OECD/OCDE

2014/09/26

# 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.

Reference:

OECD (2016), Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264786-en.

©OECD(2014)

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

2014 年 9 月 26 日採択

# 化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

## 哺乳類骨髄染色体異常試験

### 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、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 475 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から得られた科学知見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。遺伝毒性に関する試験ガイドラインの序論として提示されている文書(1)は、これらの試験ガイドラインの利用者に対する簡潔で有用な手引きである。

2. 哺乳類を用いた *in vivo* 骨髄染色体異常試験は、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も有用である。

3. 哺乳類を用いた *in vivo* 染色体異常試験では、被験物質によって誘発される染色体構造異常を検出するために、動物（通常はげっ歯類）の骨髄細胞を用いる(2) (3) (4) (5)。染色体構造異常には 2 つの型、すなわち染色体型および染色分体型がある。遺伝毒性物質により誘発される異常の多くは染色分体型であるが、染色体型も生じる。染色体損傷およびその関連事象は、多くのヒトの遺伝的疾患の原因となる。実際これらの傷害や関連事象が、がん遺伝子や腫瘍抑制遺伝子に変化を生じさせ、ヒトや実験動物におけるがん誘発に関わっている証拠がある。*In vivo* 染色体異常試験では、倍数性（核内倍加を含む）を認めることがある。しかし、倍数性それ自体の増加は、異数性誘発能を示すものではなく、単に細胞周期の乱れあるいは細胞毒性を示しているにすぎない。本試験は異数性の測定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 vivo* であれば哺乳類を用いた *in vivo* 赤血球小核試験（試験ガイドライン 474）、*in vitro* であれば哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験（試験ガイドライン 487）が推奨される。

4. 用語の定義を補遺 1 に示す。



**©OECD, (2014)**
本資料は、個人的な非営利目的であれば、出典を適切に明記するという条件で、OECDに事前の承諾を得ることなく自由に使用してよい。本資料を商業的に利用する場合は、必ずOECDの書面による承諾を得なければならない。

## 最初に考慮すべき事項

5. 本試験には通常げっ歯類が用いられるが、科学的妥当性が示されれば、その他の哺乳動物種も使用できる。骨髄は当該試験の標的組織で、それは骨髄が非常に血管に富んだ組織であり、速やかに分裂する細胞集団を含み、その細胞を容易に単離し処理することができるからである。ラット、マウス以外の動物種を用いる場合には、その科学的妥当性を報告書に記載する。また、げっ歯類以外の動物種を用いる場合、骨髄染色体異常の測定を別の適切な毒性試験に組込むことが望ましい。

6. 被験物質またはその代謝物が標的組織に到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。

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。

## 試験法の概要

8. 適切な投与経路により動物を被験物質に曝露させ、投与後適切な時間に人道的に安楽死させる。安楽死の前に分裂中期停止剤（例：コルヒチンまたはコルセミド®）を動物に投与する。次に、骨髄細胞から染色体標本を作製、染色し、染色体異常について分裂中期細胞を分析する。

## 試験施設の習熟度の検証

## 習熟度の検討

9. 試験を日常的に実施するのに先立ち、その試験について十分な実施経験を確立するため、試験実施施設は、表 1 に記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／溶媒対照類（22 項参照）を用いて、染色体異常の出現頻度について公表データ（例：(6)）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みられる複数の用量を用いて、対象組織（骨髄）における試験系の感度および検出範囲を当該試験施設で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 10～14 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。



©OECD, (2014)

**背景対照データ**

10. 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

11. 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場合、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%管理限界内に収めるのが望ましい。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、できれば同じ実験条件下で実施した 20 回以上の実験を含むことが望ましい。試験施設では、管理図（例：C 管理図または X バー管理図(7)）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(8)。

12. 習熟度の検討（9 項に記載）期間に、統計学的に頑健な陰性対照の分布（11 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(8)に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。

13. 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（11 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を証明できれば、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。

14. 陰性対照データは、各動物における染色体構造異常（ギャップを除く）の出現頻度からなる。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（11 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



©OECD, (2014)

の分布に含めてよい。

## 試験方法

### 準備

*動物種の選択*

15. 通常使用されている系統の健康な若齢成獣を使用する。ラットが通常用いられるが、マウスも適切と考えられる。ラット及びマウス以外の動物種を使用する場合は、その科学的妥当性を報告書に記載する。

*飼育および給餌条件*

16. 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*

17. 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*

18. 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



©OECD, (2014)

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。

*溶媒／媒体*

19. 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る。特殊な溶媒／媒体を選択する場合、それによる構造異常や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*

20. 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（固定した未染色スライド）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。

21. 陽性対照物質は、染色体構造異常細胞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。陽性対照の用量は、作用は明らかであるが、コード化された標本が測定者によって直ちに特定されないよう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よい。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。



©OECD, (2014)

**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］ |

*陰性対照*

22. 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、構造異常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。その場合の陰性対照は、最初の試料採取時点とする。

