OECD/OCDE

2015/07/28

試験ガイドライン No.476

Hprt 遺伝子と*xprt* 遺伝子を用いる哺乳類細胞の
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.

Reference:

OECD (2016), Test No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264809-en.

©OECD(2015)

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

2015年7月28日　採択

OECDの化学物質の試験に関するガイドライン

*Hprt*遺伝子と*xprt*遺伝子を用いる哺乳類細胞の*in vitro*遺伝子突然変異試験

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を踏まえて定期的に見直されている。試験ガイドライン476（TG476）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年近くにわたる本試験の実施経験を反映したものであり、チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の*in vitro*遺伝子突然変異試験に特化した新たなガイドライン（TG490）の作成に伴うものである。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。現在作成中のガイダンス文書は、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となるであろう。

2. 哺乳類細胞の*in vitro*遺伝子突然変異試験は、化学物質によって誘発される遺伝子突然変異を検出することを目的としている。これらの試験に用いられる細胞株で、レポーター遺伝子、特に内因性ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（げっ歯類細胞では*Hprt*、ヒト細胞では*HPRT*で、本ガイドラインでは*Hprt*遺伝子およびHPRT試験と総称する）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導入遺伝子（*gpt*）（XPRT試験と称する）の前進突然変異を測定する。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。HPRT試験で検出される遺伝的現象（例：塩基対置換、フレームシフト、小さな欠失と挿入）に加え、*gpt*導入遺伝子が常染色体に局在しているXPRT試験では、*Hprt*遺伝子がX染色体上にあることからHPRT試験では検出されない大きな欠失から生じた突然変異や体細胞組み換えの検出も可能と考えられている(1)(2)(3)(4)(5)(6)。今のところ、XPRT試験は、規制対応の目的としては、HPRT試験ほど広く使われてはいない。

3. 用語の定義を補遺1に示す。

© OECD, (2015)

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および限界

4. *In vitro*で実施する試験は、一般的に外因性の代謝活性物質を利用する必要がある。外因性代謝活性化系は*in vivo*での状況を完全に再現するものではない。

5. 見せかけの陽性結果、すなわち被験物質の細胞の遺伝物質への直接的相互作用ではなく、試験系との相互作用に起因する陽性結果が起こるような条件を避けるよう注意を払う必要がある。そのような条件には、pHや浸透圧の変化(7)(8)(9)、培地成分との相互作用(10)(11)、または、過度の細胞毒性(12)などが含まれる。19項で示した推奨最高レベルを超える細胞毒性は、HPRT試験において過度に当たると考えられる。

6. 混合物について、規制対応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。

試験の概要

7. 突然変異細胞は、HPRT試験では*Hprt*酵素活性、またはXPRT試験では*gpt*酵素活性 [訳注：原文の*xprt*は間違い] を欠損しておりプリン類縁体も6-チオグアニン（6-TG）の細胞毒性作用に抵抗性がある。*Hprt*保持細胞（HPRT試験）または*gpt*保持細胞（XPRT試験）は、6-TGに対して感受性があり、細胞性代謝が抑制され、細胞分裂を停止する。このように、変異体細胞はTG 存在下で増殖できるが、*Hprt*酵素（HPRT試験）またはgpt酵素（XPRT試験）を保持する正常な細胞は増殖できない。

8. 懸濁培養または単層培養の細胞を、外因性代謝活性化系（14項参照）の存在下および非存在下で、適切な時間（3～6時間）被験物質に曝露した後、継代培養して細胞毒性を決定し、形質を発現させた後、突然変異体を選択する(13)(14)(15)(16)。細胞毒性は相対生存率（RS）、すなわち被験物質処理直後のコロニー形成率を処理中の細胞消失で補正し、陰性対照と比較して示される（18項、補遺2参照）。処理した細胞は、誘発された突然変異形質発現が至適となるように、増殖培地で十分な期間（各細胞株固有の時間）培養する（通常は最低7～9日間）。発現期間経過後、突然変異体コロニーを検出するための選択薬剤を含んでいる培地、およびコロニー形成率（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播種することにより、突然変異体頻度を決定する。適切な培養時間後に、コロニーを計測する。突然変異体頻度は、変異体選択時のコロニー形成率で補正された変異体コロニー数に基づき算出される。

