

精進基因毒性試驗與 3Rs 策略探討與研析

盧欣怡^{1*}、李彥芸¹

摘要

盧欣怡、李彥芸。2025。精進基因毒性試驗與 3Rs 策略探討與研析。臺灣農藥科學 19 : 69-95。

致腫瘤性在新化合物開發及化學物質安全性評估中一直是備受關注的重要健康議題。然而，進行為期兩年的致腫瘤性動物研究作為毒性測試，需要犧牲大量動物，準確性也有文獻提出檢討，尤其與 3R 的理念大相逕庭，既不符合動物福祉，也不具成本效益。目前，許多基因毒性測試被開發為短期篩選工具，用於預測化合物的致腫瘤潛力，並成為國際間化合物登記所必需的測試，導致大量試驗需求。歐盟動物替代試驗參考實驗室根據 3Rs 原則（替代、減量及精緻化）提出一系列策略，以減少基因毒性及後續致腫瘤性試驗中的動物使用量。這些策略包括：(1) 精進現有細胞基因毒性試驗方法，降低偽陽性結果，減少後續無謂的動物試驗；(2) 優化現有的致變異性動物試驗，或與其他毒性試驗相結合，進一步減少實驗動物的使用；(3) 開發並驗證替代性測試方法，以補足非基因毒性途徑下的致腫瘤機制，提升致腫瘤性預測的準確性，部分替代傳統的啮齒類動物致腫瘤試驗。本報告將詳細探討基因毒性在致腫瘤性預測中的理論基礎及其限制，並分析試驗執行單位如何導入 3Rs 策略，在提升試驗準確性的同時，滿足法規要求及兼顧動物福祉的目標。

關鍵詞：致腫瘤性、基因毒性、3Rs 策略

接受日期：2025 年 7 月 22 日

* 通訊作者。E-mail: evalu@acri.gov.tw

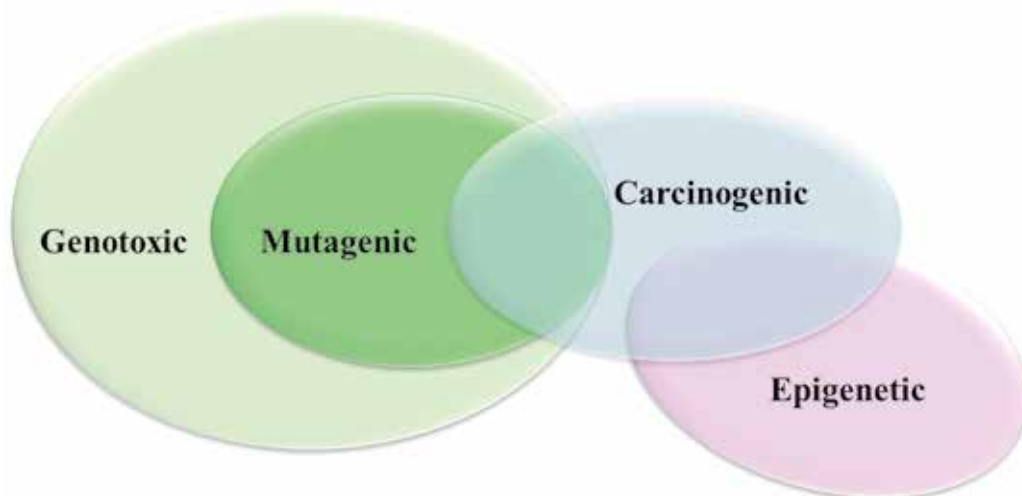
¹ 臺中市 農業部農業藥物試驗所

前言

「基因毒性 (genotoxicity)」是指任何類型之可測量的遺傳物質改變，包括最終導致突變 (mutations) 或透過 DNA 修復逆轉之突變和 DNA 損傷，可能會或不會導致後代細胞發生永久性和可遺傳性的改變。其中，致變異性 (mutagenicity) 亦屬於基因毒性範疇，惟特別指細胞 DNA 物質的永久性改變且能藉由細胞分裂或遺傳傳遞下去的能力 (圖一)，包括 (1) 單一或多個基因的 DNA 鹼基對改變；(2) 染色體斷裂 (chromosome break) 所造成的缺失、重複或重新排列之影響；(3) 整條染色體的獲得或缺失，形成非整倍體；或 (4) 有絲分裂重組所造成任何的 DNA 變化

等^(3,88)。大部分狀況下，基因毒性及致變異性為可互通之專有名詞，本文為讓讀者更容易閱讀，致變異性試驗係專指為量測基因突變 (gene mutation) 或染色體畸變 (chromosomal aberration，包括染色體結構性異常 (structural aberration) 及染色體數目改變 (numerical aberration)) 等不可逆性且具傳遞性基因毒性事件之測試方法^(3,31)。

突變可以發生在生殖細胞 (germ cells) 和體細胞 (somatic cells)。當突變發生在生殖細胞有絲分裂時，可能將突變傳遞到後代；若突變發生在生殖細胞受精時，有可能造成受精卵無法存活，抑或是影響發育晚期造成胚胎死亡，或引起先天性的發育異常^(19, 41)。體細胞的突變可發生在各種細胞上，但不會傳遞到下一代，



圖一、基因毒性、致變異性、表觀遺傳學性及致腫瘤性潛力之間的關係⁽³⁾。

Fig. 1. Relationship among genotoxic, mutagenic, epigenetic, and carcinogenic potentials⁽³⁾.

該突變有可能引起細胞死亡或藉由有絲分裂將基因缺損傳遞到子細胞甚或引發腫瘤病變^(41, 88)。自 1973 年 Bruce Ames 博士發表使用細菌基因逆向變異試驗檢測化學物之致變異性，且其結果對化學物之致腫瘤潛力具有高度預測性後 (70-90% 陽性預測力)，基因毒性試驗逐漸演變成篩選化學物是否為潛在致癌物的常規檢測，應用於多種化學物包括農藥、人醫用藥、獸醫用藥、工業化學品、飼料添加物和化妝品等之前導試驗或是用於權責機構登記註冊時必要繳交的試驗項目之一^(49, 50, 94)。

由於細菌體系的基因毒性試驗有其限制性 (例如無法檢測具有殺菌性的化學物或無完整的代謝能力)⁽⁴⁹⁾，其他哺乳動物細胞或動物的基因毒性試驗被開發出來以弭補其缺點，各化學物管理權責機關也將上述不同體系的試驗以成組 (battery) 或分階段 (tiered) 方式併入登記審查的試驗要求^(31, 75)。歐盟動物替代試驗參考實驗室 (EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing，以下簡稱 EURL ECVAM) 於 2013 年提出如何就現有相關法規要求下，以替代 (replacement)、減量 (reduction) 及精緻化 (refinement) 之 3Rs 原則，減少基因毒性動物試驗或後續致腫瘤試驗之策略^(16, 17)，主要包含三個方向 (圖二)：(1) 降低目前細胞體系基因毒性試驗的偽陽性結果 (false positive) 或稱為不相關性正反應結果 (irrelevant positive)，以減少後續不必要的動物試驗 (即動物基因毒性試驗或致

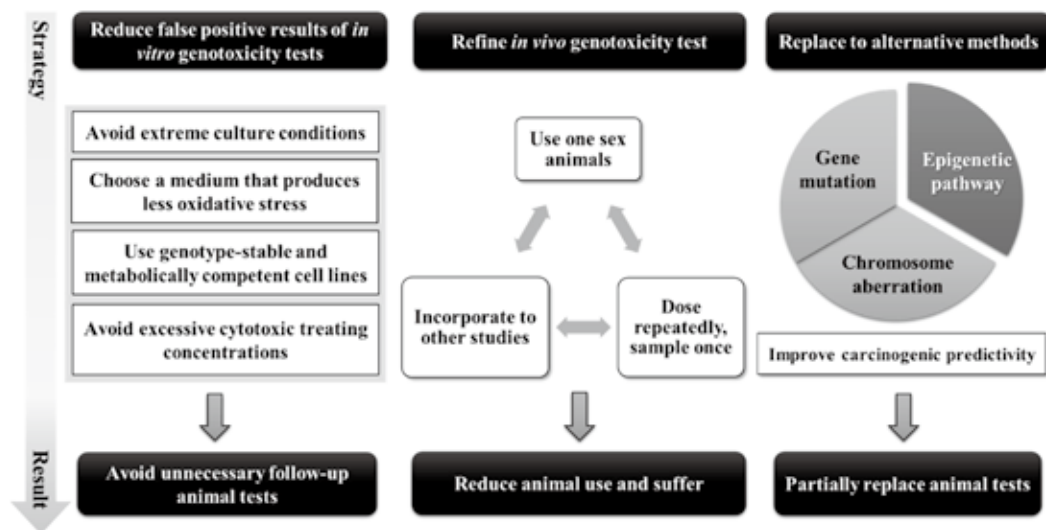
腫瘤性試驗⁽⁷⁵⁾)；(2) 優化現有的基因毒性動物試驗 (例如有條件下使用單一性別動物) 或與其他動物毒性試驗 (toxicity study) 合併 (例如合併重複口服毒性 28 天試驗和微核試驗) 減少使用動物量；(3) 尋找並驗證替代性試驗 (例如細胞轉化測試 (cell transformation assay))，補足致腫瘤機制內非基因毒性 (non-genotoxic，或稱表觀遺傳學性 (epigenetic)) 途徑致腫瘤篩選系統，提昇預測致腫瘤潛力正確性，以部分替代啮齒類動物致腫瘤性試驗 (rodent carcinogenic bioassays)^(21, 37)。