## 手順

### 動物数および性

23. 一般に、小核の誘発反応は雌雄の動物間で類似しており(9)、このことは染色体構造異常についても当てはまると想定されるので、ほとんどの試験は雄雌いずれかを用いて実施すればよい。雄雌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、骨髄毒性に違いがみられる等）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。

24. 動物数は、1 群あたり雄雌いずれかの分析可能な動物を 5 匹以上、あるいは雄雌両性を用いる場合は、雄雌それぞれが 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）を設定した 2 回の標本作製時点による骨髄を用いる試験では、45 匹の動物が必要となる。



©OECD, (2014)

**用量段階**

25. 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、同一試験実施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(10)。この試験の目的は、最大耐量（MTD）を特定することで、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最高用量と定義され、試験期間の長さに関連した毒性（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用量である (11)。

26. 最高用量は、骨髄に毒性徴候を示す用量とも定義できる。

27. 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、用量設定基準の例外と考えられ、個別の状況により評価する。

28. 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示さない場合、単回投与の最高用量は 2000 mg/kg 体重とする。一方、被験物質が毒性を示す場合、MTD を最高投与用量とし、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**

29. 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（骨髄増殖の低下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よい。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 日間を超える投与期間の場合、限界用量は 1000 mg/kg 体重/日とする。14 日間以内の投与期間の場合、限界用量は 2000 mg/kg 体重/日とする。



©OECD, (2014)

投与

30. 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（33, 34 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

31. 被験物質は通常単回投与とするが、大容量投与を容易にするために分割投与（すなわち、2～3 時間以内の間隔で同一日に 2 回以上投与すること）としてもよい。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。

32. 本試験に対する反復投与による試験の適切性に関しては、入手可能なデータがほとんどない。しかし、本試験の反復投与毒性試験への組み入れが望ましい場合には、毒性量で生じる染色体損傷を有する分裂細胞の消失を回避するよう留意する。こうした組み入れは、最高用量が限界用量以上である場合（29 項参照）および 1 用量群が投与期間中に限界用量を投与される場合に許容できる。他の試験との組み入れが望まれる場合は、小核試験（試験ガイドライン 474）を染色体異常検出のための *in vivo* 試験として選択することを考慮するべきである。

33. 骨髄試料は、単回投与後間隔をおいた 2 時点で採取する。げっ歯類の場合、最初の試料採取は、1.5 倍の正常細胞周期長を完了するのに要する時間（投与後通常 12～18 時間）とする。被験物質の吸収と代謝ならびに細胞周期に及ぼす影響のため必要とされる時間は、染色体異常検出の至適時間に影響するため、次の試料採取は最初の試料採取時点の 24 時間後が推奨される。最初の試料採取時点では、すべての用量群が処理され分析用試料が採取されるべきである。しかしながら、その後の試料採取時点では、最高用量群のみでよい。科学的妥当性に基づき 2 日間以上の投与処法を用いる場合、最終投与後の約 1.5 正常細胞周期長と



©OECD, (2014)

なる 1 回の試料採取時期を通常用いる。

34. 投与後の試料採取前に、動物には適切な用量の分裂中期停止剤（例：コルセミド®またはコルヒチン）を腹腔内投与し、その後適切な時間をおいて試料を採取するマウスの場合、その採取までの時間は約 3～5 時間、ラットの場合は 2～5 時間である。細胞を骨髄から採取後、低張処理、固定および染色し、染色体異常を分析する(12)。

**観察**

35. 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、疾患や死亡がみられないかどうか観察する。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(11)。

**標的組織の曝露**

36. 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、被験物質の血漿濃度測定のために、血液試料を適切な時点で採取する（44 項参照）。

**骨髄および染色体標本**

37. 人道的な安楽死の後ただちに、動物の大腿骨または脛骨から骨髄細胞を採取し、低張溶液で処理し、固定する。そして、確立された方法を用いて、分裂中期細胞をスライドに広げ、染色する（(3)、(12)参照）。

**分析**

38. 分析前に、陽性および陰性対照を含めたすべてのスライドを個別にコード化し、測定者に処理条件が分からないようランダム化する。

39. 全ての処理群（陽性対照を含む）、無処理あるいは媒体／溶媒陰性対照群の動物について、一個体あたり少なくとも 1000 個の細胞から細胞毒性の指標として分裂指数を求める。



©OECD, (2014)

40. 染色体構造異常を、ギャップを含む場合と除く場合について、各個体 200 個以上の分裂中期細胞を分析する(6)。ただし、試験施設の陰性対照の背景データベースにおいて、背景の染色体構造異常の平均出現頻度が 1%未満の場合は、計数する細胞数を増やすことを考慮する。染色分体型と染色体型の異常を区別して記録し、さらに細分類（切断、交換）する。試験施設が用いる手順では、染色体異常の分析は十分な訓練を受けた測定者により実施され、適宜ピアレビュー（第三者検証）を受けるようにする。スライド標本作製手順により、分裂中期細胞の一部に破損を生じることがままあり、その結果染色体を失うことが知られているため、測定する細胞は $2n\pm2$（$n$ は使用動物種の染色体の一倍体の数）までの数のセントロメアを対象とする。

