

SHE 細胞形質轉換試験法(SHE CTA)評価報告書

JaCVAM 形質轉換試験資料編纂委員会

2017 年 3 月 31 日

JaCVAM 形質転換試験資料編纂委員会

委員長 浅野哲秀 (元日東電工株式会社, 現大阪信愛女学院短期大学)

委員 筒井健機 (日本歯科大学)

山影康次 (一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所)

北本幸子 (住友化学株式会社)

笠松俊夫 (花王株式会社)

山本美佳 (アステラス製薬株式会社)

目 次

1. 要 旨
2. 試験方法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性
3. 試験方法のプロトコルの妥当性
4. バリデーションに用いられた物質の分類と妥当性
5. 試験の正確性を評価するために用いられた化学物質の *in vivo* 参照データならびに参照データ作成の経緯
6. 試験方法のデータと結果の利用性
7. 試験方法の正確性
8. 試験方法の信頼性
9. 試験方法のデータの質
10. 試験方法に関する他の科学的な報告
11. 3Rs への寄与(動物福祉面からの妥当性)
12. 試験方法の有用性と限界
13. 結論
14. 参考文献
15. Appendix I, II

Abbreviations

3Rs:	Reduction, Replacement, and Refinement
CTA:	Cell Transformation Assay
CGM:	Complete Growth Medium
CIM:	Cell Isolation Medium
DB-ALM:	DataBase service on Alternative Methods to Animal Experimentation
DRF :	Dose Range Finding assay
DRP :	Detailed Review Paper
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
ESAC:	ECVAM Scientific Advisory Committee
EURL ECVAM:	European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing
FBS:	Fetal Bovine Serum
GD:	Guidance Document
IARC:	International Agency for Research on Cancer
MoA:	Mode of Action
MTF:	Morphological Transformation Frequency
NTP:	National Toxicology Program
OECD:	Organization for Economic Co-operation and Development
SHE :	Syrian Hamster Embryo
UVBCs:	Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products or Biological Materials
WoE:	Weight of Evidence
WNT:	Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program

1. 要旨

細胞の形質転換試験 (Cell Transformation Assay : CTA) は、*in vitro* において、化学物質を曝露することで起きる「細胞の形態」や「表現形質」の悪性化を指標として腫瘍誘発性の有無を調べる試験法の一つである。

JaCVAM SHE 細胞形質転換試験資料編纂委員会は、OECD ガイダンス¹⁾として 2015 年 5 月に公表されたシリアン・ハムスター胎仔 (Syrian Hamster Embryo: SHE) 細胞を用いる CTA が化学物質のがん原性の予測に有用か否かについて検討し、その結果をまとめた。SHE 細胞を用いる CTA の特徴としては、用いる細胞が初代培養細胞である、基本的な代謝能を維持している、培養期間は1週間程度の短期である、試験費用は比較的安価である、しかし、形質転換したコロニー(細胞集落)を見極めるには十分な教育と訓練が必要であることなどが挙げられる。

SHE CTA は、試験方法やがん原性との相関に関する論文が多く出版され、その有用性についての議論も多くなされている。European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) によって、その試験方法に関するプレバリデーション研究が実施された。しかし、被験物質の数が少なく、しかも試験開始時には非遺伝毒性がん原物質と考えられていた物質が一種類存在したものの、OECD による SHE CTA 専門家会議による再評価結果²⁾では、非遺伝毒性がん原物質は含まれていないとの結論を得た。最終的には被験物質の数を増やしての正式なバリデーション研究は実施されなかったため、試験方法がバリデートされたとは言い難い。

しかしながら、がん原物質および非がん原物質を用いた研究によると、SHE CTA の試験方法の正確性については、動物を用いたがん原性試験との一致率、感度、特異度、偽陰性率および偽陽性率が、概ね、がん原物質を検出する遺伝毒性試験データと同等又はそれ以上の結果が得られおり、その有用性は高いと考えられる。

なお、本質的には、細胞が形質転換するメカニズムは未だ未解明な点が多く、CTA をもって動物を用いるがん原性試験に置き換えることは現段階では不適切であると考えられる。

このように SHE CTA が持つ固有の問題点は存在するが、化学物質による発がん機構の重要なステップである細胞の形質転換能を評価できる方法であり、実際、がん原物質の曝露により形質転換コロニーの数が増えるという事実を考慮すれば、がん原物質を検出していると考えられる。特に International Agency for Research on Cancer (IARC) グループ 1 および 2A に分類される化学物質において、SHE CTA とヒトのがん原性との相関があり、構造相関などと組み合わせることにより、がん原性を疑わせる化学物質などのスクリーニング系として応用することにより、動物数の大幅な削減が可能となり、3Rs の精神にも適う試験方法であると考えられる。このような観点から、SHE CTA はさらにデータを積み重ねることにより、化学物質のがん原性予測試験の有望な一つの試験法になると考えられる。

2. 試験方法の科学的妥当性と規制試験法としての妥当性

1) 科学的妥当性

一般的に *in vitro* における CTA とは、化学物質の曝露により培養細胞が不可逆的に形態的变化を起こすかどうかを調べる試験である。

SHE CTA は、シリアン・ハムスター胎仔に由来する初代細胞を凍結・解凍した 2 代目の細胞(正常二倍体細胞)を用いて、目的とする化学物質を *in vitro* で曝露した後、形態形質転換コロニーの出現率によって、化学物質の形質転換能の有無を評価する試験法である。SHE 細胞の形態形質転換は、多段階的腫瘍形成過程の早期に起きる現象に相当しており、形質転換細胞は、継代培養後、同系統の動物やヌードマウスに対して約 50%~100%の割合で造腫瘍性^{3,4)}を示すことが知られている。

OECD Detailed Review Paper31⁵⁾ (以下 DRP31)には、複数の pH の培養液で試験された数多くの化学物質の SHE CTA 結果がまとめられ、遺伝毒性がん原物質および非遺伝毒性がん原物質の曝露により、SHE 細胞は形態形質転換することが示されている。EURL ECVAM は、標準プロトコル、技術移転性、および施設内再現性ならびに施設間再現性を評価した結果、その有用性を認めている。また、EURL ECVAM の標準的プロトコルと DRP31 に示されたプロトコルとの間には基本的な差異はなく、これらの得られたデータは回顧的評価において、受け入れ可能であるとされた。

細胞の形質転換の正確な分子生物学的メカニズムは十分には解明されていないのが現状である。SHE 細胞が形質転換するメカニズムには不明な点が多いが、そのメカニズムを解析する論文は数多くあり、形質転換は単一のメカニズムで誘引されないことも明らかになってきた。すなわち、細胞周期制御システム、ゲノム安定性、および分化・増殖過程での遺伝子発現の変化や異常が形質転換の主たる要因として考えられている。これらの過程に影響を及ぼす遺伝的変異は直接的な遺伝毒性作用と考えられている。さらに、DNA の高メチル化あるいは低メチル化、ヒストン修飾およびヌクレオソームリモデリングによる遺伝子発現の変化や遺伝的不安定性が、エピジェネティックな変化を誘起し、悪性形質転換へと進行させる引き金になると考えられている。

