

第4回遺伝毒性評価ワーキンググループ(厚生労働省)

2014年1月24日

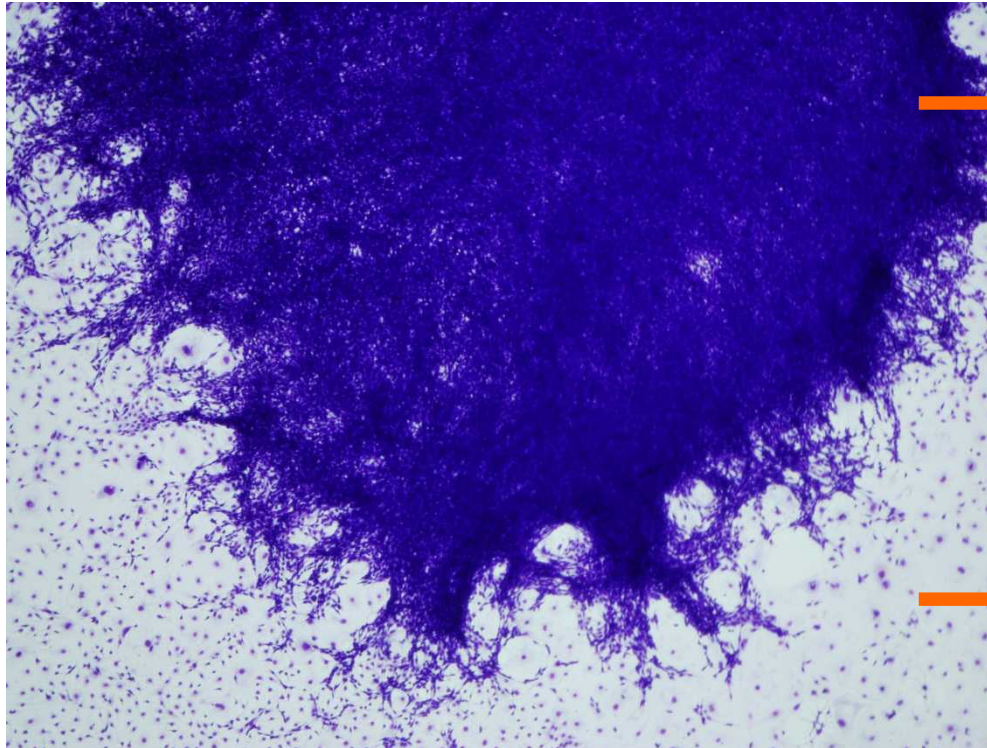
発がん性検索のための
Bhas 42細胞(v-Ha-*ras*導入BALB/c 3T3クローン)
を用いた形質転換試験の概要

