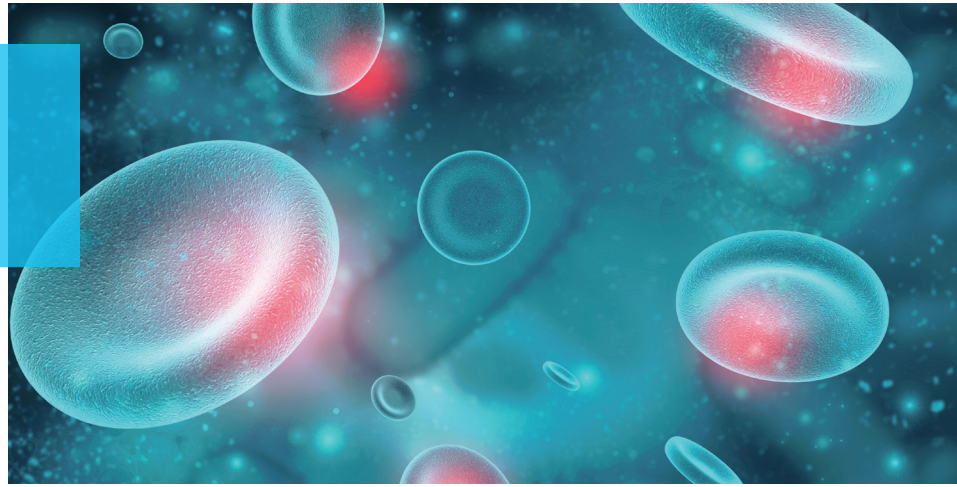


User Report



株式会社 薬物安全性試験センター
吉見研究所 第三試験室
小熊義宏、高橋知子、根岸保則

使用機種：フローサイトメーター RF-500
主な用途：In vivo 小核試験による薬物の毒性評価

1. はじめに

フローサイトメトリーは免疫学・血液学さらに再生医療分野における主要な研究・診断技術となっている。また、多細胞の測定結果を統計的に処理できることから、検査ツールとしても多分野で利用されている。

薬物の遺伝毒性試験として、マウスなどの哺乳類を用いたin vivo 小核試験が行われている。赤血球の生成過程で染色体異常が誘発されると小核が形成され、脱核後も維持されることを利用した試験である。In vivo 小核試験では、脱核直後の幼若赤血球における小核の発生率から、標的薬剤の遺伝毒性を評価している。In vivo 小核試験はギムザあるいはアクリジン・オレンジで染色したサンプルを顕微鏡で評価する方法(鏡検法)が広く用いられてきたが、その後抗CD71蛍光標識抗体とPK(プロピジウムイオダイド)で幼若赤血球およびDNAを染色しフローサイトメーターで評価する方法が開発された。多数の細胞を短時間で解析し、統計的に評価できるフローサイトメーターによる小核試験は注目されてきている。

今回、フローサイトメーターによる小核試験の実験例および顕微鏡による目視での試験結果との比較例を紹介する。

2. 鏡検法による小核試験の課題

弊社ではマウスの幼若赤血球を対象としたin vivo 小核試験による薬物毒性評価の受託業務を行っている。

鏡検法による小核試験は、サンプル調製が簡便で小核の発生を直接的に観察できるという利点がある。これまで弊社でも顕微鏡を用いた小核試験を採用してきた。しかし、経済協力開発機構(OECD)の化学物質の試験に関するガイドラインに従うと、4000個の幼若赤血球を計測して小核の発生率を測定することが求められており、1サンプル40分にもおよぶ長時間の観察時間および観察者の負担が問題となっている。さらに、実験者の主観的な判断基準の影響を小さくすることも課題となっている。

このため、短時間(1サンプル3分)で多数の細胞の測定が可能であり、かつ統計解析からより客観的な評価結果が得られるフローサイトメーターを用いた方法の導入を検討した。