その他の知見として、

- 不死化や悪性化した形質転換細胞における後期段階では、がん遺伝子 *ras* や *myc* に広汎的もしくは部位特異的に低メチル化がみられていること。
- 細胞周期チェックポイント遺伝子のメチル化による遺伝子の発現抑制や *p53* 遺伝子の突然変異と同様、不死化シリアン・ハムスター皮膚細胞において、がん抑制遺伝子 *ink4a* や *ink4b* の対立遺伝子にヘテロまたはホモの欠失が観察されていること。
- 形質転換した SHE 細胞株では細胞周期の G2 チェックポイントに障害が生じていること。
- 他の細胞を形質転換させるような活性化プロトオンコジーン *cph* が悪性形質転換細胞から分離されていること。

などが報告されている。

非遺伝毒性がん原物質もまた、多段階発がん過程に関与し、正常細胞を形質転換させるものと考えられ

ている。すなわち、ギャップジャンクションによる細胞間コミュニケーションを阻害する酸化ストレス、細胞分裂回数の増加、アポトーシスの減少、チユブリン合成阻害、テロメラーゼの活性化による老化の阻害、シグナル伝達過程の阻害、また、ホルモン介在過程やペルオキシゾームの増殖に参与する受容体への結合などである。

このような科学的知見の多くが、がん化過程で判明している事実とその一部が整合することなどから、SHE CTA の科学的な検証は、完全ではないが、現在の分子生物学的水準に基づいてある程度なされている試験と考えられる。

2) 規制上の妥当性

SHE CTA は単一の化学物質についてのみプレバリデーション研究が実施されており、いくつかの化学物質から構成されている物質、UVCBs、或いは混合物についてはバリデーション研究が実施されていないことを留意すべきである。こうした状況を考慮した上で、OECD のガイダンスドキュメント¹⁾が明確にしていることは、がん原性を評価する試験戦略の一環として、或いはがん原性にかかる WoE(証拠の重み付け)に SHE CTA 結果を利用することは有用であるとしている。また、SHE CTA は遺伝毒性がん原物質に対して高感受性をもつが、非遺伝毒性がん原物質に対しては未だ議論の余地があり、より多くの情報が求められているのも事実である。本試験法が OECD 試験法ガイドラインとして承認されなかった理由として指摘されていることは、形質転換細胞の評価に関して本質的な問題がそこには存在すること、すなわち、形質転換に至る分子生物学的作用機構の理解が限定的であることである。また SHE CTA の正確性分析で用いた非遺伝毒性がん原物質が少なかったこと^{1,2)}、SHE CTA の結果からは、*in vivo* におけるがん原性の強さ、種特異性または組織特異性などの情報は得られないことなどが指摘されている。

本試験法は現行のがん原性試験に完全に置き換わる試験法としての位置づけではなく、化学物質等のがん原性に関しての行政的な判断が必要になった場合、補助的な試験(例えば Weight of Evidence: WoE)として位置づけることがその利用価値を高めるものと考えられる。

3. 試験方法のプロトコルの妥当性

1) 試験法の概略

SHE 細胞は胎生 13 日目のシリアン・ハムスター胎仔の初代培養から得られた正常二倍体細胞で、薬物代謝能や p53 活性を有する。SHE 細胞は、種々のタイプの細胞型から構成されるため、SHE CTA は株細胞からなる他の CTA 法と比較して、より生体に近い正常細胞に起こる変化を捉えることができる。多種多様ながん原物質を SHE 細胞に曝露するとまず形態形質転換が誘導され、形質転換細胞は、継代培養後、大部分が造腫瘍性マーカーである足場非依存性増殖能を獲得し、感受性を持つ動物に悪性腫瘍を形成することが知られている。

SHE CTA は被験物質の曝露によって、多段階的に進行する腫瘍形成過程の初期に起こる形質転換を検出する *in vitro* 試験法である。本試験法によって、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験からは入手できない被験物質に潜在する細胞形質転換能を検出することができる。

SHE CTA で得られた結果を包括的な試験戦略の一部や WoE に活用すれば、被験物質のもつ潜在的形質転換能の評価に使えるばかりでなく、SHE CTA は、従来の動物を用いたがん原性試験の一部置き換え (Replacement) ならびに動物数の削減 (Reduction) に貢献することになり、その意義は大きい。

2) 試験法の原理

- (1) SHE 細胞は胎生 13 日目のシリアン・ハムスター胎仔細胞の初代培養から得る。酵素で胎仔組織を消化後、細胞を収集し液体室素中で保存する。凍結細胞の一部はフィーダー細胞 (支持細胞) に、他は標的細胞に使用する。X 線照射で増殖能を不活化させた細胞をフィーダー細胞に用いる。フィーダー細胞は標的細胞への栄養補給と薬物代謝活性をサポートする目的で播種され、標的細胞は形態形質転換能を調べるために播種される。
- (2) 標的細胞は形成されるコロニーの発育を考慮して、CTA の試験成立基準を満たすに必要なクローニング効率を達成できるクローン密度でフィーダー細胞層上へ播種する。播種後、被験物質を 7 日間曝露する。その後、細胞を洗浄・固定し染色する。ディッシュはコード化し、実体顕微鏡検査でコロニーの形態的表現型を記録する。
- (3) 細胞毒性はコロニー形成効率とコロニーの大きさや細胞密度の減少から評価する。記録したコロニーの総数に対する形態形質転換コロニー数の割合を各試験濃度で算出する。被験物質曝露群の総コロニー数に対する形態形質転換コロニー数の割合を溶媒対照群のその割合と比較する。なお、コロニーサイズと密度等の状態は必要に応じて記録に残し、評価の参考とするが、形質転換率には寄与しない。

3) プロトコルの妥当性

以下の項目の問題点が明確にされており、妥当性は概ね確保されている。

- (1) 実験系:

一腹のシリアン・ハムスター胎仔から得られた初代培養細胞を使用する。このことは最低でも1匹の妊娠ハムスターの安楽死を意味するが、細胞の適切な凍結保存によって、1匹の妊娠ハムスターから少なくとも50回分のCTAを実施するのに必要で十分な細胞を得ることができる。

(2) SHE 細胞とウシ胎仔血清 (FBS) のロット試験:

SHE 細胞、FBS とも使用に先立って、新しいロット毎に CTA に適切かどうかをチェックする。更に、適切であると判明した細胞と FBS を組み合わせて CTA を実施し、定められた試験成立基準を満たすかどうかの試験を行う。