試験方法

準備

細胞

9. HPRTおよびXPRT試験で使用する細胞株は変異原物質に対する感受性が示されていること、コロニー形成率が高いこと、核型が安定であること、および自然突然変異体頻度が安定していることを示す必要がある。HPRT試験で最もよく用いられる細胞は、チャイニーズハムスター細胞株のCHO、CHL、およびV79と、マウスリンパ腫細胞L5178Y、およびヒトリンパ芽球様細胞TK6である(17)(18)。XPRT試験では、*gpt*導入遺伝子を保有するが*Hprt*遺伝子を欠損しているCHO由来のAS52細胞が使用される(19)(20)。つまり、AS52細胞は、*hprt*遺伝子を欠損しているため、HPRT試験では使用できない。他の細胞株を使用する場合には、その妥当性を示す必要がある。

10. 細胞株は定期的に染色体モード数の安定性を検査し、マイコプラズマの汚染がないことを確認する(21)(22)。マイコプラズマ汚染がある場合または染色体モード数が変化した場合には、その細胞を使用すべきではない。試験施設で使用する細胞は、正常な細胞周期時間が把握され、それが公表されている細胞特性に一致している必要がある。保存されているマスターストック細胞の自然突然変異体頻度も確認し、その突然変異体頻度が適切でない場合は使用してはならない。

11. 試験での使用に先立ち、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。例えば、HPRT試験ではHAT培地で、XPRT試験ではMPA培地で培養することにより除去できる(4)(23)（補遺1参照）。除去後の細胞を凍結し、ワーキングストックとして解凍して使用する。新たに解凍した細胞は、通常の倍加時間に到達した後、試験での使用が可能となる。XPRT試験実施の際、AS52細胞の通常の培養は、*gpt*導入遺伝子が確実に維持される培養条件を使用する必要がある(19)。

培地および培養条件

12. 培養の維持には、適切な培地と培養条件（培養容器、5%CO_2の加湿状態、および37°Cの培養温度）を使用する。細胞培養は、必ず対数的に増殖するような条件下で常に維持しなければならない。発現期間における細胞増殖および突然変異細胞と非突然変異細胞のコロニー形成率が最適となる培地と培養条件を選択することが特に重要である。

培養細胞の準備

13. 細胞株は、保存培養から細胞を増殖させ、懸濁状態または単層状態の細胞が処理期間および発現期間を通じて対数増殖を維持できる密度で培養培地に播種する（例：単層培養では、密集状態にならないようにする）。

代謝活性化

14. 内因性の代謝能が不十分な細胞を使用する場合は、外因性の代謝系を用いる必要がある。他に妥当な理由がある場合を除き、通常よく用いられ、既知のものとして推奨される代謝系は、アロクロール1254 (24)(25)(26)(27)またはフェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用(28)(29)(30)(31)などの酵素誘導剤で処理したげっ歯類（通常はラット）の肝臓から調製したミクロソーム画分（S9）に、補酵素を添加した溶液である。フェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用は「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(32)に抵触せず、複合機能オキシダーゼの誘導能はアロクロール1254と同程度に高いことが確認されている(28)(30)。最終的な試験培地中でのS9の濃度は通常1～2%（v/v）を使用するが、10%（v/v）に高める場合もある。使用する外因性代謝活性化系または代謝誘導剤の種類および濃度の選択は、被験物質の種類によっては考慮すべき場合がある(33)(34)(35)。

被験物質の調製

15. 被験物質が固体の場合は、適切な溶媒で溶解し、適宜希釈して細胞に処理する（16項参照）。被験物質が液体の場合は、試験系に直接添加するか、希釈して添加する。被験物質が気体または揮発性の場合は、密封容器内で処理するなど、標準的なプロトコールに適切な修正を加えて試験を実施する(36)(37)。保存可能であることが安定性データによって証明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

16. 試験の実施に有害な影響を及ぼす（例えば、細胞増殖を変化させる、被験物質の特性に影響する、培養容器と反応する、代謝活性化系を障害する）ことがなく、被験物質の溶解性を最適化できる溶媒を選択する。可能な限り、水性の溶媒（または培地）の使用を第一に考慮する。問題なく使用できるとされている溶媒は、水やジメチルスルホキシドである。一般に処理培地中の最終濃度は、有機溶媒では1%（v/v）、水性溶媒（生理食塩水または水）では10%

