

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験（プロモーション試験）報告書

試験番号 7501

本 文

本文目次

[項目]	[ページ]
1. 要約	1
2. 試験材料	
2-1. 被験物質	2
2-2. 陽性対照	3
2-3. 陰性(溶媒)対照	4
2-4. 使用した細胞	4
3. 試験方法	
3-1. 採用した試験方法	5
3-2. 試験構成	5
3-3. プロモーション試験	5
3-4. 観察	6
3-5. 判定	7
4. 試験成績	
4-1. プロモーション試験	8
5. 結果の判定	9
6. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 及び試験計画書に従わなかったこと	9
7. 参考文献	10
試験結果 表 1～3	11
試験結果 図 1～3	14

1. 要約

3,4-ジメチルフェノールの Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験（プロモーション試験）を実施し、*in vitro* の発がんプロモーション作用を評価した。

形質転換試験の用量設定のための細胞増殖試験は、最高用量を 10 mM（約 1.3 mg/ml）とし、公比 2、10 用量段階で実施した。その結果、陰性（溶媒）対照群に対する相対細胞増殖率は 1.3、2.5、5.0、10 mM の用量でそれぞれ、97、50、1.9、3.9%を示し、2.5 mM 以上の用量では強い細胞毒性が認められた。また、位相差顕微鏡による細胞観察により、1.3 mM の用量では部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度であることが確認された。細胞増殖試験において位相差顕微鏡による細胞観察でコンフルエントよりも少ない細胞密度を示す用量は、形質転換試験に用いた場合に形質転換巣の観察ができない可能性が高いため、形質転換試験の最高用量は 1.3 mM に近い 1.2 mM とし、公比 2、7 用量段階に設定した。

形質転換試験を実施した結果、ウェルあたりの平均形質転換巣数（形質転換率）は 0.038、0.075、0.15 mM の各用量でそれぞれ、16.2、16.3、19.3 であり、陰性（溶媒）対照群と比較して統計学的に有意な増加を示した。一方、0.60、1.2 mM の各用量の形質転換率は 0.7、1.3 であり、有意な減少を示した。また、陰性（溶媒）対照群に対する相対細胞増殖率は、0.019、0.038、0.075、0.15、0.30、0.60、1.2 mM の用量でそれぞれ、102、101、84、89、104、102、87%であった。

なお、試験成立の判定基準（陰性（溶媒）対照群の形質転換率が 12 個/ウェル未満、陽性対照群の形質転換巣数が有意に高い、被験物質処理群の統計処理対象群が 4 濃度以上）は、全て満たされていた。

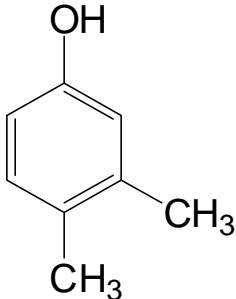
形質転換試験（プロモーション試験）において、連続した 3 用量の被験物質処理群で、陰性（溶媒）対照群と比較して形質転換率が統計学的に有意な増加を示した。かつ、試験成立の判定基準は全て満たされており、試験は成立したものと判断した。

以上の結果より、本被験物質の Bhas 42 細胞に対する *in vitro* での発がんプロモーション作用は陽性と判定した。

2. 試験材料

2-1. 被験物質(被験物質番号：4374)

1) 被験物質の性質

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	3,4-ジメチルフェノール					
別 名	3,4-キシレノール					
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)						
試験に供した 化学物質の純度	99.5% (キャピラリー-GC)	試験に供した化学 物質のロット番号	PDE4787			
不純物の名称及び 濃度(含有率)	-					
C A S 番 号	95-65-8	蒸 気 圧	-			
分 子 量	122.16	分 配 係 数 (1-オクタノール/水分配係数)	2.23			
融 点	65.8	常 温 に お け る 性 状	褐色、結晶または塊			
沸 点	225 ~ 227					
安 定 性	水： - 光： 光により変質するおそれがある 熱： -					
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の 安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の 安定性
	水	約 26 mg/ml 未満*	-	DMSO	約 260 mg/ml 以上*	-
	エタノール	溶けやすい	-	その他()	-	-
供 試 元	和光純薬工業株式会社					

