OECD/OCDE

2016/07/29

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 (2016), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264762-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

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

哺乳類赤血球小核試験

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、規制要件の変化および動物福祉への配慮に照らして定期的に見直されている。試験ガイドライン 474 の初版は 1984 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き、改訂版が採択された。今回の改訂版試験ガイドラインは、30 年を超える本試験の実施経験およびそのデータの解釈、とりわけ自動計数技術の進歩および本試験の一般毒性試験への組み込みまたは他の遺伝毒性試験との組合せの可能性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一部である。遺伝毒性試験に関する簡潔な情報と、この試験ガイドラインに加えられた最近の変更点の概要を説明する文書を作成した(1)。

2. 哺乳類を用いた *in vivo* 小核試験は、動物種間で様々に異なるとはいえ、*in vivo* での代謝、薬物動態および DNA 修復が機能し、反応に関与していることから、遺伝毒性の評価にとりわけ妥当なものである。*In vivo* 試験は、*in vitro* 試験系で検出された遺伝毒性をさらに詳しく検討する場合に有用である。

3. 哺乳類を用いた *in vivo* 小核試験は、被験物質によって誘発される赤芽球の染色体や染色体分裂装置の損傷を検出するために用いられる。本試験は、動物（通常、げっ歯類）の骨髄または末梢血から採取した赤血球における小核形成を評価する。

4. 小核試験の目的は、細胞遺伝学的損傷をもたらす物質を検出することであり、損傷により生じた遅延染色体断片または染色体全体から構成される小核の形成を指標としている。

5. 骨髄赤芽球が幼若赤血球（多染性赤血球または網状赤血球とも呼ばれる）に分化する際、主核は脱核するが、この間に形成されていた小核は細胞質内に留まる可能性がある。これらの細胞には主核がないため、小核の視認化や検出は容易である。被験物質処理動物において小核を有する幼若赤血球の出現頻度が高まれば、染色体の構造または数的異常が誘発されたことを示している。

6. 新たに形成された小核を有する赤血球は、染色後、顕微鏡を用いた目視計数または自動解析により定量する。自動計数装置により、成獣の末梢血または骨髄における十分量の幼

©OECD, (2016)
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。
本ガイドラインは、2016 年 7 月 29 日に OECD 理事会が手順書に従って採択したものである［C（2016）103］

若赤血球の計数が容易に行える。自動計数装置による評価は、目視計数に替わるものとして許容される(2)。適切な校正が行われている場合、これらの方法では顕微鏡での目視計数と比べて、試験施設間および試験施設内の再現性および感度が改善されることが比較試験によって示されている(3) (4)。小核を有する赤血球の測定が可能な自動化システムには、フローサイトメーター(5)、画像解析装置(6) (7)およびレーザースキャニングサイトメーター(8) 等があるが、これだけではない。

7. 通常は、試験の一部として実施されることはないが、小核形成に関与したのは染色体断片なのかあるいは染色体全体なのかを識別するいくつかの方法がある。たとえば、無傷の染色体の特徴である動原体またはセントロメア DNA の有無の確認である。動原体またはセントロメア DNA がなければ、その小核が染色体の断片のみから成ることが示され、一方、それらが存在すれば染色体の喪失によることが示唆される。

8. 用語の定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項

9. 赤血球は骨髄で作られるため、本試験では遺伝的損傷の標的組織として若齢成獣げっ歯類の骨髄を使用する。末梢血における小核を有する幼若赤血球の測定は、これらの細胞中 の染色体に構造または数的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（幼若赤 血球に小核を誘発させることにより）証明されており、科学的妥当性が示されれば、その他 の哺乳動物も使用できる。小核を有する幼若赤血球の出現頻度が試験の主要評価項目である。小核を有する細胞が脾臓で捕捉されない動物種であり、かつ使用する動物種の赤血球寿命（例：マウスでは 4 週間以上）を超える期間にわたって連続的に処理を行う場合には、末梢血における小核含有成熟赤血球の割合も評価項目として使用できる。

10. 被験物質またはその代謝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切である。

11. 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。

試験法の概要

12. 適切な投与方法により動物を被験物質に曝露させる。骨髄を用いる場合、動物に処理した後、適切な時間に人道的に安楽死させて骨髄を採取し、標本を作製した後、染色する(9)

©OECD, (2016)

(10) (11) (12) (13) (14) (15)。末梢血を用いる場合、処理した後、適切な時間に採血し、標本を作製した後、染色する(12) (16) (17) (18)。急性投与の場合は、処理に起因する小核含有幼若赤血球の誘発が検出可能な骨髄または血液の採取時間を選択することが重要である。末梢血を採取する場合、小核を有する赤血球が循環血中で認められるのに十分な時間が経過している必要がある。標本は、顕微鏡による目視観察、画像解析、フローサイトメトリーまたはレーザースキャニングサイトメトリーのいずれかを用いて、小核の有無を分析する。

