

自動解析技術を活用した安全性評価 — *in vitro* および *in vivo* 小核試験 —

住友化学株式会社 生物環境科学研究所
佐々木 克典 北本 幸子

はじめに

化学物質を適切に管理する上で、その的確な安全性評価は必要不可欠である。特に、遺伝子やDNAへの悪影響を引き起こす遺伝毒性は、がんや遺伝的疾患といったヒト健康被害の原因となる最も重篤な毒性の一つとして優先的に評価する必要がある。

小核試験はこの遺伝毒性の有無を調べる代表的な試験である。小核とは、化学物質のDNAへの作用によって生じたDNA断片からなる小さな核のことで、DNA損傷の指標となる。従い、化学物質を作用させた後に細胞を観察し、小核を持つ細胞の出現頻度を調べることで、化学物質の遺伝毒性の有無を検出することができる。培養細胞を用いる *in vitro* (試験管内) 小核試験は、その簡便さから化合物のスクリーニングに適しているのに対し、マウス等の実験動物を用いる *in vivo* (生体内) 小核試験は、生体における遺伝毒性評価を確定する重要な試験に位置付けられる。

このように *in vitro* および *in vivo* 小核試験は化学物質の安全性評価上欠かせないものであるが、いずれも化

合物あたり100,000個以上の細胞を一つずつ顕微鏡下で目視観察する必要があるため、これらの実施に多くの時間と労力を要するという課題があった。この課題の解決策として、最新の細胞解析技術を用いた様々な自動観察法が提案されている^{1),2)}。本稿では当社で実施した、自動解析技術を活用した迅速かつ高精度な小核試験の確立について概説する。

細胞イメージアナライザーを用いた *in vitro* 小核試験の自動解析

細胞イメージングとは、蛍光顕微鏡の細胞画像の撮影と画像解析を瞬時に行う技術である。蛍光色素で染色した細胞や細胞内の複雑な構造体の形、大きさ、長さ、数量といった要素の特性を高速かつ自動的に識別し、定量化することができる。この技術を *in vitro* 小核試験に活用することで化合物スクリーニングの迅速化が図れると考え、細胞イメージアナライザーによる自動解析の最適化に取り組んだ。

通常 *in vitro* 小核試験では、化学物質を細胞に作用さ

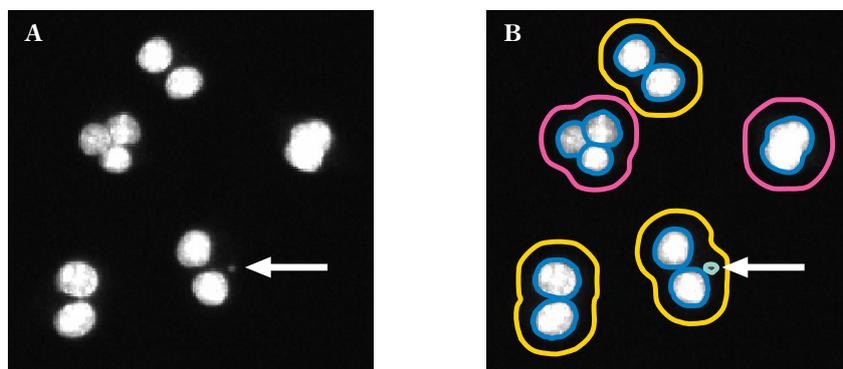


Fig. 1 Application of image analysis to micronucleus test on determination of cell type and micronuclei.
A) Microscopic image of main nuclei and a micronucleus (indicated by a white arrow) after staining,
B) Composite image after image analysis.

Binucleated cells (yellow), mono- or multinucleated cells (pink), main nuclei (blue) and a micronucleus (aqua, indicated by a white arrow).

せた後、細胞分裂を止める薬剤を添加し、細胞分裂過程の後期にある二核細胞（二つの細胞核を持つ細胞、Fig. 1）を観察する。これは小核がこの時期の直前に生成することに因るもので、遺伝毒性により生じた異常細胞は小核を持つ二核細胞（Fig. 1矢印）として検出される。一方、分裂していない単核細胞や、2回以上分裂した多核細胞は小核観察の対象としないが、細胞毒性の指標となる細胞増殖率を求めめるため、各々の細胞数も識別して定量する必要がある。

これら細胞の自動解析にあたっては、各細胞の占める領域を認識して核の数を計数した上で、二核細胞のみを対象として小核の有無を判定する必要がある。まず、隣り合う細胞へのそれぞれの正しい数の核の帰属が容易となるよう標本作製法の改良を行った。細胞の播種や固定方法、染色色素の種類や染色条件など種々の検討を行った結果、細胞の大きさや密度を極めて均質に

分布させる標本作製法を見出した。次に解析パラメーターの最適化に取り組み、各細胞の識別ならびに二核細胞に存在する小核の識別に適した数値アルゴリズムを確立した。これにより細胞画像の高精度な解析に成功し、小核試験が陽性となる既知の化合物について期待通りの結果が得られる自動観察法を構築することができた（Table 1）。同時に本法は、評価に必要な化合物量、試験期間の大幅な削減を実現した（Table 2）。

フローサイトメーターを用いたin vivo小核試験の自動解析

通常in vivo小核試験では、化学物質を投与後安楽死させた実験動物から骨髓塗抹標本を作製し、成熟過程で主核が脱落した幼若赤血球中に生じる小核の有無を目視で観察する。近年、動物使用数を削減するという動物福祉の観点から、他の安全性試験で得られる末梢

Table 1 In vitro micronucleus test – Comparison between manual and automated scoring

