OECD/OCDE

1986/10/23

試験ガイドライン No.482

遺伝毒性：DNA 傷害及び修復/哺乳動物細胞を用いる
in vitro 不定期DNA 合成試験

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. 482: Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair/ Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro, 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-482-1986.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：DNA 傷害及び修復/哺乳動物細胞を用いる *in vitro* 不定期 DNA 合成試験

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

哺乳動物細胞を用いる *in vitro* 不定期 DNA 合成（UDS）試験に関する本指針は、哺乳動物由来の初代培養細胞あるいは株細胞を用いて DNA の修復合成を検出する手順を解説する。不定期 DNA 合成試験は、放射性同位元素で標識されたヌクレオチド、たとえば ^{3}H-TdR の DNA 鎖への取り込みを、オートラジオグラフィーあるいは液体シンチレーションカウンターを用いて検出する。UDS は *in vivo* の系でも用いられる

・試験法の原則

UDS 試験は、化学的・物理的因子により傷害を受けた DNA 部分の除去にともなう DNA 修復合成を測定する。この試験は、通常、トリチウムにより標識されたチミジン（^{3}H-TdR）の S 期以外の細胞周期にある哺乳動物細胞 DNA への取り込みを観察する。取り込まれた ^{3}H-TdR 量は、処理細胞から抽出した DNA をオートラジオグラフィーあるいは液体シンチレーションカウンターで計測することにより測定する。ラット肝細胞の初代培養以外の培養哺乳動物細胞は、哺乳類代謝活性化系の存在下および非存在下で被験物質の処理を行う。

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

被験物質および対照物質は培養液で調製するか、もしくは適切な溶媒に溶解した後、培養液で希釈して用いる。溶媒の最終濃度は、細胞の生育率に影響を与えない濃度とする。

細胞および培養条件

初代培養系（ラット肝細胞など）、ヒトリンパ球、あるいは樹立細胞株（ヒト２倍体線維芽細胞など）などが試験に用いられる。培養に際しては、適切な培養液、CO_2 濃度、温度、および湿度を選択する。株細胞についてはマイコプラズマ汚染の有無を定期的に調べる。

・試験条件

プレート数

UDS の検出にオートラジオグラフィーを用いる場合には、試験濃度ごとに少なくとも２枚のプレートを用いる。液体シンチレーションカウンターを用いる場合には、試験濃度ごとに６枚のプレートを用いる。ただし、科学的に正当な理由があれば、プレート数を減らしてもよい。

対照

試験に際しては、常に代謝活性化系の存在下および非存在下で、陽性ならびに陰性（溶媒）対照も同時に検討する。

ラット肝細胞系の陽性対照物質としては、7,12-dimethylbenzanthracene（7,12-DMBA）および 2-acetylaminofluorene（2-AAF）などがあげられる。株細胞の場合には、オートラジオグラフィーおよび液体シンチレーションカウンターのいずれを用いる試験でも、代謝活性化系を用いない場合には 4-nitroquinoline-N-oxide（4-NQO）が、代謝活性化系を用いる場合には N-dimethylnitrosamine が陽性対照物質の例としてあげられる。

試験濃度

被験物質の濃度は、はっきりした効果が観察される濃度範囲を含む数点を選択する。最高濃度は何らかの細胞毒性効果がみられる濃度とする。

水に難溶性の物質は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関しては、個別に最高濃度を設定する。

代謝活性化

固有の代謝能を有する初代培養細胞以外の細胞は、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。

・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）、適切な細胞密度で播種し、37℃で培養する。

哺乳動物肝細胞の短期培養は、バラバラにした直後の肝細胞をプレート中のスライドグラスに付着させて行う。

ヒトリンパ球は、適切な手法を用いて培養の準備を行う。

被験物質による処理

－哺乳動物肝細胞の初代培養系

新たに分離した哺乳動物肝細胞は、適当な時間 ^{3}H-TdR を含む培地中で被験物質の処理を行う。処理終了後、細胞を洗浄し、固定・乾燥する。スライドはオートラジオグラフ用乳剤に浸すか、細長いフィルムをあて、感光・現像・染色・計数を行う。

他に、放射性標識に加えてブロモデオキシウリジン（BrdU）を取り込ませた後、密度勾配遠心を行う手法もある。この方法により、液体シンチレーション計数前に複製中の DNA と修復合成（UDS）後の DNA を分離することが可能である。

－オートラジオグラフィーを用いる株細胞あるいはヒトリンパ球

培養中の細胞は適切な時間、被験物質で処理する。処理時間は被験物質の性質、代謝活性化系の活性、および細胞の種類によって決められる。UDS のピークを検出するためには、^{3}H-TdR の

添加は被験物質と同時か、あるいは被験物質の処理後数分以内に行う。どちらの方法を選択するかは、被験物質と ^{3}H-TdR の間にどんな相互作用があるかによって決まる。

UDS を通常の半保存的 DNA 複製と区別するためには、アルギニン除去培地・血清濃度減少・培地へのヒドロキシウレアの添加などの手法を用いて、通常の DNA 合成を低下もしくは阻害させる。