(3) 被験物質のフィーダー細胞障害性確認:

(a) CTA への使用に先立って、フィーダー細胞だけをディッシュに播種・培養し、コロニー形成能のないことを確認する。

(b) 被験物質で選択的に障害された場合を除いて、被験物質曝露群のディッシュ上のフィーダー細胞を可視できなければならない。

(4) CTA 技術の熟達度確認試験:

CTA 実施施設は定められた作用機序の異なる陽性および陰性対照物質を用いて CTA を実施し、CTA 技術の熟達度を確保する。

(5) 使用する培地の pH (pH6.7 および pH7.0):

CTA の実施に先立ち、適用する pH 条件で前述した CTA 技術の熟達度確認試験を実施し、熟達度を証明する。

(6) 両 pH 間の SHE CTA プロトコルの差異:

培地中の FBS 濃度に差はあるが、それ以外での差は認められない。

(7) 両 pH 間における SHE CTA パフォーマンスの差の有無:

いずれの pH でも CTA の結果は、感度、特異度とも同程度であり、大きな差は認められない。

(8) 試験成立基準:

CTA の結果はプロトコルで規定している試験成立基準に従い、判定する。

(9) CTA 評価の客観性の確保:

CTA にあたっては、被験物質や得られたデータについてコード化して評価する。

(10) コロニーの主観的スコアリングによるデータの変動:

この対策として、以下のことを実施する。

(a) 施設内外の CTA 経験者によるスコアラーのトレーニング

(b) 種々の正常および形質転換コロニーの写真見本の利用 (スコアリングにあたっては、常時写真見本を参考にする)

(c) セカンドオピニオン (他のスコアラーまたはスコア経験者の意見を参考にする) や他のスコアラーによる二重スコアリング

(d) ディッシュのコード化

(11) 結果判定基準

CTA の結果をプロトコルで定めた結果判定基準に従い、判定する。

4. プレバリデーション研究に用いられた物質の分類と妥当性

プレバリデーション研究^{6,7)}に供された6物質のうち、4物質ががん原物質で、そのうちの3物質は遺伝毒性物質、1物質は非遺伝毒性物質であると試験開始時には評価されていたものの、SHE CTA 専門家会議による再検討結果から、4物質は全て遺伝毒性物質であったと判断された²⁾。残る2物質は非遺伝毒性非がん原物質である。全体で6物質と化合物数は少なく、大部分が多環芳香族炭化水素と芳香族アミンで、被験物質の作用メカニズムに偏りがみられた。また、陽性物質は明らかな陽性反応を示す化合物が多く(4/6)、がん原性のあいまいな反応を示す化合物は含まれなかったものの、陰性物質も33%(2/6)を占めており、選ばれた化合物は妥当であると考えられた。

< Genotoxic carcinogens >

- Benzo(a)pyrene
- 2,4-Diaminotoluene
- 3-Methylcholanthrene
- o-Toluidine*

*試験開始当時は equivocal または inconclusive genotoxic carcinogen を non-genotoxic carcinogen であると解釈していた。

< Non-genotoxic non-carcinogen >

- Anthracene
- Phthalic anhydride

5. 試験の正確性を評価するために用いられた化学物質の *in vivo* 参照データならびに参照データ作成の経緯

非遺伝毒性がん原物質を検出する *in vitro* 試験法の開発の重要性が指摘されたことを受け、1997年から「Non-Genotoxic Carcinogens Detection: the Performance of *In Vitro* Cell Transformation Assays」と題する Detailed Review Paper の作成が開始された。それは、SHE 細胞、BALB/c 3T3 細胞および C3H10T1/2 細胞を用いる CTA に焦点が当てられた。2001年に最初の案が The Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT) に回覧され、各国の専門家からの広範囲にわたるコメントをもとに改定版が作成されたが、最終化には至らなかった。2002年には、第2案が回覧され、再び多数のコメントが出されたことから、フランス(SHE 細胞)、日本(BALB/c3T3 細胞)、カナダ(C3H10T1/2 細胞)の3国が、それぞれの細胞を用いた各試験法について改定作業を継続して進めた結果、2006年に第3案が提示された。第3案に対するコメントへの議論(ワシントン会議)を経て第4案が作成された。この第4案「DETAILED REVIEW PAPER ON CELL TRANSFORMATION ASSAYS FOR DETECTION OF CHEMICAL

CARCINOGENS」がいわゆる DRP31 として 2007 年 4 月に開催された WNT19 で承認され最終化された。表題が変更されていることから分かるように、この DRP31 は、がん原物質の検出における CTA の意義を主目的とし、非遺伝毒性がん原物質の *in vitro* 検出系としての分析は次の課題とされた。

CTA に関しては、上述の DRP31 作成経緯にあるように SHE 細胞以外に BALB/c 3T3 細胞あるいは C3H10T1/2 などの細胞が用いられている。これらの細胞での形質転換能と *in vivo* がん原性との相関については、DRP31 が参照し得るデータ集である。

DRP31 では、げっ歯類におけるがん原性試験データ、遺伝毒性データと 3 種類の CTA データがまとめられている。がん原性試験データに関しては、IARC および NTP のデータが採用されている。

DRP31 では、SHE CTA の結果とげっ歯類でのがん原性試験結果の両方が記載された化学物質の数は 245 である。その内訳は、がん原物質が 175 物質、非がん原物質が 70 物質である。内訳は、有機化合物が 190 物質(がん原物質:127 物質、非がん原物質:63 物質)、無機化合物が 55 物質(がん原物質:48 物質、非がん原物質:7 物質)であった(Appendix 1)。

SHE CTA ガイドラインの作成過程において、データの再評価が実施された。Chemical Carcinogenesis Research Information System, NTP, IARC Monographs (1-106), PubMed, および CLP/GHS のデータベースを用いて、SHE CTA のデータのみならず、遺伝毒性に関するデータおよびがん原性のデータについても再評価された。その結果、対象となった 108 物質(がん原物質 66 物質、非がん原物質 42 物質)について、再評価されたデータが示された²⁾。

6. 試験データと結果の利用性

プレバリデーション研究に用いた 6 物質(陽性 4 物質、陰性 2 物質)のデータは、試験方法の信頼性の評価に用いることが出来る。施設間再現性の評価には 6 物質全てのデータが用いられた。一方、施設内再現性の評価には陽性対照物質として使われた Benzo[a]pyrene のみの結果が用いられ、1 施設ではコード化して繰り返し 3 回実施(pH7.0 法)し、良好な結果が得られたが、他の 3 施設については、毎回コード化せずに陽性対照として実施し、得られた値を比較した結果(pH6.7 法)しか示されていない。このように、強い陽性反応を示す 1 化合物のみで施設内再現性試験が実施されていること、また、同一プロトコルで実施された試験ではないことから、施設内再現性を評価するには十分とは言い難い。

