

JaCVAM 第2回ワークショップ

形質転換試験のバリデーション研究

酒井綾子

食品薬品安全センター

秦野研究所

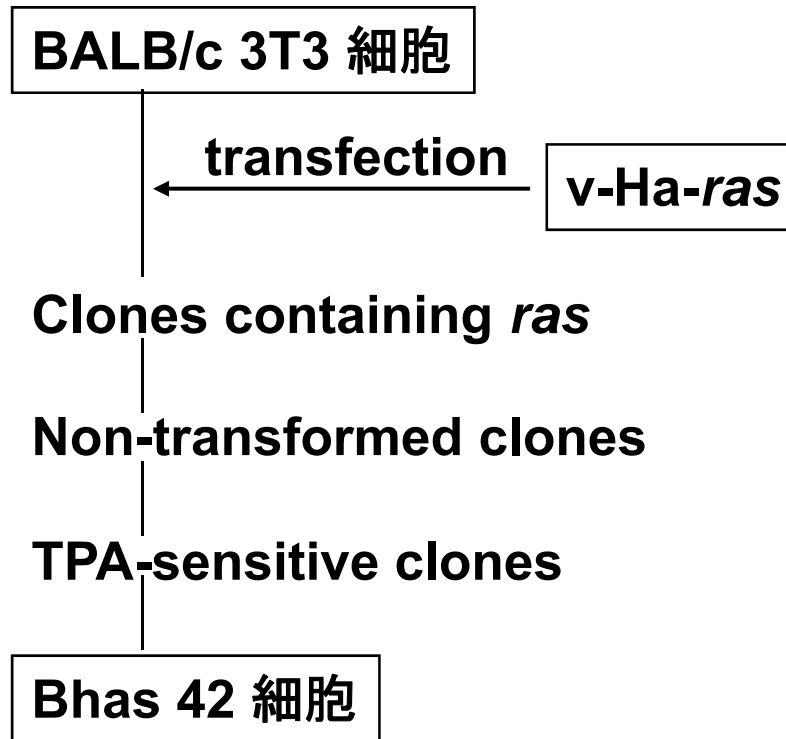
2009.4.17

概要

Bhas 42 細胞形質転換試験

- 1) 試験法
- 2) 従来法との感受性の比較
- 3) 試験法の特性とパフォーマンス
- 4) OECDガイドライン化を目指したバリデーション研究