試験施設の習熟度の検証

習熟度の検討

13. 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実施経験を確立するため、試験施設は表 1 に掲載されているような陽性対照物質を少なくとも 2 種類（低用量の陽性対照で誘発される弱い反応を含む）と適合性のある媒体／溶媒対照（26 項を参照）を用いて、小核の出現頻度について公表データ(17) (19) (20) (21) (22) から期待される結果を再現できる能力を有することを示す必要がある。これらの試験には再現性があり、用量依存的な増加が見られる複数の用量を用いて、対象組織（骨髄または末梢血）における試験系の感度および検出範囲を当該試験施設の計数方法を用いて検討する必要がある。以上の要件は、経験を有する、すなわち、14～18 項の定義に従って背景データが利用可能な試験施設には適用されない。

背景対照データ

14. 試験施設は、習熟度の検討の過程で以下を確立する必要がある。
－陽性対照の背景データの範囲および分布
－陰性対照の背景データの範囲および分布

15. 陰性対照の背景データの分布に関するデータを最初に得る際、用いた陰性対照群のデータは、公表されているものと一致している必要がある。分布の検討ではより多くの実験データが追加されるため、各陰性対照群の値は、背景データの分布の 95%管理限界内に収まるのが望ましい。試験施設の陰性対照の背景データは、当該施設の陰性対照群のデータを確実に評価できるだけの統計学的頑健性を備えている必要がある。文献的には、最低でも 10回の実験によって最初の構築を行う必要があるが、できれば同じの実験条件下で実施した 20 回以上の実験を含む方が望ましい。試験施設では、管理図（例：C 管理図または X バー管理図(23)）などの品質管理方法を用いて、当該施設のデータにどの程度のばらつきがあるかを特定し、その試験方法が当該施設において「管理下にある」ことを示す必要がある。背景データの構築方法および使用方法（すなわち、背景データとしての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）に関する詳しい勧告が、報告されている(24)。

©OECD, (2016)

16. 習熟度の検討（13 項に記載）期間に、統計学的に頑健な陰性対照の分布（15 項参照）を確立できるだけの十分な数の実験を完了できない場合、初期の日常的な試験の間に本分布の確立を行ってもよい。この手法を採る場合は、文献(24)に提示されている推奨事項に従う必要があり、これらの実験で得られた陰性対照の結果は、公表されている陰性対照データと一致していなければならない。

17. 実験プロトコールに何らかの変更を加える場合には、その結果得られるデータと試験施設の既存の背景対照データとの整合性の維持に当該変更が及ぼす影響という観点から考察する必要がある。重大な不整合があった場合、専門家の判断により、分布が変更前のものと異なると判定された際には、新たな背景対照データベースを構築しなければならない（15項参照）。再構築を行う間、各陰性対照群の数値が以前のデータベースあるいは公表データと一致していることが証明できれば、実際に試験を実施する上で、完全な陰性対照の背景データベースが必要とされることはない。

18. 陰性対照データは、各動物における小核を有する幼若赤血球の出現率からなる。各陰性対照群のデータは、試験施設が有する陰性対照の背景データの分布の 95%管理限界内に収まるのが望ましい。各陰性対照群のデータがこの 95%管理限界から外れた場合でも、そのデータが極端な外れ値でなく、試験系が「管理下にある」こと（15 項参照）および技術的または人的な過誤がなかったことが証明される場合は、そのデータを背景対照の分布に含めてよい。

試験方法

準備

動物種の選択

19. 通常使用されている系統の健康な若齢成獣を使用する。マウス、ラットまたはその他の適切な哺乳動物が使用できる。末梢血を使用する場合、選択した動物種において、循環血中から小核を有する細胞が脾臓で除去されることで誘発された小核の検出が妨げられることがないことを確認しておく必要がある。これらのことは、マウスおよびラットの末梢血では明確に証明されている(2)。ラットおよびマウス以外の動物種を使用する場合は、その科学的根拠を報告書に記載する。げっ歯類以外の動物種を使用する場合、小核誘発の測定を別の適切な毒性試験に組み入れて実施することが望ましい。

©OECD, (2016)

飼育および給餌条件

20. げっ歯類の場合、動物飼育室の温度は 22°C（±3°C）とする。相対湿度は 50～60%が理想的だが、常に 40%以上を確保し、飼育室の清掃時を除いて 70%を超えないことが望ましい。照明は人工照明とし、12 時間明期、12 時間暗期に設定する。給餌については、通常の実験動物用飼料を用い、飲水は自由摂取とする。被験物質を混餌投与する場合には、適切な混合飼料が得られるように飼料を選択する。げっ歯類では、攻撃行動が予期されない場合、同性の同一投与群の個体を少数（ケージあたり 5 匹以下）で飼育し、適切な環境を確保した平底ケージの使用が望ましい。1 匹ずつの個別飼育は、科学的妥当性がある場合に限られる。

