OECD/OCDE

2022/06/30

試験ガイドライン No.470

哺乳類赤血球Pig-a 遺伝子突然変異試験

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 (2022), Test No. 470: Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation 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/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-470-2022.pdf

©OECD(2022)

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

OECD/OCDE 470
2022 年 6 月 30 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

哺乳類赤血球 Pig-a 遺伝子突然変異試験

はじめに

1. *In vivo* 赤血球 *Pig-a* 遺伝子突然変異試験（以下、*Pig-a* 試験と呼ぶ）では、体細胞遺伝子変異のレポーターとして、内因性の哺乳類遺伝子であるホスファチジルイノシトールグリカンクラス A 遺伝子（*Pig-a*）を用いる。*Pig-a* 試験などの *in vivo* 遺伝子突然変異試験は、変異原性の評価との関連性が特に高い。何故なら、被験化学物質の曝露部位からの吸収、全身循環を介した試験系全体への被験化学物質の分布、ならびに *in vivo* 代謝および DNA 修復プロセスなどの生理的要因のすべてが変異原性反応に寄与するからである。これらの理由から、*in vivo Pig-a* 試験は、*in vitro* 系により検出された遺伝毒性の可能性のさらなる検討に使用できる。

2. *Pig-a* 試験は、通常用いられる系統のラットまたはマウスにより実施でき(1)（段落 28 参照）、動物を安楽死させずに試験を実施できる。こうした特性により、多くの *in vivo* げっ歯類試験プロトコールへの *Pig-a* 試験の統合が容易になる（段落 7～8 および補遺 2 参照）(2) (3)。

3. 本試験ガイドライン（TG）は、*Pig-a* 試験の科学的原理、技術的な実施内容、性能、および使用の背景を説明している詳細総括書（DRP）記載の推奨事項(3)に基づいている。加えて、本 DRP では、*Pig-a* 試験の利点と欠点を、他の *in vivo* 遺伝毒性試験と関連付けて比較している(3)。本 DRP は、複数の *Pig-a* 試験プロトコールに関する遺伝毒性試験国際ワークショップによるレビュー(2)に基づいたものである。*Pig-a* 試験の主要な構成要素および手順について、以下に記す。本 TG の推奨事項に従った詳細な試験実施施設プロトコールなど、*Pig-a* 試験実施に関するさらなるガイダンスは、上述および他の公表文献 (4) (5) (6) (7)に見出せる。

4. *In vivo* 赤血球 *Pig-a* 遺伝子突然変異試験(3) (9)で実施された後ろ向き性能評価に関する独立したピアレビュー(8)では、*Pig-a* 試験は高い正確度で *in vivo* 変異原を特定するのに適切であると結論付けられた。ピアレビューでは、規制上の判断の裏付けに用いられる TG の開発に関し、*Pig-a* 試験は十分に検証されていることが示された。

5. 主要な用語の定義を補遺 1 に示す。

© OECD, (2022)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

最初に考慮すべき事項および限界

6. *Pig-a* 遺伝子突然変異は、変異原の反復投与により蓄積することが認められており、変異赤血球の頻度増加は、末梢血中において通常数ヵ月間持続する(10) (11) (12)。これらの観察結果は、*Pig-a* 変異細胞が血液循環から出現および消失する速度が、*Pig-a* 野生型細胞の場合と類似していることを示唆しており、*Pig-a* 試験において測定された変異が、あたかも比較的中立的な表現型、すなわち、細胞増殖に有利にも不利にもならない表現型を有するかのように振る舞うことを示している。*Pig-a* 試験では様々な投与計画が採用されてきたが、28 日間連続投与（またはそれ以上、段落 43 参照）を採用したプロトコールが、変異体の蓄積を利用し、変異体発現に十分な期間をもたらし、標準的な反復投与毒性試験への *Pig-a* 試験の統合を容易にしている。28 日間投与プロトコールでは、弱い *in vivo* 変異原検出の正確度が、短期（すなわち、連続 14 日間未満）投与プロトコールよりわずかに高いことも示した（例：2 組の基準を用いた場合 93%と 89%の一致を示したのに対し、短期投与のみのデータを用いた場合は 88%。完全な考察については(3)参照）。最後に、28 日間の投与プロトコールでは、より短い投与スケジュールに比べ、（1 日当たり）より低い用量段階で一部の変異原が検出される(13)。

7. 3R の原則（すなわち、代替法の活用、使用数の減少、動物の苦痛の軽減）および実験データから、可能な限り、*Pig-a* 試験と他の試験との統合が支持される。ただし、きわめて効果的に行うために考慮すべき重要な要因が複数ある。*Pig-a* 試験実施に関し推奨される手順には、28 日間連続投与後に *Pig-a* 遺伝子突然変異試験を行うことが挙げられる（段落 40）。よって、*Pig-a* 試験を、こうした反復投与スケジュールを用いる試験デザインに統合することは容易で、その例には、OECD TG 407 (14)および TG 412 (15)記載の 28 日間亜急性一般毒性試験、あるいは、OECD TG 488 (16)記載のトランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験が挙げられる。*Pig-a* 試験は、OECD TG 408 (17)および TG 413 (18)記載の亜慢性毒性試験など、長期曝露期間を伴う試験と併用することもできる。*Pig-a* 試験と、短期での投与および試料採取スケジュールからなる試験との組み合わせは、補遺 2 で考察する。

8. 段落 7 および補遺 2 に概説されている条件下では、*Pig-a* および赤血球小核試験は、エンドポイントごとに少量の末梢血のみ必要であるため、単一の実験に統合できる。したがって、染色体異常誘発性／染色体異数性誘発性（小核試験）および遺伝子変異（*Pig-a* 試験）の両方を、同一の試験で評価できる(19)。*Pig-a* 試験に比べ *in vivo* コメット試験は異なる種類のエンドポイント（鎖切断形での DNA 損傷）を検出することから、*Pig-a* 試験は、（変異体発現期間を考慮する限り）*in vivo* コメット試験も補足する。コメット試験は、骨髄区分の変異を誘発する被験物質の検出感度が低いことも示している(20)が、*Pig-a* 試験は、骨髄赤血球細胞において誘発される変異を特異的に測定する（段落 10）。

9. *Pig-a* 遺伝子は比較的大きい（5 つのエクソンを有する 1302 bp のタンパク質コード配列）。*Pig-a* 変異表現型を生じる変異（段落 15 参照）は、コード領域および隣接するスプライス部位配列全体にわたり、変異の主要なホットスポットなしに検出されてきた(21) (22) (23) (24)。*Pig-a* 試験により検出された変異のほとんどは、エクソン欠失となる変異を含む塩基対置換およびフレームシフトであり、検出された変異の性質に関する既知のバイアスはなかった。

10. 赤血球 *Pig-a* 試験は、赤血球前駆細胞において誘発される変異を検出し、変異は成熟げっ歯類の骨髄に主に認められる。骨髄は十分な潅流がみられる組織であるため、他の組織での変異を誘発する多くの物質は骨髄でも変異を誘発する。*Pig-a* 試験は、直接作用型変異原である被験化学物質と、変異の誘導に代謝活性化を要する被験化学物質（すなわち、前駆型変異原）のいずれにも感度が高い。ただし、*Pig-a* 試験は、骨髄に到達しない被験化学物質およびその代謝物の変異原性の評価には適用できない（段落 71 参照）。一般に、本 TG 記載の *Pig-a* 試験では、最初の接触部位での遺伝毒性は調査できない。

11. 既知変異原を投与された、げっ歯類骨髄由来の *Pig-a* 変異表現型に関する赤血球前駆細胞の DNA 配列解析により、*Pig-a* 遺伝子突然変異の範囲について解析が行われている。これらの試験から得られた

© OECD, (2022)

知見により、*Pig-a* 変異表現型を決定する細胞は *Pig-a* 変異を包含するが、*Pig-a* 野生型細胞は包含しないことが指摘される(21) (22) (23) (24)。

12. 本 TG は、げっ歯類血液の赤血球に基づいた *Pig-a* 試験にのみ適用できるが、*Pig-a* 変異は、*in vitro*、培養哺乳類細胞株、およびヒトを含む様々な動物種において検出可能である(3) (25) (26)。他の哺乳類種の末梢血を用いた類似の測定は、変異原性物質および非変異原性物質の検出に十分な感度および特異度が立証された場合には、実行可能であり最終的に価値があると考えられる。

13. ピアレビュー済みの *Pig-a* 試験データのほとんどは、ラットから得られている。これまでに収集されたマウスデータ(1) (25)は、マウスも *Pig-a* 試験に使用可能であることを示している(3)。ただし、マウスでの試験を計画する場合、マウスはラットに比べ循環血液量が少ないなど、マウスに基づく試験の複数の特徴を考慮に入れる（例：段落 56 参照）。

14. 工業生産されたナノ材料を試験する場合、最も適切な *in vivo* 試験法は接触部位での影響を測定可能な試験であると考えられ(27)、この種の物質の試験では、*Pig-a* 試験の妥当性はより低くなりうる。ただし、*Pig-a* 試験は、工業生産されたナノ材料の骨髄または全身アベイラビリティを立証できる場合には（例：静脈内投与後）、工業生産されたナノ材料の変異原性試験に適切であると考えられる(28) (29)。

試験法の原理

15. グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）細胞膜アンカーの生合成には、*Pig-a* 遺伝子によりコードされるタンパク質が必要である(30)。GPI アンカーは、約 150 種類の独自のタンパク質を哺乳類の細胞膜内腔面に結合させる。GPI 合成に関与する約 30 個の遺伝子のうち、*Pig-a* は X 染色体上に位置する唯一の遺伝子である。雄には X 染色体が 1 個のみ存在し、雌で機能する X 染色体は 1 個であるため、単一変異により、*Pig-a* 遺伝子産物が不活化され、GPI アンカーおよびこれに関連する GPI アンカータンパク質を欠失した細胞が生じる可能性がある。したがって、雌雄動物は、*Pig-a* 変異体誘発に同等の感度を有する(3)。GPI 生合成に関与する他の遺伝子は、両対立遺伝子の変異でのみ不活化が可能であり、GPI 不活化の標的にはそれほどふさわしくなく、また、その変異により、*Pig-a* 試験で測定される変異表現型である GPI アンカー欠失を生じる可能性はより低い(31)。

16. 末梢血には、マイクロリットル単位の量に数 100 万個の赤血球（RBC）が含まれ［例：(32)］、その数パーセントは網状赤血球（RET）としても知られる未熟赤血球である。RET は残存 RNA 量を含有し、赤血球前駆細胞に典型的な CD71 などの表面マーカーを発現するが、成熟 RBC は残留 RNA を含有せずそうした表面マーカーも発現しない。本ガイドラインの目的として、RBC は年齢に関係なくすべての循環赤血球を意味するのに用いられる一方、RET は循環赤血球の最も未熟な画分に適用される。RET と成熟 RBC との識別は、残存 RNA および／または適切な蛍光色素もしくは抗体を用いた CD71 表面マーカーの存在に基づくことで可能である。

17. 末梢血中の RBC および RET では、*Pig-a* 変異表現型（すなわち、GPI アンカーの消失）を、GPI アンカータンパク質に対する蛍光色素結合抗体での標識により、フローサイトメトリーを用いて解析できる(33) (34) (35)。そのため、GPI アンカーエピトープに関しては、*Pig-a* 変異細胞は蛍光を発せず、*Pig-a* 野生型細胞は蛍光を発することになる。このように、数 100 万個の標識された RBC および RET の *Pig-a* 変異表現型について、フローサイトメトリーを用いて試験できる。段落 23～25 および 60 の記述どおり、実用での 1 試料当たり数 100 万個の細胞を評価するため、RET および／または変異細胞を濃縮する方法が開発されている。

18. RET 集団と総 RBC 集団の両方について、変異表現型を評価する。末梢血循環では、高頻度の変異網状赤血球（MUT RET）が変異赤血球（MUT RBC）に比べ早く出現する。それでも、MUT RBC は、

© OECD, (2022)

変異の遅れに関する重要な確証となる指標に当たることから、MUT RET に加え MUT RBC を計数することは重要である。赤血球の両コホートで変異体発現が立証されると、このことは、被験化学物質が誘発する変異原性活性の最も強力な証拠に当たり（段落 66 参照）、また、本文書記載の投与／採血スケジュール（段落 40～45 参照）は、MUT RET および MUT RBC の両方が、変異原性物質曝露による増加に十分な期間となるよう設定された。げっ歯類を既知変異原性物質に曝露させ、28 日間反復投与プロトコールを利用した場合、MUT RET または MUT RBC の 1 集団のみにおける統計学的に有意な増加の発生がまれであるのは確かである。しかし、変異は 1 回または数回の試料採取時にのみ測定されるため、遅れて生じる RBC の突然変異体頻度に関しては、MUT RET の陽性反応は生じても、MUT RBC の反応は生じない可能性があること、あるいは、一方または他方の赤血球コホートにおいて、陰性反応が確率的に検出されることは考えられる。こうした結果の有益性は、被験化学物質の変異原性確立に関する専門家の評価から得られる。

