

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

哺乳類の *in vitro* 染色体異常試験

はじめに

1. *in vitro* 染色体異常試験の目的は、哺乳類培養細胞での染色体の構造異常を生じる化学物質を特定することである(1)(2)(3)。構造異常には、染色体型と染色分体型の2種類の異常がある。染色体異常を誘発する変異原性物質の多くは染色分体型異常であるが、染色体型異常もみられる。倍数体の増加から化学物質が染色体の数的異常を引き起こす可能性がある。しかし、本ガイドラインは数的異常を測定するようには計画されておらず、通常この目的に用いることはない。染色体変異および関連する事象は多くのヒトの遺伝病と関連があり、体細胞のがん遺伝子と腫瘍抑制遺伝子の変化の原因となる染色体変異および関連する事象が、ヒトおよび試験動物でのがん誘発に関わっている証拠がある。
2. *in vitro* 染色体異常試験では、樹立細胞系、細胞株または初代細胞培養を用いる。培養の成長能力、核型の安定性、染色体数、染色体変異、染色体異常の自然発生頻度に基づき使用する細胞を選択する。
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. *in vitro* の試験は、通常、外因性の代謝活性物質を必要とする。この代謝活性物質は哺乳類の *in vivo* での状態を全て満たすものではない。内因性の変異原性を反映せず、pH や浸透圧の変化、また高い細胞毒性によって生じることがある陽性結果の条件を避けるよう注意を払う(4)(5)。
5. 本試験は、哺乳類の変異原性および発がん性をスクリーニングするときに用いる。本試験で陽性を示す多くの物質は哺乳類で発がん性を有するが、本試験と発がん性との間に完全な相関関係はない。相関関係は化学物質の種類によって異なり、DNA への直接的な障害以外の機序によって作用するために、本試験では検出されない発がん性物質があるという証拠が増加している。

試験の概要

6. 培養細胞を、代謝活性化系存在下または非存在下の状態で被験物質に曝露させる。予め規定した間隔で培養細胞に曝露させた後、分裂中期停止剤（Colcemid®またはコルヒチン）で処理し、採取、染色して、染色体異常について分裂中期停止細胞を顕微分析する。

試験方法

準備

細胞

7. ヒト細胞を含む多種細胞系、細胞株、初代培養細胞を用いる（チャイニーズハムスター線維芽細胞、ヒトまたは他の哺乳類末梢血リンパ球）。

培地および培養条件

8. 適切な培養培地、培養条件（培養容器、CO₂濃度、温度、湿度）を培養中に用いる。樹立細胞系と細胞株は染色体数の安定性を常に観察し、マイコプラズマの汚染がないことを確認する。汚染がある場合は使用しない。通常の細胞周期および培養条件を確認しておく。

細胞の準備

9. 樹立細胞系および細胞株：細胞は保存細胞から増殖させ、採取前までに密集しないような密度で播種し、37°Cで培養する。
10. リンパ球：健康被験者から得た抗凝固剤（ヘパリン）を添加した全血またはリンパ球をマイトジェン（フィトヘマグルチニン）を含む培養培地に加え、37°Cで培養する。

代謝活性

11. 培養細胞を、代謝活性化系存在下または非存在下の状態で被験物質に曝露させる。通常よく用いられる系は、Aroclor 1254などの酵素誘導剤(6)(7)(8)(9)で処理したものか、またはフェノバルビトンとβナフトフラボン(10)(11)(12)を併用した、げっ歯類の肝臓から得た補酵素を添加したマイクロソーム画分(S9)である。マイクロソーム画分は、通常、最終培地中1~10% v/vの濃度を用いる。代謝活性化系の条件は被験物質の分類に基づく。マイクロソーム画分の濃度が1以上あった方が望ましい場合もある。特定の活性酵素を発現する遺伝子組み換え細胞株の構造を含む多くの新規物質では、外因性活性をもたらす可能性がある。細胞系の選択は科学的に正当であること（被験物質の代謝に関するチトクロム P450 アイソザイムとの関連など）。

被験物質／準備

12. 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

13. 溶剤／溶媒は、被験物質と化学反応を起こす疑いがないものを用い、細胞の生存と S9 活性がともに適合できるようにする。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。被験物質が水に不安定であれば、有機溶媒に水が混ざらないこと。水はモレキュラーシーブを加えて除去する。