動物の準備

21. 通常は健康な若齢成獣（げっ歯類の場合、投与開始時に 6～10 週齢であることが望ましいが、この週齢を若干超えていても差し支えない）を使用し、対照群と投与群に無作為に割り付ける。各個体は、人道的で低侵襲の方法（例：足環、タグ、マイクロチップの装着あるいは生体認証が挙げられるが、耳パンチや指切法は用いない）により識別し、5 日間以上飼育室環境に馴化させる。またケージは、位置による影響を最小限に抑えられるよう考慮して配置する。陽性対照と被験物質による交差汚染を防止する。試験開始時には、動物の体重のばらつきを最小限に抑え、雌雄ともそれぞれ平均体重の± 20%の範囲内に収まるようにする。

投与の準備

22. 固体の被験物質は動物に投与する前に、適切な溶媒／媒体に溶解／懸濁するか、飼料／飲水に混ぜる。液体の被験物質は直接投与するか、希釈してから投与する。吸入曝露の場合、被験物質は、その物理化学的性質に応じて気体、蒸気または固体／液体のエアロゾルとして投与できる。安定性データによって被験物質が保存可能なことが証明され、適切な保存条件が規定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／媒体

23. 溶媒／媒体は用いる量で毒性を示さず、被験物質との化学反応を起こすおそれのないものを用いる。性質が既知でない溶媒／媒体を用いる場合、適合性を示すデータによる裏付けが必要である。可能な限り、まず水溶性の溶媒／媒体の使用を検討することを推奨する。一般に用いられる適合性のある溶媒／媒体の例には、水、生理食塩液、メチルセルロース溶液、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩溶液、オリーブ油およびコーン油が挙げられ

©OECD, (2016)

る。特殊な溶媒／媒体を選択する場合、それによる小核および他の悪影響が生じないことを示した背景対照データまたは公表された対照データがないときは、本溶媒／媒体対照が使用できることを証明するための初期の試験を実施する必要がある。

対照

陽性対照

24. 通常は、試験毎に陽性対照物質で処理した動物群を設ける。ただし、試験施設が十分な習熟度を備えていることが示され、陽性対照の背景データの範囲が確立されている場合はこの限りではない。同時陽性対照群を設けない場合は、実験ごとに計数対照（計数方法に応じた、固定した未染色スライドまたは細胞懸濁試料）を含める。これらは、試験施設において、定期的（例：6～18 ヵ月ごと。例として習熟度検証試験の間やその後必要に応じた定期的間隔）に別途実施する陽性対照実験で作製され保存された適切な標本を含めることで可能となる。

25. 陽性対照物質は、小核の出現頻度において、自然発生レベルと比較して検出可能な増加を確実にもたらすものでなければならない。顕微鏡を用いた目視での計数を行う場合、陽性対照の用量は、作用は明らかであるが、コード化された試料が測定者によって直ちに特定されないように選択する必要がある。陽性対照は、被験物質とは異なる投与スケジュールや異なる投与経路でもよく、単一時点の試料採取でも良い。また、適切な場合には、関連する化学物質クラスの陽性対照物質の使用を考慮してもよい。陽性対照物質の例を表 1 に示す。

表 1 陽性対照物質の例

物質名および CAS 番号
メタンスルホン酸エチル［CAS 番号 62-50-0］
メタンスルホン酸メチル［CAS 番号 66-27-3］
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］
コルヒチン［CAS 番号 64-86-8］またはビンブラスチン［CAS 番号 865-21-4］－異数性誘発物質として

©OECD, (2016)

陰性対照

26. 被験物質による処理を受けないことを除き、投与群と同様に取り扱う陰性対照群を各試料採取時点に設定する。被験物質を投与する際に溶媒／媒体を使用する場合は、陰性対照群にはこの溶媒／媒体を投与する必要がある。ただし、試験実施施設での各試料採取時点に陰性対照の背景データによって小核を含む細胞の個体間のばらつきおよび出現頻度に一貫性がある場合は、陰性対照については 1 回の試料採取を行うだけでよい。その場合の陰性対は、最初の試料採取時点とする。

27. 末梢血を使用する場合、短期間の試験については、得られたデータが試験実施施設の対照背景データベースと一致する場合、投与前の試料を同時陰性対照群の代わりに使用することができる。ラットの場合、処理前に少量の試料採取（例：100 μL/日未満）を行っても小核の背景頻度は、ほとんど影響を受けないことが確認されている(25)。

手順

動物数および性

28. 一般に、小核誘発反応の程度は雌雄の動物間で類似しており、ほとんどの試験は雌雄いずれかを用いて実施すればよい(26)。雌雄間に意義のある違いがあることを示すデータ（例：用量設定試験等で、全身毒性、代謝、バイオアベイラビリティ、骨髄毒性に違いが見られる等）がある場合には、雌雄両性の使用が望ましい。この場合、例えば、反復投与毒性試験等の一部として雌雄を用いた試験を行うのが適切である。雌雄をともに用いる場合には、要因設計を用いるのが適切である。要因設計を用いたデータ分析法の詳細を補遺 2 に示して いる。