佐々木澄志、山影康次、田中憲穂
(一財)食品薬品安全センター秦野研究所

本日の説明概要

1. Bhas 42細胞について
2. 形質転換試験の方法
3. 98物質による発がん性予測評価
4. バリデーション試験の結果
5. Bhas 42細胞形質転換試験はどのように利用されるか？

Bhas 42細胞の形質転換巣の形態



形質転換巣

塩基性染色
紡錘状
互いに交差
多層
浸潤

正常細胞

単層
接触阻止

親株のBALB/c 3T3細胞を用いた2段階形質転換試験

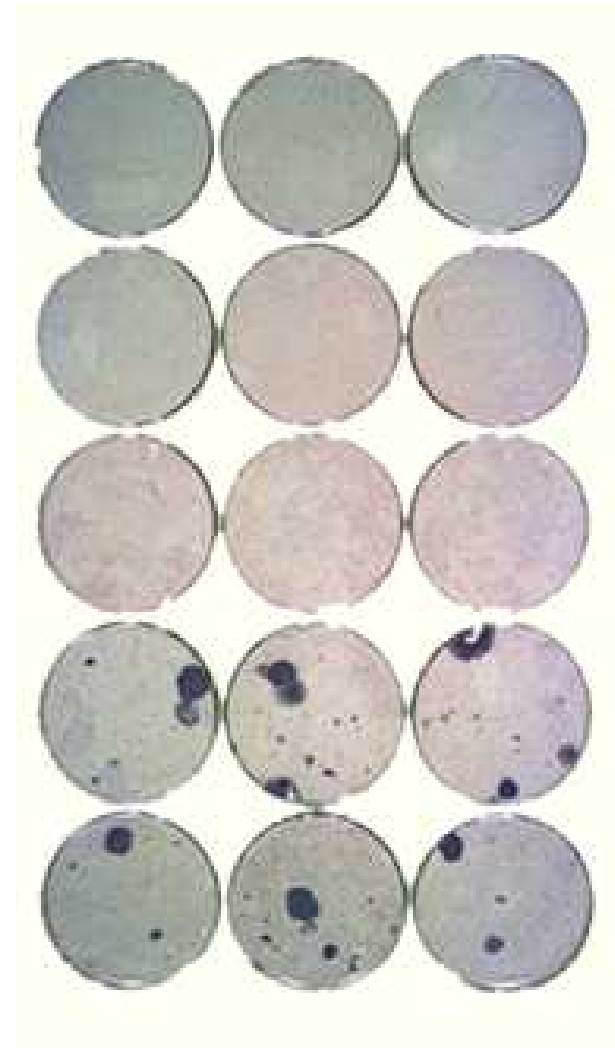
DMSO + DMSO

MCA 0.5 $\mu\text{g/ml}$ + DMSO

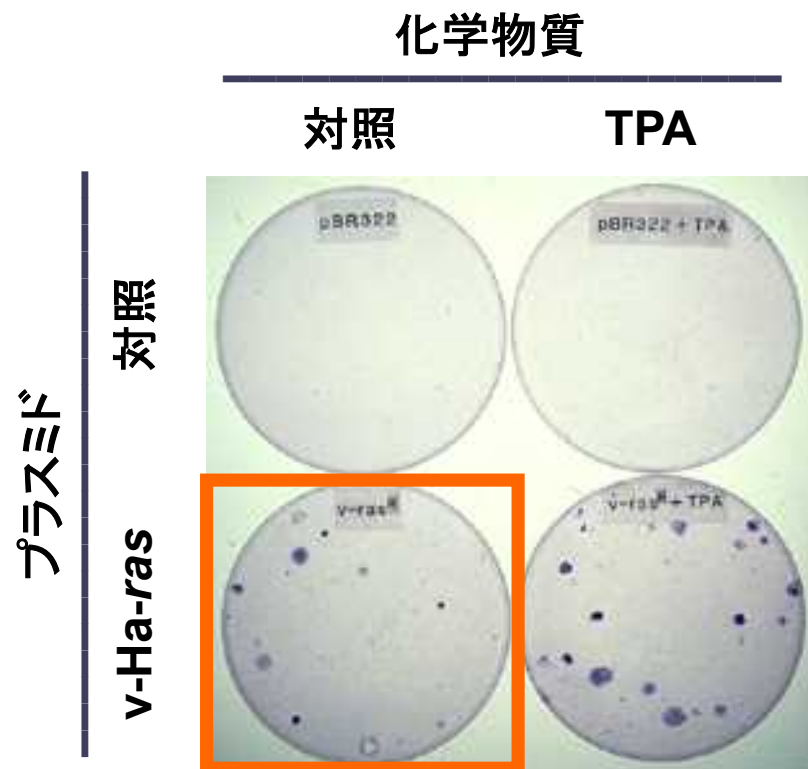
DMSO + TPA 100 ng/ml

MCA 0.5 $\mu\text{g/ml}$ + TPA 100 ng/ml

MCA 3 $\mu\text{g/ml}$ + DMSO



BALB/c 3T3細胞において化学物質によるイニシエーションは
v-Ha-*ras*導入と置き換えることができる



このディッシュにはv-Ha-*ras*が導入されているにもかかわらず、TPA処理をしない限り形質転換しない細胞（イニシエートされた細胞）が存在することが示唆される。