本文將介紹基因毒性預測致腫瘤性的理論基礎和限制性，以及試驗執行單位可導入的 3Rs 策略。

多階段致腫瘤作用和基因毒性試驗簡介

根據過去動物試驗結果，學者推測致腫瘤作用 (carcinogenesis) 是屬於多階段 (multistage) 的病變過程，包括：起始 (initiation)、促進 (promotion) 和進展 (progression) 三階段。

起始階段通常發生的很快速，在這個階段發生的變異通常需要和 DNA 發生共價鍵結、屬於基因毒性 (genotoxic)、不可逆性反應，單一處理即可能產生作用。進入促進階段時，通常是藉由非受體或受體控制的調節作用來促進細胞增生、促進有絲分裂或抑制細胞凋亡而使得細胞持續增加。這個階段的腫瘤促進物 (tumor promoter)



圖二、基因毒性試驗之動物減量策略。

Fig. 2. Strategies to reduce the use of animals in regulatory genotoxicity testing.

通常屬於非基因毒性致癌物 (non-genotoxic carcinogens)，需透過重複和持續性的暴露後，讓起始細胞增生形成癌前病變 (preneoplastic lesions)。一旦暴露移除，促進作用會消失，癌前病變也會停止生長，恢復到起始細胞階段。因此，這個階段的反應通常具有劑量反應性、具有閾值 (dose-dependent threshold) 和可逆性 (reversible) 等特性。當癌前病變轉變成腫瘤進入進展 (progression) 階段時，會發生更多的基因毒性事件，例如，染色體畸變等，引發更多的基因毒性傷害⁽³⁹⁾。當細胞累積更多的突變和非基因性變化後，細胞正常生長機制失控，使得腫瘤細胞生長速度遠高於周邊正常細胞，成為惡性或良性腫瘤。這個階段通常具有基因毒性 (包括染色體畸變和突變)、不可逆性

等特色⁽⁴¹⁾。

綜觀整個致腫瘤作用的進程，起始 (initiation) 和進展 (progression) 階段均有基因毒性事件的發生，包括：基因突變和染色體畸變等，若能夠偵測到這些事件且經過篩選就可以降低具有致腫瘤潛力的物質進入環境和生物體內⁽⁸⁸⁾。鑑此，許多基因毒性或致變異性試驗方法 (genotoxicity/mutagenicity test) 被開發出來偵測可能的致癌物⁽⁹⁴⁾，然而目前為止並未有單一項基因毒性試驗，就可以囊括所有發展成腫瘤的機制，必須用多項不同測試終點的基因毒性試驗結果進行綜合性判定。有些基因毒性例如 DNA 傷害 (DNA damage)，在細胞自我修復過程中有可能會恢復，一般初階段的基因毒性檢測並未將 DNA 傷害入；而如基因突變 (gene

mutation) 或染色體畸變 (chromosomal aberration, 包含結構性和數目性畸變) 等屬於不可逆性突變, 現今國際權責機構多以要求這兩項檢測終點 (endpoint) 為第一階段必要之致變異性試驗要求^(3, 31)。以經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Co-operation and Development, 以下簡稱 OECD) 發布的試驗指引為例, 共有 5 項體外和 9 項動物體內基因毒性試驗指引 (詳見表一)。

此處要說明的是, 突變 (mutation) 和癌症 (cancer) 本來就不是等同的生物學效應, 突變只是癌症產生過程中的部分因子 (圖一), 很難以單一基因毒性試驗來完全預測化學物的體內致腫瘤性潛力和強度 (potency)^(49, 50, 94)。Cooper 等人 (1979) 提出以預測表現 (predictive performance) 指數來比對不同的基因毒性試驗對於齧齒動物或人類致癌物的預測能力 (表二)⁽¹⁵⁾, 其代表意義如下:

表一、目前已發行可使用的 OECD 基因毒性試驗指引清單^(56-57, 59-66, 68-71)

Table 1. Current OECD genetic toxicology test guidelines^(56-57, 59-66, 68-71)

Endpoint/test system	Test title	Test guidelines (Year)
Gene mutation		
Bacteria	Bacterial reverse gene mutation assay	OECD 471 (2020)
Cells	<i>In vitro</i> mammalian cell gene mutation tests using the Hprt and xprt genes	OECD 476 (2016)
	<i>In vitro</i> mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene	OECD 490 (2016)
Animals	Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay	OECD 470 (2022)
	Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays	OECD 488 (2022)
Chromosome aberration		
Cells	<i>In vitro</i> mammalian chromosome aberration test	OECD 473 (2016)
	<i>In vitro</i> mammalian micronucleus test	OECD 487 (2023)
	<i>In vitro</i> mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene	OECD 490 (2016)
Animals	Mammalian erythrocyte micronucleus test	OECD 474 (2016)
	Mammalian bone marrow chromosomal aberration test	OECD 475 (2016)
	Rodent dominant lethal test	OECD 478 (2016)
	Mammalian spermatogonial chromosomal aberration test	OECD 483 (2016)
	Mouse heritable translocation assay	OECD 485 (1986)
DNA damage		
Animals	Unscheduled DNA synthesis (UDS) test with mammalian liver cells <i>in vivo</i>	OECD 486 (1997)
	<i>In vivo</i> mammalian alkaline comet assay	OECD 489 (2016)

Note: The information presented was tabulated by the authors as of March 28, 2025.

表二、描述致癌物篩選測試的有效性方法⁽¹⁵⁾Table 2. Validity of carcinogen screening test⁽¹⁵⁾

Test outcome	<i>In vivo</i> carcinogens		Total
	Yes	No	
Positive	a	b	a+b
Negative	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N=a+b+c+d
Sensitivity = $a/(a+c)$	False positive = $b/(b+d)$	Positive predictivity = $a/(a+b)$	
Specificity = $d/(b+d)$	False negative = $c/(a+c)$	Prevalence = $(a+c)/N$	

1. 敏感度 (sensitivity)：已知致癌物在基因毒性試驗中出現陽性反應結果比例；
2. 專一性 (specificity)：非致癌物在基因毒性試驗結果為陰性反應的比例；
3. 偽陽性 (false positive)：非致癌物在基因毒性試驗結果為陽性反應的比例；
4. 偽陰性 (false negative)：致癌物在基因毒性試驗結果為陰性反應的比例；
5. 陽性預測力 (positive predictivity)：化學物在基因毒性試驗結果為陽性反應且的確為致癌物的比例；
6. 陰性預測力 (negative predictivity)：化學物在基因毒性試驗結果為陰性反應且的確不是致癌物的比例；
7. 盛行率 (prevalence)：在所有檢測化學物中致癌物所佔的比例。

理想上，基因毒性試驗最好能兼顧高敏感性及高專一性，具有良好的陽性及陰性預測力，但在現實面上，並非所有試驗方法都能滿足上述要求。當既有的基因毒性試驗表現，只傾向於單一指數時，以權責機關的保護立場上，會選擇敏感性較高的測試方法，專一性就不是第一考量。然而，這對於藥物或化合物開發端而言，專

一性低代表偽陽性高，也代表在篩選候選藥物時，可能會因為這些與基因毒性不相關的陽性結果，而捨去具有開發潛力的化合物或藥物，或是必須進行後續大量的動物試驗來釐清致腫瘤性疑慮，這對於業界或消費者之社會經濟影響都不是我們所樂見的。以下介紹基因毒性試驗可導入之 3Rs 策略，在提升試驗準確性的同時，滿足法規要求和動物福祉的目標。

精進基因毒性試驗與 3Rs 策略

一、降低哺乳細胞基因毒性試驗之偽陽性結果

如果化學物在一項或多項體外基因毒性測試中呈陽性結果，會被要求繳交其他體外機制研究外，還可能進一步要求進行體內基因毒性試驗，甚而動物致腫瘤性試驗，以評估對人類的健康風險。然而有部分的基因毒性陽性反應，無法與致腫瘤性試驗出現一致性結果，亦不具有突變機制相關性，被稱之為偽陽性或是非相關性陽性反應。由 Matthews 等人 (2006)⁽⁴⁸⁾ 分析