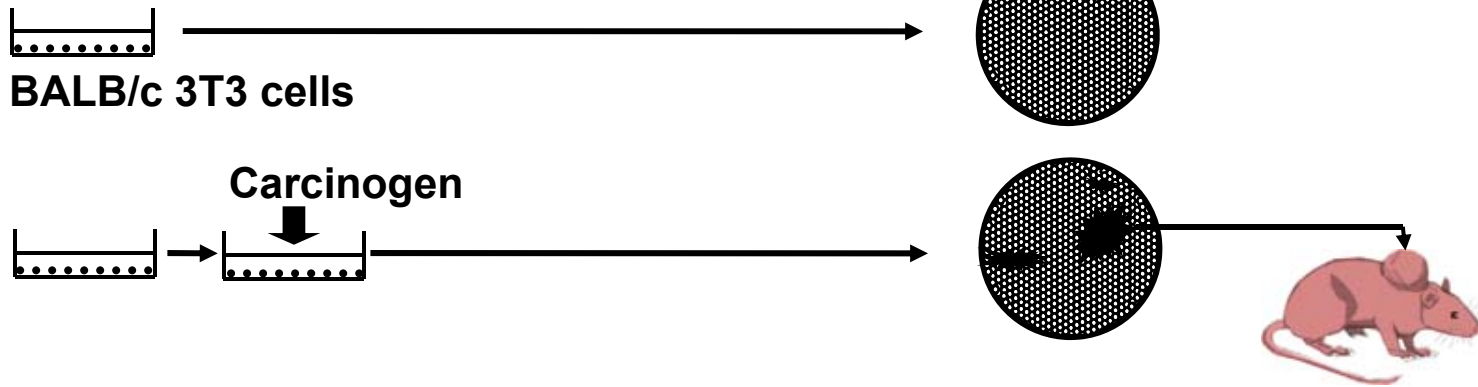
Bhas 42 細胞形質轉換試驗



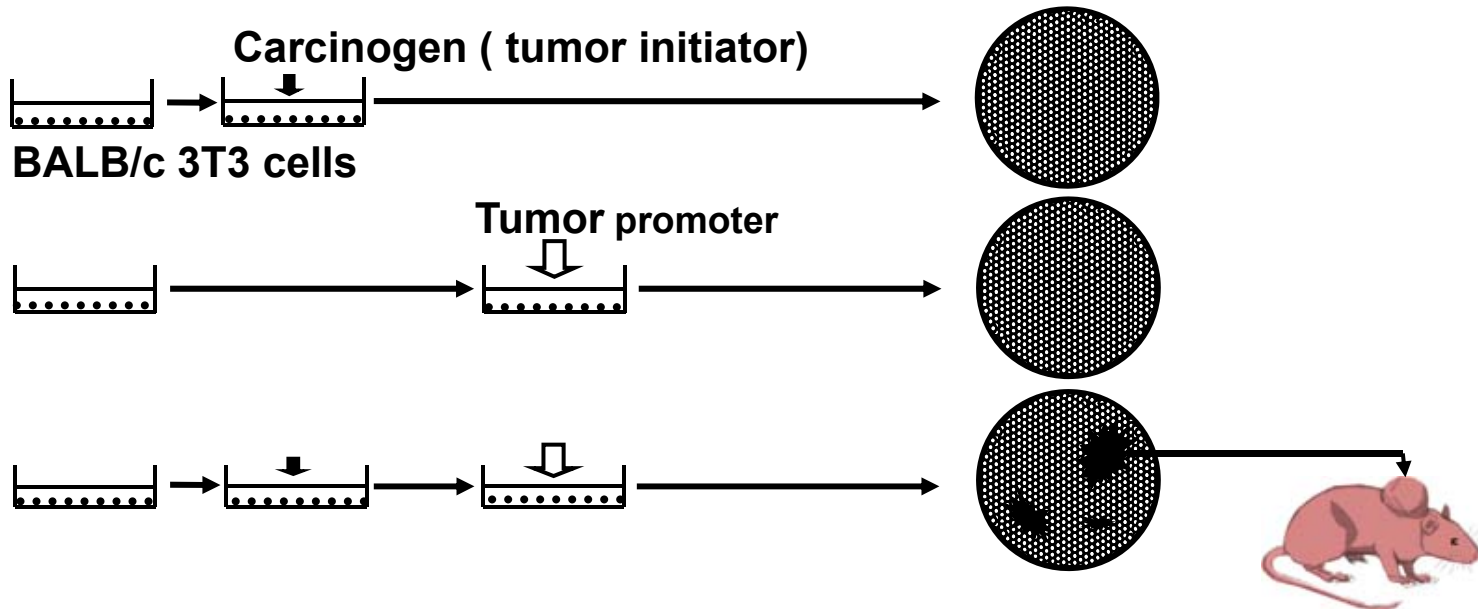
Bhas 42 細胞

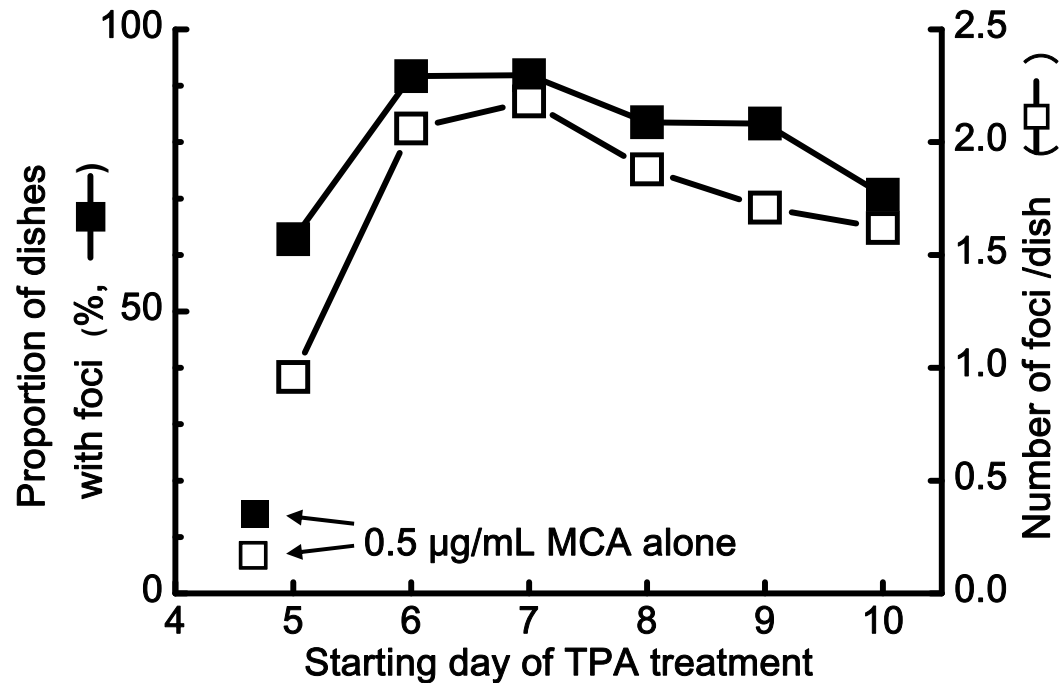
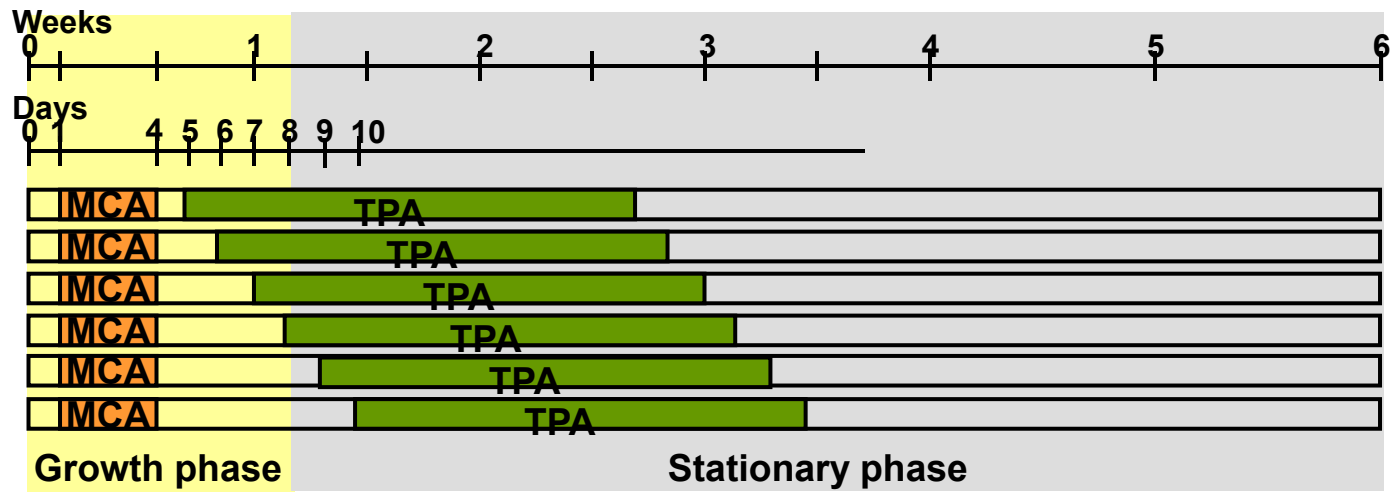
[Sasaki et al., Jpn. J. Cancer Res., 79 (1988), 921-930]