Bhas 42細胞の樹立

BALB/c 3T3細胞



v-Ha-*ras*の導入



v-Ha-*ras*を有する細胞のクローニング

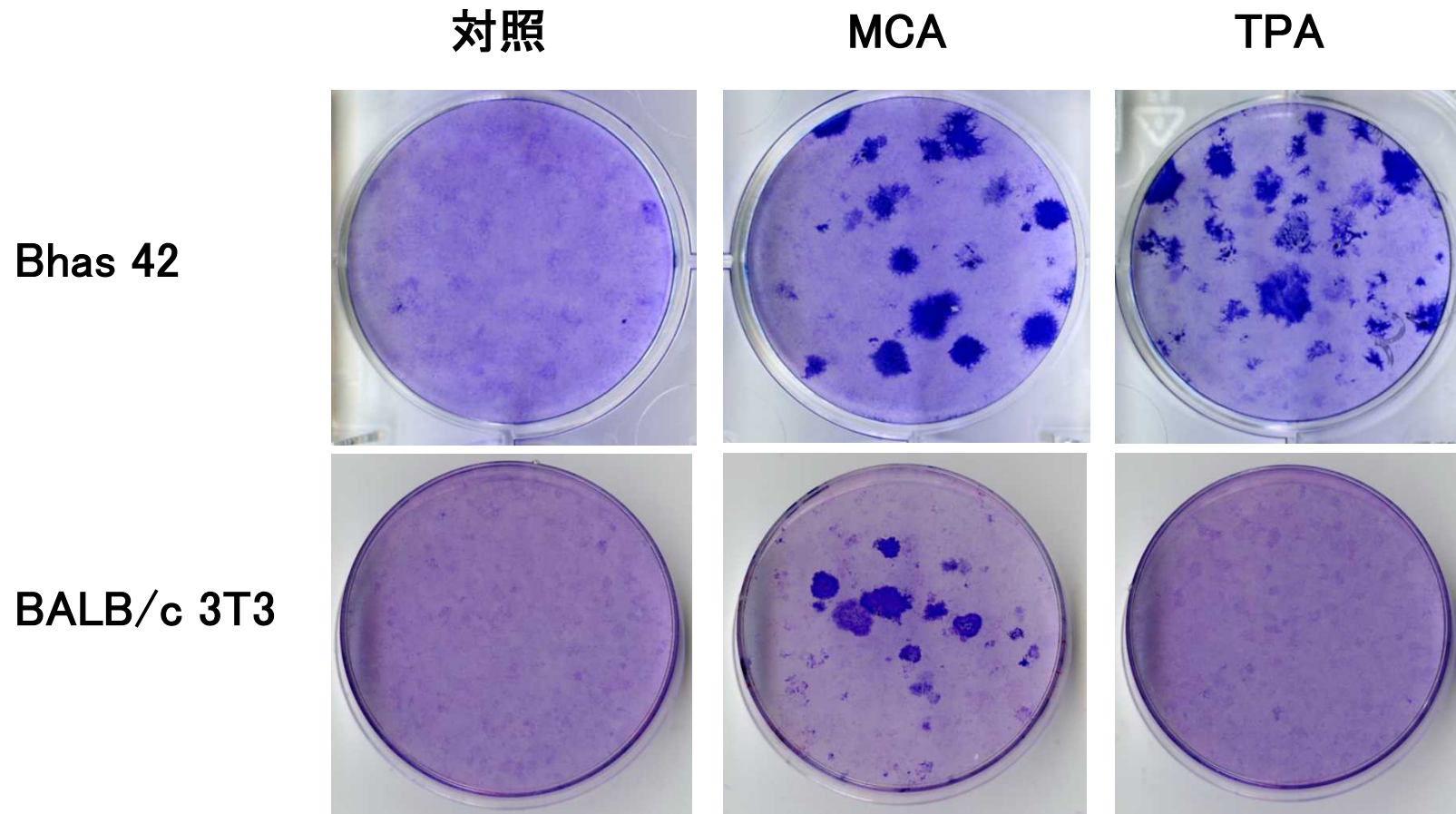


正常形態を示すがTPAにより形質転換する
クローンのスクリーニング



Bhas 42細胞

Bhas 42細胞はTPA処理のみで形質転換する



Bhas 42細胞の形質転換はin vitroでのがん化を再現している



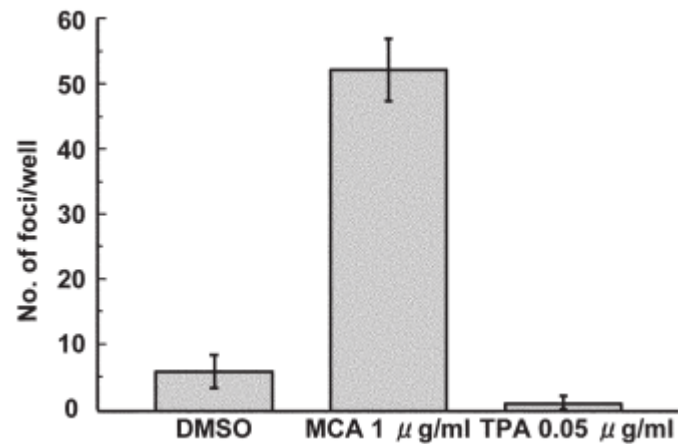
形質転換したBhas 42細胞

正常Bhas 42細胞

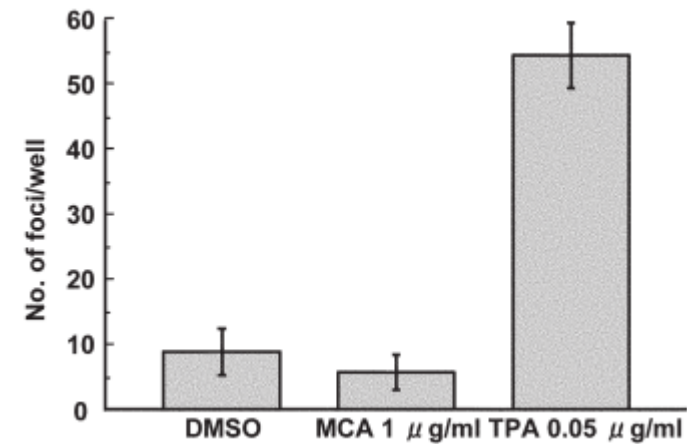
10⁶個を皮下注射し60日後

化学物質の処理において、遺伝毒性発がん物質は細胞分裂を必要とし、
非遺伝毒性発がん物質は細胞間接触を必要とする

MCA: 陽性、TPA: 陰性



MCA: 陰性、TPA: 陽性

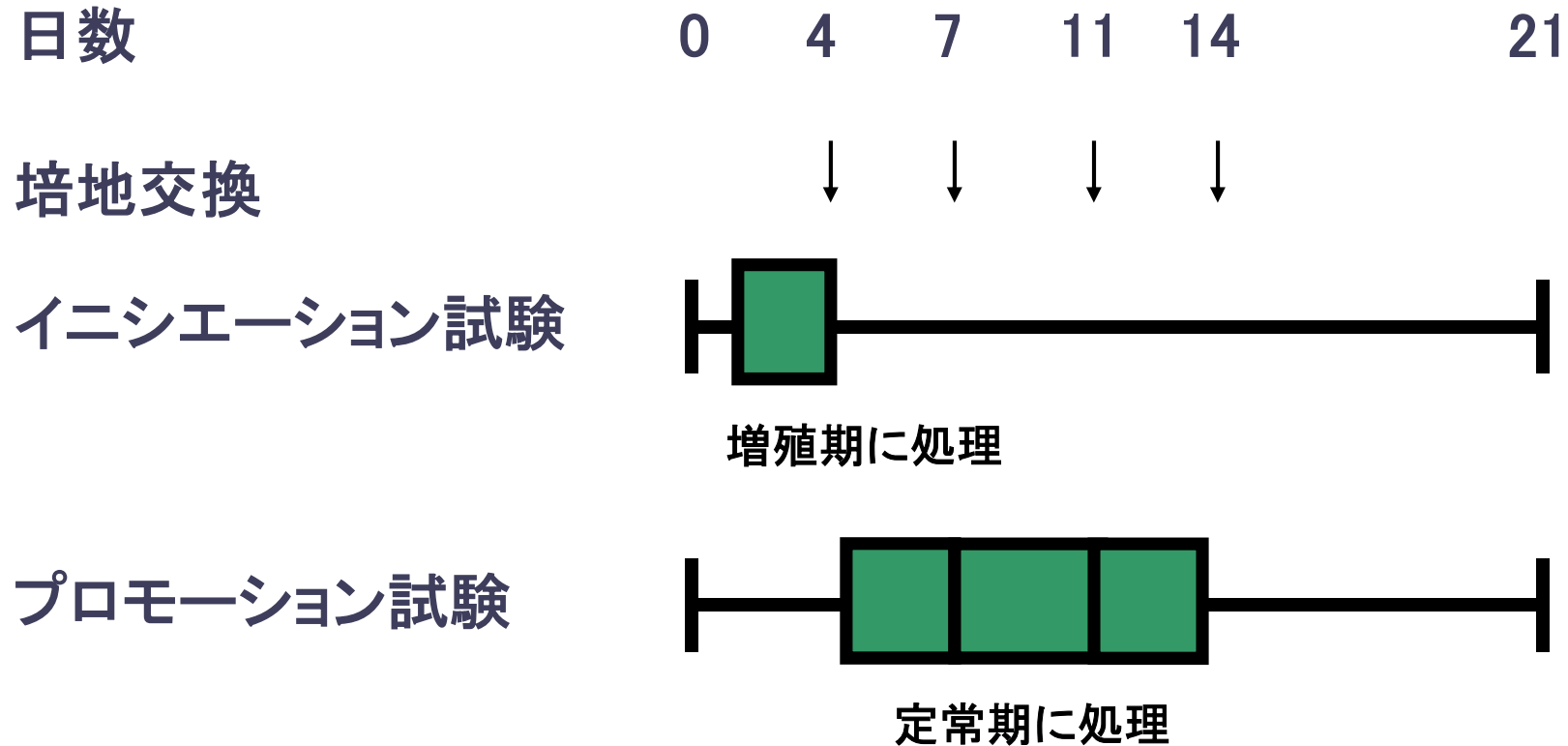


処理

増殖期に3日間

定常期に10日間

Bhas 42細胞形質転換試験の日程



6ウェルまたは96ウェルを使用。

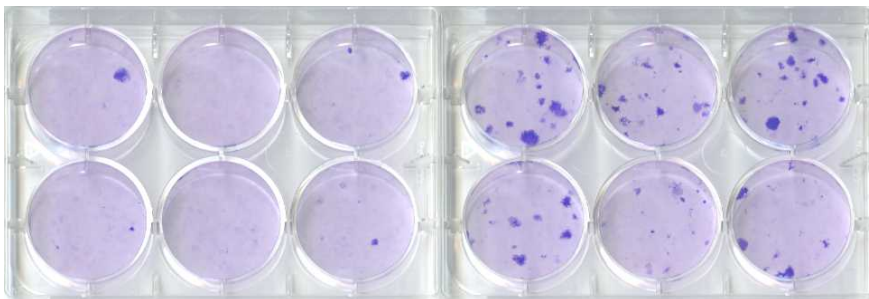
並行して行う細胞増殖試験は播種後7日目に固定・染色。

イニシエーション試験とプロモーション試験のどちらかが陽性の場合、その物質は陽性と判断。

6ウェル法と96ウェル法における形質転換率の表し方

対照

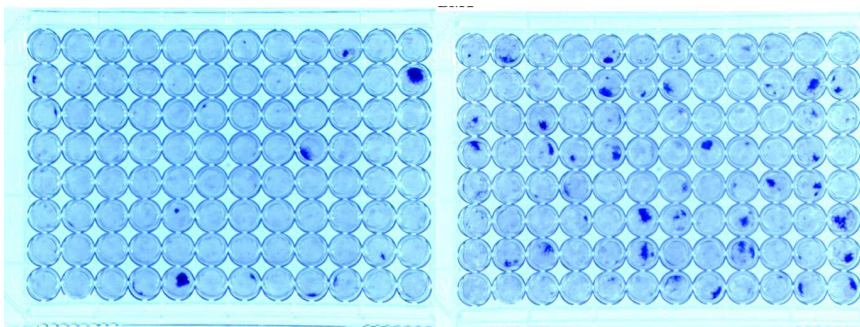
MCA 1 $\mu\text{g/ml}$



6ウェル法

形質転換巢数／ウェル

例 14個／ウェル



96ウェル法

形質転換巢を持つウェルの数／96ウェル

例 52ウェル／96ウェル

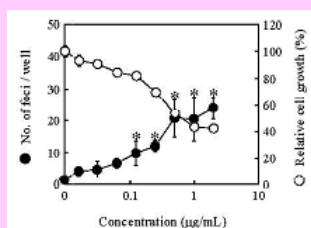
Arai S et al. AATEX. (2013) 18:1-19.

MCAとTPAの処理において、 6ウェル法と96ウェル法では類似の結果が得られる

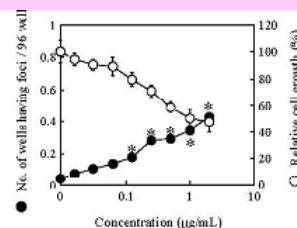
イニシエーション
試験

MCA

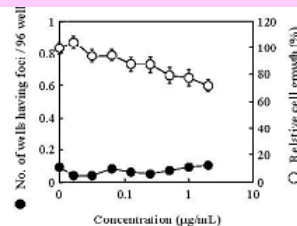
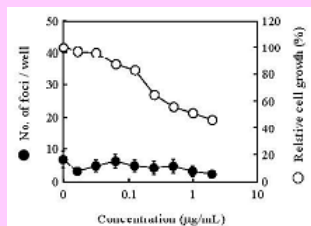
6ウェル法



96ウェル法

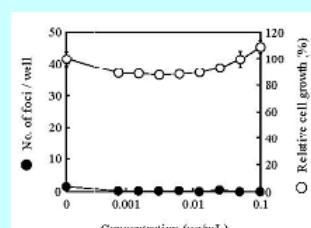


プロモーション
試験

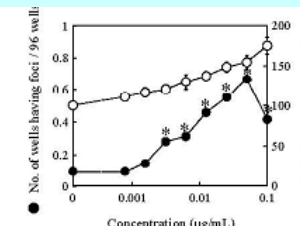
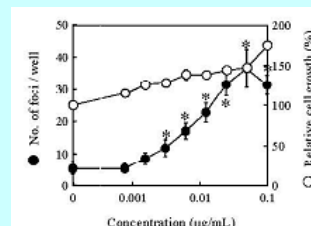
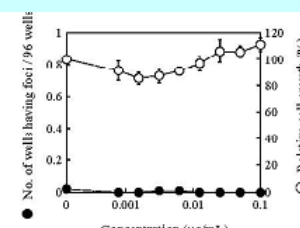


TPA

6ウェル法



96ウェル法



●: 形質転換率、○: 相対細胞増殖率