資料可知在細胞體系所進行的基因毒性試驗，如小鼠淋巴瘤細胞基因變異試驗 (mouse lymphoma mutation assays)、體外染色體畸變試驗 (*in vitro* chromosome aberration tests) 及體外微核試驗 (*in vitro* micronucleus tests) 等有較高的偽陽性率，分別為 55.8%、36.7%及 76.9% (表三)，原因可能來自於培養液本身或與測試物的交互作用、使用的細胞來源缺乏自身代謝能力、p53 基因功能缺失或 DNA 修復機制、極端的培養環境或是過高的細胞殺傷力等原因有關。若能降低這些誤導性的陽性結果 (misleading positives)，勢必能降低後續不必要的大量動物試驗⁽⁴⁰⁾。

(一) 部分細胞培養液種類會產生較高的氧化壓力 (oxidative stress)

相較於活體內 (含氧量 1-10 mm Hg)，體外細胞培養環境本身就有更高的含氧量 (95% 空氣 / 5% CO₂ 條件下約含氧 150mm Hg)、部分培養液配方含有氧化前驅物 (例如 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養基含有三價鐵離子 (Fe(NO₃)₃) 成分) 及化學物本身成分不穩定 (例如抗壞血酸 (ascorbate) 或類黃酮類 (flavonoids)) 具有氧化前驅物作用 (pro-oxidant)，容易產生氧化作用 (oxidation) 等，上述原因均為產生過氧化氫 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 或其他活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS) 營造很好的環境，增加細胞的氧化壓力⁽³⁰⁾。根據 Long 等人 (2007) 研究指出，在某些培養液配方如 DMEM±Hepes、RPMI 1640、McCoy's 5A 及 William's E

表三、基因毒性研究在不同終點和測試系統中的預測性能比較⁽⁴⁸⁾

Table 3. Comparison of the predictive performances of genotoxic studies at different endpoints and test systems⁽⁴⁸⁾

Endpoint	Toxicological test system	Total CAR	Predictive performance (%)					
			Chem.	Conc. ¹⁾	Sens.	Pos. Pred.	Spec.	False Pos.
Gene mutation	<i>Salmonella</i>	988		62.9	49.4	76.4	80.3	19.7
	<i>Escherichia</i>	192		68.8	68.8	81.5	68.8	31.3
	Hgprt (CHO/CHL)	237		63.3	59.3	83.9	72.9	27.1
	Mouse lymphoma (L5178Y)	460		59.3	70.9	62.5	44.2	55.8
	Rodent mutation <i>in vivo</i>	112		57.1	48.9	93.5	87.5	12.5
Clastogenicity	Chromosome aberrations <i>in vitro</i>	673		58.7	55.3	67.1	63.3	36.7
	Micronucleus <i>in vitro</i>	97		70.1	87.3	75.6	23.1	76.9
	Chromosome aberrations <i>in vivo</i>	201		53.7	35.0	70.7	79.8	20.2
	Micronucleus <i>in vivo</i>	437		55.8	43.1	72.0	74.9	25.1
DNA damage	UDS <i>in vitro</i>	175		59.4	47.5	87.7	85.5	14.5

CAR, rodent carcinogenicity bioassay; Chem., chemicals; Conc., concordance; False Pos., false positive; NTP, National Toxicology Program; Pos. Pred., positive predictivity; Sens., sensitivity; Spec., specificity.

¹⁾ Concordance is the fraction of both positive and negative results that are correct.

在與抗氧化劑兒茶素沒食子酸酯 (epigallocatechin gallate) 作用下，會產生過多的過氧化氫 (H_2O_2) 繼而引發細胞殺傷力及染色體畸變率增加情形，出現偽陽性結果；而在 F-10 Nutrient Mixture 及 F-12 Nutrient Mixture 培養液則無相似情形⁽⁴⁵⁾。其機制除了藥物與培養液產生交互作用外，與部分培養液本身含有較高的金屬離子亦有相關性，建議試驗單位應建立試驗流程確保不會有過多的氧化壓力 (例如偵測產生過氧化氫 (H_2O_2) 量) 造成偽陽性結果^(40, 45)。

(二) 使用的細胞來源缺乏自身代謝能力、p53 基因功能缺失或 DNA 修復機制

目前推薦用於基因毒性測試之細胞株存在多種缺陷 (表四)，可能導致較高的誤導性陽性結果。這些缺陷包括：缺乏正常代謝功能，依賴外源性代謝活化系統

(例如，Aroclor 誘導的鼠肝臟微粒體酵素系統 (簡稱 S9))、負責 DNA 傷害修復之 p53 基因功能受損以及 DNA 修復能力改變。Fowler 等人 (2012) 的研究顯示 p53 基因功能缺失的細胞株如 V79、CHO 及 CHL 以非致腫瘤性/非基因毒性試驗物質處理，會出現較高之細胞殺傷力及微核發生率，導致偽陽性結果^(23, 25)；相反的，保有 p53 基因功能的細胞株 (TK6 及 HepG2) 或人類淋巴球初代細胞，不僅偽陽性低 (專一性高) 且對基因毒性物質仍保有高敏感性^(11, 23, 25)。建議試驗單位應盡量採用保有 p53 基因功能的細胞來源，減少偽陽性結果⁽⁷⁴⁾。

(三) 細胞殺傷力計算方法影響最高測試劑量 (top concentration) 之選擇

體外染色體畸變試驗及體外微核試驗，在細胞殺傷力過高的處理下容易出現偽陽性結果，因此 OECD 指引將細胞殺傷

表四、常用於基因毒性試驗之細胞株及初代細胞 p53 基因狀態及代謝能力

Table 4. p53 gene status and metabolic competence of commonly used cell lines and primary cells in genotoxicity testing

Cell	Origin	p53 status	Metabolic competence	Reference
Cell line				
L5178Y	Mouse	Mutant	Incompetent	87
V79				10
CHO	Chinese hamster	Mutant	Incompetent	36
CHL				
TK6	Human	Wild-type	Incompetent	92
HepG2	Human	Wild-type	Limited	28, 51
Primary cell				
Lymphocyte	Human	Wild-type	Incompetent	54

力上限範圍控制在 $55\pm 5\%$ ，作為最高測試劑量選擇條件之一 (22, 27, 34, 59, 71)。但不同計算方法 (表五)，有可能低估細胞殺傷力結果，Lorge (2008)、Fellows (2008) 及 Fowler (2012) 等人在微核試驗比較不同細胞殺傷力計算方法，發現相對細胞計數 (Relative Cell Counts, RCC) 或相對複製指數 (relative Replication Index, RI) 這兩種方法傾向低估細胞殺傷力，容易引起細胞殺傷力過高之偽陽性結果 (22, 24, 46)，並建議在不添加細胞鬆弛素 B (cytochalasin B, cyto B) 處理之微核試驗應採用相對細胞倍增指數 (Relative Population Doubling, RPD) 或相對細胞增加指數 (Relative Increase in Cell Counts, RICC) 來計算細胞殺傷力；而在添加細胞鬆弛素 B (cyto B) 之微核測試法 (或稱胞質分裂阻斷微核法 (cytokinesis-block micronucleus assay)) 則建議採用胞質分裂阻斷增生指數 (Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI) 計算細胞殺傷力。類似的評估也於體外染色體畸變試驗執行，並建議人類淋巴球試驗採用有絲分裂指數 (Mitotic Index, MI)⁽⁵³⁾，其他細胞體系採用細胞倍增指數 (RPD) 或相對細胞增加指數 (RICC) 來計算細胞殺傷力，以避免低估細胞殺傷力結果。另須注意在培養時間超過 3-4 個細胞週期後，細胞倍增指數 (RPD) 亦會出現低估殺傷力情形，試驗單位須依實際培養條件，來選擇適合之計算方法⁽³⁵⁾。另相對細胞計數法 (RCC) 目前已被 OECD 體外染色體畸變第 473 號指

引排除，試驗單位應避免繼續使用⁽⁵⁹⁾。

(四) 極端培養條件 (extreme culture condition)

