OECD/OCDE

1997/07/21

試験ガイドライン No.486

哺乳類肝細胞を用いる *in vivo* 不定期DNA 合成（UDS）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.

Original work:

OECD (1997), Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071520-en.

©OECD(1997)

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

486

1997 年 7 月 21 日採択

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

哺乳類肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成（UDS）試験

はじめに

1. 哺乳類肝細胞を用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成（UDS）試験の目的は、処理動物の肝細胞で DNA 修復を誘導する物質を特定することである(1)(2)(3)(4)。

2. この *in vivo* 試験により、化学物質の肝臓における遺伝毒性を測定できる。この評価項目の測定値は、肝細胞における DNA 損傷とそれに続く修復を表す指標となる。肝臓は、通常、吸収された化合物を代謝する主要部位である。したがって、DNA 損傷を *in vivo* で測定するのにふさわしい。

3. 用いた定義を補遺に提示する。

最初に考慮すべき事項

4. 被験物質が標的組織に達しないという証拠がある場合、この試験を用いるのは不適当である。

5. 不定期 DNA 合成（UDS）は、予定の（S 期）DNA 合成に進まない細胞において標識ヌクレオシドの取り込みを測定することにより評価される。最も広く使用されているのは、オートラジオグラフィーによってトリチウム標識チミジン（^{3}H-TdR）の取り込みを決定する手法である。*In vivo* UDS 試験にはラット肝臓を用いることが望ましい。肝臓以外の組織も使用可能であるが、このガイドラインの対象ではない。

6. 検出される UDS 反応の大きさは､損傷部位で切断され置換された DNA 塩基数に依存する。したがって、UDS 試験は物質により誘発された「ロングパッチ修復」（20～30 塩基）を検出するために特に有用である。対照的に、「ショートパッチ修復」（1～3 塩基）の検出感度は、はるかに低い。その上、変異原性に係る現象は、DNA 損傷の非修復、修復ミスまたは複製ミスによっても起こる可能性がある。UDS 反応の程度は、修復過程の正確さについては何の情報ももたらさない。更に、変異誘発物質が DNA と反応したとしても DNA 損傷は除去修復プロセスでは修復されないという可能性もある。このように、UDS 試験で得られる変異原性活性は特異的情報に欠けるとはいえ、全ゲノムを対象に測定される評価項目であるゆえの感度の高さでは十分に補償される。

試験の概要

7. 哺乳類肝細胞による *in vivo* UDS 試験の結果は、化学物質または物理的因子で誘発される損傷領域を含む DNA 断片を切除し､除去した後に生じる DNA 修復合成を表す。試験は通常、細胞周期の S 期にある細胞の頻度が少ない肝細胞を用いて DNA への ^{3}H-TdR 取り込みを測

定する。^{3}H-TdR の取り込みは通常オートラジオグラフィーで決定されるので、例えば、液体シンチレーションカウンターに比べるとS期の細胞の影響を受けにくい。

試験方法

準備

動物種の選択

8. ラットが一般的に用いられるが、適当な哺乳類ならいずれも使用できる。試験機関で通常使用される系統で、若齢健康成熟動物を使用する。試験開始時、使用動物の体重のばらつきは最小限とし、各性の平均体重の± 20%を超えないこととする。

飼育および給餌条件

9. 動物飼育室の温度は 22°C ± 3°C とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要が生じる場合がある。動物は個別飼育するか、または同性の動物を群飼いする。

動物の準備

10. 健康な若齢成熟動物を対照群と投与群に無作為に割り付ける。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。全ての動物を個体識別する。本試験の開始前に、動物は 5 日間以上飼育室環境に馴化させる。

被験物質／準備

11 固体の被験物質は細胞に添加する前に適切な溶媒／溶剤に、溶解／懸濁するか、必要に応じて希釈する。液体の被験物質は試験系に直接添加するか、添加前に希釈する。保存有効期間を示す安定性データがない限り、被験物質の新鮮な溶液を用いる。

試験条件

溶剤／溶媒

12. 溶剤／溶媒は、投与に用いる量で毒性効果を生じてはならないし、被験物質との化学反応を起こす疑いがないものを用いる。性質が既知ではない溶剤／溶媒を用いるときは、適合性を示すデータが助けとなる。可能であれば、まず水溶性の溶剤／溶媒を用いることが推奨される。

対照

13. 同時に実施された陽性および陰性対照（溶剤／溶媒）を各実験にそれぞれ含める。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。

14. バックグラウンドに比較して検出可能な増加となるべき暴露量においては、陽性対照は UDS を誘発することが分かっている物質とする。代謝活性化が必要な陽性対照は、中等度の反応を誘発する用量で投与する(4)。用量は明らかな効果が発現し、かつ観察者がコード化した標本を直ちに特定できないようにする。陽性対照物質の例を以下に示す。