Arai S et al. AATEX. (2013) 18:1-19.

6ウェル法におけるBhas 42細胞形質転換試験の発がん性予測

動物または ヒト	Bhas 42試験	
	陽性	陰性
陽性	38	14
陰性	6	31

98物質を試験

89物質がin vivoデータあり

52発がん物質

37非発がん物質

9物質はin vivoデータなし

一致率	78%	=	$(38 + 31) / (38 + 14 + 6 + 31) \times 100$
感受性	73%	=	$38 / (34 + 14) \times 100$
特異性	84%	=	$31 / (6 + 31) \times 100$
+予測性	86%	=	$38 / (38 + 6) \times 100$
-予測性	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細胞形質転換試験とAmes試験の結果比較

52発がん物質

物質	Bhas 42試験		Ames	小核試験	DRP31に 記載
	イニシエーション	プロモーション			
2-Acetylaminofluorene	+	+	+	+	+
Benz[a]anthracene	+	+	+,+,+	+	+
2-Amino-3-methylimidazo- [4,5-f]quinoline (IQ)	+	-	+	-	+
5-Azacytidine	+	-	+,+/-		+
Barium chromate	+	-	-	+	+
Benzo[a]pyrene	+	-	+,+	+,+,+	+
Cyclophosphamide	+	-	+,+/-,-,+/-	-	+
Cyclosporin A	+	-	-	-	+
2,4-Diaminotoluene	+	-	+,+		+
Dibenz[a,h]anthracene	+	-	+,+/-,+		+
Melphalan	+	-	+,+,+,-/+	+	+
3-Methylcholanthrene	+	-	+,+		+
Mitomycin C	+	-	+	+,+,+	+
MNNG	+	-	+,+	+	+
Sterigmatocystin	+	-	+	+	
Thio-TEPA	+	-	+	+	+
Cadmium chloride	-	+	-, -	-	+
Chenodeoxycholic acid	-	+	+/-		
4-Chloro-o-toluidine HCl	-	+	-		+
Cholic acid	-	+	+/-		+
Deoxycholic acid	-	+	+/-	-	
Dichlorvos	-	+	+,+	-	+
Epichlorohydrin	-	+	+,+,+/-		+
D-Limonene	-	+	-, -		-
Lithocholic acid	-	+	-, -		+
Methapyrilene HCl	-	+	-		+

38発がん物質中18物質: Bhas 42細胞形質転換試験で陽性だが、Ames試験では陰性または不明瞭。
これらの物質は主にプロモーション試験で検出されている。

52発がん物質 (続き)