Test substance	Mechanism of action	Manual scoring	Automated scoring
Mitomycin C	Alkylating agent	Positive	Positive
Methyl methanesulfonate		Positive	Positive
4-Nitroquinoline-N-oxide		Positive	Positive
Cytosine arabinoside	DNA synthesis inhibitor	Positive	Positive
Camptothecin	Topoisomerase inhibitor	Positive	Positive
Colchicine	Tubulin inhibitor	Positive	Positive
Vinblastine		Positive	Positive
Paclitaxel		Positive	Positive
Nocodazole		Positive	Positive
Benzo[a]pyrene	Promutagen requiring metabolic activation	Positive	Positive
Cyclophosphamide		Positive	Positive
Dimethylnitrosamine		Positive	Positive
Sodium chloride	Not mutagenic	Negative	Negative
D-Mannitol		Negative	Negative

Table 2 Advantages of automated scoring vs. conventional manual scoring

	In vitro micronucleus test		In vivo micronucleus test	
	Manual scoring	Automated Scoring	Manual scoring	Automated Scoring
Period of examination	1 – 3 months	1 – 3 days*	1 – 3 months	1 – 3 days
Amount of test substance	1 g	0.005 g	10 – 30 g	**
Number of animals	—	—	60 animals	**

— : Not applicable

* : A large number of substances can be evaluated in parallel.

** : Usage of peripheral blood from treated animals in other toxicity tests can reduce test animals or substances.

血を小核試験に利用することが、欧州の規制当局を中心に推奨されつつある。化合物開発においても一連の安全性試験で得られる末梢血の利用は、化合物の使用量を削減できる点で有用である。しかし、末梢血の全赤血球に占める幼若赤血球の割合は1%程度であり、目視での観察は現実的に不可能であった。また、株化された培養細胞とは異なり、末梢血中には赤血球の他に、リンパ球、単球や血小板など多種多様な形状の細胞や夾雑物が存在するため、前述の細胞イメージング技術による自動解析も困難であった。そこでin vivo小核試験では、フローサイトメトリーによる自動解析技術に注目し、末梢血を用いた自動観察法の構築に取り組んだ。

フローサイトメトリーは、多様な細胞集団の中から目的の細胞を高速で識別する技術である。目的の細胞に予め目印（マーカー）を付加し、狭い流路を通して個々の細胞にレーザーを照射すると、細胞の形状やマーカーに特徴的な散乱光や蛍光が発せられる。これらの光強度を瞬時に定量化して座標にプロットする。プロット上の領域定義（ゲーティング）により、同じ形状やマーカーを有する目的の細胞を分類し、計数することができる。近年、フローサイトメーターの性能が飛躍的に向上し、小核試験にも応用されるようになってきた²⁾。当社においても、幼若赤血球やその中の

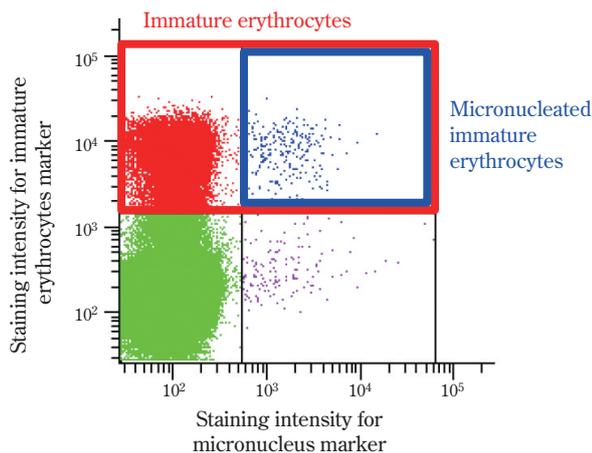


Fig. 2 Dot plot using flow cytometry to identify micronucleated immature erythrocytes (blue box) from the whole blood cells

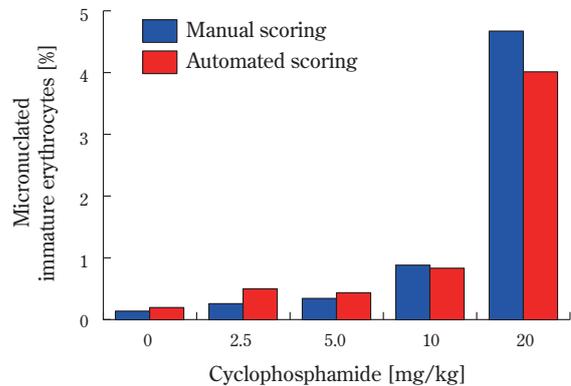


Fig. 3 Comparison of micronucleus frequencies between manual and automated scoring in immature erythrocytes treated with cyclophosphamide (typical mutagen)

小核を識別するためのマーカーや薬剤を適切に選択し、解析条件の検討を重ねてゲーティングを最適化することで、小核を持つ幼若赤血球を正確に分類できるようになった (Fig. 2)。これにより、末梢血でも従来の目視観察と同等の結果が得られる自動観察法を構築した (Fig. 3)。

おわりに

本稿では最新の自動解析技術を活用したin vitroおよびin vivo小核試験について概説した。自動観察法を確立したことにより、各々従来の目視観察法と比べて短時間でより簡便に多数の化学物質の評価が可能となった (Table 2)。当該自動観察法は、より安全な化学物質の早期開発に大きく寄与するものと期待され、今後安全性評価に積極的に利用していく予定である。

引用文献

- 1) K. Tilmant, H.H.J. Gerets, P.De Ron, C. Cossu-Leguille, P. Vasseur, S. Dhalluin and F.A. Atienzar, *Mutat Res.*, **751** (1), 1 (2013).
- 2) S. Kasamoto, D. Mukai, S. Masumori, K. Suzuki, R. Tanaka, D.K. Torous, J. Yamate and M. Hayashi, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, **762**, 39 (2014).