

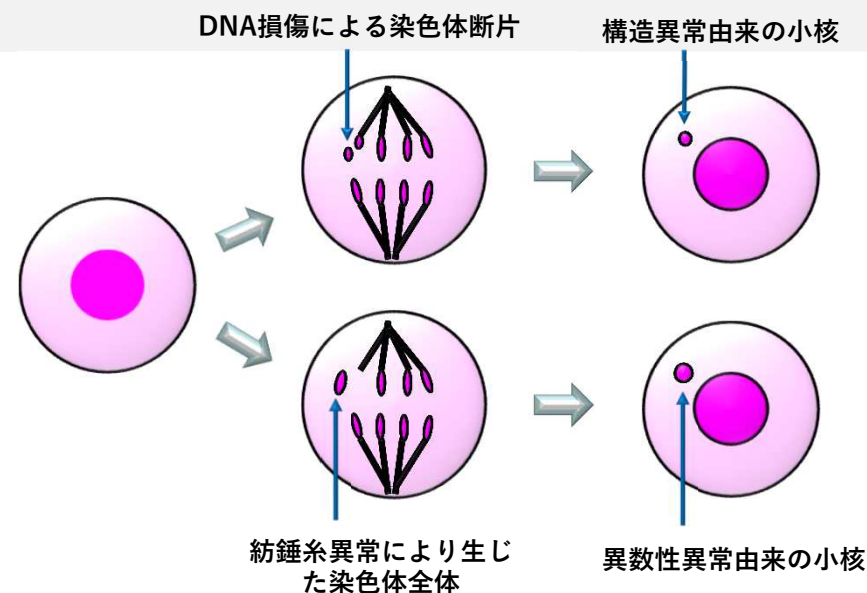
In vitro 小型化小核試験～被験物質使用量低減化の実現～

背 景

医薬品、医療機器、農薬、食品及びその他の化学物質の *In vitro* 小核試験は、間期細胞の細胞質内における小核の検出を指標に被験物質の染色体異常誘発性を評価する遺伝毒性試験です。医薬品を中心に染色体異常試験の代替法として高い汎用性を示していますが、標準的な試験では2~3 gの被験物質が必要であり、創薬初期段階では被験物質使用量の低減化が求められていました。一方で、弊社が提案している探索的スクリーニング用の小型化小核試験は**5 mg程度で試験実施が可能**です。

試験原理

誘導ラット肝S9 mixの存在下と非存在下で被験物質を処理した細胞を固定、染色後に小核の出現頻度について顕微鏡下で計測します。小核は、無動原体染色体断片、または細胞分裂後期に細胞の極への移動ができない染色体全体から生じるため、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の両方を検出することができます。



In vitro 小核試験のデザイン及び優位性

標準的な試験デザイン

弊社の *in vitro* 小核試験は医薬品、医療機器、農薬、食品及び化学物質と広範に及ぶ各種規制に対応でき、GLP、非GLP問わず対応可能です。試験デザインについては、標準的な試験条件からお客様仕様のデザインに対応できる柔軟な体制をとっておりますので、お気軽にお問い合わせください。

試験系：TK6細胞、CHL/IU細胞、L5178Y細胞

実験区分：用量設定試験＋本試験（用量設定試験は必須ではありません）

代謝活性化：誘導ラット肝S9

処理法：短時間処理法＋連続処理法

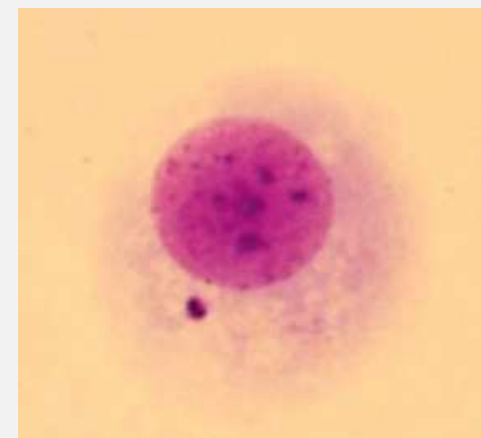
曝露時間：4時間及び24時間（げっ歯類細胞では6時間及び24時間）

細胞毒性指標：RPD（RICCでも可）

標本染色法：ギムザ染色

観察細胞数：2000細胞/群

判定方法：統計解析による



TK6細胞における小核像

優位性

- 染色体異常試験の代替法としての位置付けですが、染色体異常試験では検出できない**異数性誘発性**を検出できる優位性があります。欧州食品安全機関（EFSA）では許認可申請においてAmes試験同様必須の試験として利用されています。現状、医薬品、医療機器、農薬、食品等幅広い分野で優先的に利用されている試験種となります。
- ヒト細胞TK6を用いた小核試験では、ゲノム編集により創出された変異細胞との比較でメカニズム解析が実施可能です。