スタンダード形質転換試験



2段階形質転換試験



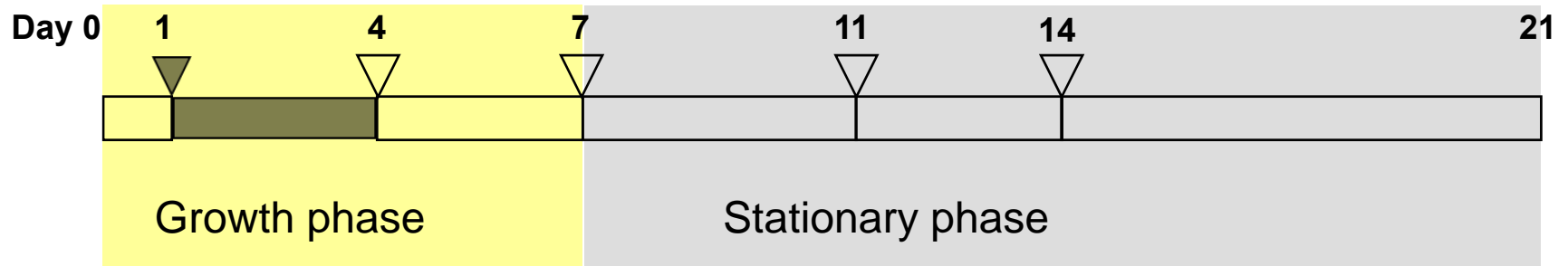


プロモーション処理の時期と形質転換頻度

[Sakai, AATEX, 14(2008), Special Issue, 367-373]

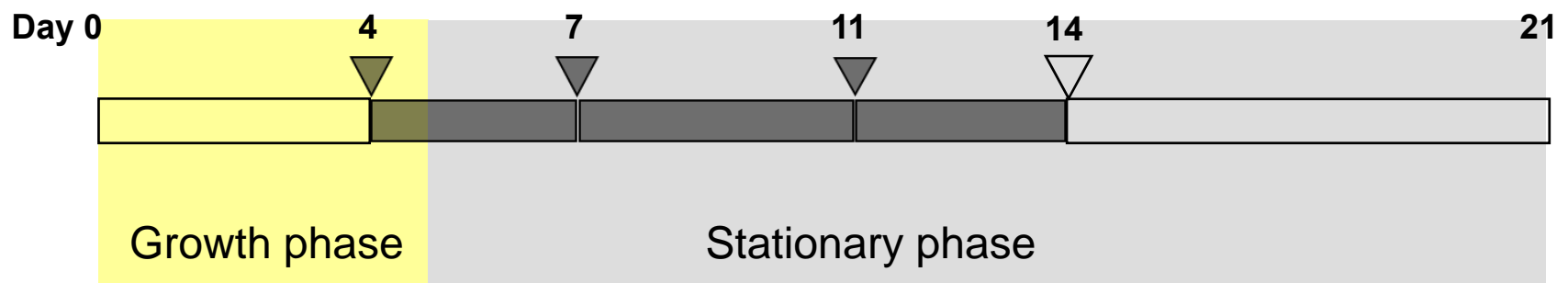
Initiation 試験:

播種細胞密度: 4×10^3 個/ウェル(6-ウェルプレート)



Promotion 試験:

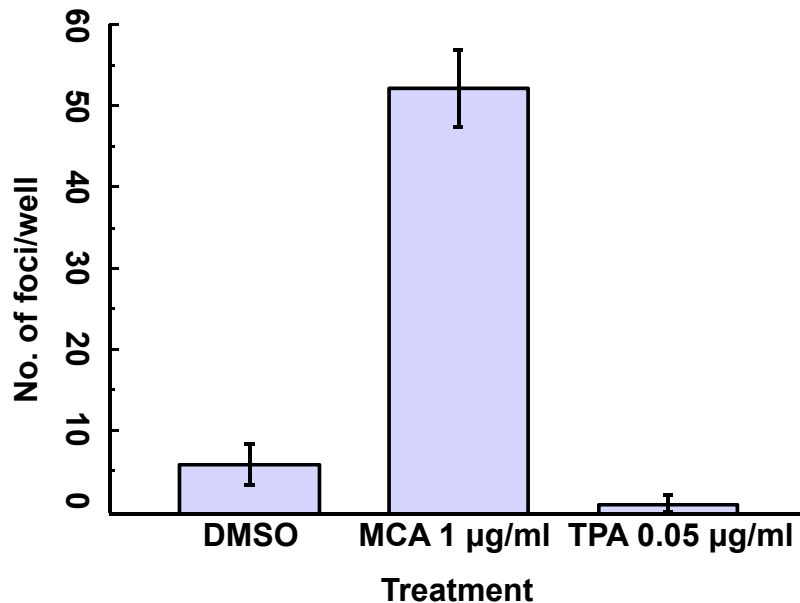
播種細胞密度: 14×10^3 個/ウェル(6-ウェルプレート)



