OECD/OCDE

2016/07/29

試験ガイドライン No.473

In Vitro 哺乳類細胞染色体異常試験

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 (2016), Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264649-en.

©OECD(2016)

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

2016 年 7 月 29 日採択

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

In Vitro 哺乳類細胞染色体異常試験

はじめに

1. 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は、科学の進歩や規制上の必要性の変化および動物福祉への配慮などを踏まえて定期的に見直されている。最初の試験ガイドライン 473 は 1983 年に採択された。1997 年にはその当時までにもたらされた科学の進歩に基づいて改訂版が発行された。今回の改訂版試験ガイドラインは、30 年近くにわたる試験の使用経験およびデータの解釈を反映したものである。本試験ガイドラインは遺伝毒性に関する一連の試験ガイドラインの 1 つである。遺伝毒性試験およびその試験ガイドラインに対して行われた近年の変更概要について、簡潔な情報を示す文書が作成されている (1)。

2. *In vitro* 染色体異常試験の目的は、哺乳類培養細胞で染色体構造異常を引き起こす物質を検出することである(2) (3) (4)。構造異常には染色体型と染色分体型の 2 種類がある。*In vitro* 染色体異常試験では倍数性（核内倍加を含む）が生じることがある。異数性誘発物質は倍数性を誘発する場合があるが、倍数性のみでは異数性誘発能があるとはいえず、細胞周期の変動または細胞毒性を示唆するのみである(5)。本試験は異数性の検出を目的としてデザインされたものではない。異数性の検出には *in vitro* 小核試験が推奨される(6)。

3. *In vitro* 染色体異常試験では、ヒトまたはげっ歯類由来の樹立細胞株または初代培養細胞を使用する。使用する細胞は培養時の増殖能、核型（染色体数を含む）の安定性および染色体異常の自然発生頻度に基づいて選択すべきである(7)。現時点で得られているデータからは強く推奨されるものではないが、化学物質の有害性を評価する際には、試験に選択した細胞の *p53* の状態、遺伝的（核型）安定性、DNA 修復能および由来（げっ歯類かヒトか） の検討が重要であると示唆されている。本試験ガイドラインの使用者には、この領域の知識の進歩に伴い、上述した要素および他の細胞特性が使用細胞株の染色体異常誘発の検出能に与える影響について考慮することが求められる。

4. 用語の定義を補遺1に示す。

© OECD, (2016)

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。

本ガイドラインは、書面による手続により 2016 年 7 月 29 日に OECD 理事会で採択された［C(2016)103］。

最初に考慮すべき事項および限界

5. *In vitro*で実施する試験は、細胞が被験物質に対して代謝能を有する場合を除き、一般的に外因性由来の代謝活性化を利用する必要がある。外因性代謝活性化系は*in vivo*での状況を完全に再現するものではない。人為的要因による陽性結果、すなわち被験物質の染色体への直接的相互作用に起因しない染色体損傷、が起こり得るような条件を避けるよう注意を払う必要がある。このような条件にはpHまたは浸透圧の変化(8) (9) (10)、培地成分との相互作用(11) (12)、過度の細胞毒性(13) (14) (15) (16)などが含まれる。

6. 本試験は染色体の構造異常を検出するために使用される。染色体異常誘発の分析には分裂中期細胞を使用する必要がある。つまり、被験物質処理および無処理細胞のいずれにおいても細胞分裂を起こすことが必須条件となる。産業用ナノ材料について本試験ガイドラインの特別な適用が必要とされる場合もあろうが、ナノ材料への適用については本試験ガイドラインでは言及していない。

7. 混合物について、規制対応の目的でデータを得るために本試験ガイドラインを使用する場合は、その前に、その目的にふさわしい結果が得られるのか、もしそうならその理由についてあらかじめ考慮する必要がある。混合物の試験に関して規制上の要件がある場合は、このような考慮を行う必要はない。

試験の概要

8. 適切な代謝能を有する細胞を使用する場合を除いて、ヒトまたは他の哺乳類に由来する培養細胞を外因性代謝活性化系の存在下および非存在下において被験物質で処理する（13項参照）。培養細胞への被験物質処理開始後、あらかじめ定められた適切な時間で培養細胞を分裂中期停止剤（例：コルセミド®またはコルヒチン）で処理し、細胞を回収、染色して、分裂中期細胞に染色分体型および染色体型の異常があるかどうかを顕微鏡下で分析する。

試験の方法

準備

細胞

9. 種々の細胞株（例：チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO)、チャイニーズハムスター肺由来細胞(V79)、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)、ヒト由来細胞(TK6)） やヒトまたは他の哺乳類末梢血リンパ球を含む初代培養細胞が使用できる(7)。細胞株の選択は

©OECD, (2016)

