OECD/OCDE

1997/07/21

試験ガイドライン No.475

哺乳類骨髄染色体異常試験

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 (1997), Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration 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-475-1997.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

475

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

哺乳類骨髄染色体異常試験

はじめに

1. 被験物質によって惹起される染色体の構造異常を *in vivo* で検出する方法として、哺乳類、通常はマウスの骨髄細胞が用いられる(1)(2)(3)(4)。染色体構造異常には 2 つのタイプ、いわゆる染色体異常および染色分体異常がある。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。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。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. 用いた定義を補遺に提示する。

最初に考慮すべき事項

3. 通常、げっ歯類がこの試験でよく用いられる。骨髄は非常に血管に富んだ組織であり、また急速に交代する細胞の集団が含まれ、容易に単離し処理することが可能なので、この試験の標的組織となる。他の種および他の標的組織は、このガイドラインの対象ではない。

4. この染色体異常試験は *in vivo* 代謝、薬物動態学および DNA 修復過程に係る因子について考慮する機会をもたらす意味で、これらの因子が種や組織によって変化する可能性はあるにしても、変異原性ハザードを評価するのに特に重要である。また、*in vivo* 試験は、*in vitro* 試験により検出された変異原性作用を更に検討するのに役立つ。

5. 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

6. 動物を適当な経路で被験物質に暴露し、処理後適当な時間に屠殺する。屠殺の前に、分裂中期停止剤（例えば、コルヒチンまたは Colcemid®）で動物を処理する。次に、骨髄細胞から染色体標本を作製、染色し、染色体異常を評価するため分裂中期細胞を分析する。

試験方法

準備

動物種の選択

7. ラット、マウスおよびチャイニーズハムスターが一般的に用いられるが、適当な哺乳類の種ならいずれも使用できる。試験機関で通常使用される系統で、若齢健康成熟動物を使用する。試験開始時、使用動物の体重のばらつきは最小限とし、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

8. 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。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要が生じる場合がある。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

9. 健康な若齢成熟動物を対照群と処理群に無作為に割り付ける。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。全ての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。

投与の準備

10. 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

11. 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

12. 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。

13. 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* で染色体構造異常を生じさせるものとする。陽性対照の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
トリエチレンメラミン[CAS 番号 51-18-3]
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]
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)]

14. 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、動物間の変動と染色体異常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、この限りではない。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／溶媒が無害であることを証明する背景のデータまたは公表された対照データがない限り、無添加の対照を用いる。

手順

動物数および性

15. 各群とも各性 5 匹以上の分析可能な動物を含める。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

16. 被験物質は単回投与するのが望ましい。被験物質を分割して 2、3 時間を超えない間隔で同じ日に投与すれば、容量の大きな物質の投与も容易になる。上記以外の投与法の場合には、科学的に正当な理由が必要である。

17. 投与後 1 日に 2 度、間隔をおいてサンプルを採取する。げっ歯類の場合、投与後正常細胞周期（通常 12～18 時間）の 1.5 倍の時間が経過したときが 1 回目のサンプリング時間となる。被験物質の吸収と代謝、ならびに、その細胞周期動力学に対する効果が染色体異常を検出するための至適時間に影響するので、最初のサンプル採取から 24 時間後のサンプル採取が推奨される。複数日にわたる投与法を用いる場合、最終投与後の 1.5 正常細胞周期長に 1 回目のサンプルを採取すればよい。

18. 動物を屠殺する前に、分裂中期停止剤（例えば、Colcemid®またはコルヒチン）を適当量、腹腔内に注射する。その後適当な間隔で動物をサンプリングする。この間隔はマウスの場合は約3～5時間、チャイニーズハムスターの場合は約4～5時間である。骨髄細胞を採取し、染色体異常を分析する。

投与量

19. 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(5)。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、（例えば、分裂指数を50%超減少させるなど）ある種の骨髄毒性の徴候をもたらす用量と定義することも可能性である。

限度試験

20. 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日を超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

21. 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。

染色体の準備

22. 屠殺後直ちに骨髄を採取し、低張溶液に暴露して固定する。次に、細胞をスライド上に広げて、染色する。

分析

23. （陽性対照を含む）全ての処理群および未処理陰性対照群において、動物あたり少なくとも1000の細胞につき、細胞毒性の指標として分裂指数を決定する。

24. 動物あたり少なくとも 100 の細胞を分析する。異常が多数観察される場合、この数を減らすことができる。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。また、スライド標本作製中に、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、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。

データおよび報告

結果の処理

25. 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。各動物について、スコア化された細胞数、細胞あたりの異常数および染色体構造異常の数について評価する。染色体構造異常の型の違いについても、各群ともに、その数および頻度を表に示す。染色体のギャップは別に記録し報告されるべきだが、一般に異常の頻度には含めない。反応に関して性差が認められない場合は、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

26. 染色体異常のある相対的な細胞数が用量依存的に増加するとか、1 回のサンプリング時にある用量群の染色体異常細胞数が明らかに増加するなど、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(6)。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。

27. 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(7)(8)。

28. 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。

29. 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。

30. *In vivo* 染色体異常試験の陽性結果は、骨髄において物質が試験に用いた種の染色体異常を誘発することを示す。試験条件下で示す陰性の結果は、被験物質が試験に用いた種の骨髄において染色体異常を誘発しないことを示す。

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、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（溶剤／溶媒）対照
- 実施した場合、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
- 必要に応じて、被験物質の全身循環または標的組織に達することを確認した方法
- 必要に応じて、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
- 飼料および水の質の詳細
- 投与およびサンプリングスケジュールの詳細な説明
- 毒性の測定方法
- 分裂中期停止剤の特定、濃度および暴露期間
- スライド標本作製方法
- 異常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
- 分裂指数
- 各動物の染色体異常の型と数
- 各群の染色体異常の総数、平均値および標準偏差
- 各群の染色体異常細胞の数、平均値および標準偏差
- 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対照データ
– 背景の対照データ、範囲、平均および標準偏差
– 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) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J. M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F., and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, 157-165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic 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.

(4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch- Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, 305-312.

(5) 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.

(6) 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: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D. J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

(8) 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 期の後に、核が有糸分裂に移行せず次の S 期を開始するプロセス。その結果、4,8,16...などの染色分体を持つ染色体ができる。

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。

数的異常：使用した動物において染色体数の正常数からの変化。

倍数体：2 倍体以外の半数体染色体(n)の複数（3n、4n など）

構造異常：細胞分裂中期に顕微鏡で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。