OECD/OCDE

1997/07/21

試験ガイドライン No.474

哺乳類赤血球小核試験

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 (1997), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 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-474-1997.pdf.

©OECD(1997)

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

474

1997 年 7 月 21 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

哺乳類赤血球小核試験

はじめに

1. 哺乳類の *in vivo* 小核試験は、被験物質によって赤血球の染色体または赤芽球の有糸分裂装置に誘発される損傷を動物（通常、げっ歯類）の骨髄および／または末梢血細胞から採取した赤血球を分析により検出するために用いられる。

2. 細胞遺伝学的損傷が生じると、進行の遅い染色体断片や全染色体を含む小核が形成されるが、小核試験の目的は、そのような効果をきたす物質を特定することである。

3. 骨髄赤芽球が多染性赤血球に分化するとき主核は押し出されるが、この間に形成された小核は他の無核の細胞質の中に留まる可能性がある。このような細胞には主核がないので、小核の視覚化は容易になる。処理動物において小核含有多染性赤血球の出現頻度が増加すれば、染色体損傷が誘発されたことが示唆される。

4. 用いた定義を補遺に提示する。

最初に考慮すべき事項

5. げっ歯類の骨髄がこの試験で通常用いられるが、それは多染性赤血球がその組織で生産されるからである。末梢血の小核未熟（多染性）赤血球の測定は、小核赤血球が脾臓では除去できないことが明らかな種、または染色体の構造や数の異常を引き起こす物質を十分な感度で検出できることが分かっている種であれば、等しく受け入れられる。小核は多くの基準により区別することができる。これらの中には、小核内の動原体 DNA またはセントロメア DNA の有無によって同定することも含まれる。小核未熟（多染性）赤血球の発現頻度が、主な評価項目である。動物が連続して 4 週以上にわたり処理を受ける場合には、末梢血中の一定数の成熟赤血球に対する小核含有成熟（正染性）赤血球数の割合を測定の評価項目として使うこともできる。

6. 哺乳類の *in vivo* 小核試験は変異原性を評価するにあたり、特に重要である。というのは、この方法では、種間、組織間および遺伝学的評価項目で違いがあるとしても、*in vivo* 代謝、薬物動態学および DNA 修復過程などの因子について考察できるからである。*In vivo* 測定法はまた、*in vitro* 測定系で検出された変異原性作用を更に調べるためにも有用である。

7. 被験物質または反応性代謝産物が標的組織に達しないという証拠がある場合、この試験を用いるのは不適当である。

試験の概要

8. 動物を、適切な投与経路で被験物質に暴露させる。骨髄を用いる場合、動物を処理後適当な時間に屠殺して骨髄を抽出し、標本を作製した後、染色する(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)。末梢血を使用する場合、処理後適当な時間に採血し、塗沫標本を作製し、染色する(4)(8)(9)(10)。末梢血での試験では、最後の暴露から細胞採取までの時間経過を可能な限り短くする。標本中に認められる小核を分析する。

試験方法

準備

動物種の選択

9. 骨髄を使用する場合はマウスまたはラットが推奨されるが、適切な哺乳類であれば、どの種でもよい。末梢血を使用する場合は、マウスが推奨される。ただし、小核赤血球が脾臓では除去できないことが明らかな哺乳動物、または染色体の構造や数の異常を引き起こす物質を十分な感度で検出できることが分かっている哺乳動物であれば、どの種でもよい。一般的に用いられる系統の若齢健康動物を用いる。本試験開始時、動物の体重偏差は最小限とし、各性の平均体重の± 20%を超えないこととする。

飼育および給餌条件

10. 動物飼育室の温度は 22°C ± 3°C とする。相対湿度は目標値を 50～60％とし、30％以上、70％を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料としては通常の実験動物用飼料を用いてさしつかえない。飲水は自由に摂取させる。被験物質を飼料に混ぜて投与する場合には、適切な混合飼料が得られるように、飼料を選択せざるを得ない。動物は個別飼育するか、または同性の動物を群飼いする。