科学的妥当性に基づいて行わなければならない。初代培養細胞を使用する場合には、動物福祉の観点から、可能であればヒト由来の初代培養細胞の使用を検討し、ヒトにおける倫理原則および規則に従って試料採取を行う。ヒト末梢血リンパ球採取の対象者は、疾病への罹患が確認されておらず、染色体異常の背景出現率を高めるレベルの遺伝毒性物質（例：化学物質、電離放射線）に最近曝露されていない若年齢（約18～35歳）の非喫煙者とする。これにより、染色体異常の背景出現率を低いレベルに安定して抑えることができる。染色体異常の背景出現率は加齢とともに上昇し、この傾向は男性よりも女性に顕著である(17) (18)。複数のドナーから採取した細胞をプールして使用する場合は、ドナー人数を明記する。また、被験物質による処理を開始してから細胞の採取までの間に細胞が分裂したことを証明する必要がある。被験物質に対する各細胞周期の感受性は不明な場合があるため、さまざまな細胞周期にある細胞が曝露されるように、培養細胞は、指数増殖期を維持するか（細胞株の場合）、または刺激して分裂させる（リンパ球の初代培養細胞の場合）。分裂を起こすため分裂促進剤で刺激する必要がある初代細胞は、通常、被験物質に曝露される期間にはもはや同調していない（例：分裂促進剤で刺激した48時間後のヒトリンパ球）。細胞周期が同調している細胞を処理に使用することは推奨されないが、妥当性が示されれば使用可能である。

培地および培養条件

10. 培養の維持には、適切な培地と培養条件（培養容器、必要に応じて5%CO_2の加湿状態、37°Cの培養温度）を使用する。細胞株は定期的に染色体モード数の安定性を検査し、マイコプラズマの汚染がないことを確認する(7) (19)。マイコプラズマ汚染がある場合または染色体モード数が変化した場合にはその細胞を使用しない。試験施設で使用する細胞株または初代培養細胞は、正常な細胞周期時間が把握され、それが公表されている細胞特性に一致している必要がある(20)。

培養細胞の準備

11. 細胞株：保存細胞から細胞を増殖させ、細胞が懸濁状態または単層状態のまま回収時点まで対数増殖を維持できる密度で培地に播種する（例：単層培養では、密集状態にならないようにする）。

12. リンパ球：被験物質で処理する前に細胞分裂を誘発させるため、抗凝固剤（例：ヘパリン）で処理した全血または分離したリンパ球を、分裂促進剤（例：ヒトリンパ球に対してはフィトヘマグルチニン(PHA)）の存在下で培養する（例：ヒトリンパ球の場合48時間）。

©OECD, (2016)

代謝活性化

13. 内因性の代謝能が不十分な細胞を使用する場合は、外因性の代謝系を用いる必要がある。他に妥当な理由がある場合を除き、通常よく用いられ、既知のものとして推奨される代謝系は、アロクロール1254 (21) (22) (23)またはフェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用(24) (25) (26) (27) (28) (29)などの酵素誘導剤で処理したげっ歯類（通常はラット）の肝臓から調製したミクロソーム画分（S9）に、補酵素を添加した溶液である。フェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用は「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(30)に抵触せず、複合機能オキシダーゼの誘導能はアロクロール1254と同程度に高いことが確認されている(24) (25) (26) (28)。S9画分の最終的な試験培地中での濃度は通常1～2%（v/v）を使用するが、10%（v/v）に高める場合もある。処理中に分裂指数を低下させる物質、特にカルシウム錯体形成物質(31)を使用してはならない。使用する外因性代謝活性化系または代謝誘導剤の種類および濃度の選択は、被験物質の種類によっては考慮すべき場合がある。

被験物質の調製

14. 被験物質が固体の場合は、適切な溶媒で溶解し、適宜希釈して細胞を処理する。被験物質が液体の場合は、試験系に直接添加するか、希釈して添加する。被験物質が気体または揮発性の場合は、密封容器内で処理するなど、標準的なプロトコールに適切な修正を加えて試験を実施する(32) (33) (34)。保存可能であることが安定性データによって証明されている場合を除き、被験物質は用時調製する。

試験条件

溶媒

15. 試験の実施に有害な影響を及ぼす（すなわち、細胞増殖を変化させる、被験物質の完全性に影響する、培養容器と反応する、代謝活性化系を障害する）ことがなく、被験物質の溶解性を最適化できる溶媒を選択する。可能な限り、水性の溶媒（または培地）の使用を第一に考慮する。十分に確立された溶媒は、水またはジメチルスルホキシド（DMSO）である。一般に処理培地中の最終濃度は、有機溶媒では1%（v/v）、水性溶媒（生理食塩液または水） では10%（v/v）を超えないようにする。十分に確立されていない溶媒（例：エタノール、 アセトン）を使用する場合は、それらが被験物質および試験系に影響しないこと、また使用する濃度で遺伝毒性がないことを示すデータによって、その溶媒の使用の正当性を裏付ける必要がある。裏付けデータがない場合は、無処理対照（補遺1参照）を設けて、選択した溶媒によって有害作用または染色体構造異常の誘発が引き起こされないことを証明すること が重要である。