19. *Pig-a* 変異体誘発に関するデータ収集に加え、赤血球細胞区分に合わせた毒性の尺度として、総 RBC に対する RET の割合を使用できる。RET の割合（%RET）に関するデータは、骨髄が生物学的に顕著なレベルの被験化学物質またはその代謝物に曝露されたことを確立するのに有用となりうる（(2) (7)、段落 49 および 55 も参照）。投与中止後約 3 日以内に血液試料を収集した場合、骨髄毒性は、同時溶媒／溶剤対照群の動物の%RET に対する相対的な%RET 低下としてしばしば発現する。一方、投与中止後約 3 日より後に血液試料を収集した場合、骨髄毒性は、同時溶媒／溶剤対照群の動物に対する相対的な%RET 上昇として時に発現しうることに留意されたい(36)。投与後の%RET 上昇は、口語では「リバウンド効果」または「ストレス赤血球生成」と呼ばれ、通常、特に赤血球生成低下を伴う場合、骨髄毒性期間に対する代償反応であることを表す。最後に、被験化学物質が溶血を引き起こす場合、%RET に用量依存的な変化が生じうる(37)。原因を問わず、%RET の用量依存的な変化は、生物学的に顕著なレベルでの全身曝露であることを示す。

試験実施施設の習熟度の検証

訓練および習熟度の調査

20. 規制上の安全性評価のため試験実施施設が *Pig-a* 試験を実施する前に、職員は採血、血液ラベリング、およびフローサイトメトリーの手順について経験を得ることが重要である。予備訓練実施に必要な動物数を最小化するため、補遺 3 記載のとおり、スパイク実験としても知られる再構築実験を実施できる(38)。

21. 試験実施施設の習熟度を確立するには、公表データ(1)から予測される結果を再現する必要がある。それには、（低用量の変異原により誘発される弱反応を含む）最低 2 つの変異原（表 1 参照）、および適合する溶媒／溶剤対照（段落 31 参照）を用いて、MUT RBC と MUT RET 両方の頻度について立証する。こうした実験では、試験実施施設での採用方法により、再現可能かつ用量依存的な突然変異体頻度の増加をもたらし、また、試験系の感度およびダイナミックレンジを立証する変異原による複数の用量を用いる。そうした習熟度確認の実験に用いられるげっ歯類から、投与前の血液試料（段落 46 も参照）および溶媒／溶剤対照試料を収集し解析することにより、試験実施施設が歴史的陰性対照データベースの増強に着手できることに留意されたい（より詳細については、段落 22 および補遺 4 第 4.1 項に記載）。

© OECD, (2022)

表 I. 訓練および習熟度確認試験に推奨される変異原

化学物質 [a]	CAS 番号	溶媒	投与経路	提唱されるラット最高用量 [b]（mg/kg/日）	提唱されるマウス最高用量 [b]（mg/kg/日）	採血日 [c]
N-エチル-*N*-ニトロソウレア（別名：ENU）[d]	759-73-9	リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）	強制経口投与	20	40	15-30
ベンゾ[*a*]ピレン（別名：B[a]P）[e]	50-32-8	ゴマ油またはコーン油	強制経口投与	125	125	15-30
7,12-ジメチルベンズ[a]-アントラセン（別名：DMBA）[e]	57-97-6	ゴマ油またはコーン油	強制経口投与	30	75	15-30

[a] 正当な理由があれば、他の変異原を使用できる。

[b] 3 日間連続投与（Day 1～3）を想定した、一般に忍容性が良好で変異原性が高い用量段階(11) (39)。

[c] 採血日には、投与開始と関連付けた日（すなわち Day 1）を用い、*Pig-a* 試験に関する末梢血収集推奨日の範囲を記載している。

[d] 強力な直接作用型変異原。加水分解抑制のため、ENU の溶解には pH 6 のリン酸緩衝生理食塩水を用いる。ENU 投与液は使用日ごとに新たに調製する。ENU 市販品は多量の安定剤を含有しており、投与液調製の際にはこのことを考慮する必要がある。

[e] 代謝活性化を要する。

歴史的陰性対照データ

22. 習熟度調査の過程で、各試験実施施設は、MUT RET および MUT RBC の頻度について、歴史的陰性対照での範囲および分布を確立する。陰性対照データは 2 つの供給源から入手できる。第 1 に、陰性対照データは、被験化学物質投与動物と共に陰性対照として試験された動物（以下、同時陰性対照と呼ぶ）から入手できる。これらの動物には、通常、溶剤／溶媒のみ投与されることになる（段落 31）。第 2 に、投与前 *Pig-a* 試験を実施している試験実施施設（段落 46）では、陰性対照データは、投与前の未投与無処置動物から入手できる（投与前対照データと呼ぶ）。本 TG で推奨される 28 日間反復投与処置プロトコールの直後に試験を実施した場合、投与前の動物は、溶剤／溶媒同時対照動物と同等の *Pig-a* 突然変異体頻度を有することが示されている(3)。陰性対照データの供給源がいずれであれ、（例えば、外れ値検定により特定される）例外的な高頻度の変異細胞を示す動物は、（段落 46 および補遺 1 で定義される）ジャックポット型の突然変異事象を発現した可能性があるため、陰性対照分布の構築に用いるべきではない。陰性対照データおよびその分布は、変異表現型について評価すべき最小細胞数の判定（段落 60）、試験の許容性の評価（段落 64）、ならびに、被験化学物質関連の影響の評価および解釈（段落 66）において重要である。歴史的陰性対照データセット作成に関するより詳細な推奨事項は、補遺 4 第 4.1 項に記載されている。

© OECD, (2022)

試験方法の説明

知的財産権に関する考慮事項

23. 薬剤の変異原性 DNA 損傷の可能性に関する評価、および、GPI アンカー欠失赤血球に基づく、変異原性 DNA 損傷を修飾しうる薬剤の効果に関する評価—これらに用いられる特殊な技術の一部は、米国、カナダ、および欧州の Litron Laboratories が特許権を所有している。この特許保護は、*Pig-a* 試験の原理および GPI 陰性細胞スコアリングの全般的な設計の対象ではないことに留意されたい。本試験法を実施する試験実施施設は、（MutaFlow®キットの市販元として知られる）Litron から細胞解析用キットを入手するか、血液試料を Litron キットでの試験に精通した試験実施施設に送付することができる。MutaFlow キットの使用ライセンスは限定的であり、署名は不要である。一方、Litron および認可されたキット販売元からキットを購入しない試験実施施設は、米国、カナダ、および欧州での特許の対象となる技術の実施には、Litron Laboratories とのライセンス契約を締結しなければならない。

24. 網状赤血球濃縮に関する免疫磁気分離を含む PIGRET 法は、日本の帝人株式会社のみが特許権を所有しており、日本のこの技術を使用するには、帝人とのライセンス契約を締結する必要がある。

25. 本 TG では、赤血球に基づく *Pig-a* 変異体解析の要件および重要な特性について記述する。特許の適用地域では、Litron Laboratories および帝人株式会社保有の特許を侵害しない代替技術を用いたプロトコールであれば、本 TG 提示のガイダンスを用いて自由に実施できる。許容基準（段落 64）を満たす限り、妥当な試験実施のために、Litron および帝人の特許技術を使用する必要はない。

準備

動物種の選択

26. よくみられる実験室系統である健康な若齢成熟ラットおよび若齢成熟マウスを通常用いる（すなわち、投与開始時に 6～12 週齢）。やや若齢またはやや高齢の動物も許容可能である（例：投与開始時に 4 週齢）。ただし、そうした逸脱の正当性を示すこと。正当性には、他の試験との統合促進、あるいは、既に飼育されているが手順に使用されていない動物の殺処分回避などが考えられる。こうした年齢の逸脱が生じうる歴史的陰性対照データベースの変更は、いずれも明文化する。Han Wistar ラット、Sprague-Dawley ラット、Fisher 344 ラット、および CD-1 マウスなどのラット系統およびマウス系統が広く用いられている(1)。げっ歯類の種および系統の選択は、（i）（データの相関性を示すことができ、統合を容易にするため）他の毒性試験において用いられる動物、（ii）（発癌作用機序を検討する場合）癌原性試験で腫瘍を発現した動物、あるいは、（iii）既知である場合、ヒトと最も関連性のある代謝を有する動物に基づくこと。

動物の飼育および給餌条件

27. 動物飼育室の温度は理想的には 22°C（±3°C）とする。相対湿度は、飼育室清掃時を除き 30%以上、70%以下が望ましいが、理想的には 50～60%とする。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期の順序とする。給餌には、通常の実験室飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。混餌投与する場合、飼料の選択は、被験化学物質の適切な混合を確保する必要性により影響されうる。攻撃的行動が予測されない場合、動物は同性の小グループ（通常、ラットでは 2 匹以下、マウスでは 5 匹以下）に収容する。ケージは、動物福祉に関する基準［例：(40)］を満たすこと。科学的な正当性がある場合に限り、動物を個別に収容できる。動物実験委員会（または同等の委員会）の推奨事項に基づき、可能な限りソリッド底を

© OECD, (2022)

用い、適切な環境エンリッチメントを提供すること。

動物の準備

28. 動物を、溶剤／溶媒対照群および被験化学物質投与群に無作為に割り付ける。動物を一意的に識別し、投与開始前の少なくとも 5 日間（または、該当する動物実験委員会もしくは同等の委員会の規定どおり）飼育室の条件に馴化させる。動物を一意的に識別する、最も侵襲性の低い方法を用いる。適切な方法には、リング、タグ、マイクロチップの装着、および生体認証が挙げられる。本 TG の試験では、足趾および耳のクリップ装着は科学的に正当化されない。ケージは、その位置による影響の可能性が最小限になるような方法で配置する。試験開始時、雌雄それぞれの体重のばらつきは、平均体重の±20%以内とする。

用量の調製

29. 固体の被験化学物質は、適切な溶剤または溶媒に溶解または懸濁し（例：水、コーン油；例については(3)参照）、あるいは、飼料または飲水に混合してから動物に投与する。液体の被験化学物質は、必要であれば直接投与できるが、様々な用量を調製し、投与群間で一定の投与量を維持するため、適切な溶媒での希釈を用いる。吸入曝露の場合は、被験化学物質をその物理化学的特性に応じて、ガス、蒸気、または固体／液体のエアロゾルとして投与できる(15) (18)。

30. 安定性データから、用いる保存条件の許容性が立証されない限り、被験化学物質の新たな調製物を用いる。

試験条件

溶剤／溶媒

31. 溶剤／溶媒は、用いる投与量で毒性作用を生じず、また、被験化学物質と化学反応を起こす疑いがないこと。周知の溶剤または溶媒以外を用いる場合、被験化学物質との非反応性、ならびに、被験動物、投与経路およびエンドポイントからみた適合性を示す参照データにより、その使用を裏付ける。水溶性の溶剤／溶媒の使用を、可能な限り最初に検討すべきであることが推奨される。

© OECD, (2022)

対照

陽性対照およびフローサイトメトリーの標準試料

32. 試験実施施設は、段落 20～21 記載の *Pig-a* 試験実施について習熟度を確立した場合が考えられる。その場合のみ、試験ごとに同時陽性対照動物を含める必要がなくなる。変異原に曝露した動物に依拠するのではなく、フローサイトメトリーの生物学的標準試料が解析ごとに含まれることで（段落 33）、試料は、3R にふさわしく、試験の信頼性立証に重要な要因に品質保証手段の重点を置く有用なタイプの解析対照となる(2) (7) (11)。具体的には、血液ベースのフローサイトメトリー標準試料の使用により確保されるのは、i）採血および細胞の染色／標識が適切に行われたこと、ii）細胞の染色／標識に用いた試薬が有効であったこと、iii）フローサイトメーターが野生型細胞から変異表現型細胞を適切に区別したことである。最後に、突然変異体頻度の増加を検出する継続的な習熟度を確実にするため、試験実施施設は、段落 21 記載の習熟度確認試験に類似した、変異原投与動物による追加試験を時に（少なくとも年 1 回）実施する。

33. フローサイトメトリーの生物学的標準試料の重要性を考慮すれば、*Pig-a* 変異体解析実施のたびに標準試料を調製し使用することが必要である。そのため、MUT RET および MUT RBC と野生型 RET および野生型 RBC とを対比させた光散乱および蛍光特性を立証する「変異体模倣試料（mutant mimic）」（すなわち、試験した場合に変異赤血球の特性を有するよう調製された血液試料）または同程度の試料（補遺 5 参照）を調製する。変異体模倣試料は、溶剤／溶媒同時対照動物由来の余分な血液を処理することで調製できる。この血液の一部は、*Pig-a* 突然変異体頻度評価用に正常に調製されるが、別の一部は、蛍光抗体標識プロトコール記載の GPI アンカー型タンパク質用の蛍光抗体を除去することで調製される(11) (38)。次に、標準試料調製のため、これら 2 つの血液試料をほぼ同じ割合で混合する。変異体模倣試料（または補遺 5 記載の代替物）から調製された標準試料は、器具の設定およびソフトウェア／データ解析パラメータの指針となり、また、解析手順の妥当性に関する対照としての役割を果たす（段落 32）のに有用であるため、変異体模倣試料を試験ごとに生成し、毎日用いる血液試料を解析する。器具の設定が確立されたら、この特定のデータ取得期間全体を通じ、変異体解析の処理を受けたすべての試料について、通常は器具の設定を変えないこと。

陰性対照

34. 同時陰性対照動物は、毎回の試料採取時に試験に含め、被験化学物質を投与しないことを除き、それ以外は投与群の動物と同一に扱う。被験化学物質投与の際に溶剤／溶媒を用いる場合、対照群には同じ溶剤／溶媒を投与する。所定の試験に関する同時陰性対照動物の MUT RET および MUT RBC の頻度は、歴史的陰性対照の分布と一致していること。そうした比較を容易にするために、使用可能な下限値および上限値を算出する妥当な方法が複数あり、その方法については補遺 4 第 4.2 項に記述する。