DRP31 で評価した物質のデータは、試験方法の正確性の評価に用いることが出来る。265 物質のうち、157 物質はドラフトテストガイドライン(OECD, Feb. 2013)で定められた pH や被験物質処理時間で実施されていないため、正確性の評価から除外された。残る 108 物質がドラフトテストガイドラインのクライテリアに従って再評価され、その結果が試験方法の正確性の評価⁸⁾に使われた。

7. 試験方法の正確性

DRP31 には、遺伝毒性データ、げっ歯類動物のがん原性試験データと 3 種類の *in vitro* CTA データがまとめられ、がん原性評価における CTA データの正確性について報告されている。SHE CTA の結果につい

では、培養液の pH が異なる試験データが蓄積されていることから、pH6.7 および pH7.0 以上の 2 つに分けて解析されている(表 1、表 2)。

がん原性評価における SHE CTA および各種遺伝毒性試験データについては、DRP31 の Annex に報告されており、それを編集した表 3 に示した通り、がん原性と SHE CTA の一致率は各種の遺伝毒性試験のそれと同等以上であり、偽陽性率および偽陰性率は低いと言う結果となっている。また、表 4 に示す通り、各種遺伝毒性試験と CTA に共通する物質の試験結果についてがん原性との一致率をみても、SHE CTA は良好な結果を示している。

表 1 がん原性評価における SHE CTA (pH6.7 法) の正確性

SHE CTA		In vivo がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
	陽性	36	5
	陰性	18	29

一致率 (Concordance) : $(36+29)/(36+5+18+29) \times 100 = 65/88 \times 100 = 74\%$

感度 (Sensitivity) : $36/(36+18) \times 100 = 36/54 \times 100 = 67\%$

特異度 (Specificity) : $29/(5+29) \times 100 = 29/34 \times 100 = 85\%$

偽陰性率 (False Negative) : $18/(36+18) \times 100 = 18/54 \times 100 = 33\%$

偽陽性率 (False Positive) : $5/(5+29) \times 100 = 5/34 \times 100 = 15\%$

表 2 がん原性評価における SHE CTA (pH7.0 法) の正確性

SHE CTA		In vivo がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
	陽性	131	17
	陰性	11	33

一致率 (Concordance) : $(131+33)/(131+17+11+33) \times 100 = 164/192 \times 100 = 85\%$

感度 (Sensitivity) : $131/(131+11) \times 100 = 131/142 \times 100 = 92\%$

特異度 (Specificity) : $33/(17+33) \times 100 = 33/50 \times 100 = 66\%$

偽陰性率 (False Negative) : $11/(131+11) \times 100 = 11/142 \times 100 = 8\%$

偽陽性率 (False Positive) : $17/(17+33) \times 100 = 17/50 \times 100 = 34\%$

表 3 がん原性評価における SHE CTA と各種遺伝毒性試験の比較

	SHE CTA		Ames	ML	HPRT	CA		MN <i>In vivo</i>
	pH6.7 法	pH7.0 法				<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
一致率 (%)	74	85	52	72	78	62	60	58
感度 (%)	67	92	39.5	86	80	65	57	58
特異度 (%)	85	66	79	26	70	59	68	55
偽陰性率 (%)	33	8	60.5	14	20	35	43	42
偽陽性率 (%)	15	34	21	74	30	41	32	45
評価物質総数	88	192	315	215	135	238	110	198
非がん原物質率 (%)	39	26	29	30	22	30	29	25

Ames : 復帰突然変異試験、ML : マウスリンフォーマ TK 試験、
HPRT : 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験、CA : 染色体異常試験、MN : 小核試験

表 4 共通物質のがん原性評価における SHE CTA と各種遺伝毒性試験の比較

	SHE	Ames	SHE	ML	SHE	HPRT
評価物質総数	242		166		111	
非がん原物質率 (%)	29		28		21	
一致率 (%)	86	48	86	75	92	78
感度 (%)	90.5	36	88	86	96	79
特異度 (%)	75	78	80	35	74	71
偽陰性率 (%)	10	64	12	14	4	21
偽陽性率 (%)	25	22	20	65	26	29

	SHE	CA <i>In vitro</i>	SHE	CA <i>In vivo</i>	SHE	MN <i>In vivo</i>
評価物質総数	180		78		154	
非がん原物質数	29		29		26	
一致率 (%)	86	62	86	66	83	56
感度 (%)	89	63	91	62.5	87	57
特異度 (%)	77	59	75	71	71	54
偽陰性率 (%)	11	37	9	37.5	13	43
偽陽性率 (%)	23	41	25	29	29	46

SHE : SHE CTA、Ames : 復帰突然変異試験、ML : マウスリンフォーマ TK 試験、
HPRT : 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験、CA : 染色体異常試験、MN : 小核試験

このように、OECDは文献調査によってCTAにおけるがん原物質の予測性を検証し、DRP31としてまとめた。その結論としてSHE CTAのガイドライン化が推奨された。その結果、判定法を含む試験法の標準化ならびにガイドライン化に向け、OECDガイダンス(OECD GD34, 2005)⁹⁾に従い、EURL ECVAM主導でプレバリテーション研究が実施された。それらの結果を評価したEURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)の報告書¹⁰⁾とその報告書を受けて作成されたEURL ECVAM RECOMMENDATION¹¹⁾はともに、SHE CTAのOECDガイドラインとすることを推奨した。このような経緯を経て、SHE CTAのガイドライン案が2013年に公表された。しかしながら、提案された試験法ガイドライン案に対して、関係各国からのコメントとして試験法ガイドライン案の判定基準とDRP31の判定結果との整合性の再確認が求められた。

これを受けて、pH6.7法とpH7.0法(pH7.0を超える条件で実施されたデータは除外)で実施されているデータの再評価が行われた⁸⁾。すなわち、pH6.7法では93物質、pH7.0法では42物質について再評価が行われた(表5、表6)。

表5 がん原性評価におけるSHE CTA(pH6.7法)の正確性(再評価結果)

		<i>In vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
SHE CTA	陽性	42 (6)	8 (1)
	陰性	15 (1)	26 (0)
	不確定 (Equivocal)	1 (0)	1 (0)

一致率 (Concordance) : $(42+26)/(42+8+15+26+1+1) \times 100 = 68/93 \times 100 = 73\%$

感度 (Sensitivity) : $42/(42+15+1) \times 100 = 42/58 \times 100 = 72\%$

特異度 (Specificity) : $26/(8+26+1) \times 100 = 26/35 \times 100 = 74\%$

偽陰性率 (False Negative) : $15/(42+15+1) \times 100 = 15/58 \times 100 = 26\%$

偽陽性率 (False Positive) : $8/(8+26+1) \times 100 = 8/35 \times 100 = 23\%$

括弧内の数値は無機物質の評価数

表6 がん原性評価におけるSHE CTA(pH7.0法)の正確性(再評価)