©OECD, (2016)

細胞増殖と細胞毒性の評価ならびに処理濃度の選択

16. 被験物質の最高濃度を決定する際には、人為的な陽性反応、例えば、過剰な細胞毒性（22項参照）、培養液中の沈殿物（23項参照）、pHや浸透圧の著しい変化（5項参照）などを引き起こす可能性のある濃度は避ける。被験物質を添加した際に培養液のpHが著しく変化する場合は、最終処理培養液を緩衝液で処理してpHを調節することで、人為的な陽性結果の回避や適切な培養条件の維持ができることがある。

17. 細胞増殖の測定を行い、十分な数の処理細胞が試験中に細胞分裂を起こしていること、および処理が適切な細胞毒性レベルで実施されていることを確認する（18, 22項参照）。細胞毒性は細胞死および細胞増殖などの適切な指標を用いて、主試験の代謝活性化系の存在下および非存在下それぞれで決定する。予備試験（用量設定試験）で細胞毒性を評価することは、主試験で使用する濃度をより明確に決定する上で有用であるが、予備試験の実施は義務付けられてはおらず、実施した場合も主試験での細胞毒性の測定の代用にはならない。

18. 細胞遺伝学的試験で細胞毒性を評価する際には、相対的細胞集団倍加（RPD）または相対的細胞数増加（RICC）を用いるのが適切な方法である(13) (15) (35) (36) (55)（数式については補遺2参照）。長時間の処理および処理開始後から回収時間までが正常な細胞周期の1.5倍以上に及ぶ（すなわち、合計で細胞周期の3倍を超える）場合には、RPDでは細胞毒性が過小評価されることがある(37)。このような状況下ではRICCがより優れた方法であり、もしくは正常な細胞周期の1.5倍以降の細胞毒性の評価にRPDを用いることが有用な推定となる。

19. 初代培養リンパ球の場合、分裂指数（MI）が細胞毒性／細胞増殖抑制の尺度となる一方、MIは処理後の測定する時間、使用した分裂促進剤および被験物質処理に伴う細胞周期 の乱れによって影響を受ける。しかしながら、他の細胞毒性評価法は煩雑で実用的でなく、またPHA刺激に反応して増殖中のリンパ球が対象の場合には適用できないため、MIは細胞 毒性の指標として受け入れられる尺度となっている。

20. 細胞株についてはRICCおよびRPDが、初代培養リンパ球についてはMIが細胞毒性パラメータとして推奨される。一方、他の指標（例：細胞の健全性、アポトーシス、壊死、細胞周期）からもさらに有用な情報が得られる場合がある。

21. 試験許容基準（適切な細胞毒性、細胞数など）を満たす少なくとも3段階（溶媒および陽性対照を除く）の試験濃度を評価すべきである。細胞の種類（細胞株または初代培養リンパ球）に関わらず、試験する各濃度で複数系列または1系列の培養を使用する。2系列で培

©OECD, (2016)

養した細胞を使用するのが望ましいが、計数する細胞総数が2系列で培養した細胞と同じで あれば、1系列で培養した細胞の使用も可能である。1系列の培養の使用は、特に3段階を超 える濃度で評価する場合に妥当である（31項参照）。設定した濃度において、それぞれ2系 列以上で培養した細胞から得られた結果は、プールしてデータ解析できる (38)。細胞毒性をほとんどまたはまったく示さない被験物質については、通常、公比約2～3で設定した濃度 段階の使用が適している。細胞毒性がある場合は、選択した試験濃度が22項に記載したよう に細胞毒性を示す濃度、中等度の細胞毒性を示す濃度および細胞毒性をほとんどまたはまっ たく示さない濃度を含む必要がある。被験物質には急勾配の濃度反応曲線を示すものが多く、低い細胞毒性および中等度の細胞毒性でのデータを得るため、または用量反応関係を詳しく 調べるためには、とりわけ確認試験が要求される状況では（47項参照）、濃度間隔のより密 な設定や3段階を超える濃度の設定（1系列または複数系列の培養）の必要がある。

22. 最高濃度が細胞毒性に基づく場合、最高濃度は、推奨する細胞毒性パラメータを用いて、55 ± 5%の細胞毒性をもたらすように（すなわち、細胞株についてはRICCおよびRPDが、初代培養リンパ球についてはMIが、同時陰性対照の45 ± 5%にまで低下するように）設定する必要がある。陽性の結果がこの55 ± 5%の細胞毒性範囲の上限においてのみ見られる場合には、結果の解釈に注意を払う必要がある(13)。