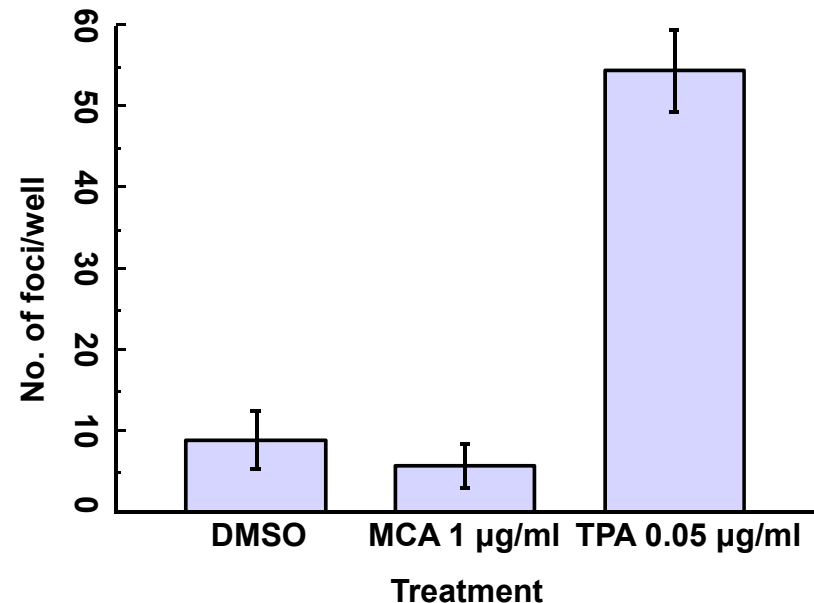
Bhas 42細胞形質転換試験

培地交換: ▼, 被験物質を含む培地; ▽, 通常の培地

Initiation 試験

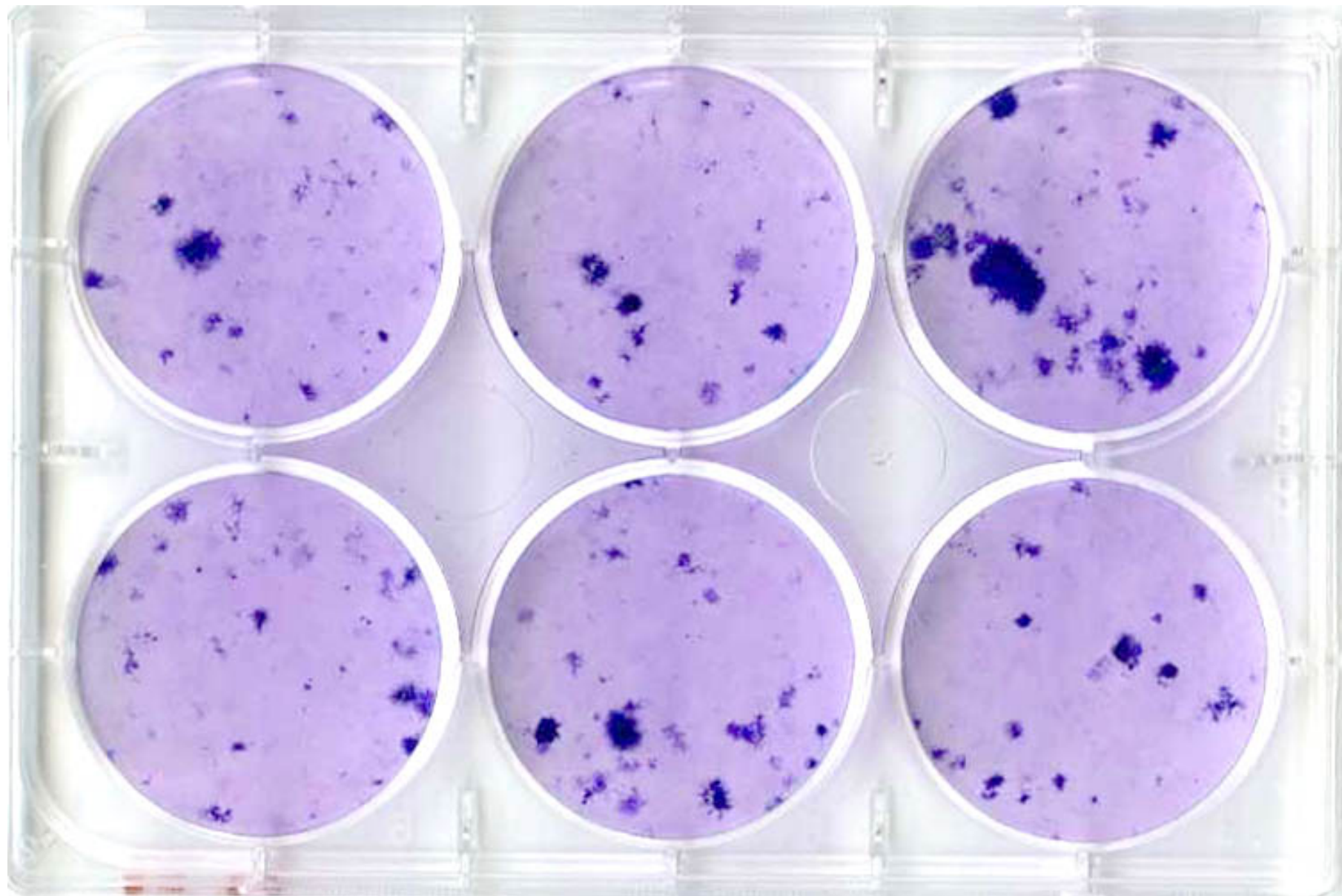


Promotion 試験



Bhas 42細胞形質転換試験による発がんプロモーターとイニシエーターの区別

[Sakai, AATEX, 14(2008), Special Issue, 367-373]



Bhas 42 細胞の形質転換フォーカス

形質転換試験の比較

	BALB/c 3T3	Bhas 42
試験期間	6週間	3週間
発がんプロモーターの検出	可 Initiation処理必要	可 Initiation処理不要
培養容器	60 mmディッシュ 10-20 枚／群	6 ウェルプレート 1 枚／群
培地	40 – 100 mL／回／群	12 mL／回／群
培地交換	8 回	4 回
牛胎児血清	10%	5%
ハイスループット化	？	可 96ウェルプレート法

感受性の従来法との比較

感受性の比較

Bhas 42細胞形質転換試験／BALB/c 3T3細胞2段階形質転換試験

Sodium arsenite

Sodium arsenate

Monomethylarsonic acid (MMAA)

Dimethylarsinic acid (DMAA)