物質	Bhas 42試験 イニシエーション プロモーション		Ames	小核試験	DRP31に 記載
Methylarsonic acid	-	+	-	-	
Mezerein	-	+	-,-		+
2-Naphthylamine	+/-	+	+,+,+/-,-,+,+/-	-,+,+,-	
Phorbol 12,13-didecanoate	+	+			+
Quercetin	-	+	+,+,+/-,-,+/-	+,+	+
Sodium arsenate	-	+	-	-	+
Sodium arsenite	+/-	+	-	+	+
Sodium saccharin	-	+	-,-		+
Styrene oxide	-	+	+,+,+/-,-,+/-	-	+
TPA	+/-	+	-		+
o-Toluidine	-	+	+, -	+/-,-	+
Zinc chloride	-	+	+		+
o-Anisidine	-	-	+		+
Benzene	-	-	-	+,+	+
Cobalt sulfate heptahydrate	-	-	+		+
Diethylstilbestrol	-	-	-, -, -, -	+/-,-,+, -	+
Dimethylarsinic acid	-	-	-	+/-	
1,4-Dioxane	-	-	-, -	-	+
Ethyl carbamate (Urethane)	-	-	+/-,-, -, -	+,+	+
Formaldehyde	-	-	+,+/-,-, +/-	+/-	+
Furylfuramide (AF-2)	-	-	+,+,+		+
Methyl carbamate	-	-	-, -, -	-	+
Nickel (II) chloride	-	-	-	-	+
Nickel monooxide	-	-	-	-	+
Phenobarbital sodium	-	-	-,+/-		+
p-Toluidine	-	-	-		+

38発がん物質中18物質: Bhas 42細胞形質転換試験で陽性だが、Ames試験では陰性または不明瞭。
これらの物質は主にプロモーション試験で検出されている。

37非発がん物質

31非発がん物質中8物質:
Bhas 42細胞形質転換試験
で陰性だが、Ames試験で
陽性または不明瞭。

物質	Bhas 42試験 イニシエーション プロモーション		Ames	小核試験	DRP31に 記載
4-Acetylaminofluorene	-	-	+		+
Acid red 14	-	-	-,-	-	+
Ampicillin sodium salt	-	-	-,-		+
Anthracene	-	-	+, -, +/-		+
L-Ascorbic acid	-	-	+/-,-	+	+
Aspartame	-	-	-	-	
Benzoin	-	-	+/-,-, +/-	-	+
Caffeine	-	-	-,-,-	+	+
ε-Caprolactam	-	-	-,-	-,-	+
2-Chloroethanol	-	-	+, +, +/-	-	+
Chromium (Ⅲ) Chloride, anhydrous	-	-	-		+
2,6-Diaminotoluene	-	-	+		+
Diazepam	-	-	-,-		+
N,N-Dimethylformamide	-	-	-,-		+
Eugenol	-	-	-	-,+	+
HC Blue 2	-	-	+		+
Hydrocortisone	-	-			+
D-Mannitol	-	-	-,-	-	+
Methotrexate	-	-	-	+	+
1-Naphthylamine	-	-	+, +, +/-	+, +	+
Phenanthrene	-	-	+, -, +/-		+
Phenol	-	-	-	+	+
p-Phenylenediamine 2HCl	-	-	+		+
Phthalic anhydride	-	-	-,-		+
Rotenone	-	-	-	+	+
Sodium chloride	-	-	-		+
Sodium nitrite	-	-	+, +	-,+ , +	+
Sunset yellow FCF	-	-	-	-	
Thiabendazole	-	-	+	+	+
m-Toluidine	-	-	-		+
Triphenyltin hydroxide	-	-	-,-		+
Barium chloride dihydrate	-	+	-,-		+
tert-Butylhydroquinone	-	+	-,-	-	+
8-Hydroxyquinoline	-	+	+, +	-	+
Propyl gallate	+	+	-,-	+/-	+
Sodium fluoride	-	+	-,-	-,+	+
Tetracycline HCl	-	+	-,-		+

9発がん性不明物質

物質	Bhas 42試験		Ames	小核試験	DRP31に 記載
	イニシエーション	プロモーション			
Sodium valproate	+	+			
Valproic acid	+	+			
2,3-Diaminotoluene	-	+	+		
2,5-Diaminotoluene 2HCl	-	+			
3,4-Diaminotoluene	-	+	+		
Sodium orthovanadate	-	+		-	+
Capsaicin	-	-		-	
Ethidium bromide	-	-		-	
Salicylic acid	-	-			