在 OECD 之細胞體系基因毒性試驗相關指引中，最高測試劑量的選擇上除了避免過高的細胞殺傷力和試驗物質沉澱物等所造成的偽陽性結果外，也提及應避免在極端培養條件下執行試驗，亦即避免過高的試驗濃度、培養液滲透壓或酸鹼值的大幅改變^(59, 61, 66, 71)。在過去的研究指出，非基因毒性物質如氯化鈉 (NaCl)、氯化鉀 (KCl)、蔗糖 (sucrose) 或山梨醇 (sorbitol) 等在高測試劑量下，會大幅增加滲透壓，進而造成哺乳細胞殺傷力、染色體畸變、DNA 單股/雙股斷裂及姊妹染色體交換 (sister-chromatid exchange, SCE) 發生率的增加⁽²⁶⁾ 或造成酵母菌的突變增加⁽⁷³⁾ 等，這些反應並非直接與 DNA 作用所引起，推測可能機制為特定離子滲透壓力所造成的染色體結構及/或修復酵素活性改變，導致 DNA 複製或修復效率及正確性異常所致⁽²⁶⁾。雖然滲透壓改變，不等同產生基因毒性，但仍有部分物質會因此出現偽陽性結果，為減少滲透壓等混淆因子並保有試驗敏感度，Scott 等人 (1991) 提出細胞基因毒性試驗之最高測試劑量上限為 10 mM，滲透壓改變應低於 50 mOsm/kg 之建議⁽⁸⁴⁾。惟根據作者實驗室實測結果，溶劑對照組 (例如、0.1%DMSO) 與培養液本身之滲透壓差即

表五、用於基因毒性試驗之細胞增生及細胞殺傷力計算方法及公式^(24, 71)**Table 5.** Methods and formula for measuring cell proliferation and cytotoxicity in genotoxicity testing^(24, 71)**Replication index (relative Replication Index, relative RI) – MN with Cyto B**

Approximately 500 cells per culture were examined, for proportions of mono-, bi- and multinucleate cells.

$$RI = \frac{\text{No. of binucleated cells} + 2 \times (\text{No. of multinucleate cells})}{\text{Total Number of cells}}$$

$$\text{relative RI (\%)} = \frac{\text{RI of treated cultures}}{\text{RI of vehicle controls}} \times 100$$

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - \text{relative RI}$$

Cytokinesis-Block Proliferation Index (CBPI) – MN with Cyto B

CBPI indicates the number of cell cycles per cell during the period of exposure to cytochalasin-B.

Approximately 500 cells per culture were examined, for proportions of mono-, bi- and multinucleate cells.

$$CBPI = \frac{[\text{No. of mononucleate cells}] + 2 \times [\text{No. of binucleate cells}] + 3 \times [\text{No. of multinucleate cells}]}{[\text{Total number of cells}]}$$

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - 100 \times \frac{CBPI_{\text{test}} - 1}{CBPI_{\text{control}} - 1}$$

Mitotic Index (MI) – CA with primary culture of lymphocytes

$$MI (\%) = \frac{\text{No. of mitotic cells}}{\text{Total No. of cells scored}} \times 100$$

$$\text{Cytotoxicity or cytostasis (\%)} = 100 - 100 \times \frac{MI_{\text{test}}}{MI_{\text{control}}}$$

Relative Population Doubling (RPD) – CA or MN w/o Cyto B

$$RPD = \frac{\text{No. of Population doublings in treated cultures}}{\text{No. of Population doublings in control cultures}} \times 100$$

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - RPD$$

Population Doubling = $[\log(N/X_0)]/\log 2$, N = mean final cell count/culture at each concentration, X₀ = starting (baseline) count.

Relative Increase in Cell Counts (RICC) – CA or MN w/o Cyto B

$$RICC = \frac{\text{Increase in no. of cells in treated cultures (final - starting)}}{\text{Increase in no. of cells in control cultures (final - starting)}} \times 100$$

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - RICC$$

Relative Cell Counts (RCC) – CA or MN w/o Cyto B

$$RCC = \frac{\text{Final cell count(treated)}}{\text{Final cell count(control)}} \times 100$$

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 - RCC$$

MN, *in vitro* micronucleus test; Cyto B, Cytochalasin B; CA, *in vitro* chromosomal aberration test; w/o, without; No., number.

可超過 50 mOsm/kg，溶劑本身便可能改變滲透壓，建議試驗單位在每次藥物處理前、後，應至少量測培養液、溶劑對照組及最高測試劑量組之滲透壓。評估處理組在相同溶劑含量下，以溶劑對照組為比對基準判定是否相差 50 mOsm/kg 以上，排除滲透壓所造成的偽陽性結果。另外，一般哺乳動物細胞的培養環境酸鹼值 (pH) 約在 6.8-7.5 之間，有研究指出極端的培養液酸鹼度改變 (超過 1 個酸鹼值單位)，尤其是在低的酸鹼值環境下 (於中國倉鼠卵巢細胞 (CHO) 及肺臟細胞 (CHL)：pH≤6.5；於中國倉鼠肺臟細胞 (Don) 及人類子宮頸癌細胞 (HeLa)：pH≤6.6；在中國倉鼠肺臟細胞 (V79-379A) 及人類淋巴瘤細胞 (全血培養)：pH=6.0)，會增加哺乳細胞之染色體畸變發生率，透過酸鹼值調整至正常範圍 (例如 pH 為 7.2) 後染色體畸變率下降，其機制尚未釐清，但可能與影響 DNA 複製或修復酵素的作用有關，同樣的這些反應不僅非直接與 DNA 作用所引起，且不太可能在真實體內環境中發生^(8, 52)。因此，為避免培養液酸鹼度改變所引起的偽陽性結果，OECD 指引建議，若試驗物質造成培養液酸鹼值顯著改變時，在試驗前應使用緩衝溶液調整其酸鹼值至培養液正常範圍^(59, 61, 66, 71)。因此，試驗單位應將酸鹼值量測納入試驗流程中，至少量測培養液、溶劑對照組及最高測試劑量組之酸鹼值，並注意是否有差異超過 1 個酸鹼值單位情形；若需調整酸鹼值，在調整後，亦須觀察是否出現試驗

物質溶解度或穩定性改變等其他繼發性問題⁽⁸⁴⁾。

二、優化現有的基因毒性動物試驗或與其他動物毒性試驗合併

針對既有的基因毒性動物試驗，依照 OECD 試驗指引建議，可有兩個方向執行動物減量的策略：(1) 在獨立的基因毒性動物試驗中^(60, 63, 65, 69)，根據前試驗、藥物動力學或特定用藥族群等資訊，除非試驗物毒性有性別差異性，否則可選擇單一性別來進行主要試驗，根據作者實驗室數據顯示，可減少動物數量 30-50%；(2) 基因毒性試驗與其他動物毒性試驗合併執行，合併方式可為基因毒性試驗與重複毒性試驗，亦可為兩種以上基因毒性終點在同一批動物上檢測。例如，哺乳動物紅血球 pig-a 基因突變試驗 (mammalian erythrocyte pig-a gene mutation assay) 可與 28 天亞急性或 90 天亞慢毒性試驗一起執行，或與哺乳動物紅血球微核試驗 (mammalian erythrocyte micronucleus test) 或哺乳動物彗星試驗 (*in vivo* mammalian alkaline comet assay) 合併執行，惟合併之試驗設計須注意動物物種選擇、採樣時間點、蒐集檢體之種類及增加觀測標的等條件並互相配合^(67, 69, 79)。以微核試驗合併 28 天重複試驗為例，試驗結果如僅以多染性紅血球 (polychromatic erythrocytes) 為觀測標的，則只能評估給藥後 24-72 小時

發生的染色體損傷 (即 28 天試驗最後 3 天內)，因此需同時觀察正染性紅血球 (normochromatic erythrocytes) 內微核發生率才得以完整評估 28 天暴露期間微核變化情形⁽⁹³⁾。再以微核試驗及彗星試驗合併為例，Bowen 等人 (2011) 將大鼠分別於 0 小時、24 小時及 45 小時共給藥三次，於最後一次後 3 小時 (48 小時) 犧牲動物，取周邊血液及骨髓檢測微核發生率；取血液、胃及肝臟細胞進行彗星試驗測單一細胞電泳 (single cell gel electrophoresis) 之尾部比例 (tail%)。這樣的試驗設計，符合於最後一次給藥後 24 小時內取骨髓或 40 小時內取血液測微核⁽⁶⁰⁾、2-6 小時內取組織測彗星試驗結果⁽⁶⁵⁾之要求，可讓 8 種已知體內基因毒性物質 (*in vivo* genotoxins) 在至少一個基因毒性終點得到陽性結果，合併不同基因毒性終點之動物試驗，不僅提高敏感性，也大幅減少動物的使用⁽⁷⁾。

三、尋找並驗證新的替代性試驗 (Alternative methods for detecting non-genotoxic carcinogens)

致腫瘤作用 (carcinogenesis) 是一個多階段的過程，包含基因毒性和非基因毒性分子事件。目前國內外權責機構對於化學物登記，用來評估是否具致腫瘤性的預測性試驗，均以基因毒性途徑為主；對於非基因毒性途徑的致腫瘤性潛力評估卻無