35. 毎回の試料採取時に溶剤／溶媒同時陰性対照動物から採取した血液の解析要件は、投与前の血液試料の収集および解析を含む試験にも適用される（段落 46）。すなわち、用いる統計手法に関わりなく、投与前の血液試料は、同時溶剤／溶媒対照の代替にはならない。

© OECD, (2022)

手順

動物数および性別

36. 雌雄いずれかの動物の血液を用いて *Pig-a* 遺伝子突然変異試験を実施することは、技術的に実行可能である(3)。被験化学物質へのヒト曝露が、例えば一部の医薬品と同様に性特異的であると考えられる場合、*Pig-a* 試験は適切な性別により実施する。

37. 雌雄一方の性のみによる試験を実施する場合、解析可能な動物を最低 6 匹にすることを目的に、試験開始時（および試験実施施設の習熟度確立の間）に群の大きさを確立する［群の大きさの正当化については、(41)記載の統計学的検出力の算出を参照］。したがって、段落 47 で確立されるパラメータに従って雌雄一方の性を用い、3 つの用量群および同時陰性対照を設けて実施する試験では、投与開始時に 24 匹の動物が必要になると考えられる。段落 46 記載のとおり、投与前の血液試料を用いて外れ値を除外する場合、あるいは、動物数減少となる不測の事態に対応するため追加の動物を組み入れる場合、動物数は増えることになる。いずれかの群の動物数が 6 匹未満の状況（例：ジャックポット型の突然変異反応を示した動物の除外に起因）では、データ解釈の際に専門家の判断を用いる。

38. データから、雌雄間で被験化学物質に関連する差（例：用量設定試験を含む全身毒性、代謝、およびバイオアベイラビリティの差）が立証される場合、雌雄両性を用いた試験の実施が望ましい。

39. 異なる用量段階で雌雄両性に投与する試験では、性別ごとに必要な動物数は段落 37 に示した数と同じで、1 群当たり雄 6 匹以上および雌 6 匹以上である。同じ用量段階で雌雄両性に投与する試験では、要因計画の活用により、1 群当たりの動物数削減がしばしば可能である（補遺 4 第 2.1 項参照）。統計に基づく要因計画では、雌雄それぞれの使用動物数をより少なくする一方、十分な統計学的検出力を維持できる。

投与スケジュールおよび試料採取時期

40. *Pig-a* 試験の実施には、28 日間反復投与プロトコールが推奨される。これまでに公表および解析されている投与スケジュールのうち、28 日間反復投与スケジュールは、変異陰性の試験結果が正確であるという最も説得力のある根拠を示している［例：陰性予測の割合が最も高い(3)］。科学的に正当化される場合には、代替の投与スケジュールを利用できる（段落 45 参照）。被験化学物質は、1 日当たり単回用量か分割用量（すなわち、同日に 2 回以上曝露）として投与することで、大量投与を容易にできる。

41. 動物が 28 日間連続して被験化学物質に曝露された場合、曝露中止の数時間から数日以内（例：Day[1] 28～31）に少なくとも 1 回採血する。様々な遺伝子毒試験からの収集データにより、Day 28～31 の試料採取は MUT RET および MUT RBC の反応発現に十分な期間となること、また、正確な試料収集のタイミングに重大な意味はないことが示唆されている。このスケジュールは、*Pig-a* 試験と、通常利用されている一般毒性試験および他の遺伝毒性試験との統合を容易にするという利点がある（段落 7～8）。*In vivo* コメット試験を実施する場合の組織収集を容易にするため、Day 29 に被験化学物質を追加投与してから数時間後に試料を収集するのは、許容可能であることに留意されたい。

42. 任意で、また試験遂行の上で可能な場合には、28 日間反復投与プロトコールのさらにその後の時点で収集した血液試料について、*Pig-a* 解析実施のメリットがあると考えられる。例えば、一部の毒性実験では、投与中止時の毒性作用の強弱を評価するため、サテライト「回復」群または「離脱」群を設けて

[1] 本段落および他の箇所において、試験日は投与開始と関連付け、Day 1 と定義する。

© OECD, (2022)

いる。そうした血液試料は投与中止後 2〜4 週間で通常収集され、変異体発現に関する追加期間経過後の *Pig-a* 変異表現型について赤血球を評価する機会となる。

43. 投与期間が 28 日間反復投与試験の期間を超える場合（例：90 日間亜慢性試験）、約 28 日間投与後（例：Day 28〜31）に少なくとも 1 回血液試料を収集する。段落 42 の説明どおり、実験プロトコールの後（例：投与中止後数日以内）で採血を行うメリットはあると考えられるが、延長後の試料採取時点で、赤血球前駆細胞のクローン増殖が突然変異体頻度に不釣り合いな影響を及ぼしうるという可能性が認識されている［例：(42)］。さらに、動物におけるかなり後の時点での試料採取（例：8 ヵ月齢以上の動物の試料採取）については、より高齢の動物に関する歴史的陰性対照データベース作成が必要であると考えられる（補遺 4 第 4.1 項参照）。

44. 28 日間連続曝露日数未満となる投与スケジュール（例：1 日または 3 日間連続の投与）は、反復投与での変異原検出用の 28 日間投与プロトコールよりも低い感度を示すため、科学的に正当化すること（段落 6）。短期投与プロトコールを用いる場合、採血および血液解析は少なくとも 2 回、Day 15 前後および再度 Day 30 前後に行う。試験での変異原検出感度がより高い短期投与スケジュールは、投与後の採血／血液解析回数が 1 回ではなく 2 回の方と予測される(13)。

45. それ以外の投与および試料採取スケジュールを使用できるのは、科学的に正当化される場合、特に、他の毒性試験との統合または他の遺伝毒性試験との併用を容易にする場合である。例えば、連日投与には関与せず、被験化学物質の投与を週数回、数週間用いるプロトコールでは、他の遺伝毒性試験との併用が容易である一方、*Pig-a* 試験において高感度を保持することが示されている(43)。上記のとおり、こうした試験では、MUT RET および MUT RBC の反応発現期間に認められる差、ならびに、*Pig-a* 試験の一環として実施される他の遺伝毒性試験での発現期間を考慮する必要がある（短期投与スケジュールでの *Pig-a* 試験と、他の短期遺伝毒性試験でのアッセイとの併用に関しては、補遺 2 第 2 項の考察参照）。

46. いずれの投与スケジュールであっても、被験化学物質の初回投与前に *Pig-a* 解析を実施することには利点があると考えられる（ただし、必須ではない）。被験化学物質投与前 1 週間以内に、投与前の試料を採取する（成熟マウスを用いる場合、造血系の恒常性再確立を可能にするため、投与前の試料採取を投与の約 7 日前に実施することが推奨される）。突然変異体頻度が異常に高く歴史的陰性対照の分布（その分布の記述方法については、補遺 4 第 4.2 項参照）の範囲外となる「ジャックポット」変異は、生殖細胞または初期赤血球前駆細胞の変異に起因して生じうる。こうした突然変異体頻度を有する動物を特定することは、該当する動物を主試験から除外し、歴史的陰性対照の分布範囲内の突然変異体頻度を有する動物への置換を可能にするには、有用であると考えられる。

用量群および用量段階

47. 最低 3 つの被験化学物質投与群および陰性対照群を、通常用いる。用量反応の詳細な解析には、追加の用量群が必要となることがあり（段落 48 参照）、用いる用量群をより少なくするには、その正当性を示すこと。同時陰性対照群の動物は、被験化学物質の投与以外、被験化学物質投与群の動物と同一の方法で取り扱う。被験化学物質の投与に溶剤／溶媒を用いる場合、同時対照群およびすべての投与群に等量の溶媒または溶剤を投与する。

48. 用量段階設定の際には、被験化学物質の既存の毒性およびトキシコキネティクスに関するデータを考慮する。用量選択の指標とするには、既に入手可能な適切なデータが不十分であるとの理由で、予備的な用量設定試験を実施する場合、主試験での使用と同一の系統、供給元、性別、および投与経路により、同一の試験実施施設において実施する。最高の用量段階は、毒性作用を誘発するが、死亡も重度の苦痛ももたらさないことを目的として選択する［(44)参照］。この定義は TG 407 (14)から引用されており、本

© OECD, (2022)

TG において用いることで、他の反復投与試験との *Pig-a* のエンドポイント統合を容易にし、それにより得られる毒性情報を最大化する。最高の用量段階が他の要因により制限される場合、例えば、混餌投与もしくは飲水投与での嗜好性（および強制経口投与の実施が不可能）、または、吸入投与での被験化学物質の爆発的作用などにより制約を受ける場合、実行可能な最大用量とする。その後、用量依存性反応の立証を目的に、用量段階の降順を選択する。遺伝毒性のエンドポイントを評価する場合、降順での用量段階設定には、2〜4 倍の間隔が頻用される。ほとんどの被験化学物質では、用いる用量段階は、最大の毒性から毒性がほとんどまたは全くない範囲を網羅する。追加の毒性エンドポイントを *Pig-a* 試験に統合する場合には、それ以外の用量間隔を考慮できる。4 つ目の試験群追加は、過度に大幅な用量間隔の使用には望ましいことが多い。

49. 最高用量は、骨髄区分に毒性をもたらす用量とも定義できる（段落 19 参照）。その根拠が%RET の平均値低下（例えば、28 日間投与スケジュールの 1〜3 日後に採取された血液で測定された、同時溶剤／溶媒対照の平均値との比較）により示される場合、その低下は統計学的に有意となるはずであるが、理想的には 80%を超えてはならない。その理由は、*Pig-a* 試験では、化学物質により誘発される影響を明らかにするために、新たな赤血球生成を要するためである。

50. 毒性を生じない、あるいは他の要因による制限を受けない被験化学物質（段落 48 参照）については、連続 14 日間以上の投与プロトコールの最高用量は 1000 mg/kg/日である一方、より短期の投与に関与するプロトコールの最高用量は 2000 mg/kg/日である。

限度試験

51. 上述のとおり、試験では通常、3 つの被験化学物質投与群および溶剤／溶媒同時対照群を採用する。ただし、別のデータの評価から、14 日間以上の投与試験では 1000 mg/kg 体重/日の試験最高用量、または、14 日間未満を採用した投与試験では 2000 mg/kg/日（段落 50）で、（骨髄増殖の抑制がみられず、標的組織の細胞毒性を示す別の証拠も認められないなど）観察可能な毒性作用が予測されないと考えられ、また、*in vitro* 遺伝毒性試験または構造的に関連する物質由来データに基づき、遺伝毒性が予測されないと考えられる場合、上記の 1 用量段階を使用できる。吸入曝露の場合、限度試験濃度は、蒸気、粉塵／ミスト（エアロゾル）、およびガスについて、それぞれ 20 mg/L、5 mg/L、20,000 ppm である。ヒト曝露では、より高い用量段階を用いる必要性が示される場合、限度試験の用量を適用しなくてもよい(15)。また、*Pig-a* 試験を他の試験と統合または併用する場合、限度試験の実施前に、単一の限界用量をこうした他の試験に用いることを適用できるよう確保すること。例えば、単一の限界用量に関する条項は、完全な 3 つの投与計画を適用する TG 489 (45)には含まれていない。

用量の投与

52. 投与経路選択の際の主要な懸念事項は、標的組織である骨髄への曝露の確保であるが、ヒト曝露の予測経路も考慮すること。したがって、（強制）経口投与、混餌投与、飲水投与、局所投与、皮下投与、静脈内投与、吸入投与、気管内投与、または埋植投与などの曝露経路を正当であるとして選択できる。腹腔内投与は、ヒト曝露の通常の経路ではなく、特定の科学的正当性がある場合にのみ用いるべきであるため、一般に推奨されない。被験化学物質が飼料または飲水に混合されている場合、特に単回投与または短

© OECD, (2022)

期投与の場合、食餌および水の摂取から採血までの遅延が変異体発現期間となることを確保するため、注意を払うべきである（段落 40～45 参照）。

53. 1 回で強制経口投与または注射できる液体の最大量は被験動物の大きさによる。最大量は通常 1 mL/100 g 体重以内とするが、水溶液の場合は例外で、最大 2 mL/100 g を使用できる。これを超える量を用いる場合はその正当性を示し、すべての量は、該当する動物実験委員会（または同等の委員会）のガイドラインと一致していること。より高濃度で悪化作用を通常どおり引き起こす刺激性または腐食性の被験化学物質を除き、すべての用量段階で体重に関連した一定量の投与を確保するため、試験量のばらつきを濃度調整により最小限に抑える。

観察

54. 被験動物の一般的な臨床観察を行い、臨床徴候を毎日少なくとも 1 回、望ましくは同時刻に記録し、投与後に予測される影響のピーク期間を考慮する(44)。すべての動物の病的状態および死亡について、毎日 2 回以上観察する。すべての動物の体重を毎週 1 回以上、および安楽死させる場合に測定する。被験化学物質を混餌投与する場合、摂餌量の定量的測定を少なくとも週 1 回実施し、また、動物の健康状態を確認するため、摂餌量に関する一般的な観察を行う。被験化学物質を飲水を介し投与する場合、摂水量を換水時ごとに、また少なくとも週 1 回測定する。動物実験委員会（または同等の委員会）のガイドラインを遵守すべきであるが、一般に、過剰な毒性の非致死性の指標を示す動物は、試験期間終了前に安楽死させる。