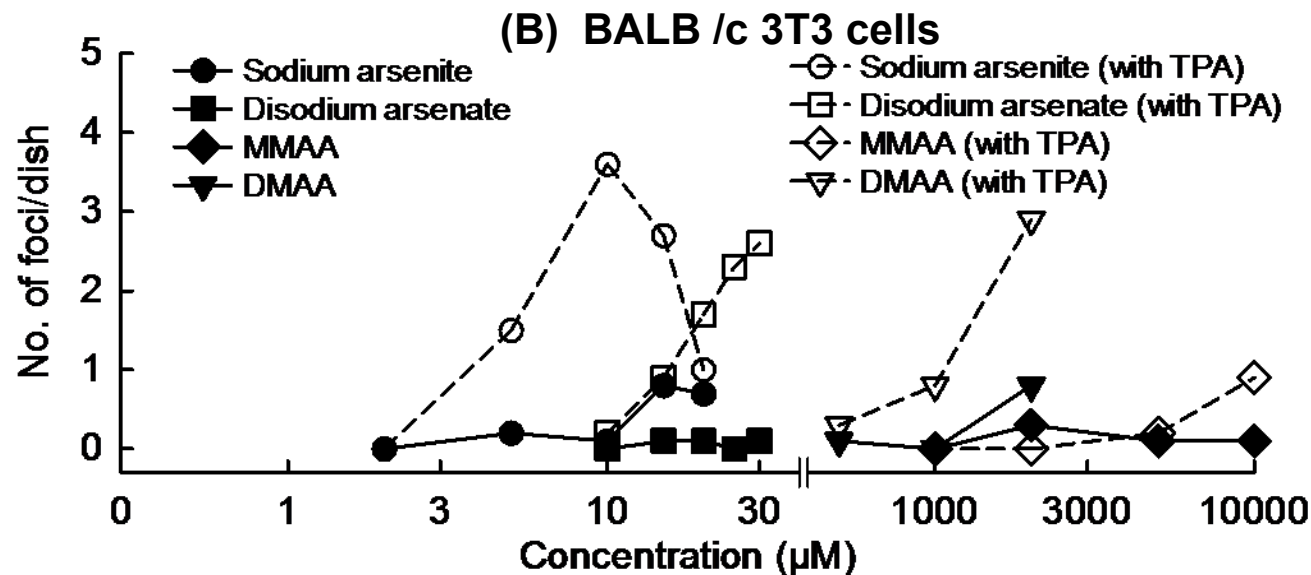
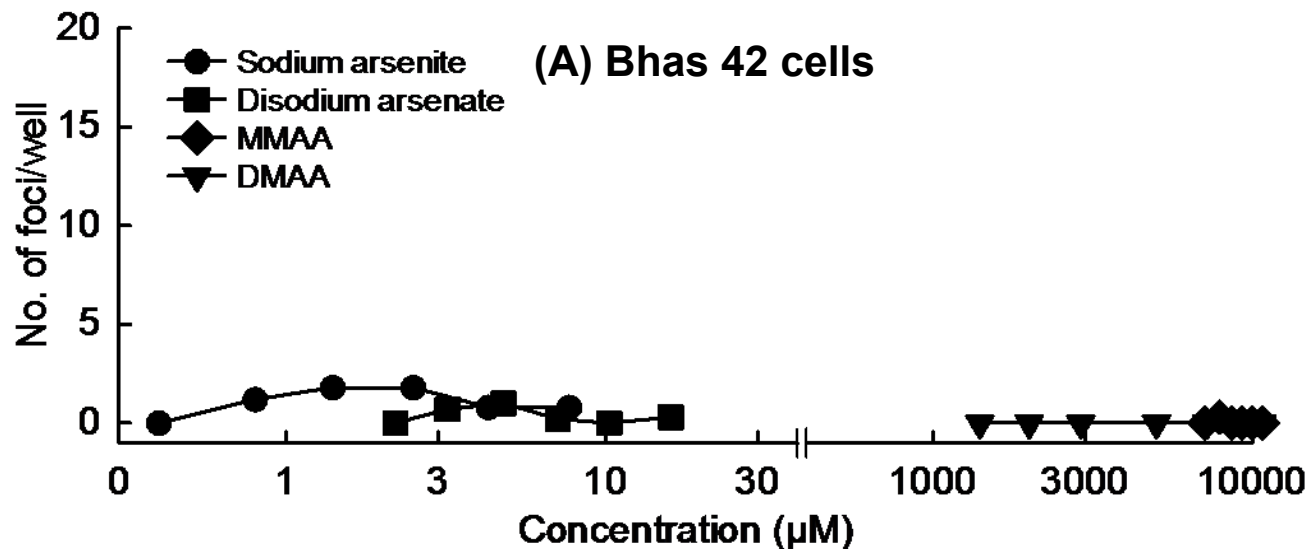
無機ヒ素の活性

ヒト発がん物質(腎、肺、皮膚)