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

Bhas 42 形質転換試験では Ames試験で陰性の発がん物質を効率よく検出できる

52発がん物質

Ames試験で陰性の幾つかの
発がん物質が陽性

例 methapyrilene HCl
sodium arsenate

偽陰性

Bhas 42

Ames

偽陰性

■: 陽性

□: 陰性

37非発がん物質

Ames試験で陽性の幾つかの
非発がん物質が陰性

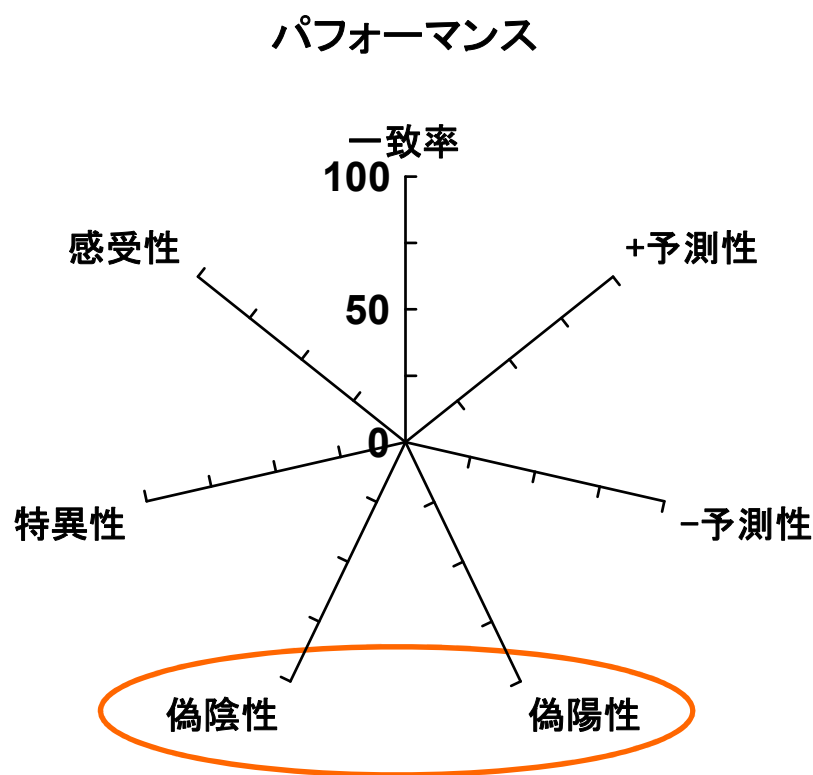
例 1-naphthylamine
sodium nitrite

偽陽性

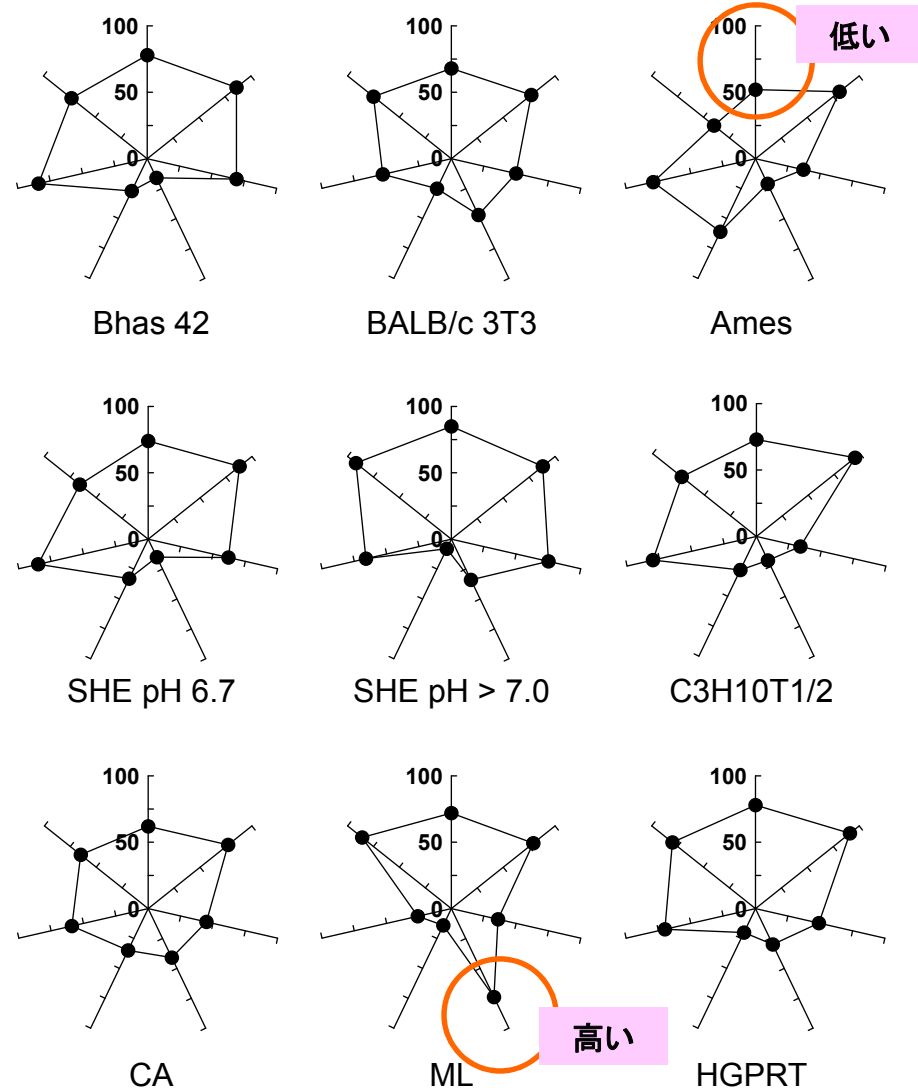
偽陽性

発がん性予測に関する各試験のパフォーマンス比較

(Bhas 42以外のデータはすべてDRP31のデータを使用)



この2つの値が低く、他の5つの値が高い場合、理想の試験と言える



98物質のBhas 42細胞形質転換試験から得られた結論

1. Bhas 42形質転換試験では多くのAmes試験で陰性または不明瞭な発がん物質を検出することができた。
2. これらの物質は主にプロモーション試験で検出された。
3. Bhas 42形質転換試験のパフォーマンスは、他の発がん物質を検出する短期試験と比べ、バランスのとれた試験である。

全バリデーション試験の概要

試験番号	プレート	物質数／ 試験	参加 研究室数	物質数／ 施設
------	------	------------	------------	------------

プレバリデーション(技術移転性と正確性を確認)

1	6ウェル	9	6	3
---	------	---	---	---

バリデーション(再現性と 関連性を確認)

2	6ウェル	12	6	3
---	------	----	---	---

3(1回目)	96ウェル	7	4	4
--------	-------	---	---	---

3(2回目)	96ウェル	16	3	2
--------	-------	----	---	---

全23物質
(重複している物質は除く)

バリデーション試験No. 3(1回目)の結果

施設	2AAF		Anthracene		B[a]P		MCA		Phenanthrene		O-Toluidine		TPA	
	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P
I	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
II	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
III	+	+	-	-	+	-	+	+/-	-	-	-	-	-	+
IV	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
総合評価	+		+		-		-		+		-		+	
In vivo	+		-		+		+		-		+		+	

I: イニシエーション試験、P: プロモーション試験、 はin vivoと一致

バリデーション試験No. 1～3におけるそれぞれの化学物質の評価

物質	試験1		試験2		試験3		総合 評価	In vivo
	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro		
アルキル化剤								
MNNG	- , + , +	- , - , -			+ , +	- , -	+	+
芳香族アミン								
2-Acetylaminofluorene			+ , + , +	+ , + , +	+ , + , + , +	- , + , + , +	+	+
o-Toluidine			- , + , +	- , + , +	- , - , - , -	- , - , - , -	+/-	+
フォルボール								
Phorbol	- , - , -	- , - , +/-			- , -	- , -	-	-
TPA					- , - , - , -	+ , + , + , +	+	+
ステロイド								
Lithocholic acid	- , - , -	+ , + , +	- , - , -	+ , + , +	- , -	+ , +	+	+

各シンボルは1施設の結果を表す、Ini: イニシエーション試験、Pro: プロモーション試験、■ はin vivoと一致

(続き)

