OECD/OCDE

1986/10/23

試験ガイドライン No.479

遺伝毒性：哺乳動物細胞を用いる *in vitro* 姉妹染色分体交換試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

本文書は削除されたガイドラインです。

Original work:

OECD (1986), Test No. 479: Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/deleted-test-guidelines/deleted-test-guideline-479-1986.pdf.

©OECD(1986)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

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 Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

遺伝毒性：哺乳動物細胞を用いる *in vitro* 姉妹染色分体交換試験

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

姉妹染色分体交換（SCE）試験は、複製している染色体の２本の姉妹染色分体間の DNA の相互交換を検出する短期試験法である。SCE は、見かけ上相同部位での複製後 DNA 鎖の交換を表している。分子レベルの情報はほとんどないが、交換はおそらく DNA の切断および再結合を経て起こると思われる。SCE を検出するには、２細胞周期の間染色体 DNA にブロモデオキシウリジン（BrdU）を取り込ませるなどして、２本の姉妹染色分体を分染する必要がある。SCE は、哺乳動物の系でも、あるいは哺乳動物以外の系でも検出することができる。

・試験法の原則

哺乳動物細胞を *in vitro* で代謝活性化系の存在下および非存在下において被験物質で処理し、BrdU を含む培地中で２回 DNA 合成を行わせる。紡錘糸阻害剤（コルヒチンなど）で処理して分裂細胞を蓄積後、細胞を回収し染色体標本を作製する。

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。

B. 試験手順の解説

・準備

被験物質

被験物質は、細胞の処理直前に培地もしくは適切な溶媒に溶解する。溶媒の培地中での最終濃度は、細胞の生育率、増殖率および SCE 頻度に明らかな影響を及ぼさない濃度とする。

細胞および培養方法

初代培養系（ヒトリンパ球など）あるいは樹立細胞株（チャイニーズハムスターの卵巣あるいは肺由来細胞など）が試験に用いられる。株細胞は、マイコプラズマ汚染および核型の安定性を定期的に調べる。

培養に際しては適切な培地および培養条件（温度、培養容器、CO_2 濃度、湿度など）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の両方において被験物質で処理する。代謝活性化系の例として、酵素誘導をかけた哺乳動物の肝臓より調整したポストミトコンドリア画分に補酵素を添加した系と、哺乳動物肝細胞初代培養を用いる系があげられる。

・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３点を用いる。最低濃度は、有意な毒性効果がみられ、かつ、まだ適切な細胞複製が行われる濃度を採用すべきである。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、細胞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。

プレート数

各試験ポイントについて少なくとも２枚のプレートを用いる。

遺伝毒性：哺乳動物細胞を用いる *in vitro* 姉妹染色分体交換試験

対照

直接作用する物質および代謝活性化を必要とする物質の両方を用いて実験ごとに陽性対照をおく。溶媒対照もおく。以下に、陽性対照物質の例を示す。

－ethylmethanesulphonate, mitomycin C（直接作用原）

－cyclophosphamide（間接作用原）

・試験の実施

培養の準備

株細胞は保存用培養から調製し（トリプシン処理あるいは振盪剥離などによる)、適切な数の細胞を播種し、37℃で培養する。単層培養の際には、試験終了後に細胞がコンフルエントの状態にならないように細胞密度を調節する。浮遊培養の細胞を用いてもよい。ヒトリンパ球培養は、血液から適切な手法を用いて調製し、37℃で培養する。

被験物質による処理

対数増殖期にある株細胞を適切な時間、被験物質で処理する。処理時間は多くの場合１～２時間が効果的であるが、２細胞周期間まで延長してもよい。被験物質の処理を、血清を含まない培地の中で行う方がより効果的な場合もある。処理は、代謝活性化系の存在下および非存在下で行う必要がある。処理終了後、細胞を洗って被験物質を除き、BrdU 存在下で２細胞周期間培養する。他に、２細胞周期の全時間、被験物質と BrdU を同時に処理する方法もある。

ヒトリンパ球培養の場合には細胞がほぼ同調状態で処理されることになる。

分析は、処理の開始後第２回目の分裂期にある細胞で行う。最も感受性の高い細胞周期の間に処理された細胞を観察するためである。

BrdU が添加された培養は､培養終了時までは BrdU を取り込んだ DNA の光分解をできるだけ少なくするように取り扱わなくてはならない。

細胞の回収

細胞を、培養終了前１～４時間、紡錘糸阻害剤（コルヒチンなど）で処理する。各培養より回収された細胞は、標本作製にいたるまで別個に取り扱う。

染色体標本作製および染色

染色体標本は通常の細胞遺伝学的手法により作製する。SCE 観察のためには幾通りかの染色法がある（蛍光ギムザ法など)。

分析

通常､プレートあたり少なくとも25個のよく広がった分裂中期細胞によりSCEを観察するが、この数はSCEの自然発生頻度により左右される。標本は観察前にコード化する。ヒトリンパ球では46個の動原体を有する細胞のみを観察する。株細胞の場合には、最頻値±２個の動原体を有する細胞のみを観察する。動原体部位での交換をSCEとして計数したか否かを必ず記載する。結果は再実験により確認を行う。

３．データおよび報告

・結果の処理

試験成績は表にして示す。観察されたSCE頻度、染色体数、およびこれらより算出された染色体あたりのSCE頻度を、処理群と対照群のすべてについて、細胞ごとに別々に表示する。

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り､その一つとして細胞あたりの平均SCE頻度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点で再現性よく統計学的に有意な陽性結果が得られることである。

細胞あたりのSCE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は、この試験系では被験物質は陰性であると考える。

・試験報告

試験報告書には以下の情報を記載する。

－使用細胞、細胞維持の方法
－試験条件：培地の組成、CO_2 濃度、被験物質の濃度、溶媒の種類、培養温度、処理時間、紡錘糸阻害剤の種類・濃度・処理時間、用いた哺乳類代謝活性化系の種類、陽性および陰性対照、BrdU 濃度
－実験濃度あたりのプレート数
－標本作製手法の詳細な記述
－分析した分裂期細胞数（プレートごとに表示する）
－細胞あたりおよび染色体あたりの平均 SCE 頻度（プレートごとに表示する）
－SCE の計数基準
－試験濃度選定の根拠
－あれば濃度依存性
－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

S.A. Latt, J.W. Allen, S.E. Bloom, A. Carrano, E. Falke, D. Kram, E. Schneider, R. Schreck, R. Tice, B. Whitfield and S. Wolff: Sister Chromatid Exchanges, in Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res. 87, 17~62, 1981.

P. Perry, L. Henderson and D. Kirkl: Sister Chromatid Exchange in Cultured Cells, in Report of the UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II, 89~122, 1984.

P.E. Perry and E.J. Thomson: The Methodology of Sister Chromatid Exchange, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, (edited by B.J. Kilby, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel), pp.495~530, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1984.

P.E. Perry: Chemical Mutagens and Sister Chromatid Exchange, in Chemical Mutagens, Vol. 6, (edited by F.J. de Serres and A. Hollaender), pp.1~39, Plenum Publishing Co., New York, 1980.

S. Takehisa: Induction of Sister Chromatid Exchange by Chemical Agents, in Sister Chromatid Exchange (edited by S. Wolff et al.), pp.87~147, John Wiley & Sons, New York, 1982.