（v/v）を超えないようにする。それ以外の溶媒（例：エタノール、アセトン）を使用する場合は、それらが被験物質および試験系に影響しないこと、また使用する濃度で遺伝毒性がないことを示すデータによって、その溶媒の使用の正当性を裏付ける必要がある。正当性を裏付けるデータがない場合は、選択した溶媒によって有害な影響も変異原性への影響も誘発されないことを証明するため、無処理対照（補遺1参照）を含めることが重要である。

細胞毒性の測定と曝露濃度の選択

17. 被験物質の最高濃度を決定する際には、見せかけの陽性反応、例えば、過剰な細胞毒性（20項参照）、培養液中の沈殿物（21項参照）、pHや浸透圧の著しい変化（5項参照）などを引き起こす可能性のある濃度は避ける。被験物質を添加した際に培養液のpHが著しく変化する場合は、最終処理培養液を緩衝液で処理してpHを調整することで、見せかけの陽性結果の回避や適切な培養条件の維持ができることがある。

18. 濃度は、細胞毒性と他の考慮すべき事項（20～22項参照）に基づいて選択する。予備試験で細胞毒性を評価することは、本試験で使用する濃度をより明確に決定する上で有用であるが、予備試験の実施は義務付けられてはいない。予備試験において細胞毒性評価を実施した場合でも、本試験における各培養の細胞毒性の測定は必須である。細胞毒性はRSで評価する。すなわち、細胞数に基づいて処理期間中の細胞消失を補正した処理直後のコロニー形成率（CE）を、陰性対照の補正されたコロニー形成率（生存率100%とする）と比較する（計算式については補遺2を参照）。

19. 試験許容基準（適切な細胞毒性、細胞数など）を満たす少なくとも4段階（溶媒および陽性対照を除く）の試験濃度を評価すべきである。2系列の培養を使用するのが望ましいが、試験する各濃度で複数系列または1系列の培養を使用することも可能である。設定した濃度において、それぞれ2系列以上で培養した細胞から得られた結果は、別々に報告すべきであるが、プールしてデータ解析することができる(16)。細胞毒性をほとんど、またはまったく示さない被験物質については、通常、公比約2～3で設定した濃度段階の使用が適している。細胞毒性がある場合は、選択した試験濃度が中等度の細胞毒性を示す濃度および細胞毒性をほとんど、またはまったく示さない濃度を含む必要がある。被験物質には急勾配の濃度反応曲線を示すものが多く、全範囲の細胞毒性を含めるため、または濃度反応関係を詳しく調べるためには、とりわけ確認試験が要求される状況では（43項参照）、濃度間隔のより密な設定や4段階を超える濃度の設定が必要な場合もある。4段階を超える濃度設定は、1系列の培養では特に重要となる可能性がある。

20. 最高濃度が細胞毒性に基づく場合、最高濃度は、RSが10～20%になるように設定する必要がある。陽性の結果が10%以下のRSを示す濃度においてのみ見られる場合には、結果の解釈に

注意を払う必要がある（43項参照）。

21. 被験物質が難溶性で、最低不溶濃度以下の濃度で細胞毒性がない場合は、観察した最高濃度において被験物質処理の終了時に、肉眼または倒立顕微鏡で混濁や沈殿が確認される必要がある。たとえ最低不溶濃度より高い濃度で細胞毒性が生じたとしても、見せかけの影響が沈殿によって生じる可能性があるため、混濁または目に見える沈殿を生じる濃度を1濃度だけ含めるようにすることが望ましい。沈殿を生じる濃度では、沈殿が試験の実施を妨げないよう注意する。実験前に培地での溶解性を測定しておくことが、有用である。

22. 沈殿も、処理濃度を規定する細胞毒性も認められない場合、最高試験濃度は10 mM、2 mg/mLまたは2 μL/mLのうち、最も低い濃度とする(38)(39)。組成が不明な被験物質、例えば、組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料（すなわち、UVCB物質[Substances of Unknown or Variable Composition, Complex reaction products or Biological materials]）(40)、環境抽出物などの場合、十分な細胞毒性を示さない場合は、最高濃度を高くして（5 mg/mLにするなど）、各成分の濃度を高める必要がある。ただし、上記の要件は、人に用いる医薬品では異なる場合があるので注意する(41)。