標的組織の曝露

55. 骨髄曝露の発生を立証する目的で、また、他の曝露データが存在しない場合（例：%RET に関する重大な混乱状態。段落 19 および 49 参照）に、被験化学物質および／またはその代謝物の血漿中濃度を測定可能にするため、適切な時点で血液試料を採取する（さらなる考察については段落 71 参照）。血液試料は、動物で測定される生物学的処理に混乱をきたすことなく、妥当な濃度の被験化学物質およびその代謝物を検出するのに十分な量とする。骨髄は末梢血循環により十分に灌流され、心拍出量の最大 15%を受け、また、被験化学物質およびその代謝物の血漿中濃度の測定は、骨髄曝露の定性的証拠とみなされる(46) (47) (48) (49)。

Pig-a 試験実施用の採血

56. 動物福祉基準を適用することで、少量の末梢血（約 300 µL 未満）を尾静脈、頸静脈、または他の適切な血管からの採血など被験動物が生存できる方法を用いるか、動物を安楽殺処分する場合に心穿刺または大血管から試料を採取するかいずれかにより入手する。動物および動物福祉基準の規模により、用いる方法の選択肢は制限されうる。フローサイトメトリー解析には単一の細胞懸濁液が必要であるため、血液凝固を回避するよう注意を払うべきであり、このことは、ヘパリンおよび／または EDTA などの抗凝固剤を用いて通常達成される。試料の採取および処理では、投与に関して盲検化するか、ブロックデザインを採用する（補遺 4 第 1 項）。

© OECD, (2022)

血液の保管

57. 抗凝固剤存在下では、血液試料は、低温で維持されているが凍結しない限り（例：2〜8°C の冷蔵庫）、フローサイトメトリー解析の処理まで最長 5 日間保存できる(2)。また、抗凝固剤存在下では、血液試料を分析検査施設に発送でき、その場合、血液試料が輸送およびその後の保管全体を通じ低温で維持され凍結されないこと、さらに収集から約 5 日以内に処理および解析されることを条件とする(2)。いずれの保管および／または発送方法を利用する場合でも、各試験実施施設は、この条件を裏付ける独自のデータを作成すること。

58. *Pig-a* 変異に関するその後の処理およびフローサイトメトリー解析に向け行う、血液試料の凍結およびその後の解凍については、手順が記載されている(50)。器具の不具合、*Pig-a* データ取得の判断延期、および解析標準試料として用いる変異原投与動物由来の血液の保存（補遺 5）など（ただし、これらに限定されない）の理由により解析が遅延する場合、この手順は有用となりうる。さらに、凍結血液試料が輸送全体を通じ凍結を維持する限り（例：ドライアイスの使用）、試料の動物実験施設から分析施設への輸送は可能である(50)。いずれの凍結および解凍方法を採用する場合でも、RBC の溶血が最小限であり、また、凍結および解凍処理ならびに保管期間が MUT RET、MUT RBC、および%RET の頻度に及ぼす影響は最小限であると立証することが重要である。

測定方法

59. フローサイトメトリー解析は、末梢血試料の%RET、MUT RET、および MUT RBC の頻度測定に用いられる。

60. 変異細胞頻度の読み取り値ゼロ（0 x 10^{-6}）となることが、通常は起こらず時に生じるよう維持する。習熟度の高い試験実施施設では、多く用いられるげっ歯類モデルについて、ベースラインにおける MUT RET および MUT RBC の頻度の平均値が通常 1〜3 x 10^{-6} 個の範囲であることを示している。このことを念頭に置くと、ほとんどの試験実施施設では、各時点の動物当たり、最低 RBC 1〜3 x 10^{6} 個および RET 1〜3 x 10^{6} 個評価することが通常必要である。末梢血循環では RET がまれであることを考慮すると、血液試料から RET 1 x 10^{6} 個以上を直接評価するのは、現実的ではないことに留意されたい。この問題を克服するため、変異細胞頻度の測定用に検討される RET 数（および、場合によっては RBC 数）を増加させるよう、免疫磁気分離法が開発された(51) (52)。この免疫磁気分離法、または検証済みの代替法を用いることで、*Pig-a* 試験の実施を容易にできる。

61. 段落 60 記載のとおり、各試験実施施設は、変異細胞頻度の読み取り値ゼロの発生を最小化するよう、解析する細胞数を設定する。それでも、特定の試験では、変異細胞頻度の読み取り値ゼロが時に複数認められる可能性がある。こうした試験が無効になるのを回避するため、適切に保存された残りの血液試料を処理することで、動物当たりの評価細胞数を増加させる（段落 57〜58）。

62. MUT RET および MUT RBC の発現率のスコアリングに好まれる抗体は、ラットでは抗 CD59、マウスでは抗 CD24 であり、それぞれ GPI アンカー型タンパク質 CD59 および CD24 を標的とする。他の GPI アンカー型タンパク質が、可能性として *Pig-a* 試験で用いることが考えられる野生型の RBC 表面（例：CD55）に存在し、野生型細胞と変異表現型細胞を識別するために、GPI アンカー型タンパク質に対する抗体を併用することも可能である（例：抗 CD59+抗 CD55）。既知 *Pig-a* 反応を生じる場合(1)および試験実施施設の習熟度が立証された場合（段落 21 参照）、*Pig-a* 変異赤血球および野生型赤血球を特定する代替抗体の使用または抗体の併用を行える。

© OECD, (2022)

データおよび報告

結果の処理

63. 個別の動物データ、ならびに群平均値および群内のばらつきの尺度（例：標準偏差または標準誤差）を表形式で示す。RET、RBC、MUT RET、および MUT RBC をスコア化した数値は、解析した動物ごとおよび時点ごと別々に一覧化し、個別の動物ごとに RET、MUT RET、および MUT RBC の頻度を併記する。RET の頻度は通常パーセンテージで表されるが、MUT RET の頻度は総 RET 100 万個当たりの MUT RET 数、MUT RBC の頻度は総 RBC 100 万個当たりの MUT RBC 数として表すのが好ましい。動物に対する毒性および臨床徴候に関するデータも報告する。

統計学的評価および結果の解釈

許容基準

64. 妥当な試験については、段落 36～62 記載の動物数、投与量、試料採取時点、変異体解析などの観点から、*Pig-a* 試験が許容基準をすべて満たす場合のみデータ解析を実施する。以下の基準により、*Pig-a* 試験の許容性が判定される。

- 同時陰性対照の頻度が、試験実施施設の歴史的陰性対照データベースにより記述された分布と一致している。歴史的陰性対照データベースは、（例えば、段落 22 および補遺 4 第 4.1 項の推奨どおり）適切に構築されたこと、また、歴史的陰性対照の突然変異体頻度およびその分布は、文献の値と一致していることが重要である(1) (3) (7)。
- 同時陽性対照を用いる場合、同時陽性対照は同時陰性対照（段落 34～35 参照）との比較により、統計学的に有意な増加を誘発すること。
- 段落 33 および補遺 5 記載のとおり、実験試料評価用のフローサイトメーターのゲートを設定するため、変異体模倣対照または陽性対照物質投与動物由来の歴史的試料が用いられた。
- 用量段階数、曝露経路、および最高用量の選択基準が、段落 47～52 記載内容と一致している。
- 適切な数の MUT RBC および MUT RET が解析されている（段落 60）。

結果の評価および解釈

65. *Pig-a* 実験データは、被験化学物質投与群の MUT RET および MUT RBC の頻度が、同時溶剤／溶媒対照群に比べ増加しているか否か判定することを目的に、通常評価される。こうした解析は、実験単位としての動物を用いた、適切な統計手法により達成されるべきである。採用した統計手法を示すこと。

66. 反応を評価する場合、すべてのデータを考慮し、すべての場合に専門家の判断を適用する。

- 段落 64 の許容基準が満たされる場合、被験化学物質は、以下の基準をすべて満たせば、明らかな陽性とみなされる。

© OECD, (2022)

a) 同時溶剤／溶媒対照との比較により、少なくとも 1 つの投与群が、MUT RET および MUT RBC の両頻度について統計学的に有意な増加を示す。

b) 突然変異体頻度に関する反応は、例えば、適切な傾向検定（補遺 4 第 3 項）（限度試験に適用できない）により評価された場合、用量依存性である。

c) （投与後のいずれの時点でも）いずれかの被験化学物質投与群での MUT RET と MUT RBC の両頻度が、歴史的陰性対照データの分布の上限を超えている。

陽性結果から、*Pig-a* 試験条件下で、被験化学物質は、被験動物種の赤血球産生細胞において *Pig-a* 遺伝子突然変異を誘発することが示される。

- 許容基準が満たされる場合、被験化学物質は、検討されたすべての実験条件において以下の基準をすべて満たせば、明らかな陰性とみなされる。

a) いずれの被験化学物質投与群に関する MUT RET および MUT RBC の頻度とも、同時陰性対照に比べ統計的に有意な増加を示さない。

b) 突然変異体頻度に関するいずれの反応も、例えば、適切な傾向検定（限度試験に適用できない）により評価された場合、用量依存性でない。

c) いずれの被験化学物質投与群での MUT RET と MUT RBC の頻度とも、歴史的陰性対照データの分布の上限を超えていない。

d) 被験化学物質および／またはその代謝物への骨髄曝露が生じた（段落 71 参照）。

陰性結果から、*Pig-a* 試験条件下で、被験化学物質は、被験動物種の赤血球産生細胞において *Pig-a* 遺伝子突然変異を誘発しないことが示される。

67. 上記段落 66 記載の統計手法に関しては、統計解析実施の単一の正しい方法はないと認識することが重要である。実践的な手法は、実行可能なある程度の評価の一例として、一連の特定の統計解析について提案することである。このことが、上記 3 種類の解析（A～C）を示した背景になっている。試験実施施設および規制審査担当者が、特定の統計解析について適切か否か、また、データ解釈について科学的に妥当か否か検討する場合、有用と判断しうる情報については、補遺 4 第 1～3 項を参照のこと。いずれの統計手法を利用しても、試験実施に先立ちその手法を記述することが重要である。

68. 明らかな陰性結果または明らかな陽性結果について、すべての基準ではないが一部が満たされた場合、結果が陽性か陰性のいずれか解釈するため専門家の判断を適用する。専門家による判断の適用は、2013 年にカナダのオタワに参集した OECD 遺伝毒性ワーキンググループ作成による推奨事項と一致しており、同グループは「...データは、統計と生物学的妥当性の両方に基づいて解釈すべきである」と言明した(53)。

69. 場合によっては（例えば、適切に保存された追加の細胞が入手可能な場合）、より多くの細胞の解析（段落 61 参照）が、明らかな陽性でも明らかな陰性でもない所見の解決に有用となりうる。専門家の判断を適用し追加の細胞を解析しても、陽性か陰性のいずれの反応か解決できない場合、同一または改変した実験条件（例：異なる系統、ラットではなくマウス、異なる投与経路、異なる変異体発現期間）を用いた再実験が必要であると考えられる。

© OECD, (2022)

70. 専門家の判断を適用し、可能性として追加データを解析した後であっても、試験結果を陽性か陰性のいずれか解釈できない場合が考えられ、そうした場合、*Pig-a* 試験では不確定とみなされる（補遺 4 第 6 項）。

71. 骨髄（および／または全身循環）が被験化学物質および／またはその代謝物に曝露されたという証拠が示された場合のみ、陰性結果は信頼性ありとみなされる（段落 66 基準 D）。毒性物質の場合、総 RBC 中の RET の割合（%RET；段落 19 参照）の統計学的に有意な変化により、骨髄曝露の直接的な証拠が示されるが、そうした証拠がない場合、被験化学物質およびその代謝物の血漿中または血中濃度の測定（例：段落 55 記載の血液試料の使用）が、曝露の立証に有用となりうる。このテーマに関する考察は、欧州食品安全機関が示している(54)。あるいは、同一投与経路かつ同一動物種（または、正当化される場合には異なる動物種）を用いた別の試験において得られた ADME（吸収、分布、代謝、排泄）データを用いることで、骨髄曝露を立証できる。概して、こうした試験から算出された血漿中濃度は、この目的に使用できる。場合によっては、モデリングソフトウェアプログラムが、血中濃度および組織中濃度に関する情報の橋渡しに役立ち、また、ある経路から別の経路、またはある動物種から別の動物種への外挿の助けとなりうる(55)。最後に、証拠の重み付け方式を用いて、被験化学物質への全身曝露および／または骨髄曝露を立証でき、例えば、着色した被験物質では、対応する尿色が被験物質への全身曝露の指標になると考えられる。

72. 明らかな陽性または明らかな陰性の反応について、さらに検証する必要はない（段落 66 参照）。

試験報告書

73. 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）との一致の観点から、試験報告書には以下の情報を含めること。

試験実施施設の習熟度の証拠

被験化学物質：

- 入手可能な場合、供給元、ロット番号、使用期限／再検査日
- 物理的性質および純度
- 本試験に関連する物理化学的特性
- 既知であれば、被験化学物質の安定性
- 単一成分物質の場合：必要に応じ、また実質的に実行可能な場合、IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、不純物の化学的同一性などでの化学物質の識別
- 多成分物質、組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料（UVCB）、および混合物の場合：可能な限りの化学的同一性の特性評価（上記参照）、成分の定量的な発生状況および関連する物理化学的特性

被験化学物質の調製：

- 溶剤／溶媒選択の根拠
- 既知の場合、溶剤／溶媒中での被験物質の溶解性および安定性
- 適切な場合、飼料、飲水、または吸入を介した投与に伴う調合に関する調製内容
- 実施した場合、調合物解析による判定結果（例：安定性、均一性、名目濃度）