太大的著墨，若能補足致腫瘤機制內非基因毒性途徑致癌物篩選系統，提昇預測致腫瘤潛力正確性，部分替代啮齒類動物致腫瘤性試驗，可大量減少動物之使用。

非基因毒性致癌物 (non-genotoxic carcinogens) 是指透過間接刺激增生反應 (indirect stimulation of hyperplastic responses) 而誘發癌症的物質，而不改變 DNA、染色體數量或結構。這類致癌物具有多種致腫瘤機制，包括透過或無須透過受體之內分泌調節 (endocrine modifiers) 誘導下游基因調控細胞增生或分化等、腫瘤促進作用 (tumor promoting)、氧化壓力 (oxidative stress)、誘導組織產生特異性毒性 (cytotoxicity) 或炎症反應、免疫抑制作用 (immunosuppressants)、DNA 甲基化程度改變 (alterations in DNA methylation)、抑制間隙連接細胞間通訊 (inhibition of gap junction intercellular communication) 等。分析國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 歸類於致腫瘤等級 1 級 (對人類具致腫瘤性 (carcinogenic to humans))、2A 級 (很可能對人類具致腫瘤性 (probably carcinogenic to humans)) 和 2B 級 (可能對人類具致腫瘤性 (possibly carcinogenic to humans)) 清單中物質，有 12% 屬於非基因毒性致癌物⁽³²⁾。另 Heusinkveld 等人 (2020) 蒐集歐洲化學局 (European Chemicals Agency) 和美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, US EPA) 資料，分析 411 種農藥

之致腫瘤試驗結果顯示，約有 170 項之農藥可歸類為非基因毒性致癌物，其中最多發生腫瘤的臟器為肝臟⁽³³⁾。由上述的評估可見，非基因毒性致癌物之重要性需要更多的關注，且在動物試驗逐漸減少之趨勢下，亟需要有替代方法來辨識這類的物質，並據以進行風險分析及管理^(32, 33)。

體外細胞轉化 (*In vitro* cell transformation) 為細胞在培養狀態下，被誘發型態改變的一種現象，這種轉化長期以來被認為與體內致腫瘤潛力有關^(2, 38)。轉化細胞 (transformed cells) 在表型上與正常細胞不同，帶有惡性腫瘤細胞特徵，具有在易感動物上生成腫瘤的能力，證實了這種體外細胞的形態改變能力可作為預測體內致腫瘤潛力的方法之一^(6, 20, 55)。目前僅知部分的細胞轉化分子機制，可能是由參與控制細胞週期、基因組穩定性、增殖和分化的表現基因發生改變引起的。影響這些基因變化可能是直接由基因毒性機制引起的，也可能透過干擾基因表現及穩定性的 DNA 甲基化異常提升或降低 (hyper- or hypomethylation of DNA)、組織蛋白修飾 (histone modifications) 及核小體重塑 (nucleosome remodeling) 等的屬於表觀遺傳學機制 (epigenetic mechanism) 來觸發致腫瘤過程^(1, 4, 14, 44)。基於上述特性，專家學者建議將細胞轉化試驗納入非基因毒性致癌物之綜合測試和評估方法 (Integrated Approach for the Testing and Assessment, IATA) 測試方法之一⁽³⁷⁾，也被歐盟動物替代試驗參考實驗室 (EURL

ECVAM) 列入體外致腫瘤試驗 (*in vitro* carcinogenicity testing) 的候選替代方法^(21, 44)。

已知細胞轉化測試 (cell transformation assay, 以下簡稱 CTA) 可以模擬體內癌發生的起始 (initiation) 和促進 (promotion) 階段，因此可以檢測已知具有起始活性 (即腫瘤起始劑 (tumor initiator)，大多數屬於基因毒性致癌物) 和/或促進活性 (即腫瘤促進劑 (tumor promotor)，大多數是非基因毒性致癌物) 的化學物質⁽⁸⁵⁾，在檢測已知啮齒類動物致癌物上具有高度陽性預測力 (positive predictivity)，目前國際上較為人所周知的 CTA 有三種細胞體系、四種常用的試驗流程如表六及表七。其中，敘利亞倉鼠胚胎 (Syrian hamster embryo, SHE) 體外細胞轉化試驗，是從妊娠 13 天的敘利亞倉鼠收集胚胎，經初代培養後獲得之試驗體系，其細胞是正常的二倍體、有代謝性及保有 p53 能力的初代細胞，對於需要代謝活化的試驗物質，它保留了生物轉化各種異生素 (xenobiotics) 的能力^(42, 58, 76, 83, 90)。SHE 細胞暴露於具有轉化能力的測試化學品會增加形態轉化且生長不規則的群落數量 (morphologically transformed colonies)。測試者可藉由辨識出不規則生長模式的細胞群落來觀察細胞轉化情形，這些轉化體 (transformants) 被認為是在分化過程中遇到阻礙的幹細胞⁽⁴⁴⁾。在進一步的體外細胞繼代後，轉化細胞株的常出現永生化或在同系宿主動物 (syngeneic hosts) 體內形

成腫瘤的能力。而未被轉化的細胞株則會老化 (senescent)^(43, 76, 91)。相較於沒有轉化的細胞，有轉化的 SHE 細胞會觀察到高頻率的永生化和無附著生長 (anchorage-independent growth) 情形⁽⁵⁵⁾。從 3Rs 的角度來看，使用初代細胞意味著只需要犧牲少數的懷孕倉鼠，若保存得宜，一隻倉鼠提供的細胞足夠進行至少 50 至 100 個 CTA 試驗。根據歐盟動物替代試驗參考實驗室 (EURL ECVAM) 評估，當 SHE CTA 結果

表六、三種細胞轉化試驗之比較^(21, 44, 58)

Table 6. Comparison of three cell transformation assays^(21, 44, 58)

Cell transformation assay	SHE	Balb/c 3T3	Bhas 42
OECD Guidance	No.214 (2015)	No.149 (2011)	No.231 (2016)
EURL ECVAM protocol	DB-ALM No.136 (2005)	DB-ALM No.137 (2004)	DB-ALM No.156 (2012)
Sampling /Culture time (day)	7/9	3/31	Initiation: 3/21 Promotion: 10/21
Platform	60 mm dish	6/96 well plate	6/96 well plate
High throughput	No	Yes	Yes
Cell type	Primary cell	Cell line	Cell line
Carcinogenic endpoint	Initiation	Initiation	Initiation/promotion

CTA: Cell transformation assay, SHE: Syrian hamster embryo.

表七、細胞轉化試驗在不同試驗體系對啮齒動物致癌物之預測性能比較^(80, 90)

Table 7. Performance of cell transformation assays in predicting rodent carcinogenicity^(80, 90)

Performance of CTA	SHE ¹⁾		BALB/c 3T3	Bhas 42
	pH 6.7	pH ≥7.0		
Number of chemicals	88	204	149	98
Concordance ²⁾ (%)	74	85	68	78
Sensitivity (%)	66	92	75	73
Specificity (%)	85	66	53	84
Positive predictivity (%)	88	88	77	86
Negative predictivity (%)	62	75	50	69
False positive (%)	15	34	47	27
False negative (%)	33	8	25	16

CTA: Cell transformation assay, SHE: Syrian hamster embryo.

¹⁾ Although some differences exist in the performance characteristics between the two protocols, their overall performances are considered equivalent.

²⁾ Concordance: agreement between rodent carcinogenicity and CTA result.

作為綜合測試和評估方法 (IATA) 或用於證據權重分析時，有助於評估測試化學品的致腫瘤潛力⁽¹⁸⁾。然而，現有數據指出 SHE CTA 對基因毒性致癌物有較高的敏感性，但對於非基因毒性致癌物的評估是否有附加價值仍有爭議，有待更多的資料來釐清。

相對於 SHE 細胞轉化試驗仍須使用動物，另外兩種細胞轉化試驗 (Balb/c 3T3 及 Bhas 42) 使用永生化細胞株進行試驗，無需使用動物，惟經歐盟動物替代試驗參考實驗室 (EURL ECVAM) 評估 Balb/c 3T3 試驗體系之結果變異性大，實驗室間結果一致性較低，目前推薦 Bhas 42 細胞轉化試驗。Bhas 42 細胞株為將 v-Ha-ras 致癌基因穩定轉染到 BALB/3T3 A31-1-1 細胞株 (後經 Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB) 證實來源是從 Swiss 小鼠而來，而非 BALB/3T3 A31-1-1 細胞株 https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=1599#) 形成的細胞株⁽⁸¹⁾。與 BALB / 3T3 A31-1-1 細胞相似，未轉化的 Bhas 42 細胞生長至匯合後會形成具接觸抑制性的單層細胞，將這種單層細胞經皮下種植到裸鼠身上不會形成腫瘤。然而在暴露於致腫瘤性刺激後，這些細胞在形態上發生改變，並在匯合的單層細胞上形成離散的不貼壁性群落 (anchorage-independent altered colonies)，稱為轉化灶 (transformed foci)，能夠在體內形成腫瘤⁽⁸²⁾，藉由量化 Bhas 42 細胞經

