OECD/OCDE

1997/07/21

試験ガイドライン No.476

哺乳類細胞の *In vitro* 遺伝子突然変異試験

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. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation 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-476-1997.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

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

哺乳類細胞の *In vitro* 遺伝子突然変異試験

はじめに

1. 哺乳類細胞の *In vitro* 遺伝子突然変異試験は、化学物質が誘発する遺伝子突然変異を検出するのに用いることができる。適切な細胞株としては、マウスリンパ腫細胞 L5178Y、チャイニーズハムスター細胞株 CHO、AS52 と V79 およびヒトリンパ芽球様細胞 TK6 などがある(1)。これらの細胞株で最も一般的に用いられる遺伝的評価項目は、チミジンキナーゼ（TK）とヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）の突然変異とキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XPRT）の導入遺伝子の突然変異を測定することである。TK、HPRT および XPRT 突然変異試験は、異なる範囲の遺伝的現象を検出する。TK と XPRT の常染色体局在は、X 染色体上の HPRT 座で検出されない遺伝現象（例えば、大きな欠失）の検出を可能にするであろう(2)(3)(4)(5)(6)。

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. 哺乳類細胞の *In vitro* 遺伝子突然変異試験では、樹立細胞系または細胞株の培養を用いることができる。使用する細胞は、培養下での増殖能と自然発生的な突然変異発生頻度の安定性に基づいて選択する。*in vitro* の試験は、通常、外因性の代謝活性物質を必要とする。*in vitro* の代謝活性化系では哺乳類の *in vivo* 状況を完全に再現することはできないので、変異原性を反映せず、pH や浸透圧の変化、また高い細胞毒性によって生じることがある陽性結果の条件を避けるよう注意を払う(7)。

4. 本試験は、哺乳類の変異原性および発がん性をスクリーニングするときに用いる。本試験で陽性を示す多くの物質は哺乳類で発がん性を有するが、本試験と発がん性との間に完全な相関関係はない。相関関係は化学物質の種類によって異なり、遺伝毒性に依存しない機序または上記の細胞では検出し難い機序によって作用するために、本試験では検出されない発がん性物質があるという証拠が増加している。

試験の概要

5. 突然変異 $TK^{+/-}\rightarrow TK^{-/-}$によるチミジンキナーゼ（TK）欠損細胞は、ピリミジン類縁体トリフルオロチミジン（TFT）の細胞障害効果に抵抗性がある。チミジンキナーゼ保持細胞は TFT に感受性で、細胞性代謝が抑制された結果、細胞分裂を停止する。このように変異体細胞は TFT 存在下で増殖できるが、チミジンキナーゼを持つ正常な細胞は増殖できない。同様に、HPRT または XPRT を欠損する細胞は 6-チオグアニン（TG）または 8-アザグアニン（AG）に抵抗性の細胞として選択される。塩基類縁体または選択薬剤と関連する化合物を

哺乳類細胞遺伝子突然変異試験のいずれかで試験する場合には、その被験物質の性質を注意深く考慮する必要がある。例えば、突然変異細胞と非突然変異細胞の両方を用いて、被験物質が選択毒性を示すかどうか検査しなければならない。このように、被験化学物質が構造的に選択薬剤に関連する場合には、選択システム／薬剤の能力について確認しなければならない。

6. 細胞懸濁液または単層培養細胞を、代謝活性化系存在下および非存在下で適切な時間で被験物質に暴露した後、継代培養して細胞毒性を決定し、表現型を発現させた後、突然変異体を選択する(9)(10)(11)(12)(13)。細胞毒性は通常、処理期間の後、培養の相対的なコロニー形成率（生存率）または相対増殖率を測定することにより決定できる。処理した細胞を増殖用の培地で維持するが、十分な培養期間（選択された各遺伝子座と細胞型に特有の時間）を設定して誘導された突然変異の表現型発現が至適な状況に達するように配慮する。突然変異頻度は、突然変異細胞を検出するための選択薬剤を含んでいる培地に、またコロニー形成率（生存数）を測定するために選択薬剤を含まない培地に、それぞれ既知の細胞数を接種することにより決定する。適切な時間培養後、コロニーを計測する。突然変異頻度は、選択培地の突然変異コロニー数と非選択培地のコロニー数から計算できる。

試験方法

準備

細胞

7. L5178Y、CHO、AS52、V79 または TK6 細胞のサブクローンを含む多様な種類の細胞が、この試験に利用できる。この試験で使用する細胞のタイプは突然変異誘発化学物質に対する感受性やコロニー形成率が高いこと、および自然突然変異頻度が安定していることが証明されたものでなければならない。また、細胞にマイコプラズマが感染していないかを確認し、感染している場合は使用してはならない。