被験動物：

© OECD, (2022)

- 動物種および系統、ならびに選択の根拠
- 動物数、週齢、性別
- ケージの種類、飼育条件、飼料、エンリッチメントなど
- 動物の個体識別に用いた方法
- 投与群形成に用いた手順
- 試験開始時の個体ごとの体重（各投与群の体重範囲、平均および標準偏差を含む）

試験条件（詳細な説明の代わりに、確立済み／公表済みの方法の参照でも可）：

- 実施した場合、用量設定試験のプロトコール
- 用量段階選択の根拠
- 被験化学物質調製の詳細
- 被験化学物質投与の詳細
- （推奨事項以外の場合）投与経路および投与期間の根拠
- 用いた場合、投与量解析に関する判定法
- 食餌および水の組成および品質の詳細
- %RET、また入手可能な場合、病理組織学的または臨床病理学的解析、ならびに動物の観察結果および体重の入手頻度など、動物に対する毒性の測定法
- （実施した場合）生物学的解析／トキシコキネティクス解析の方法
- 投与前の試料採取（実施した場合）など、末梢血試料採取プロトコール、ならびに、回収試料の採取（実施した場合）など、投与期間内（実施した場合）および投与期間後の試料採取の詳細および根拠
- 用いた場合、採血および保管に用いた方法
- *Pig-a* 試験の一部である場合、安楽殺処分に用いた方法
- 陰性結果が得られた場合、被験化学物質が骨髄に到達したこと、あるいは全身循環に入ったことの検証方法
- 細胞の免疫磁気分離に用いた方法
- 抗体および免疫磁気分離試薬の供給元およびロットなど、変異細胞の定量に用いた材料
- 突然変異体頻度の算出に用いた方法；変異情報が得られる RET 数および RBC 数の使用根拠（段落 60）
- 解析対象にした場合、陽性対照に用いた方法
- *Pig-a* 試験の許容基準

結果：

- 実施した場合、用量設定試験のデータ
- 個別の動物の体重観察結果および毒性徴候など、試験期間前および試験期間全体の動物の状態
- 混餌曝露または飲水曝露では、飼料／飲水中の被験化学物質濃度および個別の動物の摂取量から算出した用量（mg/kg 体重/日）
- 試験終了時において、入手可能な場合、個別の動物の体重、臓器重量、臨床病理学的検査結果、および病理組織学的検査結果

© OECD, (2022)

- ゲーティング戦略、MUT RET および MUT RBC スコアリング領域の構築方法（例：変異体模倣試料の使用など）、ならびに変異赤血球（または変異体模倣試料）と野生型赤血球との間で達成される蛍光分解能を示したフローサイトメーター由来のグラフ出力に関する記述など、器具の較正方法
- 評価した細胞数および細胞相当物数、観察した変異細胞数（MUT RET および MUT RBC）、変異細胞の頻度（100 万個当たりの数として報告）、および%RET など、収集された場合、動物ごとの投与前データ。さらに、提案された投与群ごとに群の平均値を報告し、群内のばらつきの尺度（標準偏差または標準誤差）を報告する
- 投与前データを用いて主試験から動物を除外した場合、その根拠を示すこと
- 主試験から、評価した細胞数、観察した変異細胞数（MUT RET および MUT RBC）、変異細胞の頻度（100 万個当たりの数として報告）、および%RET など、各試料採取時および解析時点での陰性（溶剤／溶媒）同時対照動物ごとおよび投与動物ごとのデータ。また、群の平均値および群内のばらつきの尺度を、各試料採取時および解析時点で報告する。さらに、要求に応じ、各試料解析から得られたフローサイトメトリーによるグラフ出力結果を入手可能にする
- 評価した細胞数、観察した変異細胞数（MUT RET および MUT RBC）、変異細胞の頻度（100 万個当たりの数として報告）、および%RET など、存在する場合、各解析時点での同時陽性対照データ。また、群の平均値および群内のばらつきの尺度を、各解析時点で報告する。比較のため、試験実施施設の歴史的対照データまたは文献値を含める
- げっ歯類の血液試料数が明記された歴史的陰性対照データ、データ解釈およびその使用の正当性の補完を目的に採用された、下限値および／または上限値生成に用いた算出法の種類など、分布に関する統計的記述（補遺 4 第 4.2 項参照）、ならびに、対象期間および本対象期間中に *Pig-a* 試験が管理下にあることの証拠
- 被験化学物質が MUT RET、MUT RBC、および%RET の頻度に及ぼす影響を評価するため実施した統計解析結果
- 陰性結果について、骨髄曝露が生じたことを裏付けるデータ（段落 71 参照）
- 陽性または陰性を満たす反応を裏付ける基準

結果の考察

- *Pig-a* 試験の結果を評価する際、科学的判断をいかに用いたかの説明。

結論

© OECD, (2022)

参考文献

1. Shemansky JM, LP McDaniel, C Klimas, SD Dertinger, VN Dobrovolsky, T Kimoto, K Horibata, JE Polli, RH Heflich (2019) *Pig-a* gene mutation database. Environ Mol Mutagenesis 60:759-762.
2. Gollapudi BB, AM Lynch, RH Heflich, SD Dertinger, VN Dobrovolsky, R Froetschl, K Horibata, MO Kenyon, T Kimoto, DP Lovell, LF Stankowski Jr, PA White, KL Witt, JY Tanir (2015) The *in vivo Pig-a* assay: A report of the International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) workgroup. Mutat Res 783:23-35.
3. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2020) The in vivo erythrocyte *Pig-a* gene mutation assay - Part 1: Detailed Review Paper and Retrospective Performance Assessment. Available as Publication 315 at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm
4. Chikura S, T Kimoto, S Itoh, H Sanada, S Muto, K Horibata (2019) Standard protocol for the total red blood cell *Pig-a* assay used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen Society. Genes Environ 41:5. Available at: https://doi.org/10.1186/s41021-019-0121-z.
5. Bemis JC, NE Hall, SD Dertinger (2019) Erythrocyte-based *Pig-a* gene mutation assay. In: A Dhawan, M Bajpayee (eds), Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol 2031, Humana, NY, NY. pp 29-57. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_2.
6. Chikura S, T Kimoto, S Itoh, H Sanada, S Muto, K Horibata (2021) Standard protocol for the PIGRET assay, a high-throughput reticulocyte *Pig-a* assay with an immunomagnetic separation, used in the interlaboratory trial organized by the Mammalian Mutagenicity Study Group of the Japanese Environmental Mutagen and Genome Society. Genes Environ 43:10. Available at: https://doi.org/10.1186/s41021-021-00181-7.
7. Dertinger SD, JA Bhalli, DJ Roberts, LF. Stankowski Jr, BB Gollapudi, DP Lovell, L Recio, T Kimoto, D Miura, RH Heflich (2021) Recommendations for conducting the rodent erythrocyte *Pig-a* assay: A report from the HESI GTTC *Pig-a* Workgroup. Environ Mol Mutagenesis 62:227-237.
8. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2020) Report of the peer review of the validation status of the in vivo erythrocyte Pig-a gene mutation assay. Available as Publication 319 at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm
9. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2020) The in vivo erythrocyte Pig-a gene mutation assay - Part 2 - Validation report. Available as Publication 316 at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm
10. Miura D, VN Dobrovolsky, T Kimoto, Y Kasahara, RH Heflich (2009) Accumulation and persistence of *Pig-A* mutant peripheral red blood cells following treatment of rats with single and split doses of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. Mutat Res 677:86-92.
11. Phonethepswath S, D Franklin, DK Torous, SM Bryce, JC Bemis, S Raja, S Avlasevich, P Weller, O Hyrien, J Palis, JT MacGregor, SD Dertinger (2010) *Pig-a* mutation: Kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens. Toxicol Sci 114:59-70.
12. Dertinger SD, SL Avlasevich, DK Torous, JC Bemis, S Phonethepswath, C Labash, K Carlson, J Mereness, J Cottom, J Palis, JT MacGregor (2014) Persistence of cisplatin-induced mutagenicity in hematopoietic stem cells: Implications for secondary cancer risk following chemotherapy. Toxicol Sci 140:307-314.
13. Elhajouji A, TT Hove, O O'Connell, H Martus, SD Dertinger (2020) *Pig-a* gene mutation assay study

© OECD, (2022)

design: Critical assessment of 3- versus 28-day repeat-dose treatment schedules. Mutagenesis 35:349-358. Available at: https://doi.org/10.1093/mutage/geaa014.

14. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2008) OECD Guidelines for the testing of chemicals: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. Test Guideline 407. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070684-en.pdf?expires=1619269423&id=id&accname=guest&checksum=BFC32AEBFBFAF108ABF2818FE30770AF.

15. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2018) OECD Guidelines on the testing of chemicals: 28-day (subacute) inhalation toxicity study. Test Guideline 412. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070783-en.pdf?expires=1591459924&id=id&accname=guest&checksum=5CF6E4990007E8850A376A91B0C20687.

16. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2020) OECD Guideline for testing of chemicals: Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays. Test Guideline 488. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264203907-en.pdf?expires=1608906827&id=id&accname=guest&checksum=F82C7AA8D9B443320C9BD6DF8E541269.

17. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2018) OECD Guideline for the testing of chemicals: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Test Guideline 408. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070707-en.pdf?expires=1619554311&id=id&accname=guest&checksum=E4654CBAD5DF751E5E9D8D54540D6AD0.

18. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2018) OECD Guidelines for the testing of chemicals: 90-day (subchronic) inhalation toxicity study. Test Guideline 413. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070806-en.pdf?expires=1591459983&id=id&accname=guest&checksum=81BC208072B006A03D81A6E5DE579A66.

19. Dertinger SD, S Phonethepswath, D Franklin, P Weller, DK Torous, SM Bryce, S Avlasevich, JC Bemis, O Hyrien, J Palis, JT MacGregor (2010) Integration of mutation and chromosome damage endpoints into 28-day repeat dose toxicology studies. Toxicol Sci 115:401-411.

20. Kirkland D, DD Levy, MJ LeBaron, MJ Aardema, C Beevers, J Bhalli, GR Douglas, PA Escobar, CS Farabaugh, M Guerard, GE Johnson, R Kulkarni, F Le Curieux, AS Long, J Lott, DP Lovell, M Luijten, F Marchetti, JJ Nicolette, S Pfuhler, DJ Roberts, LF Stankowski Jr, V Thybaud, SK Weiner, A Williams, KL Witt, R Young (2019) A comparison of transgenic rodent mutation and *in vivo* comet assay responses for 91 chemicals. Mutat Res 839:21-35.

21. Kimoto T, K Suzuki, Xm Kobayashi, VN Dobrovolsky, RH Heflich, D Miura, Y Kasahara (2011) Manifestation of *Pig-a* mutant bone marrow erythroids and peripheral blood erythrocytes in mice treated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea: Direct sequencing of *Pig-a* cDNA from bone marrow cells negative for GPI-anchored protein expression. Mutat Res 723:36-42.

22. Revollo JR, MG Pearce, A Dad, DM Petibone, TW Robison, D Roberts, VN Dobrovolsky (2018) Analysis of mutation in the rat *Pig-a* assay: I) Studies with bone marrow erythroid cells. Environ Mol Mutagenesis 59:722-732.

23. Revollo JR, A Dad, MG Pearce, RA Mittelstaedt, TW Robison, VN Dobrovolsky (2019) *Pig-a* mutations in bone marrow erythroblasts of rats treated with 7,12-dimethyl-benz[*a*]anthracene. Mutat Res 848:503106.

© OECD, (2022)

24. Revollo JR, A Dad, MG Pearce, RA Mittelstaedt, A Casildo, RG Lapidus, TW Robison, VN Dobrovolsky (2020) CD59-deficient bone marrow erythroid cells from rats treated with procarbazine and propyl-nitrosourea have mutations in the *Pig-a* gene. Environ Mol Mutagenesis 61:797-806.

25. Olsen A-K, SD Dertinger. CT Krüger, DM Eide, C Instanes, G Brunborg, A Hartwig, A Graupner (2017) The *Pig-a* gene mutation assay in mice and human cells: A review. Basic Clin Pharmacol Toxicol 121:78-92. Available at: https://doi.org/10.1111/bcpt.12806.

26. Bemis JC, RH Heflich (2019) *In vitro* mammalian cell mutation assays based on the *Pig-a* gene: A report of the 7th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) workgroup. Mutat Res 847:403028. Available at: https://10.1016/j.mrgentox.2019.03.001 847:403028.

27. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2009) Preliminary review of OECD Test Guidelines for their applicability to manufactured nanomaterials. Available at: https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2009)21.

28. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2014) Genotoxicity of manufactured nanomaterials: Report of the OECD Expert Meeting. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No. 43. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)34&doclanguage=en.

29. Elespuru R, S Pfuhler, MJ Aardema, T Chen, SH Doak, A Doherty, CS Farabaugh, J Kenny, M Manjanatha, B Mahadevan, MM Moore, G Ouédraogo, LF Stankowski Jr, JY Tanir (2018) Genotoxicity assessment of nanomaterials: Recommendations on best practices, assays, and methods. Toxicol Sci 164:391-416.

30. Kinoshita T (2014) Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. Proc Jpn Acad, Ser B 90:130-143.

31. Dad A, VN Dobrovolsky, RH Heflich, JR Revollo (2020) Molecular analysis of GPI-anchor biosynthesis pathway genes in rat strains used for the *Pig-a* gene mutation assay. Mutat Res 858-860:503256.