## データおよび報告

### 結果の処理

41. 動物のデータは、個体別に表形式で提示する。各個体について、分裂指数、計数した分裂中期細胞数、分裂中期細胞あたりの異常数および染色体構造異常を有する細胞の割合を評価する。染色体構造異常の型の相違について、処理群および対照群とも、その数および出現頻度を表に示す。ギャップ、倍数性細胞、核内倍加染色体を有する細胞は別途記録する。ギャップの出現頻度は報告するが、通常、構造異常の総出現頻度の分析には含めない。反応に性差の証拠が認められない場合は、雄雌のデータを統合して統計解析してもよい。動物でみ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

42. 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、試験施設の対照背景データベースに追加できるとみなせること（11～14 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（20, 21 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、25～28 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

43. 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



©OECD, (2014)

断される。

a) 少なくとも 1 つの投与群で、染色体構造異常（ギャップを除く）を有する細胞の出現頻度が同時陰性対照と比較して、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。

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文献(13)に示されている。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。染色体異常試験の陽性結果は、被験物質が試験に用いた動物種の骨髄において、染色体構造異常を誘発することを示している。

44. 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、染色体構造異常（ギャップを除く）を有する細胞の出現頻度が同時陰性対照と比較して、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、用量依存的な増加がみられず、

c) すべての結果が、陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に基づく 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文献(13)に示されている。骨髄が被験物質に曝露されたことを示す所見には、分裂指数の減少や被験物質の血漿中または血中濃度の測定等がある。静脈内投与の場合には、曝露証拠は必要ない。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骨髄に染色体構造異常を誘発しないことを示している。

45. 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。

46. もし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。



©OECD, (2014)

47. 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。

48. 全分裂中期細胞中の倍数性ならびに核内倍加を示す細胞の出現頻度は、別途記録する必要がある。倍数性／核内倍加細胞の数の増加は、被験物質が、分裂過程や細胞周期の進行を阻害する可能性があることを示している（3 項参照）。

**試験報告書**

49. 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：*

－媒体の選択理由
－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



©OECD, (2014)

－動物数、週齢および性
－供給元、飼育条件、飼料など
－動物の個体識別法
－短期試験の場合：試験開始時および終了時における個体別の体重；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
－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骨髄に到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
－毒性の測定方法
－分裂中期停止剤とその濃度、用量および投与から試料採取までの時間
－試料の分離および保存手順
－異常の計数基準
－個体あたりの分析した分裂中期細胞数および分裂指数決定のために分析した細胞数
－試験の許容基準
－試験結果を陽性、陰性あるいは結論できないとする基準

*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）
－個体別の分裂指数
－個体別の異常の型と数および異常細胞の数
－各群における異常の総数およびその平均値と標準偏差
－各群における異常を有する細胞数およびその平均値と標準偏差



©OECD, (2014)

－観察された場合、倍数性細胞や核内倍加細胞の出現頻度による倍数性の変化
－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
－骨髄が曝露されたことを裏付けるデータ
－同時陰性対照および陽性対照データ（範囲、平均および標準偏差）
－陰性対照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）
－陽性または陰性反応の基準

*結果の考察*

*結論*

*参考文献*



©OECD, (2014)

## 参考文献


(1) OECD, “Draft Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. Under preparation.

(2) Adler, I.D. (1984), “Cytogenetic Tests in Mammals”, in *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, *Mutation Research*, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) 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.

(5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, *Mutation Research*, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19-30.

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

(8) 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.

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

(10) 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.

(11) 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, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) 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.




**©OECD, (2014)**

## 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]）の染色体数に 1 本または数本の逸脱が生じること。ただし、完全なセットの染色体が倍加する場合は除く（倍数性を参照）。

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。

染色分体型異常：1 本の染色分体の切断または染色分体間の切断および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当該部位での切断および再結合として発現する染色体の構造的損傷。

核内倍加：S 期の DNA 複製後に、核が分裂に移行せず別の S 期を開始するプロセス。その結果、4 本、8 本、16 本…の染色分体数を有する染色体になる。

ギャップ：1 本の染色分体の幅より狭く、染色分体とのずれが最小限の非染色性領域。

分裂指数：細胞集団中の分裂期にある細胞数と総細胞数との比で、当該細胞集団の増殖状況の指標となる。

数的異常：用いた動物の染色体数が正常な規定数から変化すること（異数性）。

倍数性：染色体の完全なセットの数が変化する染色体の数的異常のことで、染色体数のセットの一部における数の変化ではない（異数性を参照）。

染色体構造異常：分裂中期にある細胞を顕微鏡検査することにより検出される染色体の構造変化で、欠失と断片、染色(分)体内交換または染色(分)体間交換として示される。



©OECD, (2014)

## 補遺 2

## *In vivo* 染色体異常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、各投与量あたりの動物数を最低雄 5 匹および雌 5 匹とし、最低 40 匹の動物（雄 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、より単純化した要因設計の 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, (2014)

*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, (2014)**