対照

23. 処理培地に溶媒のみを添加したもので、被験物質処理培養と同じ方法で処理した同時陰性対照（16項参照）を、細胞の試験条件ごとに設ける。

24. 同時陽性対照は、試験施設が用いた試験プロトコールの条件下で変異原物質を検出する能力を備えていること、および、外因性代謝活性化系を使用した場合は、その有効性を証明するために必要である。陽性対照の例を表1に示す。妥当性が示されれば代わりの陽性対照物質を使用してもよい。哺乳類細胞を用いる*in vitro*遺伝毒性試験は、十分に標準化されているため、外因性代謝活性化系の存在下と非存在下の処理を同時に行う試験については、代謝活性化を必要とする陽性対照のみを使用して実施してもよい。この場合、1つの陽性対照の結果で、代謝活性化系の活性と試験系の反応性の両方が証明されると考えられる。試験系の感度を証明するため、それぞれの陽性対照は、再現性があり検出できる背景出現率を超える増加が期待される1つ以上の濃度を設定し、その反応が、試験ガイドラインに規定された限度を超える細胞毒性によるものではないようにする（20項参照）。

表1. 試験施設の習熟度評価および選択する陽性対照として推奨される参照物質

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] 4-ニトロキノリン 1-オキシド[CAS 番号 56-57-5]
	xprt	ストレプトニグリン[CAS 番号 3930-19-6] マイトマイシンC[CAS 番号 50-07-7]
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] 7,12-ジメチルベンズアントラセン[CAS 番号57-97-6] ベンゾピレン[CAS 番号 50-32-8]
	xprt	ベンゾピレン[CAS 番号 50-32-8]

手順

被験物質による処理

25. 代謝活性化系の存在下および非存在下で、増殖中の細胞を被験物質で処理する。適切な期間（通常、3～6時間）曝露する必要がある。

26. 試験の各ステージにおいて、各試験培養（対照および処理）に用いる最小細胞数は、自然突然変異体頻度に基づく必要がある。一般的な目安としては、試験の全ステージで、10個の自然突然変異体を維持するために十分な細胞数を処理、継代することである(16)。自然突然変異体頻度は、通常は$5～20\times10^{-6}$である。5×10^{-6}の自然突然変異体頻度で、90%の細胞毒性（10%RS）を引き起こす濃度で処理された培養であっても、十分な数の自然突然変異体（10個以上）を維持するためには、最低20×10^{6}の細胞を処理する必要があるだろう。加えて、十分な数の細胞（ただし200万未満は不可）を発現期間に培養し、変異体選択用に培養しなければならない(16)。

形質発現期間および突然変異体頻度の測定

27. 処理後は、細胞を培養し、突然変異形質を発現させる。新たに誘発された*Hprt*と*xprt*突然変異体の形質発現が至適な状況に達するには、通常は最低7～9日間で十分である(42)(43)。この期間、対数増殖を維持するため細胞を定期的に継代培養する。形質発現期間後、選択薬剤（6-TG）を含んでいる培地および含んでいない培地に細胞を再播種し、それぞれ突然変異コロニー数および突然変異選択時のコロニー形成率を決定する。この処理は、単層培養ではシャーレ、

懸濁培養ではマイクロウェルプレートにて行われる。突然変異体選択では、変異体の出現に最適な密度で細胞を播種する（つまり代謝協同を避ける）(16)。プレートをコロニー形成に適した期間（例：7～12日間）培養し、コロニーを計数する。突然変異体頻度は、変異体選択時のコロニー形成率で補正された突然変異コロニー数に基づき算出される。（計算式については補遺2を参照）。

<u>試験施設の習熟度</u>

28. 試験施設は、試験を日常的に実施するに先立ち、この試験について十分な経験を積むため、異なる機序で作用する複数の標準的な陽性対照物質（表1に示す物質から、代謝活性化の存在下で作用するものと非存在下で作用するものをそれぞれ少なくとも1つ選択）および各種陰性対照（種々の溶媒／媒体を使用）を用いて一連の実験を行っておく必要がある。これらの陽性対照および陰性対照の反応は文献と一致していなければならない。この必須要件は経験のある、すなわち30～33項で定義した背景データが利用可能な試験施設には適用されない。

29. 陽性対照物質（25項表1参照）は、代謝活性化系の非存在下および存在下で正しく陽性と判定されることによって、変異原物質の検出、代謝活性化系の有効性の判定、および処理中の細胞増殖の条件、突然変異形質発現と突然変異体選択ならびに計数手順の習熟度が妥当であると見なされる。試験系の感度および検出範囲を示すため、選択した物質の濃度範囲は、再現性と濃度依存性があり、背景値を超える増加が認められるように設定する。