動物の準備

11. 健康な若齢成熟動物を対照群と投与群に無作為に割り付ける。動物を個体識別する。動物は、5 日間以上飼育室環境に馴化させる。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。

被験物質の準備

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、投与に用いる量で毒性効果を生じてはならないし、被験物質との化学反応を起こす疑いがないものを用いる。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。

対照

14. 試験ごとに、それぞれの性において、陽性および陰性（溶剤／溶媒）対照を同時に設定する。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。

15. バックグラウンドに比較して検出可能な増加となるべき暴露量においては、陽性対照は *in vivo* で小核を生じさせるものとする。用量は明らかな効果が発現し、かつ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。陽性対照を被験物質とは異なる経路で投与すること、および 1 回のサンプリングは容認できる。入手可能な場合、化学クラス関連の陽性対照化学物質の使用を考慮してもよい。陽性対照物質の例を以下に示す。

化学物質および CAS 番号
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]
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）]
トリエチレンメラミン[CAS 番号 51-18-3]

16. 溶剤または溶媒のみで処理され、それ以外は投与群と同様に扱う陰性対照を全てのサンプリング時において設定する。ただし、動物間の変動と小核含有細胞の出現頻度に関して許容できる背景の対照データがある場合は、この限りでない。陰性対照を 1 回のサンプリング時にのみ設定する場合は、1 回目のサンプリング時間に設定するのが最適である。更に、選択した溶剤／溶媒が有害でなく、変異原性も示さないことを明白に示す背景のデータまたは公表されたデータがない限り、無添加の対照を用いる。

17. 末梢血を使用する場合、処理前のサンプルは同時に設定された陰性対照として容認できるが、それは短期間の末梢血試験（例えば、1～3 回投与）で結果として生じるデータが背景の対照から予想される範囲にあるときに限る。

手順

動物数および性

18. 各群とも、各性 5 匹以上の分析可能な動物を含める(11)。本試験開始時において、本実験と同じ種および同じ暴露経路を用いて行われた試験で、毒性に性差がないことを示すデータがある場合には、一方の性における試験で十分である。化学物質に対するヒトの暴露に関して、ある種の医薬品のように性特異性が予想される場合、試験は適切な性の動物で行う。

投与スケジュール

19. （24 時間ごとに 1 回以上投与する）非標準的投与スケジュールは、推奨できない。投与期間を延長して得られたサンプルが認められるのは、以下の場合に限られる：本試験において陽性効果が得られている場合。試験が陰性の場合は、毒性が明らかに認められているか、または限界用量が適用されていて、かつサンプリング時まで投与が続けられていた場合。大量投与を容易にするため、被験物質を分割投与してもよい。すなわち、1 日 2 回、2、3 時間を超えない間隔である。

20. 試験は、2 つの方法で実施することができる。

(a) 動物への被験物質の投与は 1 回のみとする。骨髄検体の採取は 2 回以上で、投与後 24 時間を経過してから始め、48 時間を越えない範囲で適当な間隔を置いて実施する。投与後 24 時間以内に採取する場合には、正当な理由がなければならない。末梢血サンプルの採取は 2 回以上で、投与後 36 時間を経過してから始め、2 回目は 72 時間を越えない範囲で最初の採取と適当な間隔を置いて実施する。1 つのサンプリング時点で陽性反応が認められた場合、それ以上のサンプリングは必要ではない。

(b) 1 日 2 回以上の投与（例えば、24 時間以内に 2 回以上の投与）が実施される場合、骨髄サンプルの採取は最終投与後 18～24 時間に、末梢血サンプルの採取は最終投与後 36～48 時間に、それぞれ 1 回実施する(12)。