突然変異試験: バクテリア、－; 培養細胞、弱い＋
染色体異常、小核試験: ＋

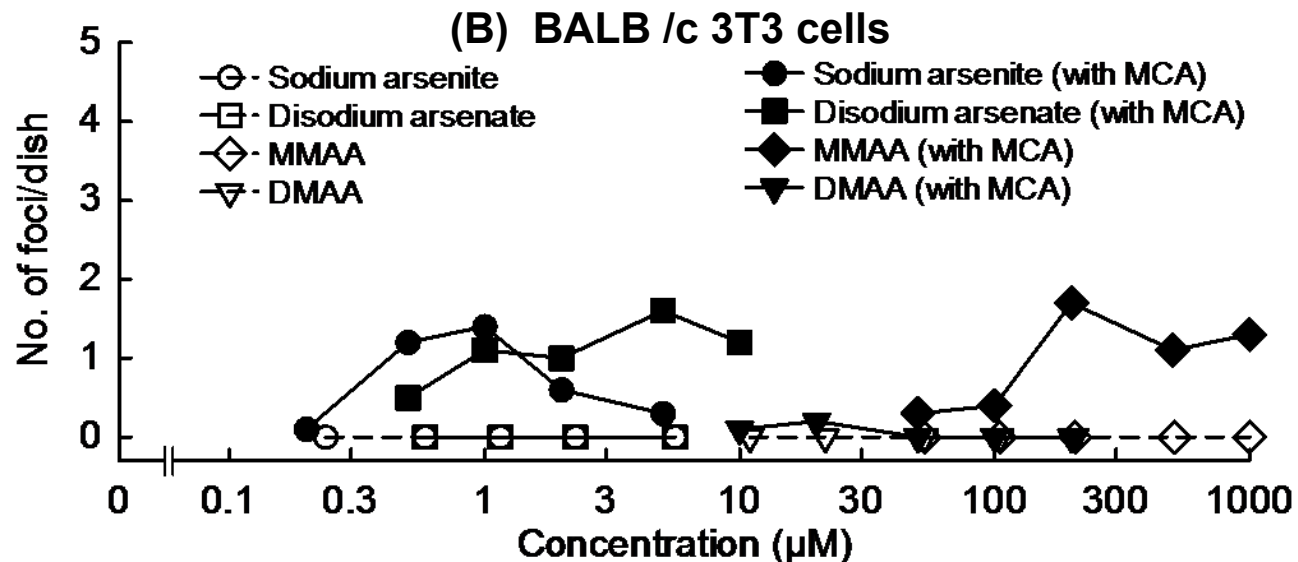
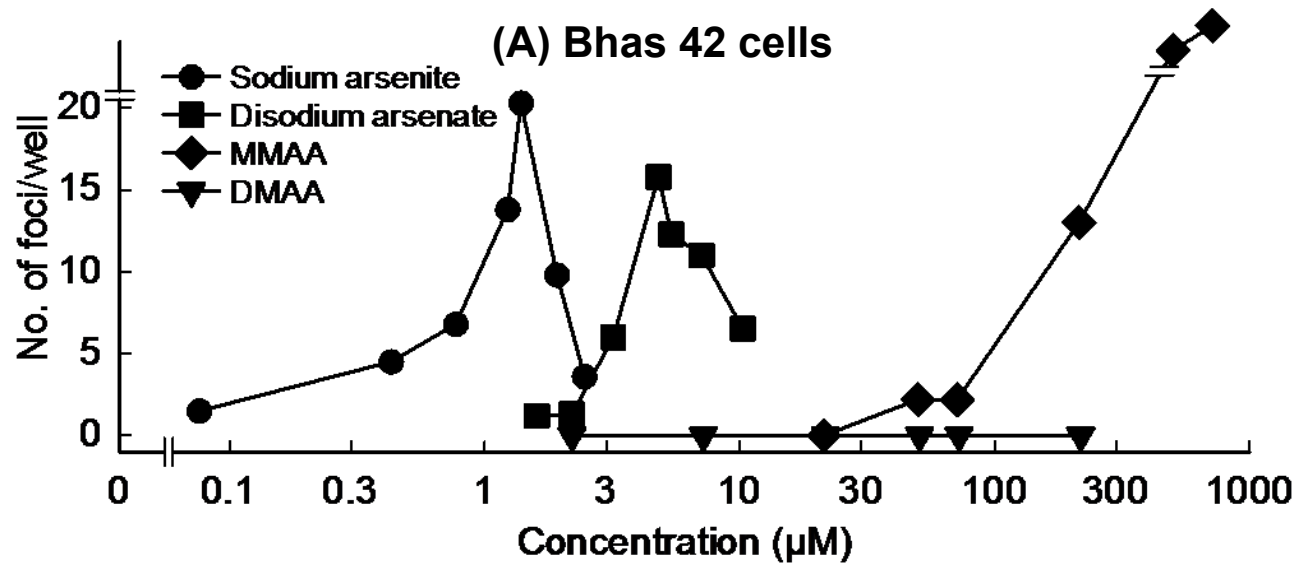
DNA メチル化: ＋

細胞形質転換試験: ＋



ヒ素化合物のイニシエーション活性の比較

Bhas 42 細胞形質転換試験／BALB/c 3T3細胞2段階形質転換試験



ヒ素化合物のプロモーション活性の比較

Bhas 42 細胞形質転換試験／BALB/c 3T3細胞2段階形質転換試験

[Muramatsu et al., Mutat. Res., 675(2009) 66-70]

Bhas 42細胞形質転換試験の感受性

- 1. Bhas 42細胞形質転換試験—イニシエーション試験の感受性は、BALB/c 3T3細胞を用いた場合のスタンダード法の感受性とほぼ等しい。**
- 2. Bhas 42 細胞形質転換試験—プロモーション試験の感受性は、BALB/c 3T3細胞を用いて既知イニシエーターで前処理を行う2段階法の感受性にほぼ等しい。**

インハウスバリデーションから得られた
試験法の特徴とパフォーマンス

試験法の特徴

インハウスバリデーション研究と既報論文から

Ames試験陰性あるいはAmes試験では検出しにくい発がん物質をよく検出することが明らかになった.

化学物質発がん性予測パフォーマンス

インハウスバリデーション研究と既報論文の総合で

Concordance, 72 %; Sensitivity, 71%; Specificity, 75%; Positive predictivity, 84%; Negative predictivity, 59%; False positive, 25%; False negative, 29%

OECDガイドライン化を目指した バリデーション研究

OECDガイドライン化を目指したバリデーション研究

[対象物質: コード化]

1) プレバリデーション研究 (6-ウェルプレート)
6 施設, 9 物質

2) 国際プレバリデーション研究 (6-ウェルプレート)
バリデーションアドバイザー: ECVAM, JaCVAM
6 施設(海外2施設), 12 物質

3) 国際バリデーション研究 (96-ウェルプレート)
JaCVAM 主導
VMT: JaCVAM, ECVAM, FDA
公式バリデーション研究
4 施設(国内限定)
プレバリデーション(MCA, TPA)
Phase I(7物質)
Phase II(より多くの物質)

プレバリデーション研究のデザイン（6-ウェルプレート法）

化学物質 A B C D E F G H I MCATPA

Lab I	●	●	●	●	●	●				●	●
Lab II							●	●	●	●	●
Lab III	●	●	●							●	●
Lab IV				●	●					●	●
Lab V						●	●	●	●	●	●
Lab VI	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

