

## フローサイトメーターを用いた*in vivo*小核試験

アプリケーションレポート Vol.22

薬物の遺伝毒性試験のひとつに、マウス等の哺乳類を用いた「*in vivo*小核試験」があります。赤血球の生成過程で染色体異常が誘発された際に生じる小核が脱核後も維持されることを利用し、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する試験です。

従来より*in vivo*小核試験は小核(DNA)を染色したサンプルを顕微鏡で観察する方法が広く用いられてきましたが、抗CD71蛍光標識抗体とPI(Propidium Iodide)で幼若赤血球および小核(DNA)をそれぞれ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ました。フローサイトメーターによる小核試験は、多数の細胞を短時間で解析し統計的に評価できることから注目されてきています。

本レポートでは、フローサイトメーターによる小核試験の実験例をご紹介します。

### 結果

遺伝毒性ストレスを誘発することが知られているマイトマイシンCを投与したマウスの骨髄サンプルをCD71-FITC(幼若赤血球マーカー)とPI(DNAインターカレーター:小核中のDNA検出)で染色し、幼若赤血球における小核発生率を解析しました。

その結果、小核を有する幼若赤血球はマイトマイシンC処理により、0.3%(対照)から7.4%に増加しました(図1)。

マイトマイシンC処理による小核を有する幼若赤血球の増加を明確に確認できました。

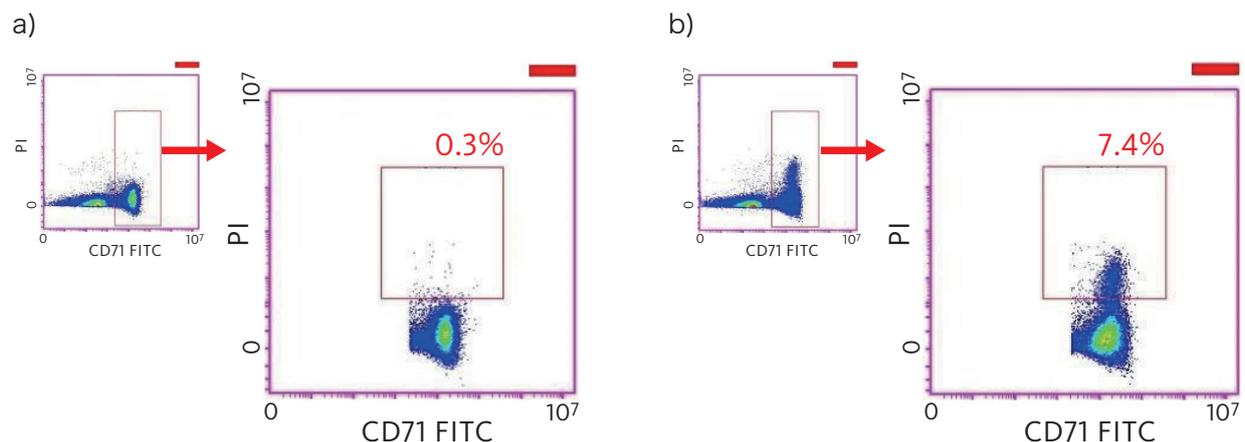


図1. フローサイトメーターによる小核試験結果

- a) 対照(Negative Control)マウス骨髄サンプルにおける、小核を有する幼若赤血球を評価。小核発生率は0.3%であった。
- b) マイトマイシンC処理(Positive Control)したマウス骨髄サンプルにおける、小核を有する幼若赤血球を評価。小核発生率は7.4%であった。

## サンプル調製・測定

マイトマイシンC処理により、マウスに遺伝毒性ストレスを誘導しました。マイトマイシンC処理および対照マウスの大腿骨から採取した骨髄サンプルは、セルロースカラムを用いて有核細胞を除去した後、冷却MeOHで固定処理を行いました。バッファー置換後、FITC標識したCD71認識抗体およびPIによる染色とRNAの分解処理を行い、フローサイトメーターRF-500で測定しました。

FSC-SSCプロットから血液細胞を選択し、CD71染色陽性細胞を解析対象の幼弱赤血球として分離し、さらにPI染色陽性領域を小核を有する幼弱赤血球として検出しました（図2）。

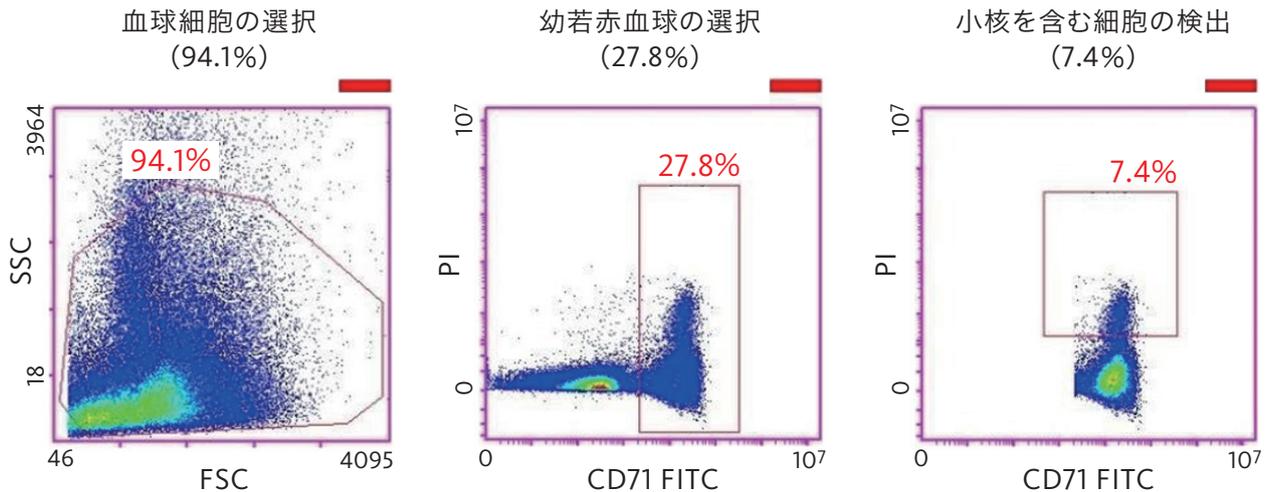


図2. フローサイトメーターによる小核含有幼若赤血球の解析

## 試薬・装置

- ・ Bone Marrow, *in vivo*, Mouse, MicroFlow Plus Kit (Litron)
- ・ フローサイトメーター：RF-500

(すべて研究用機器・試薬のため診断には使用できません。)

## 謝辞

株式会社薬物安全性試験センター様には、本レポート作成にあたり検体のご提供から試験の実施まで全面的にご協力いただきました。

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

お問い合わせ先

**シスメックス株式会社**

日本・東アジア地域本部 R&I営業部

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557