* 日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2) 保管及び取り扱い

被験物質は、被験物質保管区域で冷蔵、遮光条件下にて保管した。被験物質の取扱いは、黄色灯下で行った。

3) 被験物質の調製

使用溶媒

名称： ジメチルスルホキシド(DMSO)
製造元： 和光純薬工業(株)
Lot No.： AWF1092
純度： 100.0%

溶媒選択の理由

被験物質は、水に対して試験に用いるのに十分な溶解度を示さなかった(水: 約 26 mg/ml 未満)。しかし、DMSO に対しては、約 260 mg/ml 以上の溶解度を示し、培地に対して 0.5 vol%の添加量で試験に用いることが可能であった。また、被験物質に DMSO を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化が認められなかった。以上のことから DMSO を溶媒として選択した。

被験物質溶液の調製

被験物質を秤量し、DMSO を添加したものを最高調製溶液とした。これを DMSO で段階希釈して各被験物質溶液を調製した。調製作業は、黄色灯下で行った。被験物質溶液の調製は用時調製とした。

被験物質溶液の処理

必要量の培養液を 50 ml チューブに取り、攪拌しながら被験物質溶液を添加(最終濃度 0.5%)した(被験物質培養液)。細胞への処理はプレートの培養液を抜き、ただちに被験物質培養液を添加することにより行った。処理作業は、黄色灯下で行った。

純度換算

被験物質の純度が 95%以上であるため、純度換算は実施しなかった。

2-2 . 陽性対照

1) 陽性対照物質

名称： 12-*O*-テトラデカノイルフォルボール-13-アセテート(TPA)
ロット番号： SLBS0478V
純度： 100%
製造元： Sigma-Aldrich 社

2) 陽性対照物質の選択理由

TPA は Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験にプロモーターとして広く使用されており、日本バイオアッセイ研究センターの背景データも豊富なため。

3) 陽性対照物質溶液の調製、保存について

所定の濃度の DMSO 溶液を調製、分注して、-30 以下で凍結保存し、調製後 1 年以内に用時解凍して用いた。凍結保存溶液は、使用直前に解凍して用いた。

使用溶媒： DMSO(和光純薬工業(株)、Lot No.: AWF1092、純度:100.0%)

最終濃度： 50 ng/ml

2-3 . 陰性(溶媒)対照

陰性(溶媒)対照として、DMSO を培養液に添加した。培地への添加液量は、0.5 vol%とした。

2-4 . 使用した細胞

1) 種類

Bhas 42(マウス全胎児由来 BALB/c 3T3 A31-1-1 に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入した細胞)¹⁾

2) 供給源

一般財団法人 食品薬品安全センターより入手(2017 年 3 月 3 日、入手時 17 代)

3) 保存条件

液体窒素中で保存(19 代)

4) 培養条件

ウシ胎児血清(FBS、ロット番号：S11605S1780、Biowest 製)を 5 vol%、ペニシリンを 50 U/ml、ストレプトマイシン 50 µg/ml を含む Dulbecco's modified Eagle's medium/ Ham's F12 (Life Technologies)を培養液(DF5F)として用い、37 °C、5%CO₂の条件下で培養した。

5) 特性

接触阻止能を維持している。マイコプラズマの汚染は無い。

6) 選択理由

形質転換試験に常用されている²⁻⁵⁾。

7) 使用条件

凍結保存した細胞(19 代)を解凍して、細胞増殖試験では解凍してから継代数 10 代以内の細胞を用いた。形質転換試験では解凍してから継代数 2 代以内の細胞を用いた。

3. 試験方法

3-1. 採用した試験方法

「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」(平成 26 年 7 月 4 日、厚生労働省第 3 回遺伝毒性評価ワーキンググループ合意事項)に準拠して実施した。

3-2. 試験構成

形質転換試験の用量設定のために細胞増殖試験を実施した後に、形質転換試験を実施した。形質転換試験はプロモーション試験のみ実施した。

3-3. プロモーション試験

3-3-1. 用量設定のための細胞増殖試験

細胞増殖試験は、各用量 3 ウェルを用いて実施した。試験は最高用量を 10 mM(約 1.3 mg/ml)とし、公比 2、10 用量段階で実施した。細胞増殖試験の対照として陰性(溶媒)対照を設け、吸光度の補正のためにブランクを設けた。

実験方法

細胞は 0.25%トリプシンを用いて剥離した後、細胞濃度 0.7×10^4 個/ml の懸濁液とした。この細胞懸濁液 2 ml(1.4×10^4 個)を 6 ウェルプレートに分注(3 ウェル/群)した。播種 4 日後に培養液を被験物質または溶媒を含む培養液 2ml に交換した。播種 7 日後に 10%ホルマリンで固定し、水洗、乾燥して 0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。乾燥後、2.0 ml の色素抽出液(50%エタノール及び 0.02 N 塩酸を含む)でクリスタルバイオレットを抽出後、0.1 ml を 96 ウェルプレートに移し、550 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。次の式により各処理群での相対細胞増殖率(%)を求めた。

$$X(\%) = (T - B) / (S - B) \times 100$$

X：被験物質処理群の相対細胞増殖率(%)