		<i>In vivo</i> がん原性	
		がん原物質	非がん原物質
SHE CTA	陽性	24 (11)	1 (0)
	陰性	6 (2)	11 (0)

一致率 (Concordance) : $(24+11)/(24+1+6+11) \times 100 = 35/42 \times 100 = 83\%$

感度 (Sensitivity) : $24/(24+6) \times 100 = 24/30 \times 100 = 80\%$

特異度 (Specificity) : $11/(11+1) \times 100 = 11/12 \times 100 = 92\%$

偽陰性率 (False Negative) : $6/(24+6) \times 100 = 6/30 \times 100 = 20\%$

偽陽性率 (False Positive) : $1/(11+1) \times 100 = 1/12 \times 100 = 8\%$

括弧内の数値は無機物質の評価数

また、2つの方法に共通の物質(がん原物質:14物質、非がん原物質:4物質)についての結果が比較され、14のがん原物質の内1物質(diethylstilbestrol)のみ2つの試験間で結果が一致していなかったが、13物質はすべて結果が一致(12物質:陽性、titanium dioxideの1物質:陰性)していた。また、非がん原物質の内2物質は2試験でともに陰性、残りの2物質のうち、CaprolactamはpH6.7法では陰性であったが、pH7.0法では陽性であった。また、Phthalic anhydrideはpH6.7法では試験施設間で結果に差があり、pH7.0法では陰性の結果であった。このように、2つの方法にはpHの違いはあるが、ほぼ同等の結果が得られていると考えられる。

がん原物質を有機化合物と無機化合物に分けてその検出率についても検討している。pH6.7法については無機化合物が1物質であり、有用な情報とは考えられない。一方、pH7.0法については有機化合物が17物質、無機化合物が13物質あり、検出率はそれぞれ76.5%および84.6%であった。

更に、SHE CTAにおける非遺伝毒性がん原物質の検出率についても評価している¹²⁾(表7)。

表7 SHE CTAにおける非遺伝毒性がん原物質の検出率

		非遺伝毒性がん原物質	検出率(%)
SHE CTA (pH6.7法)	陽性	14 (1)	58
	陰性	10 (0)	42
	計	24 (1)	
SHE CTA (pH7.0法)	陽性	8 (4)	67
	陰性	4 (1)	33
	計	12 (5)	

括弧内の数値は無機物質の評価数

この結果は、遺伝毒性物質の定義を「いずれかの遺伝毒性試験で陽性(ただし、マウスリンフォーマ TK試験のみで陽性の場合を除く)の物質」とし、非遺伝毒性物質を以下のいずれかに該当する物質と定義してがん原物質を分類した場合の結果である¹²⁾。

- Ames試験(復帰突然変異試験)が陰性で *in vivo* 遺伝毒性試験データが無い。
- Ames試験(復帰突然変異試験)データが得られないが、他の遺伝毒性試験で陰性である。
- 得られているすべての遺伝毒性試験で陰性である。

しかしながら、遺伝毒性の評価はAmes試験のみで評価されてはいないことから、遺伝毒性物質および非遺伝毒性物質の定義を以下のように変更し^{2,12)}、遺伝毒性とがん原性の文献を再調査し、有機化合物を再分類した。

<遺伝毒性物質>

- In vitro* 試験データが陽性であり、それが *in vivo* 遺伝毒性試験で確認されている。
- In vivo* 試験データが利用できない場合には、*in vitro* 試験結果が使われる。

<非遺伝毒性物質>

・Ames 試験(復帰突然変異試験)で陰性であり、培養細胞を用いる試験(染色体異常試験/小核試験/遺伝子突然変異試験/マウスリンフォーマ TK 試験については ICH による現行の基準で判断)で陰性、あるいは標準的 *in vivo* 試験で陰性(同じエンドポイントの場合、*in vivo* 試験結果を採用する)である。

その結果、再評価された有機化合物は pH6.7 法では 85 物質、pH7.0 法では 32 物質であり、それらは遺伝毒性がん原物質、非遺伝毒性がん原物質および非がん原物質に分類され、それらの SHE CTA 結果は表8に示したように、非遺伝毒性がん原物質の検出率は、pH6.7 法では 56.5%、pH7.0 法では 83.3%であった²⁾。

表 8 SHE CTA における非遺伝毒性がん原物質の検出率

		遺伝毒性がん原物質		非遺伝毒性がん原物質		非がん原物質	
		物質数	検出率 (%)	物質数	検出率 (%)	物質数	検出率 (%)
SHE CTA (pH6.7 法)	陽性	20	71.4	13	56.5	3	8.8
	陰性	3	10.7	10	43.7	26	76.5
	Equivocal	5	17.9	0	0.0	5	14.7
	計	28		23		34	
SHE CTA (pH7.0 法)	陽性	9	64.3	5	83.3	1	8.3
	陰性	4	28.6	1	16.7	11	91.7
	Equivocal	1	7.1	0	0.0	0	0.0
	計	14		6		12	

DRP31 では、文献調査した化学物質について、IARC が報告しているヒトに対するがん原性リスク分類を記載しているが、その分類と CTA 結果の相関性についての詳細は記載されていない。

そこで、当資料編纂委員会では、DRP31 の Table 11~13 に記載されている物質のうち、ヒトに対するがん原性リスク分類の記載があり、しかも SHE CTA の結果が明らかな 169 物質について、SHE CTA 結果とヒトがん原性との相関を調査した。なお、IARC の分類については、Benigni ら¹³⁾ の報告も参考にした。その結果、グループ 1(ヒトに対してがん原性がある)およびグループ 2A(ヒトに対しておそらくがん原性がある)をヒトがん原物質とした場合、SHE CTA (pH6.7 法または pH7.0 法のいずれか一方でも陽性の場合を SHE CTA 陽性と判定)における一致率は 55.0%、感度は 93.7%、特異度は 32.1%とヒトがん原物質の検出感度の高い結果であった(Appendix II)。

さらに、IARC 分類毎、SHE CTA およびがん原性試験結果の試験法毎にそれらの相関を表 9-1 に示した。

表 9-1 ヒトにおけるがん原性リスク分類(IARC 分類)と SHE CTA およびがん原性試験結果との相関性

アッセイ系	判定	ヒトに対するがん原性			
		グループ 1	グループ 2A	グループ 2B	グループ 3
SHE CTA (pH 6.7 法)	陽性	6 (66.7%)	6 (100.0%)	12 (75.0%)	8 (36.4%)
	陰性	3 (33.3%)	0 (0.0%)	4 (25.0%)	14 (63.8%)
	計	9	6	16	22
SHE CTA (pH 7.0 法)	陽性	43 (95.6%)	13 (92.9%)	40 (87.0%)	24 (51.1%)
	陰性	2 (4.4%)	1 (7.1%)	6 (13.0%)	23 (48.9%)
	計	45	14	46	47
実験動物 における がん原性試験	陽性	48 (100.0)	16 (94.1%)	50 (94.3%)	22 (39.3%)
	陰性	0 (0.0)	1 (5.9%)	3 (5.7%)	34 (60.7%)
	計	48	17	53	56