曝露濃度

14. 最高濃度を決定する際に考えられる基準には、細胞毒性、試験系での溶解性、pH や浸透圧の変化がある。
15. 密度の程度、生存細胞数、分裂指数などの適切な細胞の健全性および成長指標を用いて、主試験では代謝活性化系の有無別に細胞毒性を決定する。予備試験で細胞毒性および溶解性を決定することは有用である。
16. 3 以上の分析可能な濃度を用いる。細胞毒性がみられる場合、濃度は最高から毒性がほとんどないか、または全くない濃度までを網羅する。このことは通常、濃度が $2\sim\sqrt{10}$ を超えない係数によって分けられることを意味する。採取時には、最高濃度で密度、細胞数、分裂指数の有意な減少（全て 50%以上）がみられるようにする。細胞分裂指数は、唯一の細胞毒性／細胞増殖抑制作用の間接的な指標であり、添加後の時間に依存するが、他の毒性試験が煩雑または非現実的である懸濁培養にも使用が可能である。平均産生時間（AGT）などの細胞周期に関する情報は補助情報として用いることができる。ただし、AGT は全体の平均であるため、遅延した部分集団の存在を常に示すわけではない。平均産生時間がわずかに増加しても染色体異常の最適産生時間で大幅に遅延していることがある。比較的毒性のない物質では、最高濃度は $5\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 、 $5\ \text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.01\ \text{M}$ の最も低いものとする。
17. 不溶濃度よりも低い濃度で毒性がない、比較的不溶性の物質では、最高濃度は終了時の最終溶媒濃度の可溶限界を超える濃度となるようにする。ある物質（最低不溶濃度よりも高いときのみ毒性があるなど）では、可視沈殿ができる 1 つ以上の濃度で試験することが推奨される。細胞、S9、血清などの存在下で試験系の曝露中に溶解性が変化することがあるため、試験開始時および終了時の溶解性を評価するのに有用である。不溶性は肉眼で確認できる。沈殿物は計数を妨害しないこと。

対照

18. 各試験には、代謝活性化系存在下または非存在下の陽性および陰性（溶媒または溶剤）対照を用意する。代謝活性化系存在下の場合、陽性対照は変異原性反応をもたらす活性のある物質とする。
19. 陽性対照は、背景を超えた増加が再現可能で検出できる、すなわち試験系への感受性を示すことが予測される量の染色体異常誘発物質とする。陽性対照は作用が明らかになる量を選択し、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。

代謝活性状態	化学物質および CAS 番号
外因性代謝活性化系非存在下	メタンスルホン酸メチル (CAS 番号 66-27-3)
	メタンスルホン酸エチル (CAS 番号 62-50-0)
	エチルニトロソ尿素 (CAS 番号 759-73-9)
	マイトマイシン C (CAS 番号 50-07-7)
	4-ニトロキノリン-N-オキシド (CAS 番号 56-57-5)
外因性代謝活性化系存在下	ベンゾピレン (CAS 番号 50-32-8)
	シクロホスファミド (一水和物) (CAS 番号 50-18-0) (CAS 番号 6055-19-2)

20. 他の適切な陽性対照物質を用いることもできる。必要に応じて関連する分類の陽性対照物質を使うことを考慮する。
21. 試験培地が溶剤または溶媒のみから成る陰性対照は試験培地と同様に扱い、毎回採取を行う。更に、選択した溶剤が有害作用や変異原性作用を誘発しないことを示す背景データがない限りは、無添加の対照を用いる。

手順

被験物質の添加

22. 増殖細胞に代謝活性化系存在下または非存在下の状態で、被験物質を添加する。リンパ球の添加は、マイトジェンを添加してから 48 時間後に開始する。
23. 各濃度には、通常、二連培養を用いる。陰性/溶剤対照培養を用いることが強く推奨される。背景データから二連培養間の変動が最小であることが示唆される場合(13)(14)、各濃度に単一の培養を用いることができる。
24. 気体または揮発性物質は密封した培養容器などの適切な方法で試験する(15)(16)。

培養採取時間

25. 最初の試験では、細胞を代謝活性化系存在下または非存在下の状態で 3~6 時間処理する。添加後、通常 of 細胞周期の 1.5 倍に相当する時間ごとに採取する(12)。この短期間処理で代謝活性化系存在下または非存在下の状態で陰性結果を得たならば、更に代謝活性化系存在下の状態で、通常 of 細胞周期の 1.5 倍に相当する時間ごとに連続採取する。被験物質によっては、細胞周期の 1.5 倍超の処理/採取時間で検出し易くなる。代謝活性化系存在下の陰性結果は、個別に確認する必要がある。陰性結果の確認が必要ではないと考えられる場合には、正当な理由を述べる。

染色体の準備

26. 通常、採取 1~3 時間前に Colcemid®またはコルヒチンを培養細胞に添加する。培養細胞を採取し、染色体の標本作製する。染色体標本作製には細胞の低張処理、固定および染色を含む。

分析

27. 陽性および陰性対照を含む全てのスライドを顕微分析する前に、それぞれコード化する。固定の手順により染色体を欠失した分裂中期細胞の割合が崩れることがあるため、全細胞種についてセントロメア数が染色体数±2に等しい数を含むようにする。200以上のよく広がった分裂中期細胞を濃度別に計数し、対照は必要に応じて二連間で均等に分割する。異常が多くみられるときは、この数を減少できる。
28. 試験の目的は染色体構造異常を検出することであるが、倍数体および核内倍加がみられた場合には記録しておくことが重要である。