S：陰性(溶媒)対照群の吸光度

T：被験物質処理群の吸光度

B：ブランクの吸光度(培養液のみを入れたウェル)

3-3-2 . 形質転換試験

形質転換試験は、形質転換用に各用量 6 ウェル、細胞増殖率測定用に 3 ウェルを用いて実施した。用量設定のための細胞増殖試験の結果に基づき、形質転換試験は最高用量を 1.2 mM とし、公比 2、7 用量段階で実施した。形質転換試験の対照として陰性(溶媒)対照及び陽性対照を設け、細胞増殖率測定 of 吸光度の補正のためにブランクを設けた。なお、TPA の培地における溶媒(DMSO)濃度は、被験物質の溶媒(DMSO)濃度(0.5 vol%)と一致させた。

実験方法

細胞は 0.25%トリプシンを用いて剥離した後、細胞濃度 0.7×10^4 個/ml の懸濁液とした。この細胞懸濁液 2 ml(1.4×10^4 個)を 6 ウェルプレートに分注し、それぞれ形質転換試験(6 ウェル/群)及び細胞増殖率測定(3 ウェル/群)用とした。播種 4 日後に培養液を被験物質、陽性対照物質または溶媒を含む培養液と交換した。形質転換試験用の細胞は、播種 7 日後、播種 10 日後に被験物質、陽性対照物質または溶媒を含む培養液と交換し、播種 14 日後に新鮮培養液に交換した。播種 21 日後にエタノールで固定した後、5 vol%ギムザ液で染色し、各ウェルの形質転換巣を数えた。細胞増殖率測定用の細胞は、播種 7 日後 10%ホルマリンで固定後、細胞増殖試験と同様の操作を行った。

3-4 . 観察

1) 形質転換巣観察

実体顕微鏡を用いて細胞を観察し、次の基準により形質転換巣であると判定したのについて、その数を数えた。なお、プレートをコード化し、処理条件が判らない状況で観察した。

形質転換巣を構成する細胞数が 100 個以上。

紡錘形をしている(spindle-shaped)。

細胞質が塩基性(濃い紫色)に強く染まっている(basophilic)。

ランダムな配列で互いに交差している(criss-cross)。

積み重なりあっている(piling-up)。

周辺部の単層の細胞へ浸潤している(invasive)。

- の所見が全部揃わなくても、一部著しければ形質転換巣と判定した。形質転換巣の数は、それぞれのウェルごとに記録した。

2) 結果の表示

相対細胞増殖率(%)

ウェルごとの形質転換巢の数

ウェルあたりの平均形質転換巢の数(形質転換率)

3-5. 判定

1) 統計処理対照群

以下に示す基準を満たした群について統計処理を行った。

細胞増殖試験用のプレートでは2ウェル以上が測定可能である。

形質転換試験用のプレートでは5ウェル以上が計数可能である。

2) 結果の解析

各被験物質処理群と陰性(溶媒)対照群間において Dunnett 検定を行った(有意水準 $\alpha=0.05$ 、片側)。また、陽性対照群と陰性(溶媒)対照群間において Student の t 検定を行った(有意水準 $\alpha=0.05$ 、片側)。

3) 試験成立の判定

以下の基準が全て満たされた場合、結果を評価できる試験が成立したと考えた。

陰性(溶媒)対照群の形質転換率が12個/ウェルを越えていない。

陽性対照群の形質転換巢数が有意に高い。

被験物質処理群において以下の条件を含む統計処理対象群が4濃度以上ある。ただし、大きくこの条件から外れない限り、処理濃度は適正であったと考える。

a) 細胞増殖の促進が見られた場合、少なくとも、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2濃度ある。

b) 細胞増殖の阻害が見られた場合、少なくとも、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 IC_{50} の間に2濃度ある。

