



遺伝毒性：酵母を用いる遺伝子突然変異試験**1. 序論**・ 前提条件

- 固体、液体、揮発性またはガス状被験物質
- 被験物質の化学的同定
- 被験物質の純度（不純物）
- 溶解性
- 融点／沸点
- pH
- 蒸気圧（もしデータがあれば）

・ 基準となる文書

適切な国際的基準はない。

2. 試験法**A. 緒言**

本試験は、単細胞真核生物である酵母における遺伝子突然変異を検索するものである。*Saccharomyces cerevisiae* 株は前進あるいは復帰突然変異（塩基置換あるいはフレームシフト）を検出するために開発された。

・ 定義

塩基置換型変異原物質とは、DNA に塩基対置換を誘発する化学物質である。復帰突然変異試験では、この変化は元の突然変異部位、あるいはゲノムの別の部位に生じる。

フレームシフト型変異原物質とは、DNA 分子に一つあるいは多数の塩基対を付加または欠失させる化学物質である。

・ 試験法の原則

化学物質により生じた遺伝子突然変異の検出には、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の種々の 1 倍体および 2 倍体株が用いられる。

本テストガイドラインを使用するものは、序文の特に3、4、7及び8を熟慮すること。

遺伝毒性：酵母を用いる遺伝子突然変異試験

赤色のアデニン要求性変異株 (ade-1, ade-2) から、アデニン要求性白色二重変異株への突然変異を検出するような、1倍体株を用いる前進突然変異系や、カナバニンおよびシクロヘキシミド抵抗性を誘発するような選択系が用いられる。

最も広く認められている復帰突然変異系としては、1倍体株 XV 185-14C が用いられる。この株に生じているオーカーナンセンス突然変異 ade 2-1、arg 4-17、lys 1-1 および trp 5-48 は、部位特異的突然変異またはオーカーサプレッサー突然変異を誘発する塩基置換型変異原により復帰可能である。XV 185-14C 株は、主に別の部位に生じた突然変異により復帰されるミスセンス突然変異である his 1-7 マーカー、およびフレームシフト型変異原により復帰される hom 3-10 マーカーを保持している。

2倍体株として広く用いられているのは、ilv 1-92 についてホモ接合体である D7 株のみである。

B. 試験手順の解説

・準備

被験物質

被験物質および陽性対照物質の溶液は必要に応じて適切な溶媒を用いて試験直前に調製する。溶媒の最終濃度は、細胞の生育率および増殖特性に明らかな影響を与えない濃度とする。

試験株

遺伝子突然変異試験に最も広く用いられる株は1倍体株 XV 185-14C と2倍体株 D7 である。他の株を用いてもよい。

培地

培地は細胞の生存および突然変異頻度の測定に適したものをを用いる。

代謝活性化

細胞を適切な哺乳類代謝活性化系の存在下および非存在下、被験物質で処理する。

最も一般的に用いられている系は、酵素誘導をかけたげっ歯類の肝臓のポストミトコンドリア分画に補酵素を補ったものである。それ以外の動物種、組織、ポストミトコンドリア分画、あるいは手法を用いてもよい。

遺伝毒性：酵母を用いる遺伝子突然変異試験

・試験条件

試験濃度

被験物質の濃度は、適切な濃度幅をおいて少なくとも5点を用いる。濃度選定の際に考慮すべき要因には細胞毒性および溶解度がある。最低濃度は細胞の生育率に影響を与えない濃度を選ぶ。毒性を示す物質については、最高濃度は生存率を5～10%以下にまで下げない濃度とする。水に難溶性の物質は適切な手法を用いて溶解限界まで試験する。水によく溶けるが、毒性を示さない物質については、個別に最高濃度を決定する。

自然発生突然変異頻度

試験に用いる細胞は、自然発生突然変異頻度が容認される正常範囲内にある培養を用いる。

プレート数

遺伝子突然変異によって生じる栄養非要求株の発生頻度や生育率の測定には、1濃度あたり少なくとも3枚のプレートを用いる。低い突然変異率を示す hom 3-10 マーカーなどを用いる場合には、統計学的に適切な試験成績を得るためにプレート数を増す必要がある。