9個のコード化した物質、2個の陽性対照物質、3施設/物質

Bhas 42 細胞形質転換試験プレバリデーション研究

結果の要約

Lab.	MNNG		B[a]P		Pyrene		B[a]A		Anthracene		Mezerein		LCA		MPH		Phorbol	
	In ^a	Pr ^b	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr
I	+	-	+	-					-	-	-	+	-	+			-	-
II					+	+	+	+							-	+		
III	-	-							-	-			-	+				
IV											-	+					-	-
V			+	-	+	-	+	-							-	+		
VI	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+/-
No of positive Lab.	2	0	3	0	3	2	3	2	0	0	0	3	0	3	1	3	0	1
Overall Judgement	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Carcinogenicity																		
IARC ^c	2A		2A		3		2A		3									
CCRIS ^d											TP ^f							
G & Z ^e													-		+			
Others													TP		TP			

^a Initiation assay

^b Promotion assay

^c IARC (International Agency for Research on Cancer) Classification

^d Chemical Carcinogenesis Research Information System

^e Carcinogenic Potency Database according to Gold and Zeiger

^f In vivo tumor promoter

090201

[Tanaka et al., AATEX(2009) 831-848]

Bhas 42 細胞形質転換試験プレバリデーション研究

結果の要約

Lab.	MNNG		B[a]P		Pyrene		B[a]A		Anthracene		Mezerein		LCA		MPH		Phorbol		
	In ^a	Pr ^b	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	In	Pr	
I	+	-	+	-					-	-	-	+	-	+			-	-	
II					+	+	+	+							-	+			
III	-	-							-	-			-	+					
IV											-	+					-	-	
V			+	-	+	-	+	-							-	+			
VI	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+/-	
No of posirive Lab.	2	0	3	0	3	2	3	2	0	0	0	3	0	3	1	3	0	1	
Overall Judgement	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	
Carcinogenicity																			
IARC ^c	2A		2A		3		2A		3										
CCRIS ^d																			
G & Z ^e																			
Others	+(CC),+/- (TP) ^g																		
													TP		TP		(TP) ^g		

^a Initiation assay

^b Promotion assay

^c IARC (International Agency for Research on Cancer) Classification

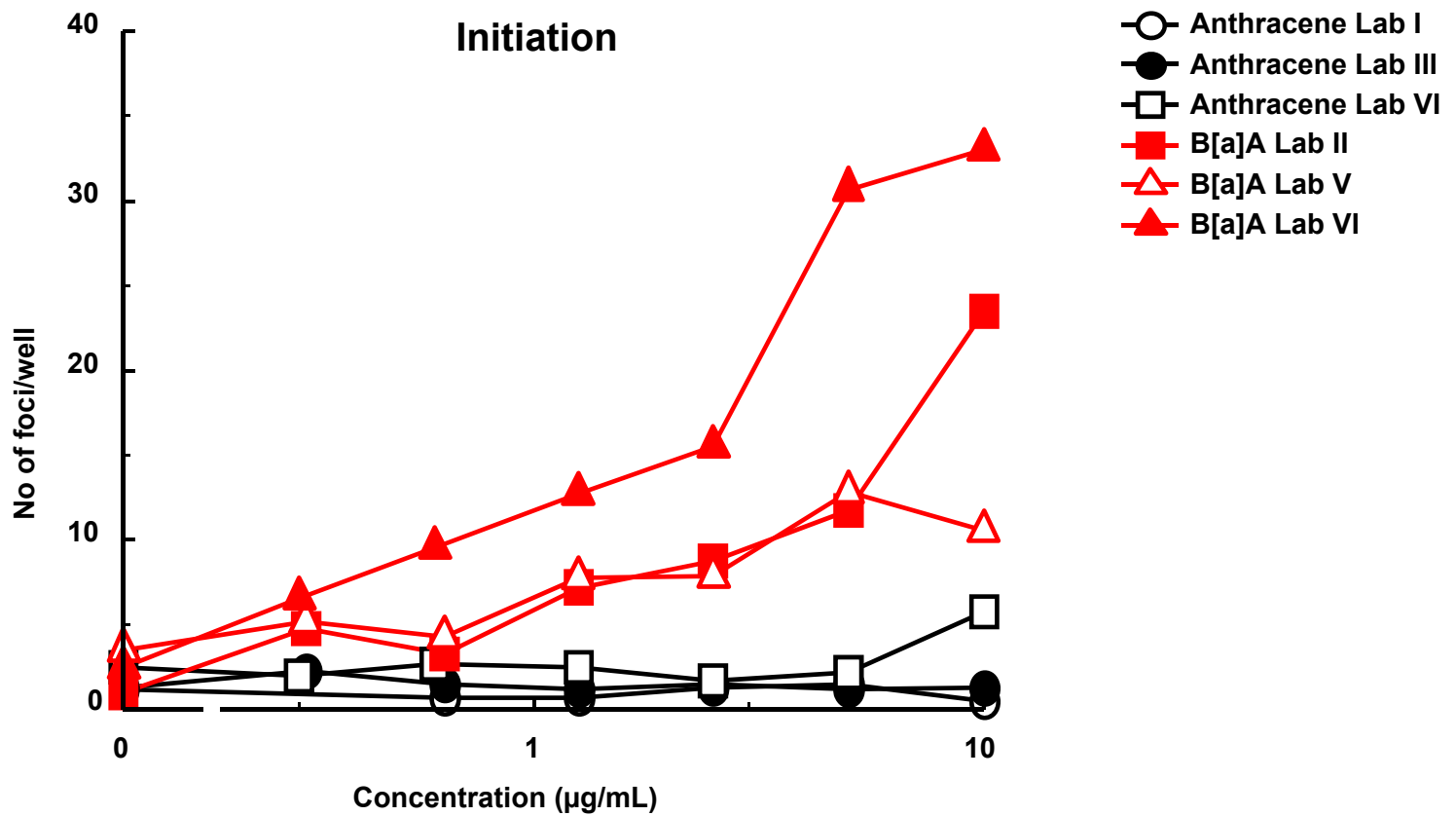
^d Chemical Carcinogenesis Research Information System