8. 試験には、予め定められた感度と解析能力（分解能）が備わっていなければならない。これらのパラメータを反映するように、細胞数、培養数および被験物質の濃度を決める(14)。処理後生き残った最小生存細胞数ならびに試験の各ステージにおいて使用した最小生存細胞数は、自然突然変異頻度に基づくはずである。一般的な目安としては、自然突然変異頻度の逆数の 10 倍以上の細胞数を使用することになる。ただし、少なくとも 10^6 の細胞を利用することを推奨する。試験で使用する細胞システムを用い、一貫して有効な試験成績が得られたことを証明するのに十分な背景データが必要である。

培地と培養条件

9. 適切な培養培地、培養条件（培養容器、温度、CO_2 濃度、湿度）を使用する。試験で使用する選択システムと細胞の種類に合わせて培地を選択する。突然変異細胞と非当然変異細胞の発現期における至適増殖およびコロニー形成能を保つように、培養条件を選択することが特に重要である。

培養の準備

10. 細胞は保存培養から増殖させて培地に接種し、37°C で培養する。この試験での使用に先立って、すでに存在する突然変異細胞を除去する必要があるだろう。

代謝活性

11. 細胞を、適切な代謝活性化系存在下および非存在下で被験物質に暴露する。通常よく用いられる系は、Aroclor 1254 などの酵素誘導剤 1254(15)(16)(17)(18)で処理したものか、またはフェノバルビトンとβナフトフラボン(19)(20) を併用した、げっ歯類の肝臓から得た補酵素を添加したミクロソーム画分(S9) である。ミクロソーム画分は、最終培地中 1～10% v/v の濃度を用いる。代謝活性化系の選択と条件は、試験された被験化学物質の種類に依存する可能性がある。場合によっては、複数の濃度のミクロソーム画分を用いる方が良いかもしれない。特異的な活性化酵素を発現するよう遺伝子工学的に構築された細胞など、多くの進歩により内因性活性化系が使用できるようになるだろう。細胞系の選択は科学的に正当であること（被験物質の代謝に関するチトクロム P450 アイソザイムとの関連など）。

被験物質／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、被験物質と化学反応を起こす疑いがないものを用い、細胞の生存と S9 活性がともに適合できるようにする。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。被験物質が水に不安定であれば、有機溶媒に水が混ざらないこと。水はモレキュラーシーブを加えて除去する。

暴露濃度

14. 最高濃度を決定する際に考えられる基準には、細胞毒性、試験系での溶解性、pH や浸透圧の変化がある。

15. 細胞毒性は代謝活性化系存在下および非存在下に主実験で決定すべきであるが、その際、相対コロニー形成率（生存率）または相対増殖率のように、細胞の健全性および増殖性を示す適切な指標を用いる。予備試験で細胞毒性と溶解性を測定するのは有用であろう。

16. 少なくとも 4 つの濃度で行われた分析可能なデータが必要である。 細胞毒性がみられる場合、濃度は最高から毒性がほとんどないか、または全くない濃度までを網羅する。このことは通常、濃度が 2～√10 を超えない係数によって分けられることを意味する。次に、最大濃度を細胞毒性に基づいて決める場合、相対生存率（相対コロニー形成率）または相対増殖率が、ほぼ 10～20%（10%未満は不可）になるよう決定する。比較的毒性のない物質では、最高濃度は 5 µL/mL、5 mg/mL、0.01 M の最も低いものとする。

17. 比較的不溶性の物質は、培養条件下で溶解度の限度またはそれを越えて試験する。不溶性については、細胞を被験物質に暴露する最終処理培地を用いて、その証拠を明らかにする。細胞、S9、血清などの存在下で試験系の暴露中に溶解性が変化することがあるため、試験開始時および終了時の溶解性を評価するのに有用である。不溶性は肉眼的に検出し得るが、沈殿物は計数を妨害しないこと。

対照

18. 各実験には、代謝活性化系存在下および非存在下で、同時に実施した陽性および陰性（溶剤または溶媒）対照を含める。代謝活性化系存在下の場合、陽性対照は変異原性反応をもたらす活性のある物質とする。