23. 被験物質が難溶性で、最低不溶濃度より低い濃度で細胞毒性がない場合は、観察した最高濃度において被験物質処理の終了時に、肉眼または倒立顕微鏡で混濁や沈殿が確認される必要がある。たとえ最低不溶濃度より高い濃度で細胞毒性が生じたとしても、人為的影響が沈殿によって生じる可能性があるため、観察対象としては濁りまたは目に見える沈殿を生じる濃度を1濃度含めるだけにすることが望ましい。沈殿を生じる濃度では、沈殿が試験の実施（例：染色や計数）を妨げないよう注意する。実験前に培地での溶解性を測定しておくと、有用である。

24. 沈殿も処理濃度を規定する細胞毒性も認められない場合、最高試験濃度は10 mM、2 mg/mLまたは2 µL/mLのうち、最も低い濃度とする(39) (40) (41)。組成が不明な被験物質、例えば、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（すなわち、UVCB [Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials]物質(42)）、環境抽出物などの場合、十分な細胞毒性を示さない場合は、最高濃度を高くして（5 mg/mLにするなど）、各成分の濃度を高める必要がある。ただし、上記の要件は、ヒト用医薬品では異なる場合があるので注意する(43)。

対照

25. 細胞の回収時期ごとに、処理培地に溶媒のみを添加したもので、被験物質処理と同じ

©OECD, (2016)

方法で処理した同時陰性対照（15項参照）を設ける。

26. 同時陽性対照は、試験施設が用いた試験プロトコールの条件下で染色体構造異常誘発物質を検出する能力を備えていること、および使用した場合は外因性代謝活性化系の有効性を証明するために必要である。陽性対照の例を表1に示す。妥当性が示されれば代わりの陽性対照物質を使用してもよい。哺乳類細胞を用いる*in vitro*遺伝毒性試験は十分に標準化されているため、陽性対照の使用は代謝活性化を必要とする染色体構造異常誘発物質に限定できる。もし非活性化での試験を同じ処理時間を用いて同時に実施する場合には、この単一の陽性対照物質の反応によって代謝活性化系の活性と試験系の反応性がともに証明されることになる。ただし、長時間処理（S9なし）については、代謝活性化系を用いる試験とは処理時間が異なるため、それ自体の陽性対照が必要である。試験系の感度を証明するため、それぞれの陽性対照は、再現性があり検出できる背景出現率を超える増加が期待される1つ以上の濃度を設定し（すなわち、作用は明らかであるが、観察者によってコード化されたスライドが直ちに特定されない）、その反応が、本試験ガイドラインに規定された限度を超える細胞毒性によるものではないようにする。

表1 試験施設での習熟度評価および選択する陽性対照として推奨される参照物質

分類	物質	CAS番号
1. 代謝活性化なしで活性を示す染色体異常誘発物質		
	メタンスルホン酸メチル	66-27-3
	マイトマイシンC	50-07-7
	4-ニトロキノリン-N-オキシド	56-57-5
	シトシンアラビノシド	147-94-4
2. 代謝活性化を必要とする染色体異常誘発物質		
	ベンゾ[a]ピレン	50-32-8
	シクロホスファミド	50-18-0

手順

被験物質による処理

27. 代謝活性化系の存在下および非存在下で増殖中の細胞を被験物質で処理する。

培養細胞の回収時期

28. 結果を陰性と判定するのに必要となる厳密な評価を行うには、代謝活性化の存在下および非存在下での短時間処理、ならびに代謝活性化の非存在下での長時間処理による、次の3つの実験条件をすべて実施する必要がある（43～45項参照）：

©OECD, (2016)

- 代謝活性化の非存在下で細胞を被験物質に3～6時間曝露し、処理開始後正常な細胞周期の約1.5倍に相当する時間に回収する(18)。
- 代謝活性化の存在下細胞を被験物質に3～6時間曝露し、処理開始後正常な細胞周期の約1.5倍に相当する時間に回収する(18)。
- 代謝活性化の非存在下で、正常な細胞周期の約1.5倍に相当する時間にわたり細胞を被験物質で連続的に処理した後に回収する。物質によっては（例：ヌクレオシド類似体） 正常な細胞周期の1.5倍を超える処理時間（回収までの時間）とすることでより容易に検出できる(24)。