29. 動物数は、1 群当たり雌雄いずれかの分析可能な動物を 5 匹以上、あるいは雌雄両性を用いる場合は、雌雄それぞれが 5 匹以上となるように設定する。化学物質に対するヒトの曝露に関して、例えば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実施する。動物の最大必要数の目安として、3 用量群および同時陰性対照群ならびに陽性対照群（各群ともいずれかの性の 5 匹から構成）を設け、37 項で設定しているパラメータに従って実施する骨髄を用いる試験では、25～35 匹の動物が必要となる。

用量段階

30. 用量選択に役立つ既存の入手可能な適切なデータがないために予備的な用量設定試験を実施する場合、同一試験施設において主試験に用いられるのと同じ動物種、系統、性および投与計画を用いて行う(27)。この試験の目的は、最大耐量（MTD）を特定することで、

©OECD, (2016)

MTD とは、試験の実施を制限する毒性を示すことなく忍容性が認められる（例：体重減少や造血系の細胞毒性の誘発は認められるが、死亡や人道的な安楽死を必要とする疼痛、苦痛、疲弊の所見は認められない(28)）最高用量と定義される。

31. 最高用量は、骨髄に毒性（例：骨髄または末梢血中の総赤血球に対する幼若赤血球の比率の減少。50%以上減少しても対照群の値の 20%以下とはならないようにする）をもたらす用量とも定義できる。しかし、末梢循環血中の CD71 陽性細胞を分析する場合（すなわち、フローサイトメトリーによる）、この非常に若い幼若赤血球画分は、幼若赤血球中のより大型の RNA 陽性を指標とする方法に比べ、毒性刺激に対してより迅速に反応する。したがって、CD71 陽性の幼若赤血球画分を検査する方が、RNA 含量に基づく幼若赤血球を特定する試験と比較してより明白な毒性が得られる。このため、投与期間が 5 日間以内の試験の場合、毒性を示す被験物質の最大投与量は、全赤血球数中に占める CD71 陽性幼若赤血球の割合を統計学的に有意に低下させるが、陰性対照群の値の 5%以下までは引き下げない用量と定義することができる(29)。

32. トキシコキネティクスが飽和を示す物質または長期投与後に曝露量が低下するような解毒過程を誘導する物質は、用量決定基準の例外と考えられ、個別の状況により評価する。

33. 用量反応性に関する情報を得るために、陰性対照群および通常公比 2（ただし 4 を超えない）による最低 3 用量段階を設ける必要がある。用量設定試験の結果、または既存のデータに基づき被験物質が毒性を生じない場合、最高用量は投与期間が 14 日以上の場合には 1000 mg/kg 体重/日、投与期間が 14 日未満の場合には 2000 mg/kg 体重/日とする。一方、被験物質が毒性を示す場合、MTD を最高投与量とし、用量段階は、この最大量から毒性をほとんどあるいは全く生じない用量までの範囲を含めるのが望ましい。試験したすべての用量で標的組織（骨髄）に対する毒性が認められた場合、非毒性用量での試験を追加することが望ましい。定量的用量反応性をより詳細に明らかにすることを意図した試験では、さらに多くの用量群が必要となる。特別な要件が適用されるある種の被験物質（例：ヒト用医薬品）の場合、限界量が上記とは異なる場合がある。

限度試験

34. 用量設定試験または関連する動物試験で得られた既存のデータで、少なくとも限界用量（下記参照）の投与により、明確な毒性作用が示されない場合（骨髄増殖の抑制または標的組織に対するその他の細胞毒性所見が認められないことを含む）、ならびに *in vitro* 遺伝毒性試験や構造的に関連のある物質のデータに基づき遺伝毒性が予測されない場合には、被験物質が標的組織（骨髄）に到達することが証明されていれば、3 用量段階を用いた完全な試験は必要ないと考えて良い。このような場合、限界用量のみの単一用量で十分である。14

©OECD, (2016)

日間以上の投与の場合、限界用量は 1000 mg/kg 体重/日とし、投与期間が 14 日間未満の場合、限界用量は 2000 mg/kg 体重/日とする。

投与

35. 試験を計画する際には、想定されるヒト曝露経路を考慮する。このため、妥当性が示されれば混餌、飲水、局所皮下、静脈内、経口（強制）、吸入、気管内または埋植などの曝露経路が選択可能である。いかなる場合でも、標的組織が適切に曝露される経路を選択する。腹腔内投与はヒトで意図される曝露経路ではないため、通常は推奨されず、特別な科学的妥当性がある場合のみ用いる。被験物質を飼料または飲水に混ぜる場合、特に単回投与の試験では、餌や水の摂取と試料採取までの間隔を十分にとり、その作用が検出できるよう留意する必要がある（37 項参照）。強制経口投与または注射により 1 回に投与できる液体の最大容量は、供試動物の大きさによって異なる。最大容量は、通常 1 mL/100 g 体重を超えないものとするが、水溶液の場合は、最大で 2 mL/100 g まで使用可能である。これを超える場合には、その妥当性を示す必要がある。通常、濃度が高くなるにつれて影響の増悪がみられる刺激性または腐食性の被験物質を除き、すべての用量段階で体重に対して一定の容量を投与できるよう濃度を調節して、投与容量のばらつきを最小限に抑える。

