



遺伝毒性：ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験**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、目的、範囲、関連性、適応および限界**

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いる伴性劣性致死 (SLRL) 試験は、昆虫の生殖細胞に生じる点突然変異と小さな欠失の両方を検出する。この試験は前進突然変異を検出する系であり、X染色体上の約800座位に生じる突然変異を検出することができる。これはX染色体上に存在するすべての座位の約80%に相当し、X染色体は全ゲノムの約1/5にあたる(1)。

・ 定義

致死突然変異とは、発現したときに致死となる遺伝子上の変化のことである。

劣性突然変異とは、ホモ接合体ないしはヘミ接合体の状態で発現する遺伝子上の変化のことである。

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：ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験

伴性遺伝子は性染色体（X あるいは Y）上に存在している。ただし、本ガイドラインでは伴性遺伝子を X 染色体上の遺伝子に限定して用いている。

・参照化学物質

以下に陽性対照物質の例を示す。

— ethyl methanesulfonate

— N-nitroso-dimethylamine

・試験法の原則

ショウジョウバエの X 染色体上に生じた突然変異は、変異した遺伝子をもつ雄において表現型として発現される。突然変異がヘミ接合体の状態では致死作用をもつならば、ヘテロ接合体の雌（F1）より生まれる二つのタイプの雄（F2）のうち、一方が死ぬことによって致死突然変異の存在を推定することができる。

SLRL 試験は特別に工夫された標識遺伝子と逆位をもつ染色体を利用して行われる。

B. 試験手順の解説

ショウジョウバエを用いた SLRL 試験の実施方法は参考文献(1)と(2)に記載されている。野生型雄を処理し、適切な雌と交配させる。F1 の雌はそれぞれの兄弟と交配させ、次の世代でそれぞれの交配から生まれた子孫（F2）について、表現型が野生型である雄の数を調べる。野生型雄が存在しないときは、P1 の雄の生殖細胞に伴性劣性致死突然変異が生じたことを示している。

・準備

系統

十分に研究された野生型の雄と Muller-5 系の雌を用いる。X 染色体に複数の逆位をもつ他の適切な系統の雌を用いてもよい。

遺伝毒性：ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験

被験物質

被験物質は水に溶解する。水に不溶な物質は適切な溶媒（たとえばエタノールと Tween 60 あるいは 80 の混合液）に溶解または懸濁させ、その後水あるいは生理食塩液で希釈してから投与する。ジメチルスルフォキシドは溶媒として用いるべきではない。

・試験条件

投与経路

投与は経口、注射またはガス状暴露で行う。被験物質は砂糖溶液に入れて餌として与えることができる。必要ならば、被験物質を 0.7% の NaCl 溶液に溶かし、胸部または腹部に注入することもできる。

用量段階

第一段階で変異原性を評価するときには、被験物質の単一用量、つまり最大耐量または可能ならば何らかの毒性の徴候を示す用量を用いる。確認のための試験では、さらに少なくとも二段階の用量を追加して行う。

対照

陰性（溶媒）対照群を設けることが望ましい。しかし、研究室ではこれまでに蓄積した適切な対照データが使えるならば、対照試験を同時に行う必要はない。

・試験の実施

野生型の雄（3 ないし 5 日齢）は被験物質で処理してから、Muller-5 系または他の適切な系（X 染色体に複数の逆位をもっている）の複数処女雌とそれぞれ交配させる。2～3 日おきに新しい処女雌と取り替え、生殖細胞の全成熟過程をカバーするよう交配させる。これらの雌の子孫に対

遺伝毒性：ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験

する致死効果を記録し、処理した時点での成熟精子、中期および後期の精子細胞、前期精子細胞、精母細胞、精原細胞に対する影響を調べる。

こうした交配により生じたヘテロ接合体の雌 F1 は、1 匹ずつ（すなわち、1 ガラス瓶あたり雌 1 匹）同腹の雄と交配させる。F2 世代では、ガラス瓶ごとに野生型の雄がいるかどうかを記録する。あるガラス瓶の中の F2 世代が、X 染色体上に致死変異をもった雌 F1 から生まれたと思われるならば（すなわち、F2 世代に野生型雄が観察されないならば）、F1 の雌と同じ遺伝子型をもつ F2 雌について、致死が次の世代においても反復されるか否かを確認する。

試験はあらかじめ設定した統計学的な検出感度と検出力に基づいて実験計画を立てる。各群に用いる個体数はこれらの設定したパラメータに依存する。非常に弱い致死突然変異率を示す物質を検出する場合には、分析に必要な個体数は対照群の自然致死率によって大きく左右される。

試験の結果は、別に計画した実験によって確認する必要がある。

3. データおよび報告

・結果の処理

試験成績は表にして、試験した染色体の数（F2 が得られた F1 雌の数）、不妊雄の数、各用量の処理雄および交配期間ごとの致死突然変異をもつ染色体の数を示す。劣性致死のクラスターがあればその数と大きさを雄ごとに報告する。

伴性劣性致死試験を評価する際に、いくつかの統計学的方法を用いることができる。1 匹の雄に由来する劣性致死のクラスターについては特別な考慮が必要であり、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、その一つとして伴性劣性致死突然変異率の増加に統計学的に有意な用量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

遺伝毒性：ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験

た用量の少なくとも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。

伴性劣性致死突然変異率の増加に統計学的に有意な用量依存性がなく、用いたいかなる用量においても再現性よく統計学的に有意な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に変異原性がないと考える。

評価を行う際には、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。

— 系統：使用したショウジョウバエの系統、日齢、処理雄の数、不妊雄の数、交配させた F1 雌の数、F2 が得られなかった F1 雌の数、試験した染色体の数（F2 が得られた F1 雌の数）、生殖細胞の各成熟段階ごとに検出された致死突然変異をもつ染色体の数（F1 雌の数）

— 試験条件：処理とサンプリングのプロトコール、用量段階、毒性データ、もしあれば陰性（溶媒）および陽性対照、これらに関する詳細な記述

— 致死突然変異の計測基準

— あれば用量反応関係

— 統計学的な評価

・結果の解釈

ショウジョウバエを用いる SLRL 試験の結果が陽性であるときは、被験物質が昆虫の生殖系に突然変異を誘発することを示している。陰性結果は、当該試験条件下では被験物質が昆虫の生殖系に突然変異を誘発しないことを示している。

遺伝毒性：ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験

4. 参考文献

1. F.H. Sobels and E. Vogel : Mutation Res. 41, 95~106, 1976.
2. F.E. Würzler, H. Sobels and E. Vogel : in Handbook of Mutagenicity Test Procedures (edited by B.J. Kilbey, et al.) pp. 335~373, Elsevier, Amsterdam, 1977.