上記のいずれかの実験条件で陽性反応が認められた場合、残りの試験条件で試験する必要はない。

染色体標本の作製

29. 培養細胞は通常回収前の1～3時間にわたりコルセミド®またはコルヒチンで処理する。各培養細胞を回収し、個別に操作して染色体標本の作製を行う。染色体標本の作製では細胞の低張処理、固定、および染色を行う(1)。単層培養の場合、3～6時間の被験物質処理の終 了時に分裂細胞（球形を呈し、単層表面から剥離しかけている細胞として認識される）が認められる。これらの分裂細胞は容易に剥がれるため、被験物質を含む培地を除去する際に失われる可能性がある。そのため、分裂細胞数が対照と比較して大幅に増加しており、分裂が停止している可能性がある場合は、分裂期にあって染色体異常を形成している可能性のある細胞の喪失を避けるために、細胞回収の際に遠心分離によって細胞を集め、これを培養液に戻す必要がある。

分析

30. 陽性および陰性対照を含めたすべてのスライドをそれぞれコード化してから、染色体異常について顕微鏡下で分析を行う。細胞固定の操作により、染色体を欠落した分裂中期細胞を生ずることがままあるため、染色体モード数±2のセントロメアを含む細胞を分析対象にする。

31. 被験物質が明らかに陰性であると結論するためには，300個以上のよく広がった分裂中期細胞を濃度および対照ごとに計数する必要がある（45項参照）。複数系列の培養を使用する場合、300個の細胞を各培養で均等に分割する。濃度別に1系列の培養を用いる場合（21項参照）、300個以上のよく広がった分裂中期細胞をこの1系列の培養で計数する。300個の細胞を計数することには試験の統計学的検出力を高める利点があり、またゼロ値が観察されることもほとんどない（わずか5%と予測される）(44)。染色体異常を有する細胞が多数観察され、被験物質が明らかに陽性と判定される場合、分析する分裂中期細胞数を減らすことが

©OECD, (2016)

できる。

32. 染色体構造異常を有する細胞を、ギャップを含めた場合と除外した場合について計数する。切断およびギャップは文献に従って補遺1に定義している(45) (46)。染色分体型および染色体型の異常はそれぞれ別に記録し、さらに細分類（切断、交換）する。試験施設で使用する手順書には、染色体異常の分析について十分に訓練を受けた計数者により実施されることおよび必要に応じてピアレビュー（第三者検証）を行うことを規定しておく必要がある。

33. 試験の目的は染色体構造異常を検出することであるが、倍数性および核内倍加の細胞が観察された場合には、それらの頻度を記録しておくことが重要である（2項参照）。

試験施設の習熟度

34. 試験を日常的に実施するに先立ち、その試験について十分な経験を積むため、異なる機序で作用する複数の標準的な陽性対照物質および種々の陰性対照（種々の溶媒／媒体を使用）による一連の実験を実施しておく必要がある。これらの陽性および陰性対照の反応は文献と一致すべきである。以上の要件は経験を有する試験施設、すなわち37項の定義に従った背景データベースが利用可能となっている試験施設には適用されない。

35. 陽性対照物質の選択（26項表1参照）に際しては、代謝活性化の非存在下での短時間および長時間処理、ならびに代謝活性化の存在下での短時間処理を用いて検討することにより、染色体構造異常誘発物質を検出でき、代謝活性化系の有効性を判定する習熟度を試験施設が有していることを証明する必要がある。試験系の感度および検出範囲を明らかにするため背景出現率を超え、かつ再現性のある濃度依存的な増加が観察されるように選択した物質の濃度範囲を設定する必要がある。

対照の背景データ

36. 試験施設は、下記について確立しておく必要がある：

- 陽性対照の背景データの範囲および分布
- 陰性（無処理、溶媒）対照の背景データの範囲および分布

37. 最初に背景陰性対照の分布データを得る場合は、公表されている陰性対照データがあれば、このデータと同時陰性対照のデータが一致していなければならない。対照の分布に追加する実験データの増加に伴い、同時陰性対照は、その分布の95%管理限界の範囲内に収めるのが理想的である(44) (47)。試験施設の陰性対照の背景データベースは、最初は最低10回の実験によって構築すべきだが、できれば同等な条件下で実施された少なくとも20回の実験

©OECD, (2016)

によって構築することが望ましい。試験施設は、管理図（例：C管理図、Xバー管理図(48)）などの品質管理の方法を用いて、試験施設における陽性、陰性の両対照データの変動の様子を明らかにし、その試験方法が当該施設で「管理下にある」ことを示す必要がある (44)。背景データの構築および使用の方法に関するさらなる推奨事項（すなわち、背景データにおけるデータの選択および除外基準ならびに所定の実験の許容基準）が、文献に示されている (47)。

38. 実験プロトコールに変更がある場合は、試験施設の既存の対照背景データベースのデータとの整合性を考慮する。重大な不一致があった場合には、新たに対照の背景データベースを構築すべきである。