4) 結果の判定

3)の「試験成立の判定」により試験が成立した場合、被験物質群の統計処理を実施した群において、以下の基準によって結果を判定した。

陰性：形質転換率の統計学的に有意な増加が、全ての群で認められない。

陽性：形質転換率の統計学的に有意な増加が、連続した2濃度以上で認められる。

疑陽性：形質転換率の統計学的に有意な増加が、1 濃度または不連続な 2 濃度以上で認められる。

最終的な判定は、統計学的検定、背景データ、形質転換巢の誘発率を考慮し、生物学的な観点からの判断を加味して総合的に評価した⁶⁾。

4. 試験成績

4-1. プロモーション試験

4-1-1. 用量設定のための細胞増殖試験

細胞増殖試験の結果を表 1 と図 1 に示した。細胞増殖試験は最高用量を 10 mM とし、公比 2、10 用量段階で実施した。その結果、陰性(溶媒)対照群に対する相対細胞増殖率は 1.3、2.5、5.0、10 mM の用量でそれぞれ、97、50、1.9、3.9%を示し、2.5 mM 以上の用量では強い細胞毒性が認められた。また、位相差顕微鏡による細胞観察により、1.3 mM の用量では部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度であることが確認された。細胞増殖試験において位相差顕微鏡による細胞観察でコンフルエントよりも少ない細胞密度を示す用量は、形質転換試験に用いた場合に形質転換巢の観察ができない可能性が高いため、形質転換試験の最高用量は 1.3 mM に近い 1.2 mM とし、公比 2、7 用量段階に設定した。

4-1-2. 形質転換試験

形質転換試験の結果を表 2、3 と図 2 に示した。形質転換試験は最高用量を 1.2 mM とし、公比 2、7 用量段階で実施した。試験の結果、ウェルあたりの平均形質転換巢数(形質転換率)は 0.038、0.075、0.15 mM の各用量でそれぞれ、16.2、16.3、19.3 であり、陰性(溶媒)対照群と比較して統計学的に有意な増加を示した。一方、0.60、1.2 mM の各用量の形質転換率は 0.7、1.3 であり、有意な減少を示した。また、陰性(溶媒)対照群に対する相対細胞増殖率は、0.019、0.038、0.075、0.15、0.30、0.60、1.2 mM の用量でそれぞれ、102、101、84、89、104、102、87%であった。

1.2 mM の用量では、3 日間の被験物質処理後の細胞を位相差顕微鏡で観察した際、部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度であることが確認された。10 日間処理後には、さらに細胞密度が減少した可能性があり、減少した細胞密度は、処理後に被験物質を含まない培養液での 7 日間培養の期間にコンフルエントまで回復したと推測された。形質転換巢は、細胞密度がコンフルエントに達した後に形成されるため、1.2 mM の用量では、

形質転換巢の形成が遅延していたと推測される。0.60 mM の用量においても同様の影響があった可能性が考えられる。

なお、試験成立の判定基準（陰性(溶媒)対照群の形質転換率が 12 個 / ウェル未満、陽性対照群の形質転換巢数が有意に高い、被験物質処理群の統計処理対象群が 4 濃度以上）は、全て満たされていた。

5. 結果の判定

形質転換試験(プロモーション試験)において、連続した 3 用量の被験物質処理群で、陰性(溶媒)対照群と比較して形質転換率が統計学的に有意な増加を示した。かつ、試験成立の判定基準は全て満たされており、試験は成立したものと判断した。

以上の結果より、本被験物質の Bhas 42 細胞に対する *in vitro* での発がんプロモーション作用は陽性と判定した。判定が陽性となったため、陰性(溶媒)対照群、陽性対照群、被験物質処理群のプレートの中から代表的なウェルを選び、図 3 に示した。

6. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態は発生しなかった。また、計画書に従わなかった事態は発生しなかった。

7. 参考文献

- 1) Sasaki, K. et al.: Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, Jpn. J. Cancer Res. 79 (1988) 921-930.
- 2) Ohmori, K. et al.: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, Mutat. Res. 557 (2004) 191-202.
- 3) Ohmori, K. et al.: An inter-laboratory collaborative study by the non-genotoxic carcinogen study group in Japan, on a cell transformation assay for tumor promoters using Bhas 42 cells, Altern. Lab. Animal 33 (2005) 619-639.
- 4) 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. 702 (2010) 100-122.
- 5) Sakai, A. et al.: An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity, Mutat. Res. 725 (2011) 57-77.
- 6) OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2016 Guidance document on the in vitro Bhas 42 cell transformation assay. Series on Testing and Assessment No. 231, 08 Jan-2016. Available at [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO\(2016\)1.pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO(2016)1.pdf) [accessed 19 Dec 2016].