これら物質には、げっ歯類のがん原性試験で陽性の 136 物質(有機化合物:94 物質、無機化合物:42 物質)と陰性の 38 物質(有機化合物:34 物質、無機化合物:4 物質)が含まれているが、さらに有機化合物と無機化合物に分類して表 9-2 に示した。

表 9-2 ヒトにおけるがん原性リスク分類(IARC 分類)と SHE CTA およびがん原性試験結果との相関性
(有機化合物)

アッセイ系	判定	ヒトに対するがん原性			
		グループ 1	グループ 2A	グループ 2B	グループ 3
SHE CTA (pH 6.7 法)	陽性	3 (50.0%)	6 (100.0%)	10 (76.9%)	7 (33.3%)
	陰性	3 (50.0%)	0 (0.0%)	3 (23.1%)	14 (66.7%)
	計	6	6	13	21
SHE CTA (pH 7.0 法)	陽性	11 (84.6%)	12 (92.3%)	34 (87.2%)	21 (50.0%)
	陰性	2 (15.4%)	1 (7.7%)	5 (12.8%)	21 (50.0%)
	計	13	13	39	42
実験動物 における がん原性試験	陽性	15 (100.0)	15 (93.8%)	43 (93.5%)	21 (41.2%)
	陰性	0 (0.0)	1 (6.2%)	3 (6.5%)	30 (58.8%)
	計	15	16	46	51

(無機化合物)

アッセイ系	判定	ヒトに対するがん原性			
		グループ 1	グループ 2A	グループ 2B	グループ 3
SHE CTA (pH 6.7 法)	陽性	3 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (66.7%)	1 (100.0%)
	陰性	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)
	計	3	0	3	1
SHE CTA (pH 7.0 法)	陽性	32(100.0%)	1 (100.0%)	6 (85.7%)	3 (60.0%)
	陰性	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	2 (40.0%)
	計	32	1	7	5
実験動物 における がん原性試験	陽性	33 (100.0)	1 (100.0%)	7 (100.0%)	1 (20.0%)
	陰性	0 (0.0)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (80.0%)
	計	33	1	7	5

グループ 1 における物質での SHE CTA の有機化合物の陽性率は、pH 6.7 法では 50.0%、pH 7.0 法では 84.6% であり、実験動物におけるがん原性試験の結果 (100.0%) と比較すると例数が少ないものの低い値であった。一方、無機化合物については、SHE CTA およびがん原性試験ともに 100.0% の陽性率であった。

グループ 2A における有機化合物の陽性率は、pH 6.7 法では 100.0%、pH 7.0 法では 92.3% であり、がん原性試験の結果 (93.8%) と同等であった。無機化合物については 1 物質のみであるが、いずれの pH でも陽性であった。

グループ 2B (ヒトに対してがん原性の可能性がある) における有機化合物の SHE CTA の陽性率 (76.9 および 87.2%) は、がん原性試験の結果 (93.5%) よりわずかに低下した。無機化合物も同様に、SHE CTA の陽性率 (66.7 および 85.7%) はがん原性試験の結果 (100.0%) より低下した。

グループ 3 (ヒトに対する発癌性が分類できない) における有機化合物の SHE CTA の陽性率 (偽陽性率と同じ) は、pH 6.7 法では 33.3%、pH 7.0 法では 50.0% であり、がん原性試験の結果 (41.2%) とほぼ同等であった。その陰性率 (特異度と同じ) も、pH 6.7 法では 66.7%、pH 7.0 法では 50.0% で、がん原性試験 (58.6%) とほぼ同等であった。

8. 試験方法の信頼性

1) 施設間変動

(1) ECVAM のプレバリデーション研究

SHE CTA の施設間の再現性は、pH6.7 および pH7.0 法のどちらも、表 10 に示すように 4 つのがん原物質と 2 つの非がん原物質、計 6 物質を用いて検証された (Benzo[a]pyrene は陽性対照物質としての評価)^{6,7)}。

表 10 ECVAM プレバリデーション研究で検討された被験物質

化学物質	CAS 番号	げっ歯類がん原性 (出典)
Benzo[a]pyrene	50-32-8	あり (IARC, 2009)
Anthracene	120-12-7	なし (IARC, 2009)
2,4-Diaminotoluene	95-80-7	あり (IARC, 2009)
3-Methylcholanthrene	56-49-5	あり (Gold and Zeiger, 1997)
o-Toluidine HCl	636-21-5	あり (NTP)
Phthalic anhydride	85-44-9	なし (NTP)

pH7.0 法については、4 施設にて試験を行い、評価した結果、Phthalic anhydride を除く全ての被験物質について判定結果が一致し、動物がん原性の結果とも合致した。Phthalic anhydride については、1 施設にて 1 濃度のみ形質転換コロニーの有意な増加があり、傾向検定でも有意な傾向を示したことから陽性との判定になったが、他の施設では動物がん原性の評価結果と同じく、陰性と判定された。

pH6.7 法については、3 施設にて試験を行い、評価した結果、全ての被験物質の判定結果が一致し、Phthalic anhydride を除いては動物がん原性試験結果とも合致した。Phthalic anhydride の SHE CTA の評価結果は各施設とも陽性と判定したが、動物がん原性を示さないとする NTP の報告と矛盾し、また上記の pH7.0 法の SHE CTA における評価結果とも異なる。この理由として Phthalic anhydride の異なる pH での安定性の違いが指摘されている。つまり Phthalic anhydride は水環境下で速やかに加水分解し、非遺伝毒性の Phthalic acid に変化するが、SHE CTA では使用する緩衝液が異なり、より低い pH では Phthalic anhydride の半減期が長くなることから、異なった試験結果が得られた可能性が示されている。

上記の施設間の試験結果を総合的に評価した結果、各施設での SHE CTA の評価結果は基本的に一致するものであり、pH6.7 法および pH7.0 法ともその施設間再現性は高いと判断された。

判定結果に関して、コロニーのカウントが主観的であることによる判定のばらつきが懸念されていたが、写真標本の提供が判定のばらつきの抑制に大きく寄与していると考えられた。

(2) その他の文献報告との一致性

pH7.0 法については、類似プロトコルによる再現性を評価した文献報告¹⁴⁾ならびに 2 機関以上で評価された物質の 87.7% (57/65) が一致するとして DRP31 を参照した。また pH6.7 法については、類似プロトコルによる再現性を評価した文献報告^{15,16)}および上記 DRP31 を参照した。これらの報告から、良好な施設間再現性を示すと考えられた。

