

## P-011

### Suitable Method for *In Vitro* Micronucleus Test Using CHL Cells: Detection Method for Aneugens

Mami Ishihara, Aya Hayashi, Mizuki Kosaka, Aoi Kimura  
Drug Safety Research Laboratories, Shin Nippon Biomedical  
Laboratories, Ltd.

The genotoxicity guidance issued in 2012 recommends *in vitro* mammalian cell micronucleus test (vitroMNT); however, this test has many options for cells and positive control articles. Therefore, we examined the suitable methods for vitroMNT using CHL/IU cells.

Mitomycin C (MMC) and cyclophosphamide (CP) were selected as clastogens, and colchicine (CLC) was selected as the aneugen. We examined (1) suitable concentrations of the articles (0.0025-0.3, 5-15, and 0.05-1 µg/mL, respectively), (2) appropriate cell classification, and (3) detection methods for aneugen.

As the results, (1) the suitable concentrations for MMC (-S9), CLC (-S9), CP (+S9) in 3-hr treatment were 0.1, 0.75, and 10 µg/mL, respectively. Those for MMC and CLC in 24hr treatment (-S9) were 0.025 and 0.1 µg/mL, respectively. (2) There were small variations and high reproducibility by classification into 3 types: cells with micronuclei, cells with anomalous nuclei, and cells excluded from evaluation. (3) An increase in the incidence of cells with anomalous nuclei suggested the detection of aneugens.

### CHL細胞を用いた *In vitro* 小核試験の試験法の検討：異数性変異の検出

石原真美、林亜耶、小坂瑞樹、木村葵  
株式会社新日本科学 安全性研究所

*In vitro* 小核試験は、2012年に通知された新ガイドラインで標準的組み合わせ試験の1つとして推奨されているが、試験に用いる細胞および陽性対照物質には選択肢が多い。そこで、染色体異常試験のデータが豊富な CHL/IU 細胞を用いて、小核試験法を検討した。

構造異常誘発性物質として mitomycin C (MMC) と cyclophosphamide (CP) を、異数性誘発性物質として colchicine (CLC) を選択し、①処理濃度（それぞれ 0.0025～0.3, 5～15, 0.05～1 µg/mL）、②評価細胞の分類基準の妥当性、③異数性誘発性物質の検出の可能性を検討した。

その結果、①陽性対照物質の適切な濃度は、3時間処理では MMC(-S9), CLC(-S9), CP(+S9) でそれぞれ 0.1, 0.75, 10 µg/mL, 24時間処理では MMC と CLC でそれぞれ 0.025, 0.1 µg/mL であった。②評価細胞を、小核を有する細胞（小核サイズの大小による分類を含む）、変核細胞（多核細胞および分裂期細胞）、および観察除外細胞に分類することでばらつきが小さく再現性の高いデータが得られた。③変核細胞の出現率を評価に加えることで、異数性誘発性物質が検出できることが示唆された。

## P-012

### Evaluation of *in vitro* micronucleus assay using HepaRG cells

Ryuu Joshou, Katsuyuki Yuki, Shoji Matsumura,  
Toshio Kasamatsu, Naohiro Ikeda and Naohiro Nishiyama  
Kao Corporation, Global R&D – Safety Science

To address the problem of high false positive rates in *in vitro* mammalian genotoxicity test, we have examined the usefulness of *in vitro* micronucleus assay using 3D human reconstructed skin model (RSMN). This model successfully categorized 88.4% (23/26) of 26 chemicals as genotoxins or non-genotoxins in results of *in vivo* micronucleus test. Because 3 false negative chemicals exhibit genotoxic potential via metabolic activation, it is considered that higher metabolic enzyme activity cells are needed for evaluating these chemicals. In present study, we focus on human HepaRG cells, which have normal p53 function and express metabolic enzymes in high level. We evaluate 9 chemicals including metabolic activation required genotoxins in micronucleus assay, 3 genotoxins *in vivo* were judged positive correctly but 2 genotoxins *in vivo* were not. 4 non-genotoxins *in vivo* were judged as negative properly. These results suggest HepaRG cells have potential use for testing indirect genotoxic compounds. Furthermore, we ascertain the reason of misjudgment, and clarify the issues of using HepaRG cells *in vitro* genotoxicity test.

### HepaRG細胞を用いる小核試験の有用性検討

劉舒捷、幸克行、松村奨士、笠松俊夫、池田直弘、西山直宏  
花王株式会社 安全性科学研究所

これまでに我々は、哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験の偽陽性問題の解決のため、ヒト皮膚3D培養モデルを用いる小核試験（RSMN試験）の有用性を検討し、26化合物で *in vivo* 小核試験結果との一致率が88.4%（23/26）と非常に高い値を示した。一方、一致しなかった3化合物はいずれも代謝を受けて陽性結果を示す遺伝毒性物質であったことから、これらの化合物を正しく評価することが偽陽性問題解決のために重要である。そこで本発表では、p53の機能が正常で且つ高い代謝機能を保持するヒト肝臓由来細胞（HepaRG細胞）を用いて小核試験を実施した。代謝を受けて遺伝毒性を示す化合物を含む9化合物で評価した結果、*in vitro* ならびに *in vivo* にて陽性結果を示す5化合物のうち3化合物を陽性と、陰性結果を示す4化合物をすべて陰性と判断でき、HepaRG細胞は代謝を受けて遺伝毒性を示す化合物の評価に活用できる可能性が示唆された。さらに本検討では、正しく評価できなかった化合物について、原因を考察すると共に、HepaRG細胞を遺伝毒性評価に活用するための課題を提示する。