致腫瘤性刺激後所誘發出的轉化灶轉化率，可推估物質的致腫瘤潛力。與其他 CTA 中使用的細胞不同，Bhas 42 細胞因為不需要用腫瘤起始劑誘導細胞轉化而被認為已是進入起始狀態的癌細胞 (initiated cells)⁽⁸¹⁾。數據顯示轉染 v-Ha-ras 基因可引發類似由化學起始劑所誘導的起始過程⁽⁸²⁾。因此，在 Bhas 42 細胞所引起的轉化反應可視為具有引起致腫瘤過程晚期反應的潛力 (即致腫瘤促進活性 (promoting activity))；而像 BALB/3T3 A31-1-1 這些永生化細胞 (未啟動的細胞 (uninitiated cells)) 及敘利亞倉鼠胚胎初代細胞 (體外壽命有限的未啟動細胞) 的轉化反應可代表致腫瘤前期階段的反應 (即起始活性 (initiating activity))⁽⁸⁶⁾。由於致腫瘤反應機制的複雜性，Bhas 42 細胞轉化測試的結果如同 SHE CTA 一樣，建議作為綜合測試和評估方法 (IATA) 的一部分或用於證據權重分析，以評估測試化學品的致腫瘤潛力。當與基因毒性數據、結構活性分析和藥物/毒物動力學等其他資訊結合使用時，有助於評估致腫瘤潛力並可能替代體內測試⁽¹⁸⁾。Benigni 等人 (2013) 將細菌基因逆向變異試驗 (bacterial reverse gene mutation assay, 又稱 Ames 檢測) 和 CTA 合併判讀結果和已知啮齒動物致癌物 (rodent carcinogen, 包括基因毒性和非基因毒性) 比對，具有高達 90~95% 的敏感性；另外，作者利用現有的結構性警示 (structural alert) 電腦預測系統 (*in silico*) 進行前篩，再用 CTA 進行

下一步篩選，得出和細菌基因逆向變異試驗及 CTA 合併結果相近，但速度上更快⁽⁵⁾。

細胞轉化試驗對於那些不允許進行體內試驗（如化妝品）或當化學品已經被確認具有基因毒性時才可有限定地進行體內試驗的情況時，是很有幫助的測試方法⁽⁸⁹⁾，目前也有越來越多研究以細胞轉化試驗來進行奈米材料物質之致腫瘤潛力/基因毒性評估^(9, 78)，因為常用的細菌基因逆向變異試驗不適用於奈米材料評估⁽¹²⁾。過去細胞轉化試驗雖然因為（1）判定轉化後細胞型態仍具人為主觀性、實驗室間再現性低且（2）對細胞轉化成細胞團塊的形成機制尚未清楚等限制性，OECD 並未繼續將該試驗方法列入試驗指引（test guideline）之候選清單，但歸功於深度神經網路（deep neural networks）機器學習技術⁽⁴⁷⁾、次世代基因定序（Next Generation Sequencing, NGS）及各種生化分析法技術的精進^(29, 72, 77)，對於前述的限制性目前有更多的解決方式，例如以機器深度學習逐漸替代人工判讀或搭配轉錄體學（transcriptomics）路徑分析來瞭解轉化機制，轉化細胞轉化試驗應用於非基因毒性致癌物之綜合測試和評估方法（IATA），甚而成為部分取代動物試驗的替代方法之一仍是值得期待⁽¹³⁾。

結語

致腫瘤性一直是新化合物開發及化學

物質安全性評估中備受關注的核心健康議題。然而，依賴為期兩年的致腫瘤性動物研究作為篩選工具，不僅在動物福祉及成本效益方面存在諸多挑戰，其結果與人類暴露的相關性也引發了廣泛討論和爭議。雖然許多基因毒性測試已被開發為短期篩選工具，並成為國際間化合物登記所需的測試，然而基因毒性與癌變之間的區別不容忽視。突變僅是癌症發展過程中的一個因素，單一基因毒性試驗難以全面預測化學物的體內致腫瘤性潛力，因此，需結合多種試驗來更準確地進行致腫瘤性評估。隨著科學分析技術的飛速進步，我們對癌症機制的理解已突破了簡單的毒性終點觀察（如基因毒性試驗），而是在分子層面上對基因與環境交互作用有了更深刻的認識。這促使了越來越多非動物替代方法或新穎替代測試方法（New Approach Methodologies, NAMs）的應運而生，並使相關權責機構面臨數據解讀、可接受性及其在安全性評估中的應用等諸多挑戰。展望未來，我們不僅需在現有基因毒性試驗方法上精益求精，還應深入瞭解 NAMs 的發展趨勢，從機制層面加深理解，並以開放的態度積極探索非動物替代方法在化學物質評估與管理中的巨大潛力，共同推動更安全、更可持續的化學物質管理，為人類健康和環境保護貢獻力量。

謝辭

感謝農業部補助研究計畫 113 農科-

2.6.1-藥-01(4)「建構高通量非基因毒性致癌物細胞轉化檢測體系」。

引用文獻

1. Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., van Benthem, J., Zuang, V., Andersen, K. E., Angers-Loustau, A., Aptula, A., Bal-Price, A., Benfenati, E., Bernauer, U., Bessems, J., Bois, F. Y., Boobis, A., Brandon, E., Bremer, S., Broschard, T., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Cronin, M., Daston, G., Dekant, W., Felter, S., Grignard, E., Gundert-Remy, U., Heinonen, T., Kimber, I., Kleinjans, J., Komulainen, H., Kreiling, R., Kreysa, J., Leite, S. B., Loizou, G., Maxwell, G., Mazzatorta, P., Munn, S., Pfuhler, S., Phrakonkham, P., Piersma, A., Poth, A., Prieto, P., Repetto, G., Rogiers, V., Schoeters, G., Schwarz, M., Serafimova, R., Tähti, H., Testai, E., van Delft, J., van Loveren, H., Vinken, M., Worth, A., and Zaldivar, J. M. 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects - 2010. *Arch. Toxicol.* 85: 367-485.
2. Barrett, J. C., and Ts'o, P. O. P. 1978. Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3761-3765.
3. Bates, C. A., Haber, L. T., Moore, M. M., Schoeny, R., and Maier, A. 2023. Development of a framework for risk assessment of dietary carcinogens. *Food Chem. Toxicol.* 180: 114022.
4. Baylin, S. B., and Ohm, J. E. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer- A mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev. Cancer* 6: 107-116.
5. Benigni, R., Bossa, C., and Tcheremenskaia, O. 2013. *In vitro* cell transformation assays for an integrated, alternative assessment of carcinogenicity: A data-based analysis. *Mutagenesis* 28: 107-116.
6. Berwald, Y., and Sachs, L. 1963. *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature* 200: 1182-1184.
7. Bowen, D. E., Whitwell, J. H., Lillford, L., Henderson, D., Kidd, D., McGarry, S., Pearce, G., Beevers, C., and Kirkland, D. J. 2011. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay, and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutat. Res.* 722: 7-19.
8. Brusick, D. 1986. Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen.* 8: 879-886.
9. Chatterjee, N., and Alfaro-Moreno, E.

2023. *In vitro* cell transformation assays: A valuable approach for carcinogenic potentiality assessment of nanomaterials. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 8219.
10. Chaung, W., Mi, L. J., and Boorstein, R. J. 1997. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 25: 992-994.
 11. Clare, M. G., Lorenzon, G., Akhurst, L. C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V., and Lorge, E. 2006. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test II. Using human lymphocytes. *Mutat. Res.* 607: 37-60.
 12. Clift, M. J. D., Raemy, D. O., Endes, C., Ali, Z., Lehmann, A. D., Brandenberger, C., Petri-Fink, A., Wick, P., Parak, W. J., Gehr, P., Schins, R. P., and Rothen-Rutishauser, B. 2013. Can the Ames test provide an insight into nano-object mutagenicity? Investigating the interaction between nano-objects and bacteria. *Nanotoxicology* 7: 1373-1385.
 13. Colacci, A., Corvi, R., Ohmori, K., Paparella, M., Serra, S., Carrico, I. D. R., Vasseur, P., and Jacobs, M. N. 2023. The cell transformation assay: A historical assessment of current knowledge of applications in an integrated approach to testing and assessment for non-genotoxic carcinogens. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 5659.
 14. Combes, R., Balls, M., Curren, R., Fischbach, M., Fusenig, N., Kirkland, D., Lasne, C., Landolph, J., LeBoeuf, R., Marquardt, H., McCormick, J., Müller, L., Rivedal, E., Sabbioni, E., Tanaka, N., Vasseur, P., and Yamasaki, H. 1999. Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity. *Altern. Lab. Anim.* 27: 745-767.
 15. Cooper II, J. A., Saracci, R., and Cole, P. 1979. Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br. J. Cancer* 39: 87-89.
 16. Corvi, R., Madia, F., Worth, A., and Whelan, M. 2013. EURL ECVAM strategy to avoid and reduce animal use in genotoxicity testing. JRC, European Commission, Ispra, Italy. 48 pp.
 17. Corvi, R., Madia, F., Guyton, K. Z., Kasper, P., Rudel, R., Colacci, A., Kleinjans, J., Jennings, P. 2017. Moving forward in carcinogenicity assessment: Report of an EURL ECVAM/ESTIV workshop. *Toxicol. In Vitro* 45: 278-286.
 18. Creton, S., Aardema, M., Carmichael, P. L., Harvey, J. S., Martin, F. L., Newbold, R. F., O'Donovan, M. R., Pant, K., Poth, A., Sakai, A., Sasaki, K., Scott, A. D., Schechtman, L. M., Shen, R. R., Tanaka, N. and Yasaei, H. 2012. Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: State of the science