物質	試験1		試験2		試験3		総合 評価	In vivo
	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro		
芳香族炭化水素								
Anthracene	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,+	-,-,-,+	-,-,-,-	-	-
Phenanthrene					-,-,-,-	-,-,-,-	-	-
Benz[a]anthracene	+,+,+	-,+,+					+	+
Benzo[a]pyrene	+,+,+	-,-,-			+,+,+,+,+,+	-,-,-,-,-,-	+	+
Dibenzo[a,h]anthracene			+,+,+	-,-,-	+,+	-,-	+	+
3-Methylcholanthrene					+,+,+,+,+	-,-,-,-	+	+
Pyrene	+,+,+	-,+,+			+,+	+,+	+	-
抗生物質								
Ampicillin sodium					-,-	-,-	-	-
アルカロイド								
Caffeine			-,-	-,-,-	-,-	-,-	-	-

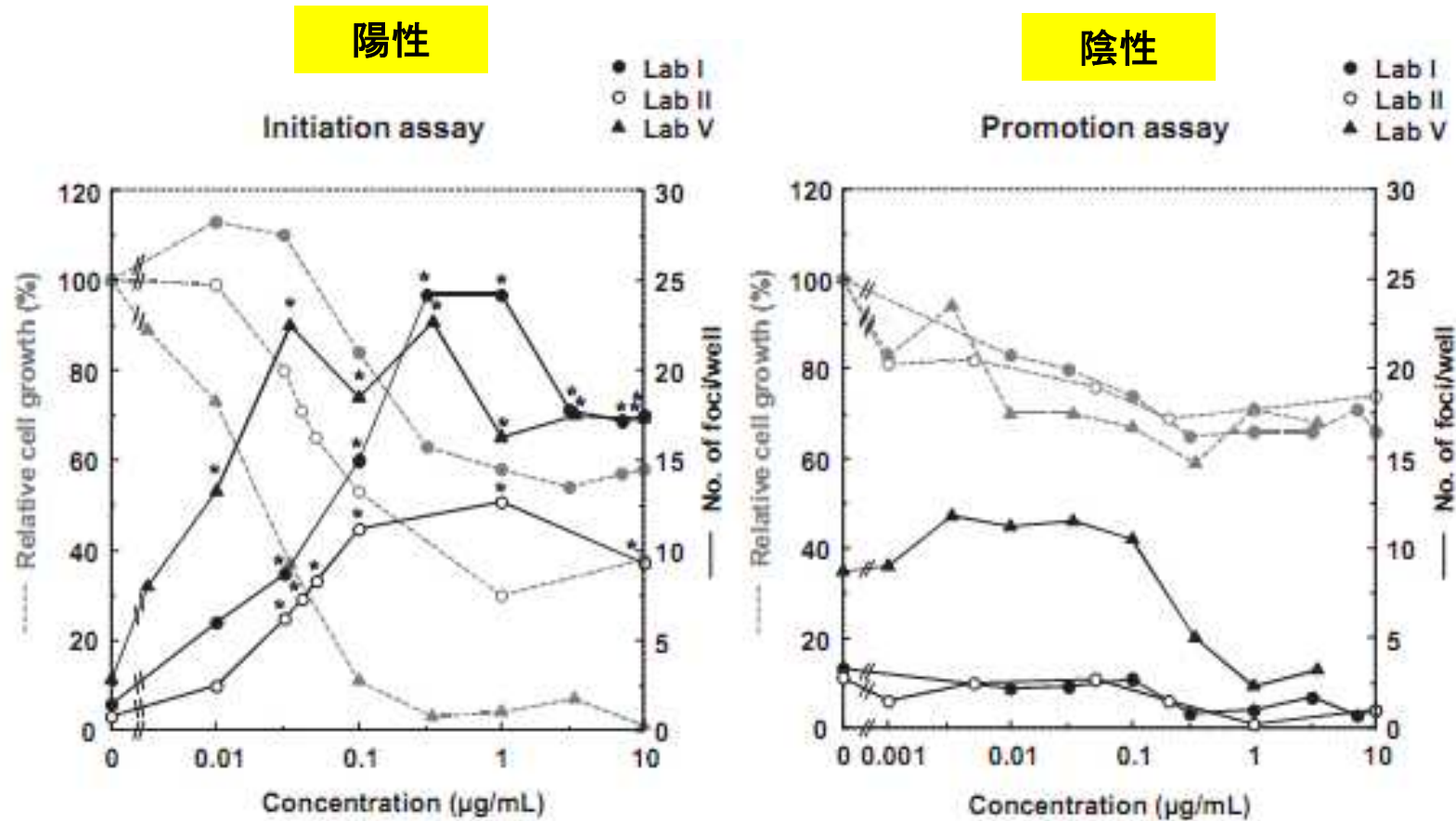
(続き)

物質	試験1		試験2		試験3		総合 評価	In vivo
	Ini	Pro	Ini	Pro	Ini	Pro		
無機物質								
Cadmium chloride			-,-,-	+,+,+	-,-	+,+	+	+
Sodium arsenite			-,+	+,+,+	-,-	-,-	+/-	+
その他								
L(+)-Ascorbic acid			-,-,-	-,-,-	-,-	-,-	-	-
Eugenol					-,-	-,-	-	-
D(-)-Mannitol			-,-,-	-,-,-	-,-	-,-	-	-
Methapyrilene HCl	-,-,+	+,+,+	-,-,-	+,+,+	-,-	+,+	+	+
Mezerein	-,-,-	+,+,+	-,+/-,-,+/-	+,+,+	+,+	+,+	+	+
ε-Caprolactam (< 5 mM)					-,-	-,-	-	-
ε-Caprolactam (> 10 mM)					+,+	-,-	+	-

Tanaka N et al. AATEX. (2009) 14:831–848.

Sakai A et al. Mutat Res. (2011) 725:57–77.