32. Giknis MLA, CB Clifford (2006) Clinical laboratory parameters for Crl:CD(SD) rats. Charles River Laboratories. pp 1-18. Available at: https://www.criver.com/sites/default/files/resources/rm_rm_r_clinical_parameters_cd_rat_06.pdf.

33. Miura D, VN Dobrovolsky, Y Kasahara, Y Katsuura, RH Heflich (2008) Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous *Pig-A* gene: I. Flow cytometric detection of CD59-negative peripheral red blood cells and CD48-negative spleen T-cells from the rat. Environ Mol Mutagenesis 49:614-621.

34. Bryce SM, JC Bemis, SD Dertinger (2008) In vivo mutation assay based on the endogenous *Pig-a* locus. Environ Mol Mutagenesis 49:256-264.

35. Phonethepswath S, SM Bryce, JC Bemis, SD Dertinger (2008) Erythrocyte-based *Pig-a* gene mutation assay: Demonstration of cross-species potential. Mutat Res 657:122-126.

36. Dertinger SD, S Phonethepswath, SL Avlasevich, DK Torous, J Mereness, SM Bryce, JC Bemis, S Bell, P Weller, JT MacGregor (2012) Efficient monitoring of *in vivo Pig-a* gene mutation and chromosomal damage: Summary of 7 published studies and results from 11 new reference compounds. Toxicol Sci 130:328-348.

37. Kenyon MO, SL Coffing, JI Ackerman, WC Gunther, SD Dertinger, K Criswell, KL Dobo (2015) Compensatory erythropoiesis has no impact on the outcome of the *in vivo Pig-a* mutation assay in rats following treatment with the haemolytic agent 2-butoxyethanol. Mutagenesis 30:325-334.

© OECD, (2022)

38. Raschke M, B-W Igl, J Kenny, J Collins, SD Dertinger, C Labash, JA Bhalli, CCM Tebbe, KM McNeil, A Sutter (2016) In vivo *Pig-a* gene mutation assay: Guidance for 3Rs-friendly implementation. Environ Mol Mutagenesis 57:678-686.

39. Labash C, SL Avlasevich, K Carlson, A Berg, DK Torous, SM Bryce, JC Bemis, JT MacGregor, SD Dertinger (2016) Mouse *Pig-a* and micronucleus assays respond to *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, benzo[*a*]pyrene, and ethyl carbamate, but not pyrene or methyl carbamate. Environ Mol Mutagenesis 57:28-40. Available at: https://doi. org/10.2903/j.efsa.2017.5113.

40. EU (European Union) (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF.

41. Dertinger SD, S Phonethepswath, P Weller, S Avlasevich, DK Torous, JA Mereness, SM Bryce, JC Bemis, S Bell, S Portugal, M Aylott, JT MacGregor (2011b) Interlaboratory *Pig-a* gene mutation assay trial: Studies of 1,3-propane sultone with immunomagnetic enrichment of mutant erythrocytes. Environ Mol Mutagenesis 52:748-755.

42. Mittelstaedt RA, VN Dobrovolsky, JR Revollo, MG Pearce, Y Wang, A Dad, PB McKinzie, H Rosenfeldt, B Yucesoy, R Yeager, S-C Hu, Y Tang, S Min, H-K Kang, D-J Yang, M Basavarajappa, RH Heflich (2019) Evaluation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) mutagenicity using *in vitro* and *in vivo Pig-a* assays. Mutat Res 837:65-72.

43. Dertinger SD, SL Avlasevich, DK Torous, P Singh, S Khanal, C Kirby, A Drake, JT MacGregor, JC Bemis (2019) 3Rs friendly study designs facilitate rat liver and blood micronucleus assays and *Pig-a* gene mutation assessment: Proof-of-concept with 13 reference chemicals. Environ Mol Mutagenesis 60:704-739.

44. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2000) Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Available at: https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2000)7&doclanguage=en.

45. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2016b) OECD Guideline for the testing of chemicals: *In vivo* mammalian alkaline comet assay. Test Guideline 489. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264885-en.pdf?expires=1608823507&id=id&accname=guest&checksum=A9E2E3FB6FC0EB098C9099D235C61839.

46. US Federal Register (1996) International Conference on Harmonisation; Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals. Vol 61 (no. 80):18198-18202. Department of Health and Human Services, Food and Drug administration. Available at: https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1996-04-24/html/96-10021.htm.

47. Marenzana M, TR Arnett (2013) The key role of the blood supply to bone. Bone Research 3:203-215.

48. Grüneboom A, I Hawwari, D Weidner, S Culemann et al. (2019) A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. Nature Metabolism 1:236-250.

49. Kirkland D, Y Uno, M Luijten, C Beevers, J van Benthem, B Burlinson, S Dertinger, GR Douglas, S Hamada, K Horibata, DP Lovell, M Manjanatha, H-J Martus, N Mei, T Morita, W Ohyama, A Williams (2019) *In vivo* genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). Mutat Res 847:403035. Available at: https://10.1016/j.mrgentox.2019.03.008.

50. Avlasevich SL, DK Torous, JC Bemis, JA Bhalli, CC Tebbe, J Noteboom, D Thomas, DJ Roberts, M

© OECD, (2022)

Barragato, B Schneider, J Prattico, M Richardson, BB Gollapudi, SD Dertinger (2019) Suitability of long-term frozen rat blood samples for the interrogation of *Pig-a* gene mutation by flow cytometry. Environ Mol Mutagenesis 60:47-55.

51. Dertinger SD, SM Bryce, S Phonethepswath, SL Avlasevich (2011) When pigs fly: Immunomagnetic separation facilitates rapid determination of *Pig-a* mutant frequency by flow cytometric analysis. Mutat Res 721:163-170.

52. Kimoto T, S Chikura, K Suzuki, Xm Kobayashi, Y Itano, K Horibata, M Honma, VN Dobrovolsky, RH Heflich, D Miura, Y Kasahara (2011) Further development of the rat *Pig-a* mutation assay: Measuring rat *Pig-a* mutant bone marrow erythroids and a high throughput assay for mutant peripheral blood reticulocytes. Environ Mol Mutagenesis 52:774-783.

53. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). (2016) Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. Series on Testing and Assessment, No. 238 – 2nd edition. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2016)33/rev1&doclanguage=en.

54. EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Committee, A Hardy, D Benford, T Halldorsson, M Jeger, HK Knutsen, S More, H Naegeli, H Noteborn, C Ockleford, A Ricci, G Rychen, V Silano, R Solecki, D Turck, M Younes, G Aquilina, R Crebelli, R Gürtler, KI Hirsch-Ernst, P Mosesso, E Nielsen, J van Benthem, M Carfi, N Georgiadis, D Maurici, J Parra Morte, J Schlatter (2017) Scientific Opinion: Clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. EFSA Journal 15:5113. Available at: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.5113.

55. Shin HK, YM Kang, KT No (2017) Predicting ADME Properties of Chemicals. In: Leszczynski J, A Kaczmarek-Kedziera, T Puzyn, MG Papadopoulos, H Reis, MK Shukla (eds). Handbook of Computational Chemistry. Springer, Cham. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27282-5_59.

56. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (2016) OECD Guideline for the testing of chemicals: Mammalian erythrocyte micronucleus test. Test Guideline 474. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264762-en.pdf?expires=1608922977&id=id&accname=guest&checksum=11DD1C964576589D2EB86B428141ECF6.

57. Bretz F, LA Hothorn (2003) Statistical analysis of monotone or non-monotone dose-response data from in vitro toxicological assays. ATLA-Altern Lab Animal 31(Suppl 1):81-96.

58. Labash C, SL Avlasevich, K Carlson, DK Torous, A Berg, JC Bemis, JT MacGregor, SD Dertinger (2015) Comparison of male versus female responses in the *Pig-a* mutation assay. Mutagenesis 30:349-357.

59. Ryan TP (2011) Statistical Methods for Quality Improvement, 3nd Ed., John Wiley and Sons, NY, NY. pp 1-704.

60. Hayashi M, K Dearfield, P Kasper, D Lovell, H-J Martus, V Thybaud (2011) Compilation and use of genetic toxicity historical control data. Mutat Res 723:87-90.

61. Vardeman SB (1992) What about the other intervals? The American Statistician 46:193-197.

62. InfinityQS International (2014) A practical guide to selecting the right control chart. pp 1-21. Available at: http://www.infinityqs.com/sites/infinityqs.com/files/files/PDFs/InfinityQS_Practical_Guide_to_Selecting_the_Right_Control_Chart_Oct2013.pdf.

© OECD, (2022)

63. Kluxen FM, K Weber, C Strupp, SM Jensen, LA Hothorn, J-C Garcin, T Hofmann (2021) Using historical control data in bioassays for regulatory toxicology. Reg Toxicol Pharmacol 125:105024.

64. Igl B-W, SD Dertinger, VN Dobrovolsky, M Raschke, A Sutter, R Vonk (2018) A statistical approach for analyzing data from the *in vivo Pig-a* gene mutation assay. Mutat Res 831:33-44.

65. Nelson LS (1984) The Shewhart control chart—tests for special causes. Jrnl Qual Tech 16:238-239.

© OECD, (2022)

補遺 1—定義および略語

3R：代替法の活用（Replacement）、使用数の減少（Reduction）、および動物の苦痛の軽減（Refinement）。3R の原則は、より人道的な動物研究実施の枠組みを示す

ADME：吸収（Absorption）、分布（Distribution）、代謝（Metabolism）、および排泄（Excretion）

クローン増殖：ある集団において細胞の子孫が過剰に発現すること。通常、集団内の他の細胞に比べ、当該細胞およびその子孫の増殖が加速することに起因する

信頼区間（CI）：一定の信頼度で母集団値を含んでいる可能性が高い値の範囲

管理限界：統計における管理図に描かれる水平方向のライン。このラインは研究者により定義され、使用事例に左右される値である。品質管理の分野では、通常この値は試料の平均±3 標準偏差であるが、それ以外に、標準偏差に対するいくつかの倍数（例：2 倍または 1.96 倍）が有用である場合がある

赤血球（Erythrocyte）：年齢とは無関係の赤血球。本文書の目的上、この用語は RBC と交換可能である

赤血球変異原：赤血球細胞の DNA 配列を変化させることができる化学物質

フローサイトメトリー：フローサイトメーターを用いた、細胞集団の特性の判定法

GPI：グリコシルホスファチジルイノシトール。約 150 種類の独自のタンパク質を、哺乳類の細胞膜内腔面に結合させる細胞膜アンカーの一種で、*Pig-a* は、GPI アンカー形成に必要な遺伝子の 1 つである

ジャックポット変異：生殖細胞の変異、または可能性がより高い骨髄赤血球前駆細胞の変異のことであり、突然変異体頻度が異常に高く歴史的陰性対照の分布の範囲外となる

変異体模倣試料：真の *Pig-a* 変異赤血球と同一の蛍光特性を示す方法により処理された赤血球。この赤血球は、溶媒／溶剤対照動物由来の余分な血液を処理し、蛍光抗体標識プロトコール記載の蛍光 GPI アンカー型抗体を除去することによりしばしば調製される。変異体模倣試料は、器具の設定およびソフトウェア／データ解析パラメータの指針とするのに有用である

MUT RBC：変異赤血球。本文書の目的上、この用語は、*Pig-a* 変異表現型（すなわち、GPI アンカーの消失）を示す、年齢とは無関係の循環赤血球を表す

MUT RET：変異網状赤血球。本文書の目的上、この用語は、*Pig-a* 変異表現型（すなわち、GPI アンカーの消失）を示す、残存 RNA および／または CD71 表面マーカーの存在により特定される、循環赤血球の最も未熟な画分を表す

陰性対照：ほとんどの場合、*Pig-a* 試験では、物質関連の顕著な作用の特定に用いられる動物の溶剤または溶媒投与群。例えば、陰性対照データベースの確立など、場合によっては、投与前データが溶剤または溶媒投与動物のデータの代替となりうる

中立的な表現型：*In vivo* において有利にも不利にも高度に選択されない変異細胞を表すために用いられる用語で、例えば、優性の野生型細胞集団由来の細胞と同じ速度で増殖する細胞が挙げられる

***Pig-a* 遺伝子**：ホスファチジルイノシトールグリカンクラス A 遺伝子

予測区間：既に認められた結果を踏まえ、将来の観察結果に一定の確率でなると考えられる区間の推定値

© OECD, (2022)

前駆型変異原：変異の誘導に、通常は酵素的代謝による構造変化を要する化学物質

分位数：確率分布または頻度分布を同等の順序付けられたサブグループにした区分のことで、例えば、四分位数やパーセンタイルが挙げられる

RBC：赤血球。本文書の目的上、年齢とは無関係に、すべての循環赤血球を含む

RET：網状赤血球（状況によっては多染性赤血球と呼ばれる）。骨髄赤芽球から発生する未熟赤血球で、その残存 RNA および／または CD71 表面マーカーの存在により識別される

残差分布：残差は、予測された反応から観測された反応を差し引いて得られる実験誤差の推定値である。予測された反応は、実験データからモデルの未知パラメータすべてを推定後、この選択モデルから算出される。残差分布の検討は、モデルの仮定および適切性に関する情報を提供することから重要である

許容区間：試料採取された母集団の特定の割合が、ある程度の信頼水準でおさまる統計的区間

UVBC：組成が未知または変化する物質、生物材料または複雑な反応生成物

分散の均一性：分散の均一性は、独立したサンプルの t 検定および ANOVA（分散分析）など、ほとんどのパラメトリック検定の仮定に当たり、すべての比較群が同じ分散を有することを主張する。独立したサンプルの t 検定および ANOVA では、それぞれ *t* 統計量および *F* 統計量を用いるが、群の大きさが等しい限り、これらの統計は仮定の違反に対し概して頑健である。