39. 陰性対照のデータは、21項で述べたように、1系列で培養した培養細胞または2系列以上で培養した場合は合計した培養細胞における染色体異常を有する細胞の出現率から構成される。同時陰性対照は、試験施設の陰性対照の背景データベース分布の95%管理限界内に収まるのが望ましい(44) (47)。同時陰性対照のデータが95%管理限界から外れた場合は、そのデータが極端な外れ値ではなく、試験系が「管理下にある」こと（37項参照）および手技的あるいは人為的なミスがなかったという証拠があれば、対照の背景データの分布に含めることができる。

データおよび報告

結果の提示

40. 染色体構造異常を有する細胞の割合（%）を評価する。染色分体型および染色体型の異常を細分類（切断、交換）し、それぞれについて処理群および対照群における出現数およびその頻度を記録する。ギャップは他の異常とは区別して記録・報告するが、総異常頻度には含めない。倍数性や核内倍加の細胞が観察された場合はその割合（%）を報告する。

41. 染色体異常を調べる本試験では、処理群、陰性対照群および陽性対照群のすべてについて細胞毒性を同時に測定、記録する。

42. 個々の培養のデータを示し、さらに、すべてのデータを表形式に要約する。

許容基準

43. 試験が許容できるかどうかは以下の基準に基づく。

- 同時陰性対照は、39項で述べたように、試験施設の陰性対照の背景データベースに追加で

©OECD, (2016)

きる。

- 同時陽性対照（26項参照）は、試験施設の陽性対照の背景データベースで得られる反応に一致し、同時陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。
- 溶媒対照における細胞増殖基準が満たされている（17, 18項参照）。
- 3つの実験条件のうち、いずれかで陽性結果が得られていない限り、3つの条件すべてで試験を実施している（28項参照）。
- 適切な細胞数および濃度数で分析可能である（31, 21項参照）。
- 最高濃度の選択基準が、22、23、24項に述べたものに適合している。

結果の評価および解釈

44. すべての許容基準が満たされている条件で、検討した実験条件（28項参照）のいずれかで以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陽性であると判定される。

a) 少なくとも1つの試験濃度で、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められる。
b) 適切な傾向検定の評価で、用量依存性の増加が認められる。
c) 当該結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界； 39項参照）から外れている。

上記基準をすべて満たす場合、被験物質は本試験系で哺乳類培養細胞に染色体異常を誘発すると判定される。なお、最適な統計学的手法に関する勧告が文献に発表されている(49) (50) (51)。

45. すべての許容基準が満たされている条件で、検討したすべての実験条件（28項参照）で以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陰性であると判定される。

a) 試験した濃度のいずれにおいても、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められない。
b) 適切な傾向検定の評価で、濃度依存性の増加が認められない。
c) すべての結果が陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界； 39項参照）内に収まる。

この場合、被験物質は、本試験系で哺乳類培養細胞に染色体異常を誘発しないと判定される。

46. 明らかな陽性反応または陰性反応については、確認の必要はない。

47. 得られた結果が上述したような明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、あるいは、結果の生物学的妥当性を確認する必要がある場合には、専門家判断や追加試験によりデータを詳細に評価する必要がある。追加の細胞を計数（適切な場合）あるいは実験条件の変更（濃度間隔、他の代謝活性化条件[すなわち、S9の濃度またはその由来]）を考慮した再

©OECD, (2016)

試験の実施が、有用な場合がある。

48. まれに、追加試験を行っても得られたデータセットからは陽性または陰性の結果に関して結論を出せず、そのため被験物質の反応が「不明確」と結論される場合もある。

49. 倍数性細胞の数の増加は被験物質に細胞分裂の過程を阻害する作用があり、その結果数的染色体異常を誘発する可能性があることを示している(52)。核内倍加の細胞数の増加は被験物質に細胞周期の進行を阻害する作用がある可能性を示している(53) (54)（2項参照）。したがって、倍数性細胞の出現率と核内倍加の細胞の出現率は区別して記録する必要がある。

試験報告書

50. 試験報告書には以下の情報を含める。

被験物質：

— 入手可能な場合、供給源、ロット番号、使用期限
— 既知の場合、被験物質自体の安定性
— 既知の場合、被験物質の溶媒への溶解性と安定性
— 必要に応じ、被験物質添加した培地のpH、浸透圧および沈殿の測定結果

単一成分物質：

— 外観、水溶性およびその他の関連する物理化学的性質
— 化学的識別情報、例えばIUPACまたはCAS名、CAS番号、SMILESまたはInChIコード、構造式、純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的同定など

多成分物質、UVCB [Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials]物質および混合物：

— 構成物質の化学的識別（上記参照）、定量的組成率および関連のある物理化学的性質によるできる範囲での特性

溶媒：

— 溶媒選択の妥当性
— 最終的な培地中の溶媒の割合（%）

細胞：

— 細胞の種類および供給元

©OECD, (2016)