データおよび報告

データ

29. 実験単位は細胞とする。したがって、染色体構造異常を有する細胞の割合を評価する。染色体構造異常の種類別に、数と頻度を試験培養と対照培養について表にする。ギャップは他の異常と区別して記録するが、通常は合計の異常数には含まない。
30. 主異常試験の全添加細胞と陰性対照培養について、細胞毒性の測定結果を記録する。
31. 各培養データを記載する。更に、全データは総括表として要約する。
32. 明らかな陽性反応の検証は必要ではない。不確かな結果については実験条件を修正した追加の試験を行い、明らかにする。陰性結果を確認する必要性は段落 25 に記載する。条件範囲を拡大する試験パラメータの修正は、追跡試験にて考慮する。修正する可能性のある試験パラメータには、維持濃度および代謝活性条件を含む。

結果の評価および解釈

33. 濃度に関連する増加または染色体異常のある細胞数増加の再現など、陽性結果を決定する基準がいくつかある。結果の生物学的関連をまず考慮する。統計解析は結果を評価する目的で用いる(3)(13)。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。
34. 倍数体のある細胞数が増加すれば被験物質が分裂過程を阻害する可能性が示唆され、染色体数的異常を誘発する可能性がある。核内倍加染色体のある細胞数が増加すれば、被験物質が細胞周期過程を阻害する可能性がある(17)(18)。
35. 結果が上記の基準と合致しない被験物質は、本試験系では変異原性を有さないと考えられる。
36. 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。

37. *in vitro* 染色異常試験で陽性結果がみられたならば、被験物質が哺乳類培養体細胞で染色体構造異常を誘発することが示される。陰性結果であれば、本試験条件で被験物質が哺乳類培養体細胞で染色体構造異常を誘発しないことが示される。

試験報告書

38. 試験報告書には、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特性
- 分かっている場合、被験物質の安定性

溶剤／溶媒

- 溶剤／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および安定性

細胞

- 使用した細胞種および供給元
- 使用した細胞種の核型特性および適合性
- 該当する場合、マイコプラズマの汚染がないこと
- 細胞周期期間に関する情報
- 血液提供者の性別、全血またはリンパ球分離、使用したマイトジェン
- 該当する場合、継代数
- 該当する場合、培養細胞の維持方法
- 染色体数

試験条件

- 分裂中期停止剤の特定、濃度、細胞曝露期間
- あれば、細胞毒性データおよび溶解限度データを含む培養数と濃度選択の根拠
- 該当する場合、培地の構成、CO₂濃度
- 被験物質濃度
- 溶媒容量と添加被験物質容量
- 培養温度
- 培養時間
- 処理期間
- 該当する場合、播種時の細胞密度
- 許容基準を含む代謝活性化系の種類と構成
- 陽性および陰性対照
- スライド標本作製方法
- 異常計数の基準
- 分析した分裂中期数
- 毒性の測定方法
- 陽性、陰性、不確かな結果を示す試験の基準

結果

- 毒性の徴候（頻度の程度、細胞周期データ、細胞数、分裂指数など）
- 沈殿の徴候
- 測定可能であれば、培地の pH、浸透圧データ
- ギャップを含む異常の定義
- 各処理培養および対照培養についての染色体異常の種類と染色体異常細胞数
- 観察された場合、倍数体の変化
- 可能な場合、用量反応関係
- もしあれば、統計解析
- 同時に実施した陰性（溶剤／溶媒）と陽性対照データ
- 背景の陰性（溶剤／溶媒）と陽性対照データ、範囲、平均および標準偏差

結果の考察

結論

参考文献

- (1) Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985). The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- (3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger, E. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen*, 10 (suppl. 10), 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C., (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- (7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- (8) Natarajan, A.T., Bates, A.D, van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by

- Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutat. Res.*, 37, 83-90.
- (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M., Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In vitro. *Mutation. Res.*, 66, 277-290.
- (10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M., Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on *in Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, 241-261.
- (13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O., and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (14) Soper, K.A. and Galloway S.M. (1994). Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, 139-149.
- (15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
- (17) Locke-Huhle, C. (1983) Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.
- (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983) Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

補遺定義

染色分体型異常：1つの染色分体の破損または染色分体間の切断と再結合として表される構造染色体の損傷。

染色体型異常：2つの染色分体の同一部位における破損、または同一部位における切断と再結合として表される構造染色体異常。

核内倍加：DNA複製のS期後の過程。核は分裂しないが、他のS期を開始する。結果として4、8、16・・・染色分体のある染色体がみられる。

ギャップ：1染色分体の幅よりも小さい非染色性部位で、染色分体の最小のずれ。

分裂指数：細胞集団で観察された総細胞数で除した分裂中期細胞の割合。集団での増殖程度をみる指数である。

数的異常：用いた細胞において染色体数の正常数からの変化。

倍数体：2倍体（3n、4nなど）以外の半数体染色体の複数。

構造異常：細胞分裂中期に顕微鏡にて確認できる染色体構造の変化。欠失、断片、構造内変化、構造間変化としてみられる。