サンプリング時間	化学物質および CAS 番号
初期サンプリング時間（2～4 時間）	N-ニトロソジメチルアミン[CAS 番号 62-75-9]
後期サンプリング時間（12～16 時間）	N-2-アセチルアミノフルオレン（2-AAF）[CAS 番号 53-96-3]

他の適当な陽性対照物質も使用できる。被験物質と異なる経路で陽性対照を投与することも可能である。

手順

動物数および性

15. 試験に対する反応においては生物学的変動が避けられないことを考慮し、十分な数の動物を使用する。各群とも 3 匹以上の分析可能な動物を確保する。背景に蓄積された相当量のデータベースがある場合には、同時に実施する陰性および陽性対照群は 1 匹または 2 匹の動物のみでよい。

16. 本試験開始時において、本実験と同じ種および同じ暴露経路を用いて行われた試験で、毒性に性差がないことを示すデータがある場合には、一方の性、望ましくは雄における試験のみで十分である。化学物質に対するヒトの暴露に関して、ある種の医薬品のように性特異性が予想される場合、試験は適切な性の動物で行う。

投与スケジュール

17. 被験物質は通常、単回投与とする。

投与量

18. 一般には、少なくとも 2 つの用量を用いる。最高用量は、それより高い用量を同じ投与計画に基づいて投与すれば致死を引き起こすと予想される用量と定義する。通常、低用量は高用量の 25%～50%とする。ホルモンやマイトジェンのように、毒性を表さない低用量で特異的な生物活性を示す物質は、このような用量決定基準の適用外であり、それぞれの状況によって評価しなければならない。適切なデータがないため用量設定試験を実施する場合は、本試験実施機関で、本試験で使用するのと同じ種、系統、性および投与計画によって実施する。

19. 最高用量は濃縮した核のように、肝臓に対して何らかの毒性の徴候をもたらす用量と定義することもできる。

限度試験

20. 少なくとも 2000 mg/kg 体重の用量を 1 日 1 回または 1 日 2 回に分けて投与する試験において毒性の徴候が全く認められず、かつ構造的に関連する物質のデータに基づいて遺伝毒性が予想できない場合には、3 用量を用いる完全な試験の必要はないと考えてよい。ヒトで想定される暴露量によっては、限度試験においても更に高用量の使用が必要になる可能性はある。

投与

21. 被験物質は、通常、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いた強制投与によって、または腹腔内注射によって投与される。正当な理由があるなら、他の暴露経路も受け入れ可能である。ただし、腹腔内経路は循環系を介することなく肝臓を直接被験物質に暴露させることになるので、推奨しない。強制投与または注射により 1 回に投与できる最大液量は、供試動物の大きさによって異なるが、体重 100g あたり 2 mL を超えてはならない。より大きい容量の使用は、正当な理由が必要である。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。

肝細胞の準備

22. 通常、投与後 12～16 時間に、肝細胞を処理動物から調製する。12～16 時間で明らかな陽性反応がない限り、更に初期サンプリング（通常投与後 2～4 時間）が必要である。ただし、トキシコキネティクスデータに基づいた正当な理由がある場合には、他のサンプリング時間でもよい。

23. 哺乳類肝細胞の短期培養は、通常、*in situ* で肝臓をコラゲナーゼ灌流し、新鮮分離肝細胞を適切な表面に付着させることにより確立できる。陰性対照動物から調製した肝細胞は、少なくとも 50%の生存率でなければならない(5)。

UDS の測定

24. 新鮮分離哺乳類肝細胞を、適当な時間（例えば、3～8 時間）、^{3}H-TdR を含む培地で培養する。培養期間終了時に培地を除去し、過剰の非標識チミジンを含む培地で培養し、取り込まれなかった放射能を減少させる（cold-chase）。培養期間がより長い場合には、cold-chase は不要かもしれない。細胞を洗浄し、固定、乾燥する。スライドをオートラジオグラフィーの乳剤に浸漬し、暗所で露出（例えば、7～14 日間冷蔵庫に放置）した後、現像、染色し、感光した銀粒子を計測する。各動物で 2～3 枚のスライドを作製する。

分析

25. スライド標本には UDS の評価が有意義なものとなるように、形態学的に正常な細胞を十分に含むようにする。標本に明らかな細胞毒性（例えば、濃縮した核、放射性標識の低下）徴候がないか、顕微鏡下で調べる。

26. 銀粒子を計測する前にスライドをコード化しておく。通常、各動物で少なくとも 2 枚のスライドを用い、合計少なくとも 100 の細胞についてスコア化する。各動物で 100 未満の細胞しか記録しない場合は、正当な理由がなければならない。S 期核については銀粒子のスコア化は不要であるが、S 期細胞の比率は記録してもよい。

27. 形態学的に正常な細胞の核内および細胞質内の ^{3}H-TdR 取り込み量（銀粒子の沈着で示される）を、適切な方法で測定する。

28. 核に分布する銀粒子（核粒子、NG）および核と等面積の細胞質に分布する銀粒子（細胞質粒子､CG）数を測定する｡CG 数は細胞質内の最も強く標識された領域で測定してもよいし、細胞質内の核付近の 2 ないし 3 領域の測定値の平均でもよい。その他の計測法（例えば、細胞全体の計測）も正当な理由があれば使用できる。

