

## P-045

**Mechanism of hepatic micronuclei induction in adult rats by single-dose administration without partial hepatectomy**

Naho Tsuji, Soichiro Hagio, Izumi Ogawa,  
Masayoshi Abe, Seigo Hayashi, Yusuke Kuroda,  
Yoshikazu Yamagishi, Tetsuya Yoshino, Satoshi Furukawa

*Biological Research Laboratories, Nissan Chemical Industries,  
Ltd.*

Last year, we reported that hepatic micronuclei (MN) were induced by single-dose administration of N-Nitrosopyrrolidine (NPYR) for in adult rats without partial hepatectomy. This time, MN assay was performed 1, 3, 7 and 21 days after the administration of NPYR in the same condition as that of previous study in order to investigate the mechanism on MN induction in the liver. In addition, comet assay and the chemical analysis of NPYR in the liver were performed. The results showed that NPYR significantly increased the frequency of MN at Day 3, 7 and 21. The comet assay showed positive results at Day 1, 3 and 7 with the highest response at Day 1, which implied that cells with DNA damage had stayed in the liver for 7 days after the administration. The chemical analysis indicated that NPYR almost disappeared except in the liver given NPYR at Day 1. The persistent DNA damage more than 7 days by single administration might cause the MN induction in the liver.

**成獣ラットへの単回投与及び非部分肝切除による肝小核誘発のメカニズム**

辻 菜穂、萩尾 宗一郎、小川 いづみ、阿部 正義、  
林 清吾、黒田 雄介、山岸 由和、吉野 哲哉、古川 賢

日産化学工業株式会社

昨年、我々は遺伝毒性発がん物質のN-Nitrosopyrrolidine (NPYR)を6週齢の成獣ラットに単回投与(300、600mg/kg)し、14日後に非部分肝切除かつ非還流法による肝臓の小核試験を実施したところ、陽性の結果を得たことを報告した。今回は小核誘発のメカニズムを検討するために、投与1、3、7及び21日後についても同様の条件で小核試験を実施した。同時にコメットアッセイ及び肝臓中 NPYR 濃度分析も実施した。

結果、小核発現頻度については低用量でも3日後で僅かながら有意な増加が、7日後には14日後の1/3程度の有意な増加が認められた。21日後の頻度は14日後と同程度であった。一方、コメットアッセイは投与1日後の反応が最も高かったが、7日後でも陽性の結果を示し、DNA損傷が継続されていたことが確認された。NPYRの肝臓中濃度は投与1日後の検体投与群の全動物で検出されたが、3日以降はほぼ検出されなかった。

以上より、NPYR投与により生じた相当量のDNA損傷(DNA付加体)が7日間以上残っていたことにより、単回投与にも関わらず肝小核頻度を有意に上昇させたと考えられた。

## P-046

**Influence of the storage time of cell suspension on the results of comet assay**

Jin Tanaka, Ai Miwa, Masahito Fukumuro,  
Miho Nagai, Fuyumi Uno, Masakatsu Natsume,  
Sawako Kasamoto, Kenichiro Suzuki, Michiyo Oba,  
Misako Iio, Shoji Masumori, Makoto Hayashi

*Public Interest Incorporated Foundation Biosafety Research  
Center*

According to the draft OECD guideline for in vivo comet assay, it is needed to determine optimum experimental conditions during the demonstration of proficiency in each laboratory. One of the experimental conditions to be determined is an acceptable time length from cell isolation to the start of preparation of specimen. An example of optimum time length shorter than 1h is given in the draft guideline. To start preparation of specimen within 1h in a study evaluating multiple tissues, more people are needed. If it is possible to prolong the acceptable time length, we could reduce the number of workers and have enough time to prepare specimens.

In this study, specimens were prepared within 1 h after cell isolation, the remainder of cell suspension was divided into two portions and kept on ice or in a refrigerator, and specimens were separately prepared 2, 4, 8 and 24 h after cell isolation. The specimens prepared within 1 h were compared to other specimens to examine the influence of the storage time on the results of comet assay. We will report these results in this meeting.

**細胞液の保存時間の結果への影響  
(コメットアッセイ)**

田中 仁、三輪 愛、福室 真仁、永井 美穂、宇野 冬美、  
夏目 匡克、笠本 佐和子、鈴木 健一郎、大羽 みちよ、  
飯尾 美沙子、益森 勝志、林 真

公益財団法人食品農薬医薬品安全性評価センター

OECDのin vivo コメットアッセイのガイドライン案では、習熟度の確認の際に各研究施設で実験条件を設定することが求められている。その中に細胞単離～標本作製までの許容時間についても記載されており、また、許容時間の例として1時間以内と記載されている。複数器官を評価する試験では、1時間以内に標本作製を行うためには、多数の人員が必要になる。そのため、許容時間を少しでも延ばすことができれば、作業人員の削減もでき、作業にも余裕が生まれると考える。

本試験では、細胞を単離した後、1時間以内に標本作製し、残った単離細胞を氷冷または冷蔵にて保存し、細胞単離後2、4、8および24時間にそれぞれ標本作製した。1時間以内に作製した標本と各保存時間の標本の% tail DNAの値を比較し、保存時間の結果への影響を確認し、その結果について報告する。