弊社における小核試験の特徴及び被験物質質量

試験デザインの比較

作業工程		小型化スクリーニング		標準法によるスクリーニング		GLP試験	
		短時間処理法	連続処理法	短時間処理法	連続処理法	短時間処理法	連続処理法
用量設定試験の有無		有 or 無		有 or 無		有	
試験構成	系列数	用量設定試験：1 本試験：1		用量設定試験：1 本試験：1 or 2		用量設定試験：1 本試験：2	
用量数		用量設定試験：8濃度 本試験：3濃度以上（本試験実施の場合）		用量設定試験：8濃度 本試験：3濃度以上（本試験実施の場合）		用量設定試験：8濃度 本試験：3濃度以上	
処 理	処理の特徴	処理液量：1 mL		処理液量：5~10 mL		処理液量：10 mL	
	容器	24ウェルプレート		遠心管	フラスコ	遠心管	フラスコ
	被験物質質量	用量設定試験：5 mg 本試験：5 mg		20~100 mg（規模による）		1.5~3 g（濃度分析有）	
	曝露時間（h）	4	24	4	24	4	24
	回復時間（h）	20	0	20	0	20	0
細胞生存率の算出法		RPD or RICC (%)		RPD or RICC (%)		RPD or RICC (%)	
標本作製	調製・固定	カルノア固定		カルノア固定		カルノア固定	
	染色方法	ギムザ染色		ギムザ染色		ギムザ染色	
標本観察	計測数	1000 cells/群		1000 or 2000 cells/群		2000 cells/群	
	観察用量数	3~5		3~5		3~5	
	指 標	単核（小核の有無） その他追加可能		単核（小核の有無） その他追加可能		単核（小核の有無） その他追加可能	
	オプション	CREST染色法		CREST染色法		CREST染色法	
判 定	統計解析	フィッシャー、 コ克蘭アーミテージ		フィッシャー、 コ克蘭アーミテージ		フィッシャー、 コ克蘭アーミテージ	
用途		● 被験物質必要量を低減した 探索的スクリーニング用		● 探索的スクリーニング用		● 各種申請試験用	

RPD：Relative Population Doubling、RICC：Relative Increase Cell Count

試験期間

試験区分	試験期間（週）											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
GLP試験	用量設定試験			本試験			速報					草案
標準法によるスクリーニング	用量設定試験		本試験			速報			草案			
小型化スクリーニング	本試験			速報								

小型化小核スクリーニング試験

- 試験開始～速報提出まで4週間！
- ご希望に応じて報告書（簡易版）の作成が可能です（+1ヶ月程度）。
- 複数の被験物質を同時に評価できます。

弊社における小核試験の特徴

ボゾリサーチセンターにおける小核試験の特徴

- 試験実績が豊富です（年間100試験の実績）。
- 細胞曝露にウェルプレートを使用することで、創薬初期における希少で価値の高い被験物質の使用量を削減可能な*in vitro*小型化小核試験を導入しました（最低5 mgで試験実施可能）。非公開とはなりますが、医薬品メーカーの化合物を用いた検証の結果、小型化小核試験と標準的小核試験には相関性があることが確認されました。
- TK6細胞を用いる遺伝毒性試験において、豊富なバリエーションを有しています（小核試験、コメットアッセイ、突然変異試験、MultiFlow、CRESTなど）ので、陽性結果に対するメカニズム解析に基づいたフォローアップの実現が可能です。
- TK6変異株を用いることで、*in vitro* 小核試験の陽性メカニズム研究への応用可能です（ゲノム編集細胞の使用によるメカニズム解析）。

TK6細胞を用いた遺伝毒性研究に関する投稿論文の一例

- A Sassa †, T Fukuda †, A Ukai, M Nakamura, R Sato, S Fujiwara, K Hirota, S Takeda, K Sugiyama, M Honma, M Yasui. Follow-up genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells. *Mutagenesis*. 2021.
† A.S. and T.F. contributed equally to this work.
- M Yasui, T Fukuda, A Ukai, J Maniwa, T Imamura, T Hashizume, H Yamamoto, K Shibuya, K Narumi, Y Fujiishi, E Okada, S Fujishima, M Yamamoto, N Otani, M Nakamura, R Nishimura, M Ueda, M Mishima, K Matsuzaki, A Takeiri, K Tanaka, Y Okada, M Nakagawa, S Hamada, A Kajikawa, H Honda, J Adachi, K Misaki, K Ogawa, M Honma. Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. *Genes Environ.* 6; 43(1):7. 2020.
- A Sassa, T Fukuda, A Ukai, M Nakamura, M Takabe, T Takamura-Enya, M Honma, M Yasui, Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells., *Genes Environ.*, 16; 41:15., 2019.