

P-003

An automated new technique for scoring the *in vivo* micronucleus assay with image analysis

Aya Shibai-Ogata, Haruna Tahara, Miyuki Shimoda, Hiroe Yoshizawa, Masaharu Fujita, Hiroshi Satoh, Atsuko Yuasa, Takanori Hioki, Toshihiko Kasahara
Safety Evaluation Center, Fujifilm Corporation

We developed an automatic scoring system with image analysis for the rodent erythrocyte micronucleus assay using 12-well. In our method, MNPCEs, PCEs, and erythrocytes were identified from 3 kinds of images: bright field image, two fluorescence images with Hoechst 33342 or propidium iodide (PI). The frequencies of MNPCEs and PCEs were subsequently calculated. A comparison of automatic and manual scoring was carried out using bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) obtained from mice treated with stepwise doses of MMC. The scores obtained by automatic analysis corresponded to those obtained by manual scoring. Furthermore, we performed 5 repeats of the examinations of mouse BM and PB treated with MMC or vinblastin sulfate, and showed that automatic scoring was equivalent to manual scoring in reproducibility. These results suggest that our automatic scoring system with image analysis is superior to manual microscopy scoring in speed and objectivity, comparable in reproducibility, and useful for the *in vivo* micronucleus assay.

蛍光イメージングを使用した *in vivo* 小核試験の新規自動計数法の開発

芝井亜弥、田原春菜、下田美裕紀、吉沢広江、藤田正晴、佐藤洋、湯浅敦子、日置孝徳、笠原利彦
富士フイルム 安全性評価センター

我々は、PI-Hoechst33342 染色と画像解析装置である IN Cell Analyser を用いて、げっ歯類の小核試験のための自動計数法を開発した。本方法は、一視野で PI(RNA)、Hoechst(DNA) 及び明視野の 3 枚の画像を自動取得・解析することで、MNPCE 及び PCE だけでなく、従来の画像解析法では困難であった NCE の識別も可能になった。本試験法の精度を確認するために、段階的な濃度の MMC を投与したマウスから骨髓と末梢血サンプルを採取し、骨髓はセルロースカラムを用いて、有核球を除去した。サンプルは、12 well プレートに塗抹し、固定後、PI と Hoechst 33342 で染色し、画像解析を行った。骨髓及び末梢血における小核出現率及び PCE 比は、自動計数法と人による計数で同程度であった。また、MMC 又はビンブラスチン処理したマウスの骨髓及び末梢血サンプルを自動計数法と人による計数法で 5 回繰り返し測定した結果、そのバラツキは同程度であった。これらの結果から、画像解析を利用した自動計数法は、簡単な染色操作で骨髓及び末梢血の小核出現率および PCE 比を迅速に測定できるだけでなく、画像データも保存できることから人による確認もできるので、より精度の高いデータをだすことが可能であることが示唆された。

P-004

Differentiation between clastogens and aneugens by automated scoring of micronuclei in mononucleated and binucleated CHL cells.

Katsunori Sasaki, Ryoko Matsuyama, Sachiko Kitamoto, Koichi Saito
Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Differentiation between clastogenic and aneugenic micronuclei requires laborious painting procedures such as FISH, and the development of simple alternative is limited. On the other hand, after prolonged inhibition of mitosis by spindle poisons, cells can eventually override mitotic arrest and enter G1 phase by a process known as mitotic slippage. Through this process, spindle poisons are reported to induce micronuclei even in mononucleated cells in cytokinesis-blocked micronucleus assay as well as in binucleated cells.

In this study, automated scoring of micronuclei both in mononucleated and binucleated CHL cells was applied for *in vitro* micronucleus assay using the image analyzer ArrayScan. As a result, aneugens induced micronuclei both in mono- nucleated and binucleated cells after 24hr continuous treatment, whereas clastogens induced them only in binucleated cells. These results indicate that simultaneous automated scoring of micronuclei in mononucleated and binucleated cells could be a simple, quick and effective tool for the differentiation between clastogens and aneugens.

CHL 細胞における単核および 2 核細胞中の小核自動計数による構造異常誘発物質と数的異常誘発物質の識別

佐々木克典、松山良子、北本幸子、斎藤幸一
住友化学株式会社

In vitro 小核試験において構造異常と数的異常とを識別するには FISH 等の煩雑な染色操作が必要であり、両者の簡便な識別法の開発は未だ限定的である。

一方、数的異常を誘発させる有糸分裂阻害が長期間継続すると、細胞が正常な分裂過程を経ずに G1 期へ移行するが知られている (mitotic slippage)。これにより有糸分裂阻害剤はサイトカラシン B 処理下で 2 核のみならず単核細胞中にも小核を誘発することが報告されている。

本研究では、構造異常と数的異常を簡便に識別して検出するスクリーニング試験系を構築することを目的として、CHL 細胞を用いた *in vitro* 小核試験に、ArrayScan を用いた自動画像解析技術を導入した。典型的な対照物質を用いて単核および 2 核細胞中の小核の自動検出を行ったところ、24 時間連続処理条件において構造異常誘発物質は 2 核細胞にのみ小核を誘発したのに対して、数的異常誘発物質は単核および 2 核細胞のいずれにも小核を誘発した。

すなわち、*in vitro* 小核試験における単核および 2 核細胞中の小核自動計数は、構造異常と数的異常を簡便に識別して検出する有用なツールとなり得ることが示唆された。