投与スケジュール

36. 投与は 24 時間間隔で 2 回以上実施するのが望ましく、本試験を他の毒性試験に組み込む場合には特に推奨される。別の手法として、科学的妥当性がある場合は（例：細胞周期阻害が既知の被験物質）、単回投与での処理も可能である。大容量投与を容易にするため、被験物質を同日中に 2 回以上に分け、2～3 時間以内の間隔で分割投与することも可能である。このような場合あるいは被験物質を吸入投与する場合には、試料採取時点は最終投与時点または曝露終了時点に基づき設定する。

37. 試験は、マウスまたはラットを用い、次の 3 種類の方法のうちの 1 つで実施する。

a. 動物に被験物質を 1 回だけ投与する。骨髄の採取は、被験物質の半減期が極めて長い場合を除き、投与後 24 時間以降 48 時間を超えない間に適切な間隔で少なくとも 2 回（それぞれ独立した動物群から）実施する。投与後 24 時間以内に試料採取時間を設定する場合は、その根拠を示す必要がある。末梢血の試料採取は、投与後 36 時間以降投与後 72 時間を超えない間に適切な間隔で少なくとも 2 回（同一の動物群から）実施する。初回の試料採取時にはすべての投与群において試料を採取して解析する必要があるが、その後の試料採取時には最高用量のみ実施すればよい。1 回目の採取時で陽性反応が検出された場合、定量的な用量反応性に関する情報が必要な場合

©OECD, (2016)

を除き、それ以上試料を採取する必要はない。記載した採取時期は、これら 2 種類の組織における小核の出現と消失の反応速度に基づくものである。

b. 連日の 2 回投与（例：24 時間間隔で 2 回投与）を実施する。骨髄の場合、最終投与後 18 時間から 24 時間までの間に 1 回、末梢血の場合、最終投与後 36 時間から 48 時間までの間に 1 回、試料採取を行う(30)。記載した採取時期は、これら 2 種類の組織における小核の出現と消失の反応速度に基づくものである。

c. 連日の 3 回以上の投与（例：約 24 時間間隔で 3 回以上の投与）を実施する。骨髄試料は最終投与後 24 時間以内に、末梢血試料は最終投与後 40 時間以内に採取する(31)。この投与方法は、コメット試験（例：最終投与後 2～6 時間に試料を採取）と小核試験を組み合わせる場合および反復投与毒性試験に小核試験を組み込む場合に適している。蓄積されたデータから、3 回以上の投与を行った場合、上記の広い時間枠を通して小核誘発が認められることが示唆される(15)。

38. 妥当でかつ科学的根拠がある場合や他の毒性試験への組み込みを容易とするためには、上記以外の投与または試料採取処方も使用できる。

観察

39. 1 日に少なくとも 1 回、投与後に予測される作用が最大となる時点を考慮に入れた上で、できる限り同じ時刻に動物の全身的な臨床観察を行い、一般症状を記録する。投与期間中は 1 日に少なくとも 2 回以上すべての個体を観察し、疾患や死亡が見られないかどうかを確認する。試験開始時、反復投与試験の場合は投与期間を通して週 1 回以上および安楽死処置時にすべての個体の体重を測定する。1 週間以上を要する試験の場合、摂餌量の測定を少なくとも毎週 1 回行う。被験物質を飲水に混ぜて投与する場合は、水消費量を水交換時毎および少なくとも毎週 1 回測定する。非致死性の過剰な毒性症状を示した動物は、試験期間の完了前に人道的に安楽死させる(28)。投与によって誘発される高体温または低体温の状況下では誤った結果がもたらされるため、動物の体温をモニターしてもよい(32) (33) (34)。

標的組織の曝露

40. 曝露検証が必要とされ、曝露に関するデータが他にない場合には、骨髄が被験物質に曝露されていることを確認する目的で、被験物質の血漿中濃度測定のために、血液試料を適切な時点で採取する（48 項参照）。

©OECD, (2016)

骨髄／血液の調製

41. 通常、動物を安楽死させた後、直ちに骨髄細胞を大腿骨または脛骨から採取する。一般に確立された方法で細胞の採取、標本作製および染色を行う。少量の末梢血を適切な動物福祉基準に従って、被験動物を生かしたまま尾静脈または他の血管から採血するか、安楽死処置時に心臓穿刺または大血管から採血する。骨髄由来、末梢血由来のいずれの赤血球についても、解析に用いる方法に従い、直ちに超生体染色を行うか(16) (17) (18)、塗抹標本を作製して顕微鏡観察用に染色するか、あるいはフローサイトメトリー解析用に固定、染色を行う。DNA 特異的染色（例：アクリジンオレンジ(35)またはヘキスト 33258 とピロニン-Y(36)）の使用により、DNA 非特異的な染色で生じる偽小核を一部排除することができる。このことは従来の染色法（例：顕微鏡分析用のギムザ染色）の使用を妨げるものではない。その他のシステム（例：セルロースカラムによる有核細胞の除去(37) (38)）についても、そのシステムが試験施設における試料調製に適合することが示されていれば、使用できる。