© OECD, (2022)

補遺 2—小核試験およびコメット試験と *Pig-a* 試験の併用

1. 小核試験およびコメットアッセイと 28 日間投与プロトコールを採用した Pig-a 試験の併用

小核試験およびコメット試験は、短期投与プロトコール（例：2〜3 日間の連続曝露）の数時間から数日後に実施されることが多い。一方、*in vivo* 小核試験に関する TG 474 (56)および *in vivo* アルカリコメット試験に関する TG 489 (45)では、これらの遺伝毒性試験をより長期の反復投与プロトコールに統合することも記述している。したがって、これら 2 つの遺伝毒性試験は、推奨される 28 日間反復投与プロトコールを用いる *Pig-a* 試験と併用できる。

In vivo 小核試験など血液ベースのアッセイ法での採血は、*Pig-a* 試験の反復投与処理スケジュールの初期（例：Day 4）に実施できる。さらに、血液ベースの小核試験および複数の組織上でのコメットアッセイは、28 日間投与プロトコール終了後、多くの場合 Day 29 に実施でき、コメットアッセイ実施の場合、組織収集前の Day 29 に投与を追加できる。

2. 小核試験およびコメットアッセイと短期投与プロトコールを採用した Pig-a 試験の併用

Pig-a 試験と小核試験およびコメットアッセイの併用は技術的に可能であるが、これらの試験に単一の短期投与プロトコールを用いる場合、2 つの重要な考慮事項に対処すること。第 1 に、急性投与スケジュールを用いて *Pig-a* データを生成する場合、そうした試験では、概して動物が 28 日間の反復投与プロトコールの場合より高い 1 日用量で試験を受けるが、被験化学物質の総用量は下回るため、*Pig-a* エンドポイント測定の科学的正当性を伴うべきである。こうした投与での *Pig-a* 突然変異体頻度は、より長期の投与スケジュールでの生成頻度より通常低くなる。第 2 に、*Pig-a* 試験では変異体発現に長期間—通常、最低 2〜4 週間—を要し(3)、短期投与でのコメット試験または小核試験よりはるかに長期となる。

小核試験およびコメットアッセイと、短期投与を採用した *Pig-a* 試験との併用について、可能な 3 つのデザインを以下に示す。

1. 単一系統の動物と単一の短期投与（例：2〜3 日間連続投与）を用いる。このプロトコールを用いる場合、*Pig-a* 試験と小核試験および／またはコメット試験を併用することで、コメット試験および小核試験は、動物を安楽死させずに達成可能な血液ベースの解析に限定される。そのため、血液ベースの小核試験およびコメット試験を短期投与後に実施し、*Pig-a* 変異体発現のための追加期間中（例：合計 28 日間）動物は飼育される。血液解析に限定することはコメット試験では問題で、血液中の DNA 損傷検出の正確度低下が示されている(20)。したがって、このプロトコールを用いる場合、*Pig-a* 試験と血液ベースの短期小核試験との併用の方が、短期コメット試験との併用よりもはるかに容易である。

2. *Pig-a* 変異体発現期間の最後の数日間に、2 回目の短期投与を組み入れる。この場合、コメット試験および小核試験ならびに *Pig-a* 試験は、この 2 回目の短期曝露後に実施できる。このプロトコールに従い、*Pig-a* 試験では、1 回目の投与により誘発された変異を主に測定し、小核試験およびコメット試験では、2 回目の投与により誘発された遺伝毒性を測定することが考え

© OECD, (2022)

られる。必要であれば、1 回目の短期投与後に血液ベースの小核試験も実施できることに留意されたい。

3. 3R にそれほどふさわしくない代替法には、コメット試験および／または小核試験実施を目的とした単一の短期投与が挙げられ、TG474 および TG489 記載のとおり、実施後間もなく半数の動物を安楽死させる。*Pig-a* 試験実施のため、残りの動物は、段落 44 記載のとおり、後の採血時（例：Day 15 および Day 30）まで飼育する。これにより、*Pig-a* 変異表現型の発現に十分な期間を有する動物の入手が確保される。

© OECD, (2022)

補遺 3—*Pig-a* 試験で用いられる習得法に向けた動物に優しい訓練演習

Pig-a 試験で用いられる動物の処置、採血、血液処理、およびフローサイトメトリー解析法習得に向けた 3R にふさわしい戦略が、(38)に記述されている。本戦略では、単一のげっ歯類 1 匹が強力な既知変異原性化学物質（例：表 1 に示した 1 物質）に曝露される。高頻度の MUT RET および MUT RBC が末梢血循環中に出現可能となる十分な表現型発現期間の経過後、曝露したげっ歯類からの採血と共に、性別および年齢をマッチさせた無処置動物または溶媒／溶剤対照動物からの採血を行える。変異原曝露動物由来の様々な量の血液（すなわち、添加試料）を含む、一連の 2 つの血液試料混合物を調製する。変異原を投与されたげっ歯類および陰性対照げっ歯類について、MUT RET および MUT RBC の頻度を測定後、陰性対照血液に添加された変異原を投与したげっ歯類の血液の割合に基づき、添加試料について予測される（中間）頻度を算出できる。複数回別々の場合に再構築実験を実施し、添加試料ごとに複数回反復実験を行うことにより、職員は試験の重要な要素について訓練でき、変異細胞頻度の実測値と予測値との優れた一致を立証することにより、職員の習熟度を確立できる。添加実験が無事完了することは、段落 21 記載の試験実施施設の習熟度調査について、有用で 3R にふさわしい道筋となる。

© OECD, (2022)

補遺 4—統計解析およびデータ解釈

1. *Pig-a* 試験データの評価に関する推奨事項

統計解析実施の単一の正しい方法はなく、統計専門家により、好まれる方法論は異なる場合がある。実践的な手法は、実行可能なある程度の評価の一例として、一連の特定の統計解析について提案することである。このことが背景となり、本試験ガイドライン段落 66 記載の 3 種類の解析が提示された。これは規定された方法ではなく、また、一連のデータすべてに適してはいないと言えることを明確にしておく。特に、提案された方法が適切でないとみなされる場合、代替法の使用は許容可能であると考えられる。そうした場合、研究者は、試験開始前にその方法（すなわち、書面による試験計画書またはバリデーション計画書）を明記し、また、健全な統計学的論拠を用いてその方法を正当化する準備を行う。

以下記載の統計手法は、すべて考慮すべきであるという重要な基本原則があることに留意されたい。具体的には、これらおよびそれ以外の統計検定では、実験デザインは、無作為抽出法または少なくともブロック法に基づくと仮定する。無作為化および／またはブロック化は、実験結果に微妙な影響を及ぼす場合もあれば、それほど微妙でない影響を及ぼす場合もありうる要因の影響を軽減するのに役立つ重要な方法であるが、検討対象の主要な要因ではない。実例では、溶媒対照動物由来の血液試料または他の一部組織を、試験実施施設の技師 1 名が完全に処理および解析する一方、高用量投与群に関しては別の技師 1 名がそのステップすべてを担当する場合が挙げられる。このことは、無作為化かブロック化のいずれかを通じ対処すべき実験デザインの非対称性を示している。

2. 対比較

一連の統計検定は、同時溶媒／溶剤（陰性）対照群における MUT RET／RBC および RET の頻度と、被験化学物質投与群で測定されたその頻度との対比較である。適切な多重比較検定による分散分析（ANOVA）を用いるパラメトリック解析が通常用いられるが、他の方法も等しく許容可能である。一般に、これらの種類のパラメトリック検定は、分散の正規性および均一性に関する仮定が妥当な場合にのみ実施する。正規性および／または不等分散が特定された場合、その要件を満たすために、対数（$\log_{10}$）または順位変換など適切なデータ変換をしばしば使用できる。突然変異体頻度の値が 0（ゼロ）の動物がいる場合、0 以外にしないとこのままでは妥当な操作にならないため、対数変換前にすべての動物の変異細胞頻度に 0.1 などの小さな定数オフセット値を加えるべきであることに留意されたい。この変換により等分散性が得られない場合、重み付き（分散補正）ANOVA および／または t 検定を適用でき、あるいは、ノンパラメトリック法の適合性を検討できる。最後に、試験に雌雄両性別を用いる場合、投与と性別の両方を考慮する要因計画法が通常有益である。これについては、以下でさらに詳述する。

2.1 要因計画

より単純な要因計画の 1 つである本計画は、性別および被験化学物質の用量段階を主効果とする二元配置分散分析に相当する。データは、JMP、SPSS、SAS、STATA、Genstat、ならびに R および RStudio など、多くの標準的な統計ソフトウェアパッケージを用いて解析できる。

解析では、データセットのばらつきを、性別間のばらつき、用量段階間のばらつき、および、性別と用量段階との間の交互作用関連のばらつきに分割する。基本的な方法の全詳細は、多くの標準的な統計学のテキストや、統計パッケージと共に提供されている「ヘルプ」機能で入手可能である。

© OECD, (2022)

解析は、ANOVA 表の性別と用量の交互作用項を最初に調査することにより進める。（一般線形モデルの使用などモデリング法を採用する統計専門家は、これと異なるがこれに匹敵する方法で解析に取り組めるが、必ずしも従来の ANOVA 表を得るとは限らないことに留意されたい。）有意な交互作用項がない場合、性別全体または用量段階全体を組み合わせた値から、ANOVA のプールされた群内のばらつき項に基づき、レベル間での妥当な統計検定結果が得られる。

用量段階間のばらつきの推定値について、溶媒／溶剤同時対照および被験化学物質の用量段階全体での反応に関する、線形および二次曲線の差の検定を示す対比結果に分割することで、この解析は継続する。性別×用量段階の有意な交互作用がある場合、この項を線形×性別および二次曲線×性別の交互作用対比結果にも分割できる。これらの項は、用量段階の反応が雌雄両性で平行であるか否か、あるいは、雌雄両性間で反応に差があるか否かの検定結果を提供する。

プールされた群内のばらつきの推定値を用いて、平均値間の差の対比較検定を行える。これらの比較は、陰性（溶剤／溶媒）同時対照のレベルと比較する場合など、雌雄両性の平均値間、および様々な用量段階の平均値間で行うことが考えられる。有意な交互作用がある場合、雌雄一方の性での様々な用量段階の平均値間、あるいは、同一用量段階での雌雄両性の平均値間における比較が可能である。

3. 傾向検定

本試験ガイドライン記載の 2 種類目の解析は、用量反応関係を特定する傾向検定である。傾向検定を実施する場合、MUT RET および MUT RBC データが同時陰性対照群および各実験用量群から入手可能であること。本解析は、限度試験（すなわち、段落 51 記載の単一の被験化学物質の用量段階に関する試験）には通常適用できないことに留意されたい。これらの解析を採用する場合、一部の種類の傾向検定結果を解釈する際に注意が必要である。例えば、単純な線形傾向検定では、用量反応が非単調である場合、傾向を検出できないことがある。こうした場合、Bretz and Hothorn (57)により提唱された Downturn Protection（曲線担保）検定など、非単調性を検出できる傾向検定が有用であると考えられる。用量反応を示すグラフは、適切な傾向検定の種類、および／または変換の必要性の有無を判定する際に役立ちうる。

4. 歴史的陰性対照データの分布

歴史的陰性対照データの分布は、変異表現型について評価すべき最小細胞数の判定、および、アッセイの許容性の評価に重要である。3 番目に重要な機能は、いずれかの被験化学物質曝露処置群について、MUT RET および／または MUT RBC の頻度の平均値が、歴史的陰性対照データの分布の上限値を超えるか否か判定することである。その重要性を考慮し、歴史的陰性対照データセットの構築に関するガイダンスを以下に示す。

4.1 歴史的陰性対照データセットの構築

習熟度調査の過程で、各試験実施施設は、MUT RET および MUT RBC の頻度について、歴史的陰性対照での範囲および分布を確立する。陰性対照データは 2 つの供給源から入手できる。第 1 に、陰性対照データは、被験化学物質投与動物と共に陰性対照として試験された動物（本 TG では、同時陰性対照と呼ぶ）から入手できる。これらの動物には、通常、溶剤／溶媒のみ投与されることになる。第 2 に、投与前 *Pig-a* 試験を実施している試験実施施設では、陰性対照データは、投与前の未投与無処置動物から入手できる（投与前対照データと呼ぶ）。

© OECD, (2022)

歴史的陰性対照の MUT RET および MUT RBC の頻度分布データを初めて取得する際、陰性対照が存在する場合には公表済みデータと一致していること(1)。後の試験の妥当性評価を容易にする統計学的に頑健なデータベース、ならびに、歴史的陰性対照の分布に対する被験化学物質曝露動物の MUT RET および MUT RBC の頻度の比較を達成するため、実験データを引き続き追加する。

こうした目的のため、試験実施施設では、理想的には試験に用いる各げっ歯類系統から、30 匹以上の陰性対照動物由来の MUT RET および MUT RBC の頻度測定値を取得するよう努力する。これらの陰性対照データは溶剤／溶媒同時対照動物由来とし、また、データが入手可能である場合、無処置（投与前）動物由来とする。各 MUT RET および MUT RBC の頻度の値は、個別の動物から取得すべきであるため、その目的では、同一動物由来の連続的な血液試料は許容できない。さらに、様々な繁殖周期から得られた動物をそれぞれ用いる、3 回以上の独立した実験からデータを取得する。可能な限り、規制上の試験と同程度の条件下で実験を実施する。