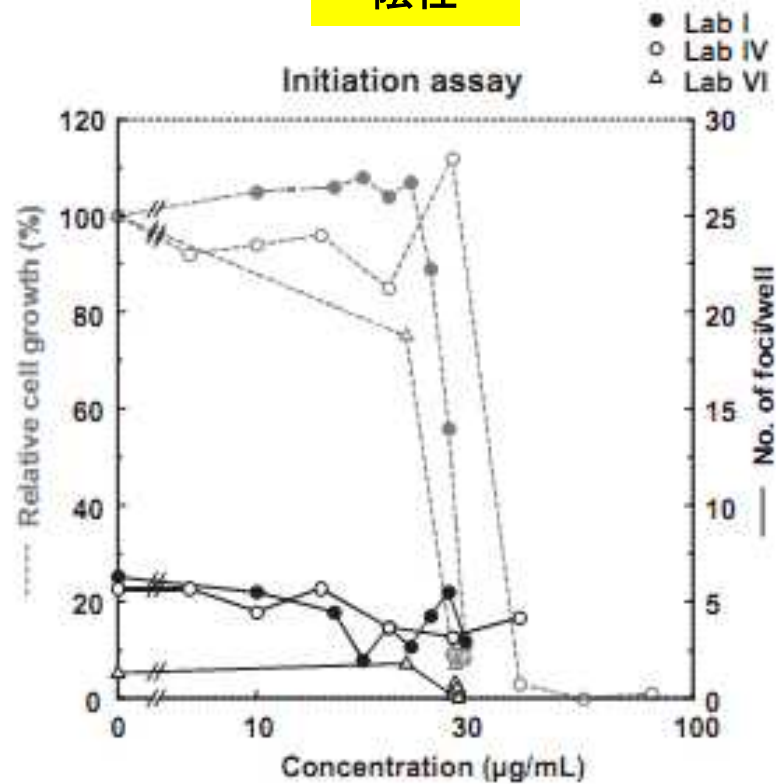
バリデーション試験No. 2でのdibenz[a,h]anthraceneの結果(例)



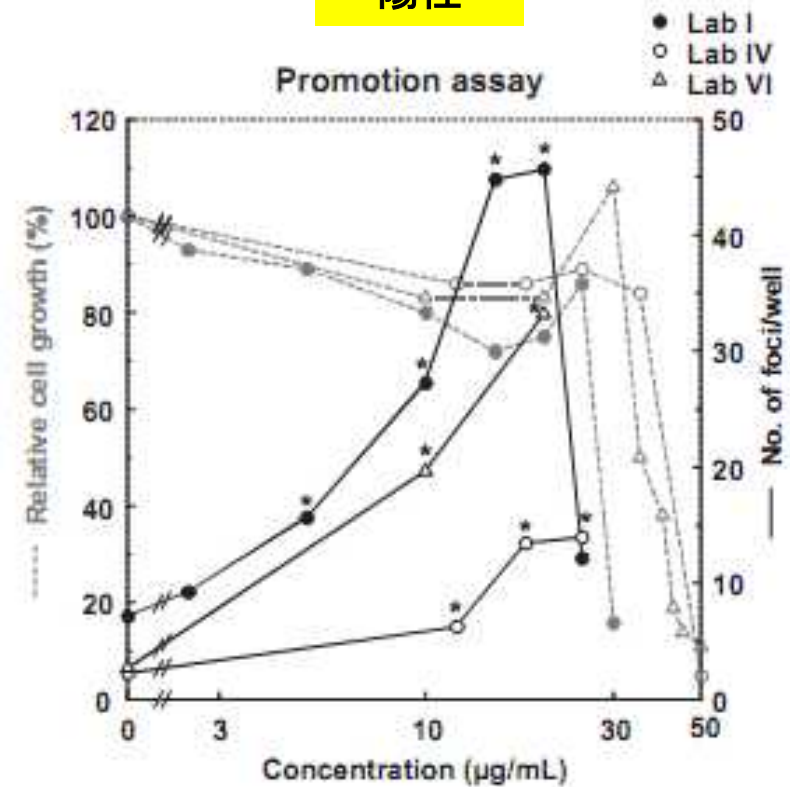
Sakai A et al. Mutat Res. (2011) 725:57-77.

バリデーション試験No. 2でのlithocholic acidの結果(例)

陰性



陽性



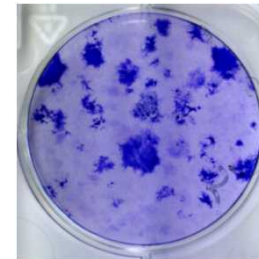
Sakai A et al. Mutat Res. (2011) 725:57-77.

発がん物質検索に関する Bhas 42細胞形質転換試験の有用性(1)

動物を用いない低コスト短期試験



動物(ラット、マウス)



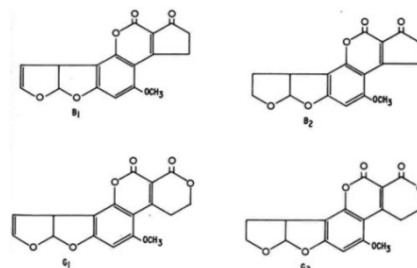
Bhas 42細胞

動物数	150～300	0
試験期間	2～3年(一生涯試験)	< 1ヶ月
費用	> 200万ドル	< 1万ドル

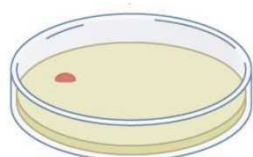
発がん物質検索に関する
Bhas 42細胞形質転換試験の有用性(2)

1. 6ウェル、96ウェルのどちらも用いることができる。
2. 96ウェル法は、ハイスループット化が可能である。
3. Bhas 42細胞形質転換試験は、2つのプロトコールを使い分けることで、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質を分別して検出できる。

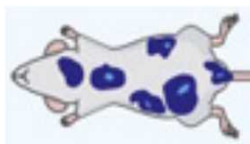
Bhas 42細胞形質転換試験はどのように利用されるか？



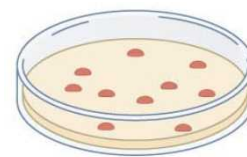
構造活性相関などの情報から発がん性が予測される物質のスクリーニング



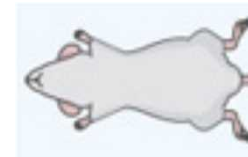
だが



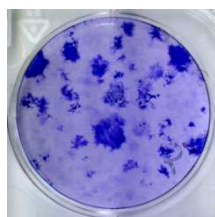
非遺伝毒性発がん物質のスクリーニング



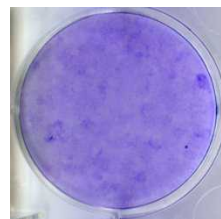
だが



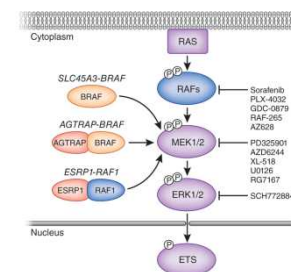
遺伝毒性非発がん物質のスクリーニング



TPA + 物質X



抗発がん物質のスクリーニング



発がんメカニズム研究