— 使用した細胞の核型特性及び適合性
— 細胞株の場合、マイコプラズマ汚染のないこと
— 細胞株の場合、細胞周期の長さ、倍加時間または増殖指標に関する情報
— 血液のドナーの性別、ドナーの年齢および関連する情報、全血か分離リンパ球か、使用した分裂促進剤
— 細胞株の場合、情報があれば継代数
— 細胞株の場合、細胞培養を維持する方法
— 細胞株の場合、染色体モード数

試験条件：

— 分裂中期停止剤の名称、その濃度および細胞を処理する時間
— 培地中での被験物質の最終濃度（例：μg/mL、mg/mLまたはmM）
— 濃度および培養系列数の選択の根拠（細胞毒性データと溶解限界値を含む）
— 培地の組成、該当する場合はCO_2濃度、湿度
— 培地に添加する溶媒と被験物質の濃度（や容量）
— 培養温度
— 培養時間
— 処理時間
— 処理後の回収時間
— 該当する場合、播種時の細胞密度
— 代謝活性化系の種類および組成（S9の供給元、S9 mixの調製方法、最終培地におけるS9 mixとS9の濃度または容量、S9の品質管理）
— 陽性および陰性対照物質と各処理条件での最終濃度
— スライド標本の作製方法および使用した染色法
— 試験の許容基準
— 異常の分析に関する基準
— 分析した中期分裂細胞の数
— 細胞毒性の測定方法
— 細胞毒性と使用した方法に関する補足情報
— 試験結果を陽性、陰性または不明確と判定する基準
— pH、浸透圧および沈殿の測定に用いた方法

結果：

— 細胞株を使用した場合、各培養について処理した細胞数および回収した細胞数
— 細胞毒性の測定値（例：RPD、RICC、MI、もしあればその他の測定事項）
— 細胞株の場合、細胞周期の長さ、倍加時間または増殖指数に関する情報
— 沈殿の有無およびその観察時期

©OECD, (2016)

— ギャップを含む異常の定義
— 処理群および対照群ごとの計数した細胞数、ギャップを含めた場合および除外した場合について染色体異常を有する細胞数および染色体異常の種類
— 観察された場合、倍数性細胞の数（倍数性および核内倍加の細胞を区別して記録）
— 可能な場合、濃度反応関係
— 同時陰性（溶媒）対照と陽性対照のデータ（濃度および溶媒）
— 陰性（溶媒）対照および陽性対照の背景データ（範囲、平均、標準偏差、分布の95%管理限界ならびにデータ数を含める）
— 統計解析、もしあればp値

結果の考察

結論

©OECD, (2016)

参考文献

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) 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

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (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.

(4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), "Improving dose selection and identification of aneugens in the in vitro chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

(6) OECD (2014), *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(11) Long, L.H. et al. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

©OECD, (2016)

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. et al. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. et al. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. et al. (1998), Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. et al. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. et al. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. et al. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. et al. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. et al. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In vitro, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

©OECD, (2016)

(26) Elliot, B.M. et al. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

(27) Matsushima, T. et al. (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J. et al. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. et al. (1994). Report from Working Group on in Vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponible à l'adresse: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in Genotoxic Effects of Airborne Agents, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(33) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(34) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122- 130.

(35) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(36) Galloway, S. et al. (2011), Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

©OECD, (2016)

(38) Richardson, C. et al. (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.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Available upon request.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pp. 36-43.

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible à l'adresse: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. et al. (1990), "Metaphase chromosome aberration assays in vitro", in Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

©OECD, (2016)

(51) Richardson, C. et al. (1989) "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *statiscal Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press,Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139-149.

©OECD, (2016)

補遺1

用語の定義

異数性：正常な二倍体（または半数体[一倍体ともいう]）の染色体数から単一もしくは複数の染色体の増減があること。ただし、染色体数の全体での倍加（倍数性）は含めない。

アポトーシス：一連の段階を踏むことを特徴とするプログラム化された細胞死のことで、細胞は分解されて膜結合粒子となり、その後貪食作用または脱落により除去される。

細胞増殖：細胞分裂の結果、細胞数が増加すること。

染色分体切断：単一の染色分体に不連続部分があり、染色分体の1つに明らかな不整列が見られる。

染色分体ギャップ：単一の染色分体の非染色性部位（非染色性損傷）で、染色分体のごく狭い範囲に不整列が見られる。

染色分体型異常：単一の染色分体の切断または染色分体間での切断の再結合として発現する染色体の構造的損傷。

染色体型異常：2本の染色分体の同一部位における切断または切断の再結合として発現する染色体の構造的損傷。

染色体構造異常誘発物質：細胞集団または真核生物に染色体の構造異常を引き起こす物質。

濃度：最終的な培地中の被験物質の濃度。

細胞毒性：本ガイドラインが対象とする細胞株を用いた試験の場合、細胞毒性は、陰性対照と比較した場合の処理細胞における相対的細胞集団倍加（relative population doubling; RPD）または相対的細胞数増加（relative increase in cell count; RICC）が減少する事象として示される（17項および補遺2参照）。本ガイドラインが対象とするリンパ球の初代培養を用いた試験の場合、細胞毒性は、陰性対照と比較した場合の分裂指数（mitotic index; MI）が減少する事象として示される（18項および補遺2参照）。

