

P-043

The Report of International Validation Study (Phase I) for the Bhas 42 Cell Transformation Assay Using 96-well Culture Plates

Shoko Arai¹, Kiyoshi Sasaki¹, Ayako Sakai¹,
Dai Muramatsu¹, Nobuko Endou¹,
Fukutaro Mizuhashi², Miho Nagai²,
Masumi Asakura³, Nobuhiko Tashiro⁴, Nana Ishii⁴,
Masaya Suzuki², Noriho Tanaka¹

¹Food and Drug Safety Center, ²Biosafety Research Center,
Foods, Drugs and Pesticides, ³Japan Bioassay Research
Center, ⁴Mitsubishi Chemical Medience Corporation

Introduction: The Bhas 42 cell transformation assay (Bhas 42 CTA) predicts the carcinogenicity of chemicals with high probability. The Bhas 42 CTA using 96-well culture plates (96-well method) has been proposed for a high-throughput system. In this study, the first phase of international validation study for the 96-well method was carried out. **Methods:** Under the initiative by JaCVAM, seven coded test chemicals were distributed to four participating laboratories, and the initiating and promoting activities of these chemicals were tested. **Results:** In 53 out of 55 assays, the same assay results were obtained from four laboratories (concordance: 96.4%). **Discussion:** The interlaboratory reproducibility of the 96-well method was excellent.

This study was supported by the New Energy and Industrial Technology Development Organization.

96ウェル培養プレートを用いたBhas 42細胞形質転換試験の国際バリデーション研究 (第I相) に関する報告

新井 晶子¹、佐々木 澄志¹、酒井 綾子¹、村松 大¹、
遠藤 伸子¹、水橋 福太郎²、永井 美穂²、浅倉 眞澄³、
田代 信彦⁴、石井 奈々⁴、鈴木 雅也²、田中 憲穂¹

¹(財)食品薬品安全センター、²(財)食品農薬医薬品安全性評価
センター、³日本バイオアッセイ研究センター、⁴三菱化学メ
ディエンス(株)

【背景】 Bhas 42細胞形質転換試験は、化学物質の発がん性を高い確率で予測することができる。近年、本試験系のハイスループット化を図る目的で、96ウェル培養プレートを用いる試験法(96ウェル法)を提案した。本研究では、96ウェル法のための国際バリデーション研究として、第I相試験を実施した。**【方法】** 日本代替法評価センター(JaCVAM)主導のもと、コード化した7検体を4施設に配布し、それらのイニシエーション活性およびプロモーション活性を調べた。**【結果】** 全55試験のうち53試験において、4施設の試験結果は一致していた(一致率=96.4%)。**【考察】** 96ウェル法における施設間の再現性は、良好である。

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構の支援により行われた。

P-044

Detection of DNA Damage Caused by Perfluorooctanoic Acid Using the Paramecium Comet Assay

Haruna Goto, Kosuke Kawamoto, Itaru Sato,
Shuji Tsuda

Faculty of Agriculture, Iwate University

Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a suspected carcinogen and is found in various environments worldwide. We examined genotoxicity of PFOA using two types of paramecium comet assays: a whole cell comet assay and a subcellular comet assay.

For the whole cell comet assay, paramecia were incubated with 1 mM PFOA for 1 hr and the large nuclei were separated in 0.25 M sucrose solution containing 0.6% Triton X-100. The procedure after embedding the large nuclei in the agarose gel was same as the conventional alkaline comet method. For the subcellular comet assay, 1 mM PFOA was incubated with the heated (80°C for 20 min) nuclei for 1 hr after their lysing, and electrophoresed at pH 13, 12.1 and 9.

DNA migration increased in both assays. In the subcellular assay, DNA migration increased at pH 13 and 12.1, but not at pH 9.

Therefore, subcellular comet assay with heated nuclei is considered as an effective way to evaluate direct DNA damage in a non-enzymatic state. It is suggested that PFOA induces single-strand breaks in DNA by directly acting DNA without enzymatic agency.

ゾウリムシComet法によるPFOAのDNA損傷の検出

後藤 遥奈、河本 光祐、佐藤 至、津田 修治

岩手大学農学部

Perfluorooctanoic acid (PFOA) は、発がん性を持つ可能性が指摘される難分解性物質であり、世界中の様々な環境で検出されている。今回我々は2種類のゾウリムシ comet 法: whole cell comet 法 (WCC法) と subcellular comet 法 (SCC法) を用いて、PFOAの遺伝毒性について検討した。

WCC法では、ゾウリムシを1 mMのPFOAに1時間暴露後、0.6% Triton X-100を含む0.25 Mスクロースで大核を分離し、以降の操作は通常のalkali comet法と同様に行った。SCC法では、80°Cで20分間加熱した大核を核膜溶解後に1 mMのPFOAに1時間暴露し、pH 13,12.1および9の泳動液を用いて電気泳動を行った。

WCC法とSCC法で共にPFOAによるDNA migrationの有意な増加が認められた。SCC法でのDNA migrationはpH 13と12.1で有意に増加したが、pH 9では増加しなかった。

以上の結果から、加熱した核を用いたSCC法は非酵素状態で起こる直接的なDNA損傷を評価する際に有効であり、PFOAがDNAに直接作用して非酵素的にDNAの1本鎖切断を引き起こすことが示唆された。