42. 小核誘発機序が染色体構造異常誘発活性によるものか異数性誘発活性によるものかを決定するための、小核の由来（染色体全体か染色体断片か）の確認には、適切な DNA 対比染色(41)を併用した、抗動原体抗体(39)、汎セントロメア DNA プローブを用いる FISH(40)あるいは汎セントロメア特異的プライマーを用いるプライムド *in situ* 標識が適用可能である。他の染色体構造異常誘発物質と異数性誘発物質の識別方法も、有効性が示されていれば利用できる。

分析（手動および自動）

43. 骨髄か血液かの種類を問わず解析を行う前には、解析用のスライドまたは試料を陽性および陰性対照を含めてすべて個別にコード化し、目視による測定者に処理条件が分からないようにランダム化する。ただし、操作者に由来するバイアスに影響されることのない自動測定システムを使用する場合には、このようなコード化は必要ない。各個体における全（幼若 + 成熟）赤血球中に占める幼若赤血球の割合は、骨髄の場合は合計で 500 個以上、末梢血の場合は 2000 個以上の赤血球について計数し、算出する(42)。小核を有する幼若赤血球の出現率を算出するには、各個体につき4000 個以上の幼若赤血球を計測する必要がある(43)。陰性対照の背景データベースにより、試験施設における小核含有幼若赤血球の背景出現頻度 が0.1%未満の場合は、計数する細胞数の増加を考慮する。試料の解析において、処理した 動物の全赤血球に対する幼若赤血球の割合は、顕微鏡を用いて計数する場合は媒体／溶媒対 照での割合の 20%を、フローサイトメトリー法により CD71 陽性幼若赤血球を計数する場合 は媒体／溶媒対照での割合の約 5%を下回ってはならない（31 項参照）(29)。例えば、顕微 鏡で計数を行う骨髄小核試験の場合、陰性対照群の骨髄における幼若赤血球の割合が 50% であったとすると、毒性の上限となる幼若赤血球の割合は 10%となる。

©OECD, (2016)

44. ラットでは小核含有赤血球が脾臓で捕捉されて壊されるため、ラット末梢血を解析する際には、検出感度を高く維持するために小核含有幼若赤血球の解析は最も幼若な画分に制限することが望ましい。自動解析法を用いる場合、この非常に幼若な赤血球は、高い RNA含量または細胞表面で高レベルに発現しているトランスフェリン受容体（CD71+）により識別できる(31)。複数の異なる染色法を直接比較することにより、従来からのアクリジンオレンジ染色を含め、様々な方法により満足な結果が得られることが示されている(3) (4)。

データおよび報告

結果の処理

45. 動物のデータは、個体別に表形式で提示する。分析した各個体について、計数した幼若赤血球数、小核を含む幼若赤血球の数および全赤血球中に占める幼若赤血球の割合を示す。マウスに 4 週間以上継続して投与する場合、小核を有する成熟赤血球の数および割合につい てもデータがあれば示す。動物で見られた毒性および一般症状に関するデータも報告する必 要がある。

許容基準

46. 以下に試験が許容できるか否かを判定するための基準を示す。

a) 同時陰性対照群のデータが、試験施設の陰性対照背景データベースに追加できるとみなせること（15～18 項参照）。

b) 同時陽性対照群または計数陽性対照群が、陽性対照の背景データベースと一致するものであり、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こと（24, 25項参照）。

c) 適切な投与用量数および細胞数の解析が行われていること。

d) 最高用量の選択基準が、30～33 項に記載の基準と合致していること。

結果の評価および解釈

47. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陽性と判定される。

a) 少なくとも 1 つの投与群で、小核含有幼若赤血球の出現頻度が同時陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示しており、

b) この増加を適切な傾向検定で評価した場合に、少なくとも 1 つの試料採取時点で用量依存性が見られる。さらに、

c) 当該結果は陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れている。

©OECD, (2016)

最高用量のみを特定の 1 つの試料採取時点で検討する場合は、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、陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく95%管理限界）から外れていれば、被験物質は明らかに陽性であると判定される。適切な統計学的手法に関する勧告が示されている(44) (45) (46) (47)。用量反応性の解析を実施する場合は、3 用量以上の投与群を解析する必要がある。統計学的検定では動物個体を実験単位とする。小核試験の陽性結果は、被験物質が試験に用いた動物種の赤芽球において染色体または染色体分裂装置の損傷を誘起し、その結果、小核を誘発することを意味している。小核内のセントロメアを検出する試験を実施した際に、被験物質によりセントロメアを有する小核（セントロメア DNA または動原体、認められれば染色体の喪失を示す）が形成された場合は、この被験物質は異数性誘発物質であるといえる。

48. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陰性と判定される。

a) いずれの投与群においても、小核含有幼若赤血球の出現頻度が陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示さず、

b) 適切な傾向検定で評価した場合、いずれの試料採取時点においても、用量依存性の増加がみられず、

c) すべての結果が、陰性対照の背景データの分布（例：ポアソンモデルに基づく95%管理限界）内に収まり、さらに、

d) 骨髄が被験物質に曝露されている。

最適な統計学的手法に関する勧告が示されている(44) (45) (46) (47)。骨髄が被験物質に曝露されたことを示す所見には、成熟赤血球に対する幼若赤血球の割合の低下、あるいは被験物質の血漿中または血中濃度の測定等がある。静脈内投与の場合、曝露証明は必要ない。骨髄曝露を証明する別の方法として、同一の投与経路および動物種を用いて別に実施された試験で得られた ADME データを使用することも可能である。陰性の結果は、試験条件下において、被験物質が試験に用いた動物種の幼若赤血球に小核を誘発しないことを示している。

49. 明らかな陽性反応または明らかな陰性反応の場合、その結果を確認する必要はない。

50. 反応が明確な陰性でも陽性でもない場合に、結果の生物学的意義（例：弱いあるいは境界線上の増加）を明確にするには、専門家による試験データの判定やこれまでに完了した試験のさらに詳細な分析により評価する必要がある。場合によっては、さらに多くの細胞数での分析または実験条件を変更した再試験の実施が有用と考えられる。

51. まれに、より詳細な検討を行っても、被験物質が陽性、陰性のいずれか結論を出せず、したがって、試験の結論が不明確（equivocal）とされる場合がある。

©OECD, (2016)

試験報告書

52. 試験報告書には、以下の情報を含める必要がある。

要約

被験物質

－ 入手先、ロット番号、もしある場合は使用期限

－既知であれば、被験物質の安定性

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：

－ 構成成分の化学的特定名（上記参照）、含有量および関連のある物理化学的性質によるできる限りの特徴付け

被験物質の調製：

－ 溶媒の選択理由

－ 既知であれば、溶媒／媒体中の被験物質の溶解性および安定性

－ 飼料、飲料水または吸入用処方物の調製

－ 実施した場合、処方物の分析項目（例：安定性、均一性、目標濃度）

供試動物：

－ 使用した動物種／系統および使用理由

－ 動物数、週齢および性

－ 供給元、飼育条件、飼料など

－ 動物の個体識別方法

－ 短期試験の場合：試験開始時および終了時における各個体別の体重；1 週間を超える試験の場合：試験中の各個体の体重および摂餌量。各群の体重範囲、平均値および標準偏差を含む。

試験条件：

－ 陽性および陰性（媒体／溶媒）対照

©OECD, (2016)

- 実施した場合、用量設定試験のデータ
- 投与用量段階選択の根拠
- 被験物質調製の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 投与経路および投与期間の設定根拠
- 被験物質が全身循環または標的組織に達したことの確認方法
- 該当する場合、飼料／飲水中の被験物質の濃度（ppm）および消費量から算出される実際の投与量（mg/kg 体重/日）
- 飼料および水の品質の詳細
- 安楽死の方法
- 鎮痛方法（使用した場合）
- 投与および試料採取スケジュールの詳細およびその選択理由
- スライド標本作製方法
- 試料の分離および保存手順
- 毒性の測定方法
- 小核含有幼若赤血球の計数基準
- 小核を含有する幼若赤血球の出現頻度および成熟赤血球に対する幼若赤血球の割合を算出する際の個体当たりの分析細胞数
- 試験の許容基準
- 該当する場合、小核の由来が染色体全体か染色体断片かを分析するのに用いた抗動原体抗体またはセントロメア特異的 DNA プローブの使用等の方法

結果：

- 試験期間前および期間中の動物の状態（毒性徴候を含む）
- 全赤血球中に占める幼若赤血球の割合
- 個体別の小核含有幼若赤血球数
- 各群における小核含有幼若赤血球数の平均 ± 標準偏差
- 可能であれば、用量反応関係
- 統計解析結果および適用した方法
- 同時陰性および陽性対照群データ（範囲、平均および標準偏差を含む）
- 陰性および陽性対照の背景データ（範囲、平均、標準偏差およびその分布の 95% 管理限界、ならびに対象期間および対象試験数）
- 骨髄が曝露されたことを裏付けるデータ
- 該当する場合、小核の由来が染色体全体か染色体断片かを示した分析データ
- 陽性または陰性反応の基準

結果の考察

©OECD, (2016)

結論

参考文献

©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) Hayashi, M. et al. (2007), In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N. et al. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

(8) Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. et al. (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 Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555-558.

©OECD, (2016)

(14) MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. et al. (1990), The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. et al. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – 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, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. et al. (2009), The rat bone marrow micronucleus test--study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. et al. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.