^e Carcinogenic Potency Database according to Gold and Zeiger

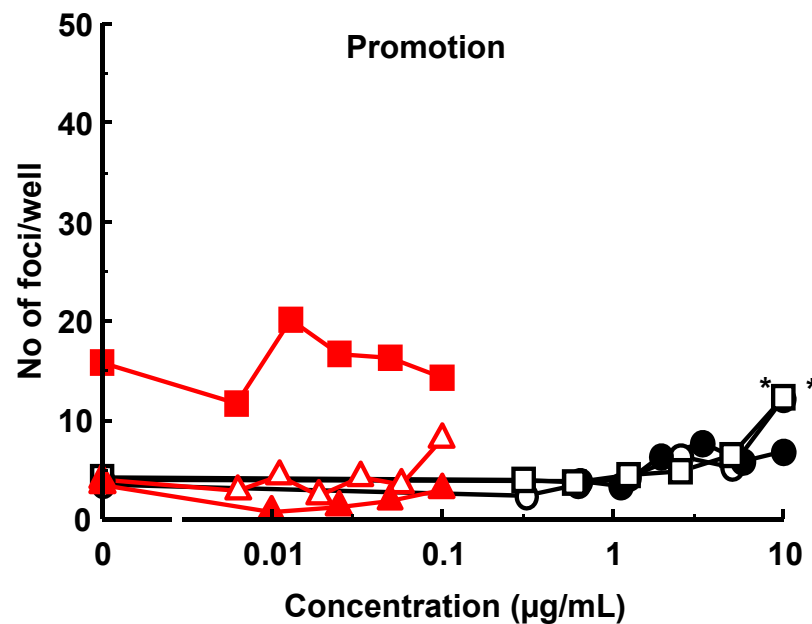
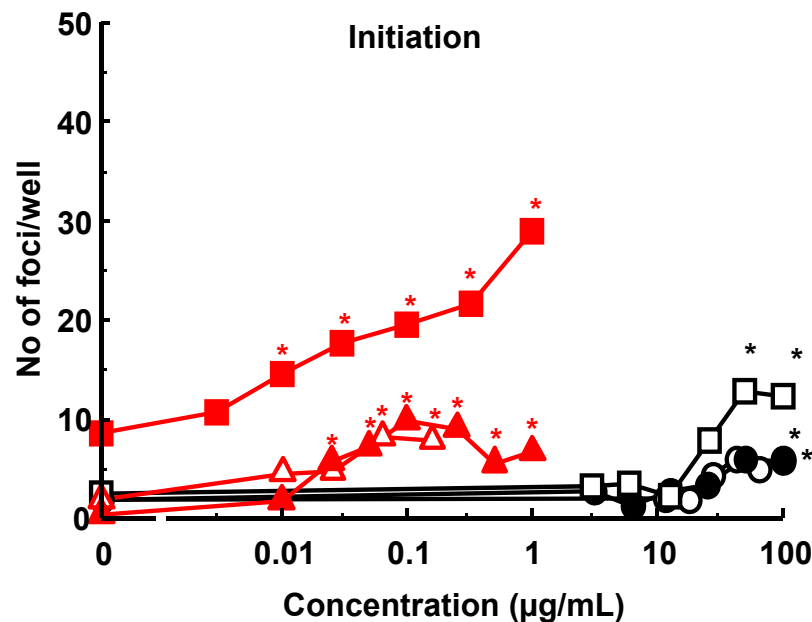
^f In vivo tumor promoter

^g Newly referred; CC, Co-carcinogen

[Tanaka et al., AATEX(2009) 831-848]



プレバリデーション研究におけるB[a]AとAnthraceneの結果



Pyreneの発がん性

DRP31:Non-carcinogenic

New born mouse, tumorigenicity (1986):

♂, 肝, ± (dose-relation ship)

♂ & ♀, 肺, - (用量, B[a]Pの5倍)

New born mouse, tumorigenicity (1989):

♂ & ♀, -, (用量, B[a]Pの8倍)

Mouse: 皮膚 (1976):

cocarcinogenicity, + (用量, B[a]Pの2.2~8倍)

promotion 活性, ± (用量, Initiator B[a]Pの1/2.5

プレバリデーション研究におけるB[a]PとPyreneの結果

バリデーション遂行上の素朴な疑問

In vivoにおける発がん性を、後付でバリデーションに用いてもよいか？

物質名は、コード化すべきと考えるが、濃度は、どうすべきか？

- ・濃度を指定すべきか、した方がよいか、しない方がよいか？
- ・特に、発がん物質、発がんプロモーターのanalogueの場合、発がん物質や発がんプロモーターと同レベルにしてはどうか？

(発がん物質、発がんプロモーターと同じ濃度域かそれに近い濃度の *in vivo* データしか存在しない場合が多い。Analogueの価格が高い。)

バリデーションは、何物質行う必要があるか？

バリデーション研究に用いることが出来る物質には、制約がある。

陽性物質について

- ・入手出来るものが減っている(販売打ち切り、輸出禁止)

陰性物質について

- ・完全な発がん試験が報告されているものは、少ない。

In vivo発がんデータは、絶対か？

まとめ

Bhas 42 細胞形質転換試験

試験法：イニシエーション活性とプロモーション活性を検出できる。

短期、簡便、軽費

従来法との感受性の比較

特徴：Ames negativeの発がん物質をよく検出する。

パフォーマンス：Specificity、Positive predictivity が高い。

プレバリデーション研究の結果

謝辞：

この研究は、NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization) によるプロジェクト研究として行われました。

ご指導頂いております次の諸先生に感謝いたします。

Dr. Raffaella ; ECVAM

小島 肇先生 ; JaCVAM

林 真先生 ; 安評センター

森田 健先生 ; 国立衛研

この研究は、食品薬品安全センターの以下のスタッフによる共同研究です。

田中憲穂、梅田 誠、佐々木 澄志、山崎晶次郎、村松 大、新井晶子、遠藤伸子、林 久実子、黒田幸子