19. 陽性対照物質の例には、以下ものが含まれる。

代謝活性化条件	遺伝子座	化学物質および CAS 番号
外因性代謝活性化非存在下	HPRT	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]
	TK（小さなコロニーと大きなコロニー）	メタンスルホン酸メチル[CAS 番号 66-27-3]
	XPRT	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]
外因性代謝活性化存在下	HPRT	3‐メチルコラントレン[CAS 番号 56-49-5] N-ニトロソジメチルアミン[CAS 番号 62-75-9] 7,12-ジメチルベンズアントラセン[CAS 番号 57-97-6]
	TK（小さなコロニーと大きなコロニー）	シクロフォスファミド（一水和物）[CAS 番号 50-18-0（6055-19-2）] ベンゾピレン[CAS 番号 50-32-8] 3-メチルコラントレン [CAS 番号 56-49-5]
	XPRT	N-ニトロソジメチルアミン（高レベルの S-9 に対して）[CAS 番号 62-75-9] ベンゾピレン[CAS 番号 50-32-8]

20. 他の適切な陽性対照物質を用いることもできる。例えば、試験機関に 5-ブロモ 2’-デオキシウリジン[CAS 番号 59-14-3]に関する背景のデータベースがある場合、この参照物質を用いることができる。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。

21. 試験培地が溶剤または溶媒のみから成る陰性対照は、投与群と同様に扱う。選択した溶剤が有害作用や変異原性作用を誘発しないことを示す背景データがない限りは、無添加の対照を用いる。

手順

被験物質の添加

22. 増殖細胞に代謝活性化系存在下または非存在下の状態で、被験物質を添加する。適切な期間（通常、3〜6 時間が効果的）にわたって暴露する。暴露時間は 1 細胞周期またはそれ以上に延長してもよい。

23. 各濃度につき、二連または単一の処理培養プレートを使用する。単一の培養プレートのみを使用する場合は、分析する培養プレート数を確保するために設定する濃度の数を増加する（例えば、少なくとも 8 つの分析可能な濃度）。二連の陰性（溶剤）対照培養を設定する。

24. 気体または揮発性物質は密封した培養容器などの適切な方法で試験する(21)(22)。

生存率、生菌数および突然変異頻度の測定

25. 暴露期間終了時に細胞を洗浄し、生存細胞数決定と変異体表現型発現のために、更に培養する。相対コロニー形成率（生存率）を測定または培養の相対増殖率を測定し、それによって細胞毒性を決定するのは通常、暴露期間終了後に始める。

26. 新しく誘導された変異体が表現型を至適に発現するための最小時間は各遺伝子座によって決まっている（HPRT と XPRT では、少なくとも 6〜8 日、TK では最低 2 日を必要とする）。選択薬剤存在下および非存在下で細胞を増殖させ、それぞれ変異体数およびコロニー形成率を決定するために使用する。発現期間終了時に選択薬剤非存在プレートに播種することによって、生菌数（突然変異頻度の算出に使用）の測定を開始する。

27. 被験物質が L5178Y $TK^{+/-}$試験で陽性の場合、試験培養のうちの少なくとも 1 つ（最高の陽性濃度）と陰性および陽性対照についてコロニーサイズ測定を実施する。被験物質が L5178Y $TK^{+/-}$試験で陰性の場合は、陰性および陽性対照についてコロニーサイズ測定を実施する。TK6$TK^{+/-}$を用いる試験においても、コロニーサイズ測定を実施する場合もある。

データおよび報告

結果の処理

28. データには、処理培養および対照培養について細胞毒性と生菌数測定値、コロニー数と突然変異頻度を含める。L5178Y $TK^{+/-}$試験が陽性反応の場合、被験物質の少なくとも 1 つの濃度（最高の陽性対照濃度）、ならびに陰性および陽性対照に関して、コロニーの大小を基準にしてコロニーをスコア化する。大きなコロニーの変異体および小さなコロニーの変異体の分子的および細胞遺伝学的性質については、詳細に調べられている(23)(24)。$TK^{+/-}$試験では正常な増殖を大きなコロニーとし、緩やかな増殖を小さなコロニーとする基準を用いて、コロニーをスコア化する(25)。最も大きな遺伝的損傷を負った突然変異細胞では倍加時間が延長するので、形成されるコロニーは小さい。この損傷は、概して全遺伝子の損失から核型識別可能な染色体異常まで幅広く変動する。小さなコロニー突然変異体の誘導には、高度の染色体異常を誘発する化学物質が係ることが知られている(26)。損傷の深刻さがより低い突然変異細胞は、親株細胞と類似の速度で増殖して大きなコロニーを形成する。