データおよび報告

結果の処理

29. 各スライドと動物のデータを提供する。更に、全てのデータを総括表にまとめる。細胞あたり、動物あたり、用量あたりおよび時間あたりの正味核粒子（NNG）数を、NG 数から CG 数を差し引くことによって計算する。「修復中の細胞」を計測する場合、「修復中の細胞」を定義するための基準について背景または同時に実施された陰性対照データに基づいてその妥当性を示す必要がある。数値データは、統計解析により評価してよい。統計解析を用いる場合には、本試験の実施前に当該統計的検定法を選択した正当な理由付けをしなければならない。

結果の評価および解釈

30. 陽性／陰性反応の基準の例を以下に示す。

陽性
(i) NNG 値が予め決められた閾値を越えるもの。ただし、この閾値は試験機関の背景データに基づいて正当化できるものであること。または、
(ii) NNG 値が同時に実施した対照より有意に大きなもの。

陰性
(i) NNG 値が背景の対照閾値の範囲内もしくはそれ以下。または、
(ii) NNG 値が同時に実施した対照より有意に大きくはない。

31. 結果の生物学的意義（すなわち、動物間の変動、用量反応関係および細胞毒性のようなパラメータ）を考慮すべきである。統計解析は結果を評価する目的で用いる。ただし、統計学的な有意差は陽性反応を決定付ける唯一の因子ではない。

32. 多くの実験で明らかな陽性または陰性結果を示していても、データセットから被験物質の活性を明確に判定できないことがまれにある。繰り返される実験回数に限らず、不確かな結果や疑問のある結果が解決されないことがある。

33. 哺乳類肝細胞を用いる *in vivo* UDS 試験の陽性結果は、被験物質が *in vivo* で哺乳類肝細胞に DNA 損傷を誘発し、その損傷は *in vitro* での不定期 DNA 合成によって修復され得ることを意味する。試験条件下で示す陰性の結果は、この試験で被験物質が検出可能な DNA 損傷を誘発しないことを意味する。

34. 被験物質が全身循環または特異的な標的組織に達する可能性（例えば、全身毒性）について、議論しなければならない。

試験報告書

35. 試験報告書は、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
- 分かっている場合、特定データと CAS 番号
- 物理的性質と純度
- 試験の実施に関連する物理化学的性状
- 分かっている場合、被験物質の安定性

溶剤／溶媒
- 溶媒選択の妥当性
- 分かっている場合、溶剤／溶媒中の被験物質の溶解性と安定性

供試動物
- 使用する種、系統
- 動物数、週齢および性
- 供給元、飼育状況、飼料、その他
- 試験開始時の動物の個体ごとの体重、各群の体重範囲、平均および標準偏差

試験条件
- 陽性および陰性溶媒／溶剤対照
- 実施した場合、用量設定試験のデータ
- 用量選択の妥当性
- 被験物質調製の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 投与経路の妥当性
- 必要に応じて、被験物質の全身循環または標的組織に達することを確認した方法
- 必要に応じて、飼料／飲料水中の被験物質濃度（ppm）から実際の投与量（mg/kg 体重/日）への換算
- 飼料と水の質の詳細
- 投与およびサンプリングスケジュールの詳細な説明
- 毒性の測定方法
- 肝細胞調製と培養の方法
- 使用したオートラジオグラフィー法
- 作製したスライド数およびスコア化した細胞数
- 評価基準
- 陽性、陰性、不確かな結果を示す試験の基準

結果
- 核粒子値、細胞質粒子値および正味核粒子値を各スライド、各動物および各群の平均として表記
- 可能な場合、用量反応関係
- もしあれば、統計評価
- 毒性の徴候
- 同時に実施した陰性（溶剤／溶媒）および陽性対照データ
- 背景の陰性（溶剤／溶媒）および陽性対照データ、範囲、平均および標準偏差
- 測定した場合、「修復中の細胞」数
- 測定した場合、S 期細胞数
- 細胞の生存率

結果の考察

結論

参考文献

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res., 189, 123-133.

(3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I.de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1994). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. Mutation Res., 312, 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo*/*In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, 553-562.

補遺

定義

修復中の細胞：予め設定された値より高い正味核粒子（NNG）で、試験を実施する試験機関で妥当性を検討すべきもの。

正味核粒子（NNG）：オートラジオグラフィーの UDS 試験において細胞の UDS 活性を定量的に表す尺度。核粒子数（NG）から核と等面積の細胞質粒子数（CG）を差し引いて算出する。すなわち、NNG = NG－CG。NNG 数は個々の細胞について算出し、ついで培養細胞と同時に実施した培養についてプールする。

不定期 DNA 合成（UDS）：化学物質または物理的因子によって DNA に誘発された損傷領域 を含む断片を切断し、除去した後に生じる DNA の修復合成。