<u>背景対照データ</u>

30. 試験実施施設は、下記について確立しておく必要がある：

－陽性対照の背景データの範囲および分布
－陰性（無処理、溶媒）対照の背景データの範囲および分布

31. 最初に陰性対照の背景分布データを得る場合は、公表されている陰性対照データと同時陰性対照のデータが一致していなければならない(21)。対照の分布に追加する実験データの増加に伴い、同時陰性対照は、その分布の95%管理限界の範囲内に収まるのが理想的である(16)(44)(45)。

32. 試験施設の陰性対照の背景データベースは、最初は最低10回の実験によって構築すべきだが、できれば同等な条件下で実施された少なくとも20回の実験によって構築することが望ましい。試験施設は、管理図（例：C管理図、X-バー管理図(46)）などの品質管理の方法を用いて、試験施設における陽性、陰性の両対照データの変動の様子を明らかにし、その試験方法が当該

施設で「管理下にある」ことを示す必要がある(45)。背景データの構築および使用の方法に関するさらなる推奨事項（すなわち、背景データにおけるデータの選択および除外基準ならびに所定の実験の許容基準）が、文献に示されている(44)。

33. 陰性対照のデータは、23項で述べたように、1系列培養あるいは望ましくは2系列以上の培養からの突然変異体頻度で構成される。同時陰性対照は、試験施設の陰性対照の背景データベース分布の95%管理限界内に収まるのが望ましい(16)(44)(45)。同時陰性対照のデータが95%管理限界から外れた場合は、そのデータが極端な外れ値ではなく、試験系が「管理下にある」こと（上記参照）および手技的または人為的なミスがなかったという証拠があれば、対照の背景データの分布に含めることができる。

34. 実験プロトコールに変更がある場合は、試験施設の既存の対照背景データベースのデータとの整合性を考慮する。重大な不一致があった場合には、新たに対照の背景データベースを構築すべきである。

データおよび報告

結果の提示

35. 結果の提示は、細胞毒性（RSで表示）の算出に必要なデータをすべて含める。処理群と対照群の細胞のデータには、処理終了時における細胞数、処理直後の播種細胞数、およびコロニー数（またはマイクロウェル法ではコロニーを含まないウェル数）を含める必要がある。各培養のRSは、同時溶媒対照に対する割合（%）で表す（定義については補遺1参照）。

36. 結果の提示は、突然変異体頻度の算出に必要なデータをすべて含める。処理群と対照群の細胞のデータには、（1）選択薬剤（突然変異体選択用の細胞播種時に使用）の存在下と非存在下で播種した細胞数と、（2）選択薬剤の存在下と非存在下で播種した細胞のコロニー数（またはマイクロウェル法ではコロニーを含まないウェル数）を含める必要がある。突然変異体頻度は、突然変異コロニー数（選択薬剤存在下のプレート）をコロニー形成率（選択薬剤非存在下のプレート）で補正して算出する。突然変異体頻度は、生存細胞100万個あたりの突然変異細胞数で表す（定義については補遺1参照）。

37. 個々の培養のデータを示し、さらに、すべてのデータを表形式に要約する。

許容基準

38. 試験が許容できるかどうかは以下の基準に基づく。

－同時陰性対照は、33項で述べたように、試験施設の陰性対照の背景データベースに追加できるものであること。
－同時陽性対照（24項参照）は、試験施設の陽性対照の背景データベースで得られる反応に一致し、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。
－2つの条件（つまり、代謝活性化の存在下および非存在下）のうち、いずれかで陽性結果が得られていない限り、両条件で試験を実施していること（25項参照）
－適切な細胞数および濃度数で解析可能であること（25、26、19項参照）。
－最高濃度の選択基準が、20、21、22項に述べた条件に適合していること。

結果の評価および解釈

39. すべての許容基準が満たされた、検討したいずれかの実験条件で、以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陽性であると判定される。

a) 少なくとも1つの試験濃度で、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る場合。
b) 適切な傾向検定の評価で、濃度依存性の増加が認められる場合。
c) 当該結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界；33項参照）から外れている場合。

上記基準をすべて満たす場合、被験物質は本試験系で哺乳類培養細胞に遺伝子突然変異を誘発すると判定される。なお、推奨される最適な統計学的手法が文献に発表されている(45)(47)。