2) 施設内変動

施設内再現性については、pH6.7 法および pH7.0 法の両方について、プレバリデーション研究が行われ評価されているが、陽性対照として使用した 1 化合物 (Benzo[a]pyrene) の結果のみの評価となっている^{6,7)}。

pH6.7 法では、コード化せずに実施した結果とコード化して実施した 3 施設の結果を比較して評価している。その結果、1 施設でコントロールの形質転換率が他の 2 施設と異なる値が得られているが、陽性対照物質である Benzo[a]pyrene の結果はほぼ同様の値が得られている。一方、pH7.0 法ではコード化した Benzo[a]pyrene を用いて 1 施設のみが 3 回の繰り返し実験を行い、良好な結果が得られている。

ESAC の報告¹⁰⁾にあるように、プレバリデーション研究では施設内再現性を調べるための適切な実験デザインが組まれておらず、現在の評価基準で考えた場合、施設内再現性については十分な評価が行われているとは結論できない。

9. 試験方法のデータの質

- プレバリデーション報告書によると、プレバリデーション研究の施設内再現性の確認を複数の化合物で実施しなかったなど方法に不十分な点があったものの、試験実施に必要なスキルの訓練を受けた施設での施設内/施設間再現性は確保されており、データの質は担保されていると考えられる。
- 評価上最も重要なデータは、形質転換コロニーの計測値である。画像アトラスにより標準化されているものの、形質転換コロニーは目視で判別するため、判別法の客観性に乏しい。このため、データの質の担保には、コード化して取得されたデータであることが重要となる。プレバリデーション研究の化合物はコード化され、形質転換コロニーの計測はコード化して行われた。従って、取得されたデータの質は担保されていると考えられる。
- 試験の妥当性を担保するためのもう一つの重要な DRP31 で採用されたデータはコード化して取得されたものではない。しかしながらプレバリデーション研究の判定基準を以て DRP31 データを再評価した結果、感度や特異度で大差がなかったことから、これらについてもデータの質は担保されていると考えられる。

10. 試験方法に関する他の科学的な報告

SHE CTA と同様に細胞の CTA には以下の方法が開発されている。

- 1) 細胞株 BALB/c3T3 を用いる CTA
- 2) 細胞株 Bhas42 を用いる CTA*
- 3) 細胞株 C3H10T1/2 を用いる CTA
- 4) JB6 細胞を用いる CTA

*2) Bhas42 を用いる CTA が 2016 年 1 月 OECD ガイダンス¹⁷⁾となった。

上記の 1)～3)については、SHE CTA と同様に形質転換した細胞についての評価であるが、形成されたコロニー中の形質転換したコロニー数を数えるのではなく、単層の正常細胞中で増殖した形質転換細胞が形成するフォーカス(形質転換細胞の集合体)の数を計測するものである。4)の JB6 細胞については、軟寒天培地での増殖能(足場依存性の喪失)を指標とする試験である。

11. 3Rs への関与(動物福祉面からの妥当性)

SHE CTA ではシリアン・ハムスターの胎仔から得た初代培養細胞を用いるため、動物を犠牲にする必要がある。そのため、他の培養細胞(Bhas42, BALB/c 3T3)を用いる CTA と比較して、動物福祉面では不利であることは否めない。しかしながら、一匹の妊娠動物由来の胎仔細胞で約 50 回の CTA が実施可能であること、および本試験を含む CTA はがん化過程における生物学的プロセスを評価するため、適切に実施することによって、多数の動物を使用するがん原性試験および関連試験を回避、あるいは省略することが期待できるため、動物福祉への寄与は大きいと考えられる。

12. 試験方法の有用性と限界

1) 有用性

(1) CTA

- がん化の過程を説明する多段階説によれば、変異原物質によりイニシエーション作用を受けた細胞は、更にその後さまざまな要因によって悪性形質を獲得すると考えられている。CTA は、培養正常細胞或いは株細胞が形態形質転換することを指標にして、化学物質の形質転換能の有無を予測する *in vitro* 試験法の一つとしての特徴がある。
- 他のがん原性予測試験結果とともに、WoE の一つとして CTA の結果を利用することができる。本試験法は現行のがん原性試験に完全に置き換わる試験法としての位置づけではなく、補助的な試験（例えば、がん原性試験の実施順位を決めるためのスクリーニング、がん原性試験が要求されないカテゴリーの医薬品のがん原性関連情報の取得など）として位置づけることは可能である。
- 3Rs の観点からも有用である。

(2) SHE CTA

CTA の有用性に加えて以下の有用性を認める。

- DRP31 の 245 化学物質で評価された結果において、SHE CTA の結果とがん原性試験結果との相関が認められる。
- SHE CTA の細胞調製は凍結保存した初代二倍体細胞を用いるが、必要とする動物数のがん原性試験に用いる動物数に比べはるかに少ない。
- 3Rs の観点から有用であることに加えて、不死化培養細胞を用いる CTA と比較して、初代培養細胞を用いることから、より正常細胞に近い状態を維持した実験系であると考えられる。

2) 問題点(限界、不利点、適用限界)

(1) CTA

- CTA で結果が陽性であっても、化学物質の形質転換能から、その化学物質の *in vivo* におけるがん原性の強さ、臓器特異性、および種特異性に関する情報は得られない。

- CTA のエンドポイントである形質転換の発生機序が明らかになっていないため、非遺伝毒性が
ん原物質の作用機序に関する情報は得られない。
- 一般的な *in vitro* 試験と同様に、結果の妥当性は標準化されたプロトコルに従って一連の試験操
作が正確に行われることによって保証される。CTA の結果の正確性を保証するため、試験操作は
もちろん、形質転換コロニー/フォーカスの判別スキルの習熟が重要である。標準物質で誘導された形
質転換コロニー/フォーカスの画像アトラス等を利用したスキル確認は重要である。
- 形質転換コロニー/フォーカスの自動判別法の開発が進んでいないため、現時点での多検体高速スク
リーニングの報告数は少ない。広範な化学物質の形質転換能を CTA で一次スクリーニングするため
には、試験系の更なる改良、或いは、形質転換コロニー/フォーカスの革新的判別方法の開発が必要で
ある。