21. 重要な場合に限り、サンプリング時間を更に加えることは可能である。

投与量

22. 適切なデータがないため用量設定試験を実施する場合は、本試験実施機関で、本試験で使用するのと同じ種、系統、性および投与計画によって実施する(13)。毒性がある場合、最初のサンプリング時には 3 つの用量を設定する。これらの用量は、最大からほとんどか、あるいは全く毒性を示さない量までをカバーする。以後のサンプリング時には、最高用量のみを行えばよい。最高用量は毒性の徴候を呈す用量で、同じ投与計画で更に高用量の投与を続ければ致死を引き起こすと予想される用量と定義する。（ホルモンやマイトジェンのように）毒性を表さない低用量で特異的な生物活性を示す物質は、このような用量決定基準の適用外であり、それぞれの状況によって評価する。最高用量はまた、骨髄に対する何らかの毒性（例えば、骨髄または末梢血の全赤血球に対する未熟赤血球の比率の減少）の徴候をもたらす用量と定義することもできる。

限度試験

23. 少なくとも 2000 mg/kg 体重の用量を 1 日 1 回または 1 日 2 回に分けて投与する試験において毒性の徴候が全く認められず、かつ構造的に関連する物質のデータに基づいて遺伝毒性が予想できない場合には、3 用量を用いる完全な試験の必要はないと考えてよい。より長期間の試験における限界量は、最長 14 日間の投与については 2000 mg/kg/体重/日、14 日を越えての投与については 1000 mg/kg/体重/日である。ヒトで想定される暴露量によっては、限度試験においても更に高用量の使用が必要になる可能性はある。

投与

24. 被験物質は、通常、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いた強制投与によって、または腹腔内注射によって投与される。正当な理由があるなら、他の暴露経路も受け入れ可能である。強制投与または注射により 1 回に投与できる最大液量は供試動物の大きさによって異なるが、体重 100g あたり 2 mL を超えてはならない。より大きい容量の使用は、正当な理由が必要である。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。

骨髄／血液の準備

25. 通常、屠殺後直ちに大腿骨または脛骨から骨髄細胞を採取する。一般に、確立した方法で大腿骨または脛骨から細胞を採取、作製し、染色する。末梢血は、尾静脈または他の適当な血管から採取する。血球は直ちに超生体染色するか(8)(9)(10)、または塗沫標本を作製後、染色する。DNA 特異的染色[例えば、アクリジンオレンジ(14)またはヘキスト 33258＋ピロニン-Y(15)]を使用することにより、DNA 非特異的染色を使用した場合に生じるアーティファクトの一部を除去することができる。この利点は従来の染色法（例えば、ギムザ染色）の使用を除外するものではない。（例えば、セルロースカラムを用いて有核細胞を除去するなどの方法(16)も、）それらの方法により適切に小核を調製できることが示されている試験機関においては使用可能である。

分析

26. 各動物の全赤血球（未熟＋成熟）中の未熟赤血球の割合は、骨髄については 200 以上の赤血球の計測、末梢血については 1000 の赤血球の計測により決定する(17)。陽性対照および陰性対照を含む全てのスライドは、顕微分析の前に無差別にコード化する。小核未熟赤血球の発生率を求めるため、動物あたり 2000 以上の未熟赤血球を計測する。小核含有成熟赤血球を記録することによって、更なる情報が得られる可能性がある。スライドを分析するとき、全赤血球に対する未熟赤血球の比率は対照値の 20%未満であってはならない。動物が連続的に 4 週以上の投与を受けるとき、動物につき 2000 以上の成熟赤血球について小核発生率を計算する。（画像解析や細胞懸濁液フローサイトメトリーなどの）自動解析装置も、その正当性と妥当性が示されるなら手動評価の代替法として受け入れることが可能である。

