験からなる。
- (5) 細胞増殖試験は、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響と本試験の最高処理濃度を決定するために実施する。また、被験物質が適正な濃度で処理されているかを確認するため、本試験においても並行して実施する。
- (6) 形質転換本試験は、被験物質の形質転換巣を誘発する作用を検出するために実施する。
- (7) Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は、6 ウェルプレートと 96 ウェルプレートのどちらを用いてもよい。

2 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験の方法

- (1) イニシエーション試験は、細胞播種後 1～4 日の 3 日間、被験物質で処理する。
- (2) プロモーション試験は、細胞播種後 4～14 日の 10 日間、被験物質で処理する。
- (3) 細胞増殖試験は、イニシエーション試験とプロモーション試験ともに、細胞播種後 7 日間培養し、固定染色する。
- (4) 形質転換本試験は、イニシエーション試験とプロモーション試験ともに、細胞播種後 3 週間培養し、固定染色する。



3 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験に用いる細胞

形質転換試験では Bhas 42 細胞（v-Ha-ras 導入 BALB/c 3T3 A31-1-1 クローン、マウス全胎仔由来）を用いる。

4 被験物質の処理濃度

- (1) 被験物質の最高処理濃度を決定する細胞増殖試験では、最高用量を 5 mg/ml とする。
- (2) イニシエーション試験及びプロモーション試験ともに、少なくとも 4 濃度を設定する。
- (3) イニシエーション試験において、理想的には次のように濃度設定する。細胞毒性が認められない濃度に 1 濃度、細胞毒性が認められない濃度から増殖が 50% 阻害される濃度（IC₅₀）間に 2 濃度、IC₅₀ から増殖が 90% 阻害される濃度（IC₉₀）間に 2 濃度。
- (4) プロモーション試験において、細胞増殖を促進させる被験物質の場合、理想的には次のように濃度設定する。細胞毒性が認められない濃度に 1 濃度、細胞増殖の促進が認められる濃度に 3 濃度、弱い増殖阻害が認められる濃度に 1 濃度。
- (5) プロモーション試験において、細胞増殖を阻害する被験物質の場合、理想的には次のように濃度設定する。細胞毒性が認められない濃度に 2 濃度、細胞毒性が認められない濃度から IC₅₀ 間に 2 濃度、IC₅₀ から IC₉₀ 間に 1 濃度。

5 対照物質

イニシエーション試験及びプロモーション試験における対照物質は、陰性対照においては、被験物質を溶解するために用いた溶媒、陽性対照においては、適切な既知の形質転換誘発物質（イニシエーション試験では 3-methylcholanthrene、プロモーション試験では 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 等）を用いる。

6 使用ウェルの数

- (1) 6 ウェルプレートを使用する場合、一群あたり、形質転換巣を観察する試験には 6 ウェル、細胞増殖試験には 3 ウェルを用いる。
- (2) 96 ウェルプレートを使用する場合、一群あたり、形質転換巣を観察する試験には 96 ウェル、細胞増殖試験には 8 ウェルを用いる。

7 観察及び記録

- (1) 形質転換本試験においては、プレートをコード化し、処理条件が判らない状況で、観察する。
- (2) 6 ウェルプレートを使用する場合、各ウェルあたりの形質転換巣数を記録し、形質転換率は「形質転換巣数/ウェル」で表す。
- (3) 96 ウェルプレートを使用する場合、形質転換巣数を含むウェルの数（1 ウェルに

形質転換巣が 1 個あっても複数個あっても 1 と数える) を記録し、形質転換率は「形質転換巣を持つウェルの数/96 ウェル」で表す。

8 結果の判定

- (1) 被験物質処理群の形質転換率が陰性対照と比較して、イニシエーション試験とプロモーション試験のいずれにおいても、統計学的有意差が認められない場合には、陰性と判断する。
- (2) 被験物質処理群の形質転換率が陰性対照と比較して、イニシエーション試験とプロモーション試験のいずれかにおいて、明らかに上昇し、かつ、その作用に濃度依存性が認められる場合には、陽性と判断する。
- (3) 明確に陽性又は陰性が判定できない場合には、適切な試験条件で確認試験を実施する。