

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 年度第 3 回 WG 合意事項)

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験には、一般にはイニシエーション試験とプロモーション試験があるが、この基準ではプロモーション試験についてのみ規定する。

【注】この試験基準は、厚生労働省の委託事業において使用するものである。

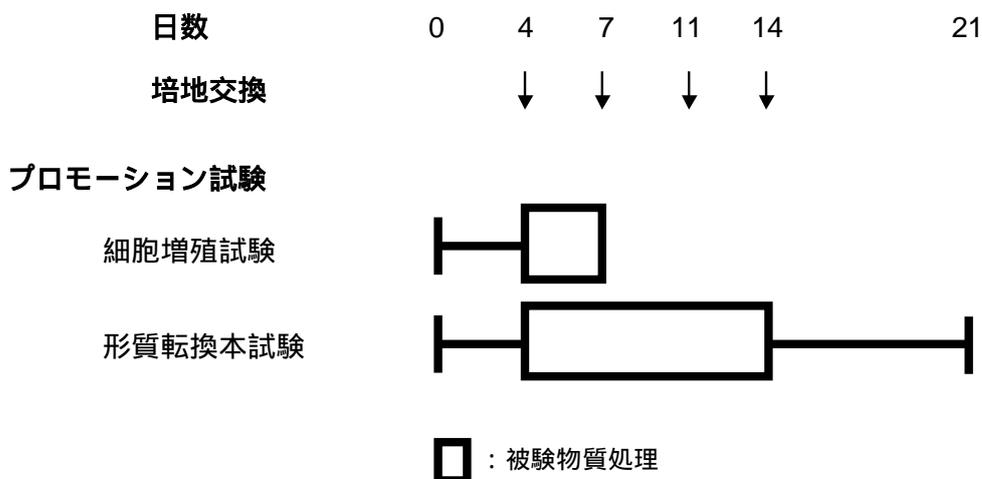
事業の仕様書には、試験基準そのものは記載されておらず、別途厚生労働省担当官が示す試験基準（遺伝毒性評価 WG で作成した試験基準）に基づいて試験を実施すべき旨が規定されている。

1 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験の種類

- (1) プロモーション試験（以下「試験」という。）は非遺伝毒性発がん物質を検索するための試験であり、細胞の定常期に処理するものである。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 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。

2 Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験の方法

- (1) 試験は、細胞播種後 4～14 日の 10 日間、被験物質で処理する。
- (2) 細胞増殖試験は、細胞播種後 7 日間培養し、固定染色する。
- (3) 形質転換本試験は、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 又は 10 mM のいずれか低い用量とする。
- (2) 形質転換本試験では、適切な間隔で 4 段階以上の濃度を設定することとし、具体的には次のとおりとする。

ア 細胞増殖を促進させる被験物質の場合、原則として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。

イ 細胞増殖を阻害する被験物質の場合、原則として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 1 濃度。

5 対照物質

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 TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) を用いる。

6 使用ウェルの数

6 ウェルプレートを使用し、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。

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) 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。

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の判定ができない場合には、適切な試験条件で確認試験を実施する。