表1 3,4-ジメチルフェノールの細胞増殖試験結果

用量 (mM)	吸光度 (OD ₅₅₀)						相対細胞増殖率 ^{b)} (% of control)
	Well 1	Well 2	Well 3	平均値	SD	-ブランク ^{a)}	
ブランク	0.049	0.048	0.048	0.048	0.001	0.000	-
0 (0.5% DMSO)	0.407	0.414	0.409	0.410	0.004	0.362	100
0.020	0.425	0.459	0.452	0.445	0.018	0.397	110
0.039	0.443	0.442	0.433	0.439	0.006	0.391	108
0.078	0.450	0.446	0.434	0.443	0.008	0.395	109
0.16	0.442	0.426	0.441	0.436	0.009	0.388	107
0.31	0.390	0.363	0.379	0.377	0.014	0.329	91
0.63	0.412	0.409	0.417	0.413	0.004	0.365	101
1.3	0.400	0.410	0.385	0.398	0.013	0.350	97[※]
2.5	0.245	0.203	0.235	0.228	0.022	0.180	50
5.0	0.057	0.055	0.053	0.055	0.002	0.007	1.9
10	0.065	0.061	0.060	0.062	0.003	0.014	3.9

a) 各群の吸光度の平均からブランクの吸光度の平均を引いた

b) それぞれの陰性(溶媒)対照群の吸光度に対する各処理群の吸光度のパーセンテージを示した

※ 細胞毒性により、位相差顕微鏡観察で部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度を示した

表2 3,4-ジメチルフェノールの形質転換試験(細胞増殖率)結果

用量 (mM)	吸光度 (OD ₅₅₀)						相対細胞増殖率 ^{b)} (% of control)
	Well 1	Well 2	Well 3	平均値	SD	-ブランク ^{a)}	
ブランク	0.059	0.058	0.059	0.059	0.001	0.000	-
0 (0.5% DMSO)	0.519	0.519	0.488	0.509	0.018	0.450	100
0.019	0.508	0.513	0.528	0.516	0.010	0.457	102
0.038	0.519	0.508	0.514	0.514	0.006	0.455	101
0.075	0.421	0.449	0.441	0.437	0.014	0.378	84
0.15	0.450	0.505	0.426	0.460	0.041	0.401	89
0.30	0.525	0.557	0.503	0.528	0.027	0.469	104
0.60	0.511	0.509	0.540	0.520	0.017	0.461	102
1.2	0.430	0.432	0.485	0.449	0.031	0.390	87[*]
TPA (50 ng/ml)	0.659	0.646	0.610	0.638	0.025	0.579	129

a) 各群の吸光度の平均からブランクの吸光度の平均を引いた

b) それぞれの陰性(溶媒)対照群の吸光度に対する各処理群の吸光度のパーセンテージを示した

* 細胞毒性により、位相差顕微鏡観察で部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度を示した

表3 3,4-ジメチルフェノールの形質転換試験結果

用量 (mM)	形質転換巢数								相対細胞増殖率 ^{b)} (% of control)
	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	平均値 ^{a)}	SD	
0 (0.5% DMSO)	8	9	10	9	9	10	9.2	0.8	100
0.019	12	11	10	15	12	12	12.0	1.7	102
0.038	13	11	14	23	19	17	16.2[*]	4.4	101
0.075	20	14	18	19	14	13	16.3[*]	3.0	84
0.15	19	20	15	22	19	21	19.3[*]	2.4	89
0.30	12	20	13	12	10	9	12.7	3.9	104
0.60	0	2	0	0	1	1	0.7[*]	0.8	102
1.2	1	1	2	1	2	1	1.3[*]	0.5	87 [✱]
TPA (50 ng/ml)	27	32	29	21	27	28	27.3[#]	3.6	129