40. すべての許容基準が満たされた、検討したすべての実験条件で、以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陰性であると判定される。

a) いずれの試験濃度においても、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ない場合。
b) 適切な傾向検定の評価で、濃度依存性の増加が認められない場合。
c) すべての結果が陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界；33項参照）内に収まる場合。

この場合、被験物質は、本試験系に培養哺乳類細胞の遺伝子突然変異を誘発しないと判定される。

41. 明らかな陽性反応または陰性反応については、確認の必要はない。

42. 得られた結果が上述したような明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、または、結果の生物学的妥当性を確認する必要がある場合には、専門家判断や追加調査によりデータを詳細に評価する必要がある。実験条件の変更（濃度間隔、他の代謝活性化条件[すなわち、S9の濃度またはその由来]）を考慮した再試験の実施が、有用な場合がある。

43. まれに、追加試験を行っても得られたデータセットからは陽性または陰性の結果に関して結論を出せず、そのため被験物質の反応が「不明確」（陽性または陰性が同程度の解釈）と結論される場合もある。

試験報告書

44. 試験報告書には以下の情報を含める。

被験物質：

－入手可能な場合、供給元、ロット番号、使用期限
－被験物質自体の安定性（既知の場合）
－溶媒中における被験物質の溶解性と安定性（既知の場合）
－必要に応じ、被験物質を添加した培地のpH、浸透圧および沈殿の測定結果

単一成分物質：

－外観、水への溶解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物質および混合物：

－構成物質の化学的識別（上記参照）、定量的組成および関連のある物理化学的性質

溶媒：

－溶媒選択の妥当性
－最終的な培地中の溶媒の割合（%）

細胞：

試験施設のマスター培養の場合：

－細胞株の種類と供給元
－継代数、試験施設の継代履歴（情報があれば）
－核型の特性や染色体のモード数

－細胞培養の方法
－マイコプラズマの汚染のないこと
－細胞倍加時間

試験条件

－濃度および培養系列数の選択の根拠（細胞毒性データと溶解限界等を含む）
－培地の組成、CO_2濃度、湿度
－培地中での被験物質の最終濃度（例：μg/mL、mg/mLまたはmM）
－培地に添加する溶媒と被験物質の濃度（および容量）
－培養温度
－培養時間
－処理時間
－処理中の細胞密度
－代謝活性化系の種類および組成（S9の供給元、S9 mixの調製方法、最終培地におけるS9 mixとS9の濃度または容量、S9の品質管理）
－陽性および陰性対照物質と各処理条件での最終濃度
－発現期の長さ（必要に応じ、播種細胞数、継代培養および培地交換のスケジュールも含む）
－選択薬剤およびその濃度
－試験の許容基準
－生存細胞数および変異細胞数の計算方法
－細胞毒性の測定に用いた方法
－細胞毒性と使用した方法に関する補足情報
－プレート播種後の培養時間
－試験結果を陽性、陰性または不明確と判定する基準
－pH、浸透圧および沈殿の測定に用いた方法

結果：

－各培養について処理した細胞数および継代培養した細胞数
－細胞毒性の測定値、もしあればその他の測定事項
－沈殿の有無およびその観察時期
－選択培地と非選択培地におけるプレートに播種された細胞数
－非選択培地のコロニー数と選択培地の抵抗性コロニー数、および関連する突然変異体頻度
－可能な場合、濃度反応関係
－同時陰性（溶媒）対照と陽性対照のデータ（濃度および溶媒）
－陰性（溶媒）および陽性対照の背景データ（範囲、平均、標準偏差およびデータ数と同様の信頼区間（例：95%）を含める）
－統計解析（個々の培養、該当する場合プールした複数系列培養）と、もしあればp値

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 Report 28: 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) 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. Mutagen. Res.,4, 394-403.

(4) 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.

(5) 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.

(6) 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.

(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) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(9) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(10) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(11) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(12) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 584 1–256.

(13) 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.

(14) 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.

(15) 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.

(16) 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. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(17) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(18) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(19) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(20) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620. (21) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(22) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(23) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(24) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(25) 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.

(26) 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.

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

(28) 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. Mutagen. 7, 175-177.

(29) 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.

(30) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(31) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(32) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int.html].

(33) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(34) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(35) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(36) Krahn D.F., Barsky F.C. and 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.

(37) 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. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(38) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.

(39) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(40) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, [http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt].