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

(24) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-120.

©OECD, (2016)

(26) Hayashi, M. et al. (1994), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.

(28) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. et al. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30)Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. et al. (2000), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. et al. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38)Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411-415.

©OECD, (2016)

(40) Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) 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.

(44) Richold, M. et al. (1990), "*In Vivo* Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. et al. (1989), "Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. et al. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233-241.

©OECD, (2016)

補遺 1

用語の定義

セントロメア：細胞分裂中に紡錘糸が染色体と結合する領域で、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移動することができる。

赤芽球：赤血球の分化過程のうち、幼若赤血球の直前に当たる初期段階の細胞をいい、まだ核を有している。

動原体：真核細胞のセントロメア上に形成される蛋白質構造で、体細胞分裂および減数分裂の過程中に染色体を紡錘体由来の微小管に結合させる。細胞分裂中に機能し、姉妹染色分体を引き離す。

小核：細胞の主核とは別の小さい核で、体細胞分裂（減数分裂）の終期に遅滞染色体断片または染色体全体によって形成される。

正染性赤血球または成熟赤血球：脱核後に残る残留 RNA や最後の赤芽球分裂に続く脱核後に特徴的に消失する他の短命な細胞マーカーが失われた、完全に成熟した赤血球。

多染性赤血球または幼若赤血球：赤血球分化過程の中間段階で新しく形成される赤血球。この新生細胞には残留 RNA が含まれているため、ライト・ギムザ染色等の古典的な血液染色液の青成分、赤成分のいずれによっても染色される。これらの新生細胞は、残留 RNA の網状質内への凝集をもたらす生体染色法によって可視化される網状赤血球とほぼ同義である。現在では、蛍光色素による RNA の単染色や CD71 等の短命な細胞表面マーカーの蛍光抗体による標識を含む方法が新生赤血球の特定によく使用されている。多染性赤血球、網状赤血球および CD71 陽性赤血球は、寿命の分布にそれぞれ多少の違いがあるものの、いずれも幼若赤血球である。

網状赤血球：細胞内残留 RNA を網状質内へ特徴的に凝集させる生体染色法によって染色される新生赤血球。網状赤血球と多染性赤血球の細胞齢分布はほぼ同等である。

©OECD, (2016)

補遺 2

In vivo 小核試験において性差を特定するための要因設計

要因設計およびその解析

この設計では、各投与量あたり動物数を最低雄 5 匹および雌 5 匹とし、最低 40 匹の動物（雌 20 匹および雌 20 匹、加えて適切な陽性対照）を用いる。

この設計は、より単純な要因設計の 1 つであり、主効果として性と用量段階との二元配置分散分析に相当する。データは SPSS、SAS、STATA、Genstat など多くの標準的な統計ソフトウェアパッケージや R の使用により分析できる。

この解析では、データの変動を雌雄間の変動、用量間の変動および性と用量との間の交互作用に関連する変動に分解している。各要因項とも、同一用量で同性の動物群内での動物間における変動の推定値に対して統計検定が行われる。基礎となる方法論の詳細は、多くの標準的な統計学の教科書（下記参考文献参照)および統計パッケージに設けられている「ヘルプ」機能に記載されている。

解析は、分散分析表（ANOVA table）[1]における性×用量の交互作用を検討することから進める。有意な交互作用がない場合は、両性または用量間の要因効果は分散分析表における交互作用変動をプールした推定値を基に、妥当な統計検定が行われる。

解析では引き続き、用量間の変動の推定値を対比により分割する。対比には、投与群全体の反応に対する線形性と非線形性に対して検定が行われる。性×用量に有意な交互作用がある場合、この項は線形性×性と非線形性×性の交互作用という対比に分割することもできる。これらの項により、用量に対する反応が雌雄間で同等であるか、もしくは反応に性差があるかの検定が行われる。

群内変動にプールされた推定値は、平均値相違についてペアワイズ検定を行うことができる。このような比較は、雌雄両性の平均値間の比較や陰性対照レベルとの比較などさまざまな用 量段階の平均値間で行うことができる。これらにおいて、有意な交互作用がある場合には、同一性で用量間の平均値間比較を行うか、同一用量間で雌雄の平均値間比較を行うことがで きる。

[1] 一般線形モデル（General Linear Model; GLM）の使用等のモデル化法を採用する統計専門家は、異なるが類似する方法で解析に取りかかる場合があるが、コンピュータ以前の時代に開発された統計値を算出するアルゴリズム法にまで遡る、伝統的な分散分析表を常に求めるとは限らない。

©OECD, (2016)

参考文献

実験計画で用いられる最も単純な二次元配置分析からより複雑な形式に至るまでの要因設計の理論、設計、方法論、解析および解釈を考察した統計学の教科書は数多くある。以下のリストは、これらすべてを網羅したものではないが、類似するデザインの適用例を記載した書籍や、さまざまなソフトウェアパッケージを用いて解析を実行するためのコードを記載したものもある。

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

©OECD, (2016)