©OECD, (2016)

核内倍加：DNA複製のS期後に核は細胞分裂に進まないが、新たにS期が開始される現象で、その結果4、8、16…本の染色分体を有する染色体が生じる。

遺伝毒性：DNAや染色体のあらゆる種類の損傷の総称。切断、欠失、付加体、ヌクレオチドの修飾や架橋、再配列、遺伝子突然変異、染色体構造異常ならびに異数性が含まれる。すべてのタイプの遺伝毒性作用が突然変異や安定した染色体損傷を起こすわけではない。

分裂指数（MI）：細胞集団で観察された分裂中期細胞を総細胞数で除した割合で、細胞集団における増殖の程度を示す指数である。

細胞分裂：細胞が分裂することをいい、通常、前期、前中期、中期、後期および終期に分けられる。

変異原性：遺伝子のDNA塩基対配列または染色体の構造に継世代的変化を引き起こす性質（染色体の場合、染色体異常）。

数的異常：用いた細胞に特有の正常な染色体数が変化すること。

倍数性：細胞または生物における数的染色体異常のうち、全染色体セットを含むもの。1本あるいは数本の染色体の数の異常（異数性）の対義語。

p53の状態：p53蛋白質は、細胞周期調節、アポトーシス、DNA修復に関与する。p53タンパク質の機能が欠損している細胞は、DNA損傷に応答するp53の機能が関与するアポトーシスまたは他のメカニズム（例：DNA修復の誘発）による細胞周期の停止や、損傷細胞の除去ができず、理論上、遺伝子突然変異や染色体異常を起こしやすくなる。

相対的細胞数増加（RICC）：化学物質で処理した培養細胞における細胞数の増加量を、無処理の培養細胞における増加量と比較し、その比を百分率で表したもの。

相対的細胞集団倍加（RPD）：化学物質で処理した培養細胞における細胞集団倍加の増加量を、無処理の培養細胞における増加量と比較し、その比を百分率で表したもの。

肝S9画分：肝ホモジネートを9000×gで遠心分離した後の上清で、生の肝臓抽出物。

S9 mix：肝S9画分と代謝酵素の活性化に必要な補因子の混合物。

溶媒対照：被験物質を溶解するのに用いた溶媒のみを添加する対照培養細胞を指す。

©OECD, (2016)

構造異常：分裂中期細胞に顕微鏡観察で検出される染色体の構造の変化で、欠失および断片、染色体内交換または染色体間交換として認められる。

無処理対照：いずれの物質も添加しない（すなわち、被験物質でも溶媒でも処理しない）が、それ以外は、被験物質で処理する培養細胞と同じ方法で同時に処理する対照培養細胞。

©OECD, (2016)

補遺2

細胞毒性評価のための計算式

分裂指数（MI）：

$$\textbf{MI}\ (\%) = \frac{\text{分裂細胞の数}}{\text{計数した細胞の総数}} \times 100$$

相対的細胞数増加（RICC）または**相対的細胞集団倍加（RPD）**は、いずれも分裂した細胞集団の割合を考慮に入れたものとして推奨されている。

$$\textbf{RICC}\ (\%) = \frac{(\text{処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 – 開始時))}}{(\text{対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 – 開始時))}} \times 100$$

$$\textbf{RPD}\ (\%) = \frac{(\text{処理した培養細胞における細胞集団の倍加数})}{(\text{対照培養細胞における細胞集団の倍加数})} \times 100$$

ここで、

細胞集団倍加（PD）＝［log（処理後の細胞数÷処理開始時の細胞数）］÷ log 2

例えば、RICCまたはRPDが53%の場合、細胞毒性／細胞増殖抑制が47%であることを示し、MIで測定した細胞毒性／細胞増殖抑制が55%の場合は、実際のMIが対照の45%であるとを意味する。

いずれの場合も処理前の細胞数を測定する必要があり、処理培養と陰性対照培養で処理前の細胞数は同数とする

過去にはRCC（すなわち、処理培養の細胞数／対照培養の細胞数）が細胞毒性パラメータとして使用されていたが、細胞毒性が低く見積もられてしまうため推奨されなくなった。

陰性対照培養では、細胞集団倍加が正常な細胞周期の約1.5倍に相当する時間に細胞を回収するという要件に適合している必要があり、分裂指数には十分な数の分裂細胞を得て、50%の減少を確実に算出できるだけの十分高い数値が必要となる。

©OECD, (2016)