a) 結果の解析として、被験物質処理群ではDunnett検定、陽性対照のTPA処理群ではStudentのt検定を実施した

Dunnett検定($\alpha=0.05$ 、片側)：陰性(溶媒)対照群に対して有意差を示した場合、平均値の右上に*を付した

Studentのt検定($\alpha=0.05$ 、片側)：陰性(溶媒)対照群に対して有意差を示した場合、平均値の右上に#を付した

b) それぞれの陰性(溶媒)対照群の吸光度に対する各処理群の吸光度のパーセンテージを示した

✱ 細胞毒性により、位相差顕微鏡観察で部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度を示した

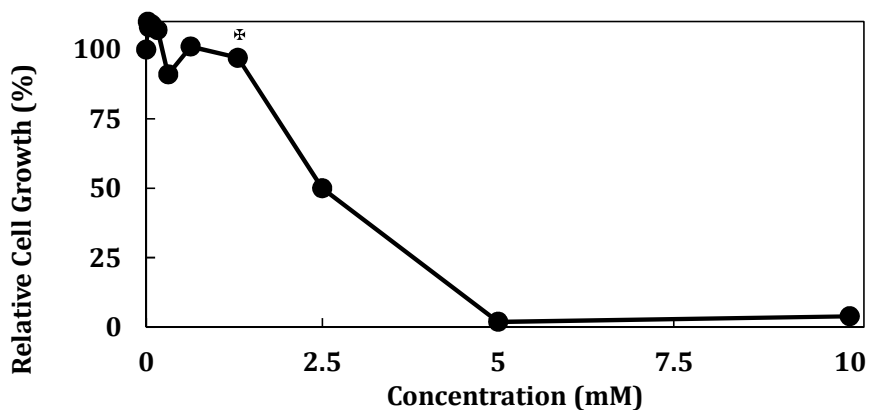


図1 3,4-ジメチルフェノールのBhas 42細胞における細胞増殖試験の結果

※ 細胞毒性により、位相差顕微鏡観察で部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度を示した

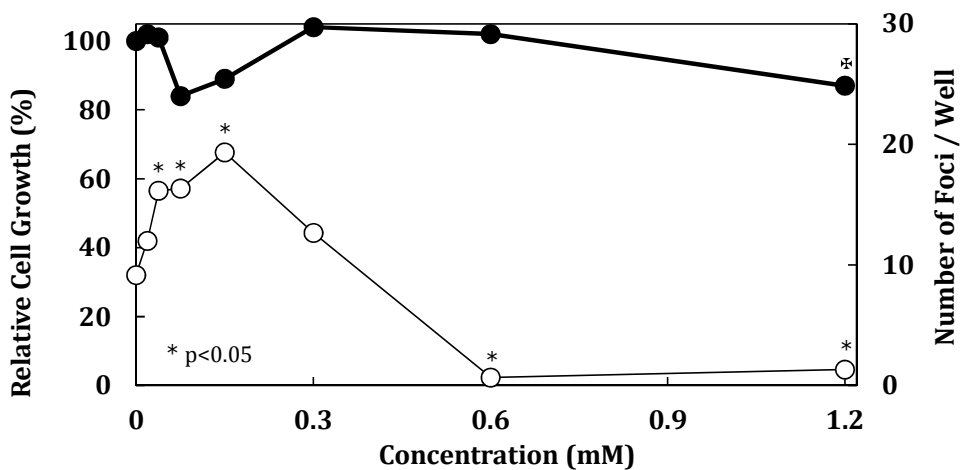


図2 3,4-ジメチルフェノールのBhas 42細胞における形質転換試験の結果

※ 細胞毒性により、位相差顕微鏡観察で部分的にコンフルエントよりも少ない細胞密度を示した

● : 相対細胞増殖率(%), ○ : 形質転換巢数/ウェル

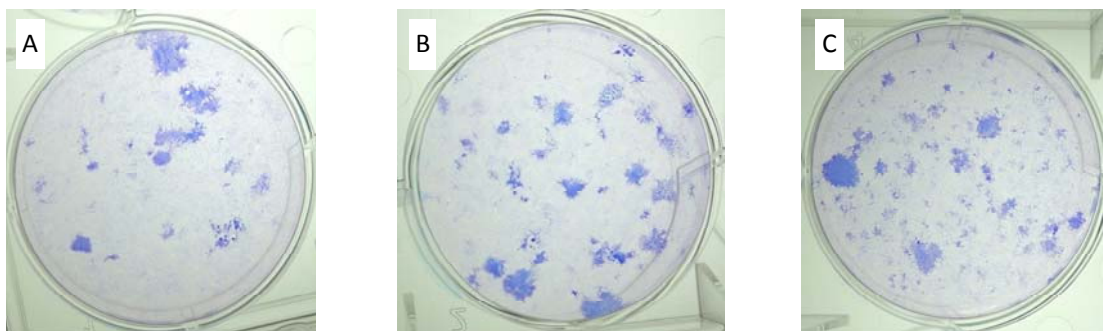


図3 染色したBhas 42細胞の代表的ウェル

A: 陰性(溶媒)対照群, B: 陽性対照群, C: 3,4-ジメチルフェノール 0.15 mM