(41) USFDA. (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(42) O'Neill J.P., and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(43) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

(44) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(45) OECD. (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No. 199.) , Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(46) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(47) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

補遺1

用語の定義

塩基対置換型変異原物質：DNAの塩基対の置換を引き起こす物質。

コロニー形成率：低い密度で播種された細胞に対し、計数可能なコロニーにまで増殖可能な細胞の割合。

濃度：培地中の被験物質の最終濃度をいう。

細胞毒性：本試験ガイドラインで述べる試験の場合、処理した細胞の相対生存率が陰性対照よりも減少する事象として示される（18項および補遺2参照）。

前進突然変異：親型から突然変異型への遺伝子の突然変異で、その結果、酵素活性または該当タンパク質の機能に変化または消失を生じる。

フレームシフト型変異原物質：DNA分子中に、一対または複数の塩基対の挿入または欠失を引き起こす物質。

遺伝毒性：DNAや染色体のあらゆる種類の損傷の総称。DNA切断、付加体、再配列、遺伝子突然変異、染色体構造異常ならびに異数性が含まれる。すべてのタイプの遺伝毒性作用が突然変異や安定した染色体損傷を起こすわけではない。

HAT培地：ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地。*Hprt*突然変異細胞を除去する際に使用。

体細胞組み換え：細胞分裂中の相同な染色分体間の組み換えで、DNAの二本鎖切断の誘発またはヘテロ接合体の消失をもたらす可能性がある。

MPA培地：キサンチン、アデニン、チミジン、アミノプテリン、およびミコフェノール酸を含む培地。Xprt突然変異細胞を除去する際に使用。

変異原性：遺伝子のDNA塩基対配列または染色体の構造に継世代的変化を引き起こす性質（染色体の場合、染色体異常）。

突然変異体頻度（MF）：突然変異コロニー数を選択培地に播種した細胞数で除した値で、突然変

異選択時のコロニー形成率（生存率）で補正される。

形質発現期間：遺伝的変化がゲノム内で固定され、既存の遺伝子産物が枯渇し、遺伝的形質が変化するまでの処理後の時間。

相対生存率（RS）：RSは処理関連細胞毒性の測定に使用される。処理中の細胞消失を補正した、処理直後の播種細胞のコロニー形成率を、陰性対照のコロニー形成率（生存率100%とする）と比較した値。

S9肝画分：肝臓のホモジネートを9000×gで遠心分離した後の上清、すなわち生の肝臓抽出物。

S9 mix：S9肝画分と、代謝酵素の活性化に必要な補因子の混合物。

溶媒対照：被験物質を溶解するのに用いた溶媒のみを添加する対照培養を指す一般的用語。

無処理対照：いかなる処理も受けない（すなわち、被験物質でも溶媒でも処理しない）が、それ以外は、被験物質で処理する培養細胞と同じ方法で同時に処理する対照培養。

補遺2

細胞毒性と突然変異体頻度測定の計算式

細胞毒性は、相対生存率（RS）で評価する。すなわち被験物質処理による細胞消失を補正した処理期間直後の播種細胞のコロニー形成率を、同様に補正した陰性対照のコロニー形成率（生存率100%とする）と比較した値で表す（RS計算式については以下参照）。

被験物質で処理された培養の補正されたCEの計算式：

$$\text{補正CE} = \text{CE} \times \frac{\text{処理終了時の細胞数}}{\text{処理開始時の細胞数}}$$

被験物質で処理された培養のRSの計算式：

$$\text{RS} = \frac{\text{処理培養の補正CE}}{\text{溶媒対照の補正CE}} \times 100$$

突然変異体頻度は、選択培地の突然変異コロニーのコロニー形成率を突然変異選択時の非選択培地のコロニー形成率で除した値で表す。

$$\text{突然変異体頻度} = \frac{\text{選択培地における突然変異コロニーのコロニー形成率}}{\text{非選択培地におけるコロニー形成率}}$$

プレートがコロニー形成率に使用される場合：

CE＝コロニー数／播種細胞数

マイクロウェルプレートがコロニー形成率に使用される場合：

マイクロウェルプレートの1ウェルあたりのコロニー数はポアソン分布に従う。

コロニー形成率＝-lnP(0)／1ウェルあたりの播種細胞数

-ln P（0）は、播種したウェルのうち、細胞が存在しない推定ウェル数で、以下の計算式で示す。

lnP(0) = -ln（細胞が存在しないウェル数／細胞播種したウェル数）