－液体シンチレーションカウンターを用いる株細胞あるいはヒトリンパ球

被験物質による処理に先立ち、細胞が S 期に入らないように上記の方法でブロックする。その後、オートラジオグラフィーの項に記載したように被験物質による処理を行う。培養終了時に細胞より DNA を抽出し、全 DNA 量と取り込まれた標識化合物量を測定する。

分裂刺激前のヒトリンパ球を用いる場合には、上記のいずれの方法を用いるにせよ半保存的 DNA 複製の抑制は不要であるということに注意する。

分析

―オートラジオグラフィー

培養した細胞の UDS 観察に際しては、S 期にある核は計数しない。スライドは計数の前にコード化する。スライドあたり少なくとも 50 個の細胞を計数する。スライドごとに、広い範囲にわたって無作為に選んだ数点の領域の観察を行う。細胞質への ^{3}H-TdR の取り込み量は、適切な手法によって測定する。

結果は、独立した別個の試験によって確認する。

－液体シンチレーションカウンター

被験物質の各処理濃度および対照ごとに 6 枚（科学的な根拠があれば少なくてもよい）のプレートを用いる。

結果は、独立した実験により確認する。

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。

－*オートラジオグラフィー*

細胞質への ^{3}H-TdR の取り込み量と細胞核中に観察された銀粒子の数は別個に記載する。

細胞質への ^{3}H-TdR の取り込み量と細胞核あたりの銀粒子数の分布の記載には、平均値、中央値、および再頻値が用いられる。UDS を示した細胞の割合もまた有益な情報を提供してくれる。

試験成績は適切な統計学的手法を用いて評価する。

－*液体シンチレーションカウンター*

液体シンチレーションカウンターを用いる計数では、標識化合物の取り込み量は dpm/μg DNA で表示する。取り込み量の記載には標準偏差つきの平均値が用いられる。

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、細胞核あたりの銀粒子数あるいは dpm/μg DNA で表わされた標識化合物の取り組み量の増加に統計学的に有意な濃度依存性があることがあげられる。その他の基準としては、試験濃度の少なくとも 1 点で再現性がよく統計学的にも有意な陽性結果が得られることである。

細胞核あたりの銀粒子数あるいは dpm/μg DNA で表わされた標識化合物の取り込み量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場合には、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、被験物質処理の際の細胞密度および継代数、プレート数
－培地の組成、温度、CO_2 濃度を含む細胞維持の方法
－被験物質、溶媒、試験濃度およびその選定理由
－代謝活性化系の詳細
－処理の手順
－陽性および陰性対照
－細胞が S 期に入るのを阻害した手法
－用いたオートラジオグラフィーの手順
－液体シンチレーションカウンターによる計数の際に行った DNA 抽出法および全 DNA 量測定法
－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

V. Andrae and R.L. Schwarz: Induction of DNA repair synthesis in isolated rat hepatcytes by 5-diazo-uracil and other DNA damaging compounds, Cancer Letters 13, 187~193, 1981.

V. Andrae: Evidence for the involvement of cytochrome P-450-dependent monooxygenase (s) in the formation of genotoxic metabolites from N-hydroxyurea. Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 409~415, 1984.

J.E. Cleaver: Methods for studying excision repair of DNA damage by physical and chemical mutagens, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures (edited by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, and C. Ramel), pp.33~70, Elsevier, Amsterdam, 1984.

J.E. Cleaver and G.H. Thomas: Measurement of unscheduled synthesis by autoradio-graphy, in DNA Repair, A Laboratory manual of research procedures, (edited by E.C. Friedberg and P.C. Hanawalt), pp.277～287, Marcel Dekker, New York, 1981.

C.N. Martin, A.C. McDermid and R.C. Garner: Testing of known carcinogens and non-carcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in the HeLa cells, Cancer Res. 38, 2621~2627, 1978.

遺伝毒性：DNA 傷害及び修復/哺乳動物細胞を用いる *in vitro* 不定期 DNA 合成試験

A.D. Mitchell, D.A. Cassiano, A.L. Meltz, D.E. Robinson, R.H.C. San, G.M. Williams and E.S. Von Halle: Unscheduled DNA synthesis tests: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res. 123, 363～410, 1983.

D.E. Pettijohn and P. C. Hanawalt, Evidence for repair replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria, J. Mol. Biol. 9, 395~410, 1964.

H.P. Stich and B.A. Laishes: DNA Repair and chemical carcinogens, in Pathobiology Annual (edited by H.L. loachim), pp.341~376, Appleton-Century-Crofts, New York, 1973.

G.M. Williams: Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell culture, Cancer Res. 37, 1845~1851, 1977.

R. Waters: DNA repair tests in cultured mammalian cells, in Mutagenicity testing, a practical approach (edited by S. Venitt and J.M. Parry), pp.99~118, IRL Press, Oxford, 1984.

R. Waters, J. Ashby, B. Burlinson, P. LeFevre, R. Barrett and C. Martin: Unscheduled DNA synthesis, in Report of the UKEMS Subcommittee of guidelines for mutagenicity testing, Part II, pp.63~87, 1984.