対照

直接作用する化合物と代謝活性化を必要とする化合物の両方を、試験ごとに陽性対照として用いる。溶媒対照も必要である。以下に陽性対照として用いる物質の例を示す。

- methylmethanesulphonate, ethylmethanesulphonate, 4-nitroquinoline-N-oxide (直接作用原)
- N-nitrosodimethylamine, cyclophosphamide (間接作用原)
- ICR-170 (フレームシフト型直接作用原)

・試験の実施

Saccharomyces cerevisiae の処理は通常、定常期あるいは増殖期にある細胞を用いる液体試験法で行う。初めの実験は増殖期細胞を用いて行う。1～5×10⁷個/mlの細胞を最大18時間まで、振盪しながら28～37℃にて被験物質で処理する。代謝活性化実験に際しては、処理の間適量の代謝活性化系を添加する。処理後、細胞を遠心、洗浄後、適切な培地に播種する。

遺伝毒性：酵母を用いる遺伝子突然変異試験

4～7日間、28～30℃の暗所で培養後、コロニー数を数えて生存率および遺伝子突然変異頻度を算出する。

最初の実験結果が陰性のときは、2回目の実験では定常期の細胞を用いて行う。最初の実験結果が陽性のときは、別個の適切な実験を行って結果を確認する。

3. データおよび報告

・ 結果の処理

試験成績は表形式にして、計数したコロニー数、突然変異体数、生存細胞数および突然変異頻度を示す。

試験成績は適切な統計学的手法を用いて評価する。

・ 結果の評価

陽性結果と判定するためにはいくつかの基準があるが、その一つとして、突然変異頻度と同様に突然変異体数の増加に統計学的に有意な濃度依存性のあることがあげられる。その他の基準としては、試験した濃度の少なくとも1点で再現性がよく、統計学的に有意な陽性結果が得られることである。

突然変異頻度の増加に統計学的に有意な濃度依存性がなく、用いたいかなる濃度においても統計学的に有意で再現性ある陽性結果が得られないときには、この試験系では被験物質には変異原性がないと考える。

評価にあたっては、生物学的有意性と統計学的有意性の双方を考慮する。

・ 試験報告

試験報告書には以下の情報を記載する。

— 用いた株

— 実験条件：細胞が定常期にあるか増殖期にあるか、培地の組成、培養温度および時間、代謝活性化系

遺伝毒性：酵母を用いる遺伝子突然変異試験

- －処理条件：処理濃度、処理の手順および時間、処理温度、陽性および陰性対照
- －計数したコロニー数、突然変異体数、生存率および突然変異頻度、(もしあれば)濃度依存性、試験成績の統計学的評価
- －試験結果に対する考察
- －試験結果の解釈

4. 参考文献

- D.J. Brusick: *J. Bacteriol.* 109, 1134~1138, 1972.
- R.D. Mehta and R.C. von Borstel: in *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens* (edited by F.J. de Serres and J. Ashby), pp.414~423, Elsevier/North Holland, New York, 1981.
- K.K. Mortimer and T.R. Manney: in *Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection*, Vol. 1, (edited by A. Hollaender), pp.289~310, Plenum Press, New York, 1971.
- E.M. Parry and J.M. Parry: The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in *Mutagenicity testing, a practical approach*, (edited by S.Venitt and J.M. Parry), pp.119~148, IRL Press, Oxford, 1985.
- J. Parry, T. Brooks, I. Mitchell and P. Wilcox: in *Report of the UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II*, (edited by B.J. Dean), pp.27~61, UKEMS, Swansea, 1984.
- A.M. Srb, C.R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. *Physiol.* 26, 363~380, 1956.
- F.K. Zimmermann: in *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, (edited by J.B. Kilby, M. Legator, W. Nichols, and C. Ramel), pp.119~134, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1977.
- F.K. Zimmermann, V.M. Mayer and J.M. Parry: *J. Appl. Toxicol.* 2, 1~10, 1982.
- F.K. Zimmermann, R.C. von Borstel, E.S. von Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale and N. Loprieno: Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*; a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*133, 199~244, 1984.