生後数ヵ月齢までの年齢の異なる動物間では、陰性対照の突然変異体頻度に有意差は検出されていないが(3)、若齢成熟動物の突然変異体頻度（例：2〜5 ヵ月齢）に基づく歴史的データの範囲を用いて、より高齢の動物（例：8ヵ月齢または12ヵ月齢）から採取した試料由来の生成データについて評価することは、さらなる証拠がなく、適切であるとは言えない。

文献に基づくと、性別が健康な若齢げっ歯類の MUT RET および MUT RBC の頻度に影響を及ぼさないと最初にみなすことは許容可能であり(58) (43) (7)、歴史的陰性対照の頻度は雌雄いずれかの動物を用いて構築できる。しかし、試験実施施設では、試験に用いる各げっ歯類系統の雌雄両性に関する陰性対照データ収集が奨励されており、この様式で、雌雄両性とげっ歯類系統との間の MUT RET および MUT RBC の頻度分布の同等性または非同等性を確立している。性別が重要な要因と認められない限りは、雌雄一方の MUT RET および雌雄一方（単独）の MUT RBC の分布を構築できる。重要な性差が認められた場合、このことから、性特異的な陰性対照の分布を構築すべきであると示すことが考えられる。

試験実施施設は管理図などの品質管理法［例：I-bar および X-bar 管理図(59)］を用いることで、そのデータにいかにばらつきがあるか特定し、試験実施施設の方法が「管理下」にあることを示す。歴史的データの構築方法および使用方法（すなわち、歴史的データベースにおけるデータの選択基準および除外基準）、ならびに、所定の実験の許容基準確立に関するさらなる推奨事項については、文献［例：(60)］に見出すことができ、以下考察する。

実験プロトコールに変更があれば、得られたデータが、試験実施施設の既存の歴史的陰性対照データベースとなお一致しているか否かについて、その影響の観点から検討する。大きな不一致があった場合のみ、新たな歴史的陰性対照データベースを確立する。再確立の間、その同時陰性対照の値が、過去のデータベースか対応する公表データのいずれかと一致していることを当該試験実施施設が立証できる場合には、実際の試験実施を可能にするための完全な陰性対照データベースは不要であると考えられる。

Pig-a 試験の陰性対照データは、各動物における MUT RET および MUT RBC の頻度からなる。個別の陰性対照動物由来データが歴史的陰性対照の分布から外れている場合、（i）これらのデータが極端でないこと（例：異常に高い突然変異体頻度を持つ、時に認められる「ジャックポット」変異が予測され、除外できること）、（ii）試験系が「管理下」にあるという証拠があること、および（iii）技術的にも人的にも誤りを示す証拠がないことを条件に、データベースへの組み入れは許容可能であると考えられる。

© OECD, (2022)

4.2 歴史的陰性対照の分布の特徴付け

歴史的陰性対照データの分布の特徴付けには複数の妥当な方法があり、各試験実施施設はそのデータを記述する適切な方法を用いるべきである。その特徴付けは、陰性対照動物の値の大多数が範囲内におさまると予測される境界を記す、上限値および／または下限値を算出する形式を一般にとることになる。考慮すべき要因には、サンプルサイズおよびデータが正規分布か否かなどがある。上限値および／または下限値の算出方法について、概要を以下に示す。さらなる情報については、(61) (62)および(63)に見出せる。

不適切な方法

範囲：範囲とは、実測値の最小値と最大値の差である。有用な上限値および／または下限値の確立を目的とした場合、範囲は、歴史的陰性対照の分布の十分な説明にならない。その理由は、サンプル数の増加につれ範囲は拡大し、2 つの極値（異常値／外れ値）に左右されうるからである。範囲の拡大により、試験実施施設の実行不良という「報い」を受けるおそれがある。

信頼区間：信頼区間とは、定義された（例：95%）信頼度での平均値など、母集団の値（パラメータ）を含んでいる可能性が高い推定値の範囲のことである。母集団の平均値に関する信頼区間は、有用な上限値および／または下限値の確立との関連では、歴史的陰性対照の分布の十分な説明に有用ではない。信頼区間に関する主要な課題は、サンプルサイズの増加につれ信頼区間が狭まり、母集団の値（パラメータ）について高い推定精度が反映されることである。

適切な方法

管理限界：品質管理の分野では、標準偏差の倍数、通常は平均±3 標準偏差を管理限界として用いる。これらの値は管理図上にプロットされた線であり、警戒限界と呼ばれる別の標準偏差の倍数（例：2x）を伴う場合がある。管理図と併せて、管理限界および警戒限界は、反復処理または反復試験が「管理下」に置かれている程度の評価に有用なツールである。正規分布および「管理下」にある処理と仮定した場合、データの 99.73%が 3 標準偏差内にあり、データの約 95%が 2 標準偏差内にあること。したがって、対照および／または警戒限界は、歴史的陰性対照データの評価に有用な資源であり、試験データの解釈に役立つ有用な上限値および／または下限値を提供できる。とはいえ、正規分布データの約 95%がおさまること（±2 標準偏差）を表す限界の方が、通常、3 標準偏差に基づく限界よりも適切である。前者は他の OECD 試験ガイドライン（例：OECD TG474）と一致しており、後者は非常にまれな／異常なデータポイントを特徴付けているため、意図する目的には広すぎる間隔を生じる。経験則では、当該処理が「管理下」にある場合、有用な管理限界および警戒限界を得るには、個別のデータポイントが 25 個以上で十分となる。

予測区間：予測区間は、既存のデータに基づいて、1 つまたは複数の将来の観察結果を予測するよう意図されている。例えば、95%予測区間であれば、新たな結果は 95%の確率の範囲内に入ることが予測されると考えられる。（信頼区間の場合と同じく、これは単純化された定義であり、正確な定義はより複雑であることに留意されたい。） 非正規データを必要に応じて変換し、報告および使用のために元の単位に逆変換する。あるいは、一部のコンピュータソフトウェアプログラムでは、正規分布を仮定しないノンパラメトリックな算出が可能である。経験則では、個別のデータポイントが 30 個以上でより優れた機能を果たすため、予測区間の算出には、より小さなサンプルサイズを用いるべきではない。

© OECD, (2022)

許容区間：許容区間は、ユーザーが定義した「適用範囲」内で、多くの将来的な観察結果を予測するよう意図されている。例えば、将来の観察結果の 95%は、95%許容区間内におさまることになる。（本用語についても、これは単純化された定義であり、正確な定義はより複雑である。） 非正規データを必要に応じて変換し、報告および使用のために元の単位に逆変換する。あるいは、一部のコンピュータソフトウェアプログラムでは、正規分布を仮定しないノンパラメトリックな算出が可能である。許容区間は、類似用語である予測区間に比べ、範囲がより広くなる傾向がある（前者は、高い割合での将来の値を予測するよう意図されているが、後者は、1 つまたは少数の新たな観察結果を予測するために通常用いられるため）。許容区間は、予測区間に比べ、はるかに大きなサンプルサイズを通常要すると認識することも重要である。経験則では、データポイントが 100 個以上でより優れた機能を果たすため、許容区間の算出には、より小さなサンプルサイズを用いるべきではない。

分位数：分位数は、何らかの特定の確率分布を仮定せずに、その大きさに従って、データポイントの順位を要約するのに用いられる。分位数は、外れ値および／または歪度のため非正規性がよくみられる、多くの生物医学的用途に広く用いられている。試験結果の解釈に役立つよう、分位数は、例えば、パーセンタイルに基づいて区間が定められる。分位数測定結果に関する不確実性の推定値を示すため、分位数の信頼区間を算出できる。信頼区間は、根底にあるデータセットの質の評価に役立つと考えられる。サンプルサイズが大きい場合を除き、分位数の信頼区間は、特に分布のテール部分では広くなると考えられる。経験則では、個別のデータポイントが 100 個以上でより優れた機能を果たすため、分位数の算出には、より小さなサンプルサイズを用いるべきではない。

上記区間は、個別の動物の変異細胞頻度を用いて通常算出されることになるが、基準 C（段落 66）記載の一次比較は、投与群の平均値が上限値に比べ低くなる場合を考慮していることに留意されたい。これは実践的な推奨事項であり、個別の動物データに基づいた場合、*in vivo* 試験系として、サンプルサイズがより大きく、歴史的対照の分布がより頑健と考えられる前提を認めている。それでも、これが比較を行える唯一の手段ではない。例えば、個別の動物の変異細胞頻度と歴史的陰性対照の上限値との関係を検討することが、有用と考えられる場合はありうる。

5. 縦断的データ

複数回の試料採取時点を含む実験デザインは、縦断的解析の実施に使用できる(64)。こうした実験デザインには、様々な時点で検討される動物のサブグループからなる用量群を含んでいる場合や、あるいは、この用量群に血液試料を複数日にわたり提供する動物を含んでいる場合が考えられる。用量と期間の両方を要因とするデザインでは、血液試料が別々の動物由来であるか、様々な日における同一動物由来の測定値（すなわち、反復測定デザイン）であるか、考慮の上解析する。一般に、ごく数ヵ月間のみ年齢が異なる成熟動物の歴史的対照データを作成する必要はない（補遺 4 第 4.1 項参照）。

MUT RET および MUT RBC の発現頻度が経時的であることに関しては、複数の予測が挙げられ、例えば、MUT RET の頻度増加は MUT RBC の頻度増加に通常先行し、その後 MUT RET と MUT RBC の両方の増加が通常認められる(2) (3)。こうした予測は、生物学的妥当性を確立する際の科学的判断／証拠の重み付けの解析、および、反応に関する統計学的結果の解釈に寄与しうる。28 日間試験での投与中止直後に測定した場合の予測では、陽性反応により、MUT RET と MUT RBC の両方の高頻度が示されることになり、投与期間中に試料採取を実施した場合、MUT RET のみ高頻度になりうる(1) (3)。

6. 試験結果の解釈

Pig-a 試験の結果を評価する場合、歴史的陰性対照データベースの分布の境界を上回る反応について、本データベースが合理的な評価を行うのに十分な品質を有することは、ある程度保証されるべきである。下

© OECD, (2022)

限値および／または上限値算出の基本となる歴史的対照データベースの品質評価に提唱される方法の 1 つは、管理図とネルソンルール(65)の併用である。それでも、歴史的対照データの品質は、公表値との一貫性および複数の試験にわたる一貫性の観点から、最終的に評価する。適切な歴史的陰性対照データベースの根拠を示すこと以外は、現行の *Pig-a* 試験は妥当とみなす。その根拠の一部には、歴史的陰性対照の分布と一致する、同時溶媒／溶剤対照処置群の MUT RET/RBC 頻度の平均値が挙げられる。1 群当たりの評価動物数およびデータセット内でのゼロの事例など、それ以外の要因は、本試験ガイドラインに示されたガイダンスに一致する。

上記解析法は、被験物質が MUT RET/RBC 頻度の増加を誘発するか否かを評価する重要なツールとみなされる。明らかな陽性（変異原性）の試験結果は、前述の 3 つの基準（有意な対比較、有意な傾向の増加、歴史的陰性対照の分布を上回る被験化学物質の反応；段落 66 参照）がすべて満たされる場合に示される。これらの基準のいずれも満たさない場合、明らかな陰性の試験結果が示される。3 つの基準の一部のみ満たす場合、科学的判断が不可欠であると考えられる。この理論的枠組みは、専門家による OECD 遺伝毒性ワーキンググループにより強化されており、同グループは「...データは、統計と生物学的妥当性の両方に基づいて解釈すべきである」と結論付けた(53)。

場合によっては、科学的判断を適用し可能性として追加データを評価した後でも、反応が陽性にも陰性にも分類できないことがある。こうした場合、この反応は不確定であり、被験物質の変異原性について解決するには、さらなる試験が必要と考えられる。さらなる試験は、最終的な判断のため、統計検定を実施し、厳格な指示を参照する程度の容易さではないが、前述の専門家ワーキンググループによれば、最善の科学的方法であるとみなされる(53)。

© OECD, (2022)

補遺 5—*Pig-a* 試験実施のためフローサイトメーターの設定確立に用いられる変異体模倣試料の代替物

変異体模倣試料の代替物には、（用いる場合、陽性対照由来など）*Pig-a* 突然変異体頻度が高い動物から過去に採取した血液試料を用いることになる。この試料は、変異型対野生型での RET および RBC について、光散乱および蛍光特性を特定するため、フローサイトメトリーの標準試料として保存および使用できる。その場合、これらの血液試料を試験の各時点で 1〜3 個採取すると、通常は十分である。突然変異体頻度の適切な増加をもたらすことになる被験化学物質の例を、表 1 に示す。実験解析実施時点で高頻度の MUT RBC および MUT RET の試料が入手可能である限り、被験化学物質と同じ投与経路を用いて物質を投与する必要はなく、投与および採血のスケジュールに差が生じうることに留意されたい。突然変異体頻度の高い血液試料が過去に投与されたげっ歯類に由来する場合、血液を適切に保存する（段落 57〜58）。これらの試料を変異体模倣試料の代わりに用いる場合、この血液試料から、変異表現型細胞の蛍光特性確立に足る十分に上昇した MUT RET および MUT RBC のレベルであることを立証する。この目的のため、これら 2 つの細胞集団における突然変異体頻度は、赤血球 100 万個当たり変異細胞 100 個以上であることが理想的である。

© OECD, (2022)