(2) SHE CTA

CTA における問題点に加えて以下の問題点を認める。

- SHE CTA には、イニシエーションとプロモーション作用とを区別する試験法が記載されていな
いため、イニシエーション/プロモーション作用といった観点での被験物質の作用機序を明らか
にすることはできない。
- SHE CTA では、プレバリデーション研究が行われた 6 物質（但し、選択された物質には、作用
メカニズムに偏りがあるとされている）については、がん原性試験結果との相関（感度、特異
度、偽陽性・偽陰性の識別の結果）は確認されているが、選択された物質には、作用機作に偏りが
あり、化学物質の数や種類も十分ではない。評価された化学物質には遺伝毒性を有するがん原物
質が多く含まれ、非遺伝毒性がん原物質（“真の (*bona fide*) 非遺伝毒性がん原物質” の定義には
議論の余地がある）が少ないため、非遺伝毒性がん原物質の検出系という観点での有用性の検証
は不十分である。

3) 今後の課題

細胞が形質転換する作用機構の解明が重要である。しかし、この課題はハードルが高い。

- ヒト細胞でも起こりうるかを再現するためには、ヒト細胞を用いた CTA が開発されることが望ましい。(*In vivo* における、動物からヒトへの外挿と同じ問題を含んでいる。)
- 形態形質転換コロニーの判定の客観性の確保が実務上必要である。
- 真の (*bona fide*) 非遺伝毒性がん原物質の数を増やして CTA を多く実施し、多くのデータを収集する。
プレバリデーション研究で用いた被験物質には真の非遺伝毒性がん原物質の数が遺伝毒性がん原物
質と比較して極めて少なかったことなどが、OECD の試験法ガイドラインとして承認(同意)されなかつた
理由の一つと言われている。これらの科学的・技術的な問題点が克服され、また正式なバリデーション
研究が実施されれば、CTA がテストガイドライン化される可能性はある。
- SHE CTA では、基本的な薬物代謝機能を保持している細胞を用いることから、代謝活性化を必要とす

る様々な化学物質の形質転換能が検出可能である。また、外部代謝活性化系を適用することにより、形質転換能の増強や新たな形質転換能を持つ化学物質を検出できるとした報告¹⁸⁻²¹⁾が少数ではあるが公表されている。すなわち、通常の形質転換試験で陰性の結果が得られた物質に関しても、外部代謝活性化系を適用することにより、更にこの試験系の正確性が高まる可能性がある。

13. 結論

- 1) CTA は *in vitro* において、化学物質を曝露することで起きる「細胞の形態」や「表現形質」の悪性を指標として腫瘍誘発性の有無を調べる試験法の一つである。
- 2) 形質転換した細胞が悪性化することで、ヌードマウスや同系統の動物への造腫瘍性が認められるため、がん原性とは何らかの関係があることが推察される。
- 3) 化学物質を用いた CTA の結果と、げっ歯類がん原性試験の結果には相関があることが報告されている。
- 4) SHE CTA の結果とげっ歯類でのがん原性試験との一致率、感度、特異度などの数値、および IARC のグループ別のがん原物質から判断すると、SHE CTA はがん原性試験の代替法としての位置づけではなく、がん原物質検出のスクリーニング試験法の一つとして位置づけることができる。

14. 参考文献

1. Guidance Document on the In Vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay, Series on Testing & Assessment No 214, ENV/JM/MONO (2015)18,OECD (2015), Paris
2. Report on the Evaluation of Genotoxic or Non-genotoxic Activity of the Organic Chemicals Tested in the SHE Cell Transformation Assay, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 17
3. Pienta, R. J., J. A. Poiley, and W. B. Leberherz III. Morphological transformation of early passage Golden Syrian embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying divers carcinogens. *Int. J. Cancer*: 19, 642-655 (1977)
4. Watanabe, Masami and Keiji Suzuki, Expression dynamics of transforming phenotypes in X-irradiated Syrian golden hamster embryo cells. *Mutat. Res.*, 249:71-80 (1991)
5. Detailed review paper on cell transformation assays for detection of chemical carcinogens, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 31 OECD (2007)
6. Report of the Validation Management Team on the ECVAM prevalidation study concerning the SHE pH6.7 Cell Transformation Assay, EC-ECVAM (2010a)
7. Report of the Validation Management Team on the ECVAM prevalidation study concerning the SHE pH7.0 CTA, EC-ECVAM (2010b)
8. Results of An Analysis of The Performance of The Syrian Hamster Embryo Cell Transformation Assay at PH 6.7 and PH 7.0, 26th Meeting of the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Program (WNT), ENV/JM/TG/RD (2014) 16
9. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 34 OECD (2005)
10. ESAC Working Group Peer Review Consensus Report on an ECVAM-coordinated prevalidation study concerning three protocols of the Cell Transformation Assay (CTA) for in vitro carcinogenicity testing, (2011)
11. EURL ECVAM Recommendation on three Cell Transformation Assays using Syrian Hamster Embryo Cells (SHE) and the BALB/c 3T3 Mouse Fibroblast Cell Line for In Vitro Carcinogenicity Testing (2012),
12. Draft Summary Record of a Meeting on Cell Transformation Assay, 14-16th January 2014, Paris, France, ENV/JM/TG/M(2014)1/REV2
13. Benigni R, Bossa C, Battistelli CL, Tcheremenskaia O, IARC Classes 1 and 2 carcinogens are successfully identified by alternative strategy that detects DNA-reactivity and celltransformation ability of chemicals. *Mutat. Res.*, 758 56– 61 (2013)

14. Isfort RJ, Kerckaert GA, LeBoeuf RA, Comparison of the standard and reduced pH Syrian Hamster Embryo (SHE) cell in vitro transformation assays in predicting the carcinogenic potential of chemicals. *Mutat. Res.*, 356: 11-63 (1996)
15. LeBoeuf RA, Kerckaert KA, Poiley JA and Raineri R, An interlaboratory comparison of enhanced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells cultured under conditions of reduced bicarbonate concentration and pH. *Mutat. Res.*, 222: 205-18 (1989)
16. Engelhardt G, Schwind KR and Mußler B, The testing of chemicals in Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay for assessment of carcinogenic potential. *Toxicol. in vitro*, 18: 213-8 (2004)
17. Guidance Document on the In Vitro Bhas42 cells Transformation Assay. Series on Testing & Assessment No 231, ENV/JM/MONO (2016) 1, OECD (2016)
18. Tsutsui T, Suzuki N, Maizumi H and Barrett J C, Characterization of an unscheduled DNA synthesis assay with Syrian hamster embryo cells, *Mutat. Res.*, 129:111-7 (1984)
19. Tsutsui T, Suzuki N, Maizumi H, McLachlan, J A and Barrett J C, Alteration in diethylstilbestrol-induced mutagenicity and cell transformation by exogenous metabolic activation, *Carcinogenesis*, 7:1415-8 (1986)
20. Tsutsui T, Watanabe E and Barrett J C, Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 14: 611-8 (1993)
21. Hayashi N, Hasegawa K, Komine A, Tanaka Y, McLachlan J A, Barrett J C and Tsutsui T, Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Mol Carcinogenesis*, 16:149-56 (1996)