OECD/OCDE

1986/10/23

試験ガイドライン No.481

遺伝毒性：酵母を用いる体細胞組み換え試験

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. 481: Genetic Toxicology: Saccharomyces cerevisiae, Mitotic Recombination Assay, 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-481-1986.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：酵母を用いる体細胞組み換え試験

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体細胞組み換え（遺伝子変換、あるいは交叉）を検出するのに用いられる。*Saccharomyces cerevisiae* 株はこの事象を検出しやすいようにヘテロな遺伝子座をホモに変換して開発されたものである。これらの組み換えは、基本的に相同な染色分体間の DNA 鎖の交換であり、非特異的な DNA 傷害を示すものである。

・定義

体細胞交叉とは、遺伝子の間（より一般的には遺伝子と動原体の間）にある小さな DNA 区分の交換であり、相同な産物を生じる。

体細胞遺伝子変換とは、遺伝子の中での DNA 配列の単一方向への変換であり、非相同な産物を生じる。

・試験法の原則

体細胞交叉および遺伝子変換は *Saccharomyces cerevisiae* を用いて検出できる。

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：酵母を用いる体細胞組み換え試験

赤交叉は一般に、ヘテロ接合株中に生じた劣性ホモ接合株のコロニーもしくは集団の発生によって検出される。遺伝子変換は、同じ遺伝子座に関して、二つの異なる欠損遺伝子を有するために栄養要求性（auxotrophic）を示すヘテロ接合体が、栄養非要求性（protrophic）への復帰変異株を生じる現象によって検出される。体細胞遺伝子変換の検出に最も通常用いられる株は、D4（ade 2 と trp 5 座におけるヘテロ接合体)、BZ34（arg 4 座におけるヘテロ接合体)、D7（trp 5 座におけるヘテロ接合体)、および JD1（his 4 および trp 5 座におけるヘテロ接合体）である。赤およびピンクのホモ接合体集団を生じる体細胞交叉は D5 および D7 株（この株はまた体細胞遺伝子変換および ilv 1-92 座における復帰突然変異も検出できる）で検索される。これら２種類の株は ade 2 相補座に関してヘテロ接合体である。

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の直前に調製する。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

最もよく用いられる株は２倍体の D4、D5、D7 および JD1 であるが、他の株を用いてもよい。

培地

培地は細胞の生存率および体細胞組み換え頻度の測定に適したものを用いる。

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加えたものである。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：酵母を用いる体細胞組み換え試験

・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。水によく溶けるが、毒性を示さない物質については、最高濃度は個別に設定する。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。

体細胞組み換え自然発生頻度

試験に用いる細胞は、体細胞組み換えの自然発生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

遺伝子変換によって生じる栄養非要求株発生頻度および生育率の測定には、１濃度あたり少なくとも３枚のプレートを用いる。体細胞交叉によって生じる劣性ホモ接合体の検出に際しては、各濃度あたりのプレート数は適切な数のコロニーを観察できるだけのものとする。

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。以下に陽性対照物質の例をあげる。

－methylmethanesulphonate, ethylmethanesulphonate, 4-nitroquinoline-N-oxide（直接作用原）

－cyclophosphamide（間接作用原）

・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含む液体試験法で行う。初めの実験は増殖期細胞を用いて行う。１～５×10^7 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、処理の間適当量の哺乳類代謝活性化系を添加する。処理後、細胞を遠心、洗浄し、適切な培地に播種する。

遺伝毒性：酵母を用いる体細胞組み換え試験

４～７日間、28～30℃の暗所で培養後、コロニーを数え、細胞の生存率と体細胞組み換え頻度を算出する。体細胞交叉によって生じた赤およびピンクのホモ接合体は、観察の前さらに冷蔵庫（4℃）中に１～２日間保存し、適度に発色したコロニーをさらに増殖させる。

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にある細胞を用いて行う。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、組み換え体数、生存細胞数および組み換え体頻度を示す。

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にはいくつかの基準があるが、その一つとして、組み換え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点で再現性よく統計学的に有意な陽性結果が得られることである。

組み換え体数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の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は DNA 組み換えを誘発しなかったと考える。

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

－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、組み換え体の数、生存率および組み換え頻度、(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

P.J. Davies, W.J. Evans and J.M. Parry: Mutation Res. 29, 301~314, 1975.

R. Fahrig: Mutation Res. 31, 381~394, 1975.

G.R. Fink and R. Lowenstein: J. Bacteriol. 100, 1126~1127, 1969.

D. Kelly and J.M. Parry: Mutation Res. 108, 147~159, 1983.

B.A. Kunz, B.J. Barcley and R.H. Haynes: Mutation Res. 73, 215~220, 1980.

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.

M.S.S. Murthy, Mutation Res.64, 1~17, 1979.

E.M. Parry and J.M. Parry: The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast Saccharomyces cerevisiae, in Mutagenicity testing, a proctical approach, (edited by S. Venitt and J.M. Parry), pp.119~148, IRL Press, Oxford, 1985.

D.C. Sharp and J.M. Parry, in Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, (edited by F.J. de Serres and J. Ashby), pp.502~626, Elsevier/North Holland, New York, 1981.

F.K. Zimmermann, R. Kern and H. Rosenberger: Mutation Res.28, 381~388, 1975.

F.K. Zimmermann: in Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd edition, (edited by J.B. Kilby, M. Legator, W. Nichols, and C. Ramel), pp.215~238, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1984.

F.K. Zimmermann and I. Scheel: in Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, (edited by F.J. de Serres and J. Ashby), pp.481~490, Elsevier/North Holland, New York, 1981.

481

遺伝毒性：酵母を用いる体細胞組み換え試験

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.