- and future research needs. *Mutagenesis* 27: 93-101.
19. Demarini, D. M. 2012. Declaring the existence of human germ-cell mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.* 53: 166-172.
 20. Elias, Z., Poirot, O., Pezerat, H., Suquet, H., Schneider, O., Danière, M. C., Terzetti, F., Baruthio, F., Fournier, M., and Cavelier, C. 1989. Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 10: 2043-2052.
 21. EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM). 2013. EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line. JRC, Ispra, Italy. 34 pp.
 22. Fellows, M. D., O'Donovan, M. R., Lorge, E., and Kirkland, D. 2008. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. II. Practical aspects with toxic agents. *Mutat. Res.* 655: 4-21.
 23. Fowler, P., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhrer, S., and Carmichael, P. 2012a. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat. Res.* 742: 11-25.
 24. Fowler, P., Smith, R., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhrer, S., and Carmichael, P. 2012b. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. II. Importance of accurate toxicity measurement. *Mutat. Res.* 747: 104-117.
 25. Fowler, P., Smith, R., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Carmichael, P., Kirkland, D., and Pfuhrer, S. 2014. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. III. Sensitivity of human cell types to known genotoxic agents. *Mutat. Res.* 767: 28-36.
 26. Galloway, S. M., Deasy, D. A., Bean, C. L., Kraynak, A. R., Armstrong, M. J., and Bradley, M. O. 1987. Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges, and DNA strand breaks, and the relation to toxicity. *Mutat. Res.* 189: 15-25.
 27. Galloway, S. M. 2000. Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 191-201.
 28. Gomes, A. R., Abrantes, A. M., Brito, A. F., Laranjo, M., Casalta-Lopes, J. E., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Botelho, M. F., and Tralhão, J. G. 2015. Influence of P53 on the radiotherapy response of hepatocellular carcinoma. *Clin. Mol. Hepatol.* 21: 257-267.

29. Guichard, Y., Savoy, C., and Gaté, L. 2023. Can a 12-gene expression signature predict the cell-transforming potential of tumor-promoting agents in Bhas 42 cells? *Toxicol. Lett.* 389: 11-18.
30. Halliwell, B. 2003. Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem? *FEBS Lett.* 540: 3-6.
31. Hayashi, M. 2022. Opinion: Regulatory genotoxicity: Past, present, and future. *Genes Environ.* 44: 13.
32. Hernández, L. G., van Steeg, H., Luijten, M., and van Benthem, J. 2009. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat. Res.* 682: 94-109.
33. Heusinkveld, H., Braakhuis, H., Gommans, R., Botham, P., Corvaro, M., van der Laan, J. W., Lewis, D., Madia, F., Manou, I., Schorsch, F., Wolterink, G., Woutersen, R., Corvi, R., Mehta, J., and Luijten, M. 2020. Towards a mechanism-based approach for the prediction of nongenotoxic carcinogenic potential of agrochemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 50: 725-739.
34. Hilliard, C. A., Armstrong, M. J., Bradt, C. I., Hill, R. B., Greenwood, S. K., and Galloway, S. M. 1998. Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environ. Mol. Mutagen.* 31: 316-326.
35. Honma, M. 2011. Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutat. Res.* 724: 86-87.
36. Hu, T., Miller, C. M., Ridder, G. M., and Aardema, M. J. 1999. Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: Implications for genotoxicity testing. *Mutat. Res.* 426: 51-62.
37. Jacobs, M. N., Colacci, A., Corvi, R., Vaccari, M., Aguila, M. C., Corvaro, M., Delrue, N., Desaulniers, D., Ertych, N., Jacobs, A., Luijten, M., Madia, F., Nishikawa, A., Ogawa, K., Ohmori, K., Paparella, M., Sharma, A. K., and Vasseur, P. 2020. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Arch. Toxicol.* 94: 2899-2923.
38. Kakunaga, T., and Yamasaki, H. 1985. Transformation assay of established cell lines: Mechanisms and application: proceedings of a workshop. IARC, Lyon, France. 225pp.
39. Kirchner, S., Stopper, H., Papp, T., Eckert, I., Yoo, H. J., Vig, B. K., and Schiffmann, D. 1993. Cytogenetic changes in primary,

- immortalized, and malignant mammalian cells. *Toxicol. Lett.* 67: 283-295.
40. Kirkland, D., Pfuhrer, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwell, P., Hayashi, M., Kasper, P., Kirchner, S., Lynch, A., Marzin, D., Maurici, D., Meunier, J. R., Müller, L., Nohynek, G., Parry, J., Parry, E., Thybaud, V., Tice, R., van Benthem, J., Vanparys, P., and White, P. 2007. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat. Res.* 628: 31-55.
 41. Klaassen, C. D. 2018. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 9th ed. McGraw-Hill Education. 1648 pp.
 42. Landkocz, Y., Poupin, P., Atienzar, F., and Vasseur, P. 2011. Transcriptomic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in Syrian hamster embryo cells: An important role of early cytoskeleton disturbances in carcinogenesis? *BMC Genomics* 12: 524.
 43. LeBoeuf, R. A., Kerckaert, G. A., Aardema, M. J., and Gibson, D. P. 1990. Multistage neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells cultured at pH 6.70. *Cancer Res.* 50: 3722-3729.
 44. LeBoeuf, R. A., Kerckaert, K. A., Aardema, M. J., and Isfort, R. J. 1999. Use of Syrian hamster embryo and BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *IARC Sci. Publ.* 146: 409-425.
 45. Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., and Halliwell, B. 2007. Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutat. Res.* 634: 177-183.
 46. Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S., and Kirkland, D. 2008. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutat. Res.* 655: 1-3.
 47. Masumoto, M., Fukuda, I., Furihata, S., Arai, T., Kageyama, T., Ohmori, K., Shirakawa, S., and Fukuda, J. 2021. Deep neural network for the determination of transformed foci in Bhas 42 cell transformation assay. *Sci. Rep.* 11: 23344.
 48. Matthews, E. J., Kruhlak, N. L., Cimino, M. C., Benz, R. D., and Contrera, J. F. 2006. An analysis of genetic toxicity, reproductive and developmental toxicity, and carcinogenicity data: I. Identification of carcinogens using surrogate endpoints. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 44: 83-96.
 49. McCann, J., and Ames, B. N. 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of

- 300 chemicals: Discussion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 950-954.
50. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B. N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 5135-5139.
51. Mitchell, J. K., Midkiff, B. R., Israelow, B., Evans, M. J., Lanford, R. E., Walker, C. M., Lemon, S. M., and McGivern, D. R. 2017. Hepatitis C virus indirectly disrupts DNA damage-induced p53 responses by activating protein kinase R. mBio 8: e00121-17.
52. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., and Okumura, K. 1992. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. Mutat. Res. 268: 297-305.
53. Muehlbauer, P. A., and Schuler, M. J. 2003. Measuring the mitotic index in chemically treated human lymphocyte cultures by flow cytometry. Mutat. Res. 537: 117-130.
54. Najafzadeh, M., Naeem, P., Ghaderi, N., Jafarnejad, S., Karimi, Z., Ghaderi, M., Akhbari, P., Ghaderi, R., Farsi, P., Wright, A., and Anderson, D. 2023. Comparing P53 expression and genome-wide transcriptome profiling to comet assay in lymphocytes from melanoma patients and healthy controls. Sci. Rep. 13: 18858.
55. Newbold, R. F., Overell, R. W., and Connell, J. R. 1982. Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. Nature 299: 633-635.
56. OECD. 1986. Genetic toxicology: Mouse heritable translocation assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 485.
57. OECD. 1997. Unscheduled DNA synthesis (UDS) test with mammalian liver cells *in vivo*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 486.
58. OECD. 2007. Detailed review paper on cell transformation assays for detection of chemical carcinogens. OECD Series on Testing and Assessment, No. 31.
59. OECD. 2016a. *In vitro* mammalian chromosomal aberration Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 473.
60. OECD. 2016b. Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 474.
61. OECD. 2016c. *In vitro* mammalian cell gene mutation tests using the *Hprt* and *xprt* genes. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 476.
62. OECD. 2016d. Rodent dominant lethal test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 478.
63. OECD. 2016e. Mammalian bone marrow