データおよび報告

結果の処理

27. 動物の個体ごとのデータは総括表として示す。実験単位は動物ごとに成立っている。計測された未熟赤血球数、小核未熟赤血球数および全赤血球に対する未熟赤血球の数を、分析された各動物について表に示す。動物に 4 週以上連続的に投与したとき成熟赤血球に関するデータがあれば、それも示す。全赤血球に対する未熟赤血球の比率および該当する場合は、小核赤血球の百分率も動物ごとに示す。反応に関して性差が認められない場合は、雌雄のデータをまとめて統計解析してもよい。

結果の評価および解釈

28. 小核細胞数の用量依存性の増加または1サンプリング時の1用量群における小核細胞数の明確な増加など、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(18)(19)。ただし、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。結果が不確定な場合は更に試験を繰り返して明らかにすべきであるが、その際実験条件を修正することが望ましい。

29. 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。

30. 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。小核試験の陽性結果は、物質が試験種において染色体損傷または赤芽球の細胞分裂装置の損害をきたしたことを意味する。陰性の結果は、当該試験条件下では被験物質が試験種における未熟赤血球で小核を惹起しないことを意味する。

31. 被験物質またはその代謝産物が全身循環または特異的な標的組織に達する可能性（例えば、全身毒性）について議論しなければならない。

試験報告書

32. 試験報告書はまた、以下の情報も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生理化学的性状
- 分かっている場合、被験物質の安定性

溶剤／溶媒
- 溶媒の選択の妥当性
- 分かっている場合、溶剤／溶媒の被験物質の溶解性と安定性

供試動物
- 使用する種、系統
- 動物数、週齢および性
- 供給元、飼育状況、飼料、その他
- 試験開始時の動物の個体ごとの体重、各群の体重範囲、平均および標準偏差

試験条件
- 陽性および陰性（溶媒／溶剤）対照データ
- 実施した場合は、用量設定試験のデータ
- 用量選択の妥当性
- 被験物質調製の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 投与経路の妥当性
- 該当する場合、被験物質が全身循環または標的組織に達することを確認した方法
- 該当する場合、飼料／飲料水中の被験物質濃度（ppm）から実際の投与量（mg/kg 体重/日）への換算
- 飼料と水の質の詳細
- 投与およびサンプリングスケジュールの詳細な記述
- スライド標本作製方法
- 毒性の測定方法
- 小核未熟赤血球をスコア化する基準
- 動物あたりの分析した細胞数
- 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
- 全赤血球に対する未熟赤血球の比率
- 各動物の小核未熟赤血球数
- 各群の小核未熟赤血球数の平均および標準偏差
- 可能な場合、用量反応関係
- 適用された統計解析と方法
- 同時に実施したか、または背景の陰性対照データ
- 同時に実施した陽性対照データ

結果の考察

結論

参考文献

(1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, 187-190.

(2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, 9-15.

(3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res. 123, 61-118.

(4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, 29-80.

(5) MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: "Developments in Science and Practice of Toxicology", Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.

(6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, G.H., Ramel C., Salamone, M.F., Tice, R.R. and Wild, D. (1987). Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. Mutation Res., 189, 103-112.

(7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol., 14, 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. Mutation Research, 245, 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMS. MMS. Mutation Res., 278, 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F.B.., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, 313-319.

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. Mutation Res., 120, 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic eruthrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 347, 97-99.

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J.Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub- Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

補遺

定義

セントロメア（動原体）：細胞分裂中に紡錘糸が染色体と接触する領域で、これにより娘細胞の極に向かって娘染色体が規則正しく動くことができる。

小核：細胞の主核とは別の小さい核で、有糸分裂（減数分裂）の終期で、進行の遅い染色体断片または全染色体によってできる。

正染性赤血球：成熟した赤血球でリボソームが存在せず、リボソームに特異的な染色により未熟な多染性赤血球と区別できる。

多染性赤血球：分化の中間段階にある未熟な赤血球で、まだリボソームを含んでいるため、リボソームに特異的な染色により成熟した正染性赤血球と区別できる。