29. 生存率（相対コロニー形成率）または相対増殖率についてのデータを記載する。突然変異頻度は、生存細胞数に対する突然変異細胞数の比として表す。

30. 培養ごとのデータを報告する。更に、動物の個体ごとのデータは総括表として示す。

31. 明らかな陽性反応の検証は必要ではない。不確かな結果については実験条件を修正した追加の試験を行い、明らかにする。陰性の結果は、それぞれの状況に応じて再確認する必要がある。陰性結果の確認が不要であると考える場合は、正当な理由付けが必要である。疑わしい、または陰性の結果に関して試験パラメータを修正し評価条件の範囲を広げることは、追跡試験にて考慮する。修正する可能性のある試験パラメータには、維持濃度および代謝活性条件を含む。

結果の評価と解釈

32. 突然変異頻度が濃度と相関するとか、突然変異頻度が増加するなど、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。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。

33. 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。

34. 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。

35. 哺乳類細胞の *In vitro* 遺伝子突然変異試験の陽性結果は、被験物質が試験に使用した哺乳類細胞で遺伝子突然変異を誘発することを意味する。再現性ある陽性濃度反応関係が最も重要である。陰性の結果は、試験条件下では被験物質が試験で用いた哺乳類細胞の遺伝子突然変異を誘発しないことを意味する。

試験報告書

36. 試験報告書には、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性状
- 被験物質の安定性

溶剤／溶媒
- 溶剤／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

細胞
- 細胞の種類および供給元
- 細胞培養数

- 該当する場合、継代数
- 該当する場合、細胞培養の維持方法
- マイコプラズマ陰性

試験条件

- 濃度および細胞培養数に関する理論的根拠（もしあれば、細胞毒性データ、溶解度の限界など
- 培地の組成、CO_2 濃度
- 被験物質の濃度
- 添加した溶媒および被験物質の体積
- 培養温度
- 培養時間
- 処理期間
- 処理期間の細胞密度
- 許容基準を含む代謝活性化系の種類と構成
- 陽性および陰性対照
- 発現期の長さ（該当する場合、播種細胞数、継代および培地交換のスケジュールも含む）
- 選択薬剤
- 陽性、陰性、不確かな結果を示す試験の基準
- 生存細胞数および変異細胞数を数値化する方法
- 大きさとタイプを考慮したコロニーの定義（該当する場合、「小さな」と「大きな」コロニーの基準を含む）

結果

- 毒性の徴候
- 沈殿の徴候
- 測定した場合、被験物質への暴露期間の pH および浸透圧に関するデータ
- 少なくとも陰性および陽性対照についてスコア化したなら、コロニーサイズ、
- 必要に応じて、L5178Y $TK^{+/-}$系を用いて小さなコロニー変異体を検出することに関する試験機関の妥当性
- 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（溶剤／溶媒）と陽性対照データ
- 範囲、平均および標準偏差を伴う背景の陰性（溶剤／溶媒）および陽性対照データ
- 突然変異頻度

結果の考察

結論

参考文献

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

(2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467-485.

(4) Moore, M.M., Harrington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394- 403.

(5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/ HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, L., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. Mutation Res., 115, 225-251.

(9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

(10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(11) Liber, H.L., Yandell, D.W. and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the tk and hprt Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res. 160, 133-147.

(13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK+/- - TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al. (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, 61-108.

(18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (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., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

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

(22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, 795-801.

(23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 51-55.

(24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 161-174.

(25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutat. Res., 229, 89-102.

(26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, 609-614.

補遺

定義

正突然変異：親型から突然変異型への遺伝子の突然変異で、その結果、酵素活性またはコード化されたタンパク質の機能変化または損失を生じる。

塩基対置換型変異原物質：DNA の一対または数対の塩基対の置換を引き起こす物質。

フレームシフト型変異原物質：DNA 分子で一対または複数の塩基対の付加または欠失を引き起こす物質。

表現型発現時間：新たな突然変異細胞中に残っている、変化していない（正常な）遺伝子産物が消失するまでの期間。

突然変異頻度：突然変異細胞数を生存細胞数で割った値。

相対増殖率：時間経過に伴う対照細胞数に対する細胞数の増加で、（陰性対照に対する相対懸浮遊細胞増殖率）×（陰性対照に対する相対コロニー形成率）として計算される。

相対浮遊細胞増殖率：陰性対照に対する発現期間中の細胞数増加。

生存数：発現期間後に選択薬剤存在下でプレートに播種するときの被験物質処理細胞のコロニー形成率。

生存率：処理期間の終わりにプレートに播種するときの処理細胞のコロニー形成率。生存率は通常、対照細胞集団の生存に対する比率で表される。