- chromosomal aberration test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 475.
64. OECD. 2016f. Mammalian spermatogonial chromosomal aberration test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 483.
65. OECD. 2016g. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 489.
66. OECD. 2016h. *In vitro* mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 490.
67. OECD. 2017. Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. OECD Series on Testing and Assessment, No. 238, 2nd ed.
68. OECD. 2020. Bacterial reverse mutation test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 471.
69. OECD. 2025a. Mammalian erythrocyte *Pig-a* gene mutation assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 470.
70. OECD. 2025b. Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 488.
71. OECD. 2023. *In vitro* mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 487.
72. Ohmori, K., Kamei, A., Watanabe, Y., and Abe, K. 2022. Gene expression over time during cell transformation due to non-genotoxic carcinogen treatment of Bhas 42 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 3216.
73. Parker, K. R., and von Borstel, R. C. 1987. Base-substitution and frameshift mutagenesis by sodium chloride and potassium chloride in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 189: 11-14.
74. Pfuhrer, S., Fellows, M., van Benthem, J., Corvi, R., Curren, R., Dearfield, K., Fowler, P., Frötschl, R., Elhajouji, A., Le Hégarat, L., Kasamatsu, T., Kojima, H., Ouédraogo, G., Scott, A., and Speit, G. 2011. *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: summary of an IWGT workshop. *Mutat. Res.* 723: 101-107.
75. Pfuhrer, S., Kirkland, D., Kasper, P., Hayashi, M., Vanparys, P., Carmichael, P., Dertinger, S., Eastmond, D., Elhajouji, A., Krul, C., Rothfuss, A., Schoening, G., Smith, A., Speit, G., Thomas, C., van Benthem, J., and Corvi, R. 2009. Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities—Report

- from an ECVAM workshop. *Mutat. Res.* 680: 31-42.
76. Pienta, R. J., Poiley, J. A., and Lebherz, W. B. III. 1977. Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int. J. Cancer* 19: 642-655.
77. Poburski, D., and Thierbach, R. 2016. Improvement of the BALB/c-3T3 cell transformation assay: A tool for investigating cancer mechanisms and therapies. *Sci. Rep.* 6: 32966.
78. Ponti, J., Sabbioni, E., Munaro, B., Broggi, F., Marmorato, P., Franchini, F., Colognato, R., and Rossi, F. 2009. Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: An *in vitro* study in BALB/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis* 24: 439-445.
79. Rothfuss, A., Honma, M., Czich, A., Aardema, M. J., Burlinson, B., Galloway, S., Hamada, S., Kirkland, D., Heflich, R. H., Howe, J., Nakajima, M., O'Donovan, M., Plappert-Helbig, U., Priestley, C., Recio, L., Schuler, M., Uno, Y., and Martus, H. J. 2011. Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutat. Res.* 723: 108-120.
80. Sakai, A., Sasaki, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N., Kuroda, S., Hayashi, K., Lim, Y. M., Yamazaki, S., Umeda, M., and Tanaka, N. 2010. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat. Res.* 702: 100-122.
81. Sasaki, K., Mizusawa, H., and Ishidate, M. 1988. Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 921-930.
82. Sasaki, K., Umeda, M., Sakai, A., Yamazaki, S., and Tanaka, N. 2015. Transformation assay in Bhas 42 cells: A model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 33: 1-35.
83. Schechtman, L. M. 1985. Metabolic activation of procarcinogens by subcellular enzyme fractions in the C3H 10T1/2 and BALB/c 3T3 cell transformation systems. pp. 137-162. In: T. Kakunaga & H. Yamasaki [eds.], *Proceedings, Transformation Assay of Established Cell Lines: Mechanisms and Application*, IARC Scientific Publications No 67., February 15-17, 1984, US National Cancer Institute

- and the US Environmental Protection Agency, Lyon.
84. Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate Jr., M., Brusick, D., Ashby, J., and Myhr, B. C. 1991. Genotoxicity under extreme culture conditions: A report from ICPEMC task group 9. *Mutat. Res.* 257: 147-205.
 85. Steinberg, P. 2017. *In vitro-in vivo* carcinogenicity, pp. 81-96. *In*: G. Reifferscheid & S. Buchinger [eds.], *In vitro* environmental toxicology- Concepts, application and assessment. Springer Cham, Gewerbestrasse, Switzerland. 324 pp.
 86. Stepanenko, A. A., and Kavsan, V. M. 2012. Immortalization and malignant transformation of eukaryotic cells. *Cytol. Genet.* 46: 96-129.
 87. Storer, R. D., Kraynak, A. R., McKelvey, T. W., Elia, M. C., Goodrow, T. L., and DeLuca, J. G. 1997. The mouse lymphoma L5178Y Tk[±] cell line is heterozygous for a codon 170 mutation in the p53 tumor suppressor gene. *Mutat. Res.* 373: 157-165.
 88. Umbuzeiro, G. D. A., Heringa, M., and Zeiger, E. 2017. *In vitro* genotoxicity testing: Significance and use in environmental monitoring. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 157: 59-80.
 89. Vanparys, P., Corvi, R., Aardema, M. J., Gribaldo, L., Hayashi, M., Hoffmann, S., and Schechtman, L. 2012. Application of *in vitro* cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals, chemicals, food products, and cosmetics. *Mutat. Res.* 744: 111-116.
 90. Vasseur, P., and Lasne, C. 2012. OECD Detailed Review Paper (DRP) number 31 on “Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens”: Main results and conclusions. *Mutat. Res.* 744: 8-11.
 91. Watanabe, M., and Suzuki, K. 1991. Expression dynamics of transforming phenotypes in X-irradiated Syrian golden hamster embryo cells. *Mutat. Res.* 249: 71-80.
 92. Whitwell, J., Smith, R., Jenner, K., Lyon, H., Wood, D., Clements, J., Ashcroft-Hawley, K., Gollapudi, B., Kirkland, D., Lorge, E., Pfuhler, S., Tanir, J. Y., and Thybaud, V. 2015. Relationships between p53 status, apoptosis, and induction of micronuclei in different human and mouse cell lines *in vitro*: Implications for improving existing assays. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 789-790: 7-27.
 93. Witt, K. L., Knapton, A., Wehr, C. M., Hook, G. J., Mirsalis, J., Shelby, M. D., and MacGregor, J. T. 2000. Micronucleated erythrocyte frequency in peripheral blood of B6C3F1 mice from short-term,

prechronic, and chronic studies of the NTP carcinogenesis bioassay program. *Environ. Mol. Mutagen.* 36: 163-194.

94. Zeiger, E. 2019. The test that changed the

world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 841: 43-48.

Comprehensive Overview of 3Rs Strategy in Genotoxicity Testing

Hsin-Yi Lu^{1*}, Yen-Yun Lee¹

Abstract

Lu, H. Y. and Lee, Y. Y. 2025. Comprehensive overview of 3Rs strategy in genotoxicity testing. Taiwan Pestic. Sci. 19: 69-95.

Carcinogenicity is a critical health concern in the development of new compounds and chemical safety assessment. However, using a two-year carcinogenicity animal study as a screening tool is neither ethical nor cost-efficient. As such, genotoxicity assays have been developed as short-term tools to predict tumorigenic potential and are now mandatory for chemical registration, significantly increasing the burden of regulatory testing. To address these issues, the European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM) has proposed strategies based on the 3Rs principles (replacement, reduction, and refinement) to minimize animal testing in genotoxicity and carcinogenicity studies. These strategies aim to reduce false positive results in *in vitro* genotoxicity assays, optimize existing mutagenicity tests, and develop new alternative methods for non-genotoxic carcinogenesis pathways, with an overall goal of improving the accuracy of carcinogenicity predictions. This report discusses the theoretical basis and limitations of genotoxicity assays in carcinogenicity prediction and explores actionable 3Rs strategies that testing facilities can adopt to enhance both ethical and scientific aspects of genotoxicity testing. These strategies, ensure compliance with regulatory requirements and improve risk assessment reliability.

Key words: carcinogenicity, genotoxicity test, 3Rs strategies

Accepted: July 22, 2025.

* Corresponding author, E-mail: evalu@acri.gov.tw

¹ Agricultural Chemicals Research Institute, Ministry of Agriculture, Taichung