OECD/OCDE

2016/07/29

# 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.

Original work:

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(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

OECD/OCDE 476
採択
2016 年 7 月 29 日

# 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

## *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 TG476 改訂版は、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専用の別の新たなガイドライン作成にも由来する。TG476 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。遺伝毒性試験およびその試験ガイドラインに行われた近年の変更概要について、簡潔な情報を示す文書が作成されている（1）。

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により、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、様々な範囲の遺伝的現象を検出する。HPRT 試験で検出される突然変異事象（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 導入遺伝子を常染色体に位置付けることで、*Hprt* 遺伝子が X 染色体上に位置付けられることから、HPRT 試験により検出されない大きな欠失や可能性としての有糸分裂組み換えに起因する突然変異の検出を行えると考えられる（2）（3）（4）（5）（6）（7）。XPRT 試験は、規制目的では現在 HPRT 試験ほど広く用いられていない。

3. 用いる用語の定義を補遺 1 に示す。

### 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用いる必要がある。外因性代謝活性化系により、*in vivo* での状況が完全に模倣されるわけではない。

5. 被験化学物質と細胞の遺伝物質との直接的な相互作用では生じない、人為的な陽性結果（すなわち、試験系との相互作用である可能性）に導くと考えられる条件は、回避するよう注意を払う必要がある。そうした条件には、pH または浸透圧の変化（8）（9）（10）、培地成分と



© OECD, (2016)
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

本ガイドラインは、書面による手続により 2016 年 7 月 29 日に OECD 理事会で採択された［C(2016)103］。

の相互作用（11）（12）、あるいは、過剰なレベルの細胞毒性（13）が挙げられる。19 項で定義される推奨最高細胞毒性レベルを超える細胞毒性は、HPRT 試験では過度とみなされる。

6. 規制上の目的を意図したデータ生成の場合、混合物について本試験ガイドラインを用いる前に、当該混合物がその目的に十分な結果を提示できるか否か、また提示できる場合にはその理由を検討する。当該混合物の試験に関する規制上の要件がある場合、こうした検討は不要である。

## 試験の概要

7. HPRT 試験における Hprt 酵素活性、あるいは XPRT 試験における xprt 酵素活性を欠く突然変異細胞は、プリン類縁体である 6-チオグアニン（TG）の細胞分裂停止作用に耐性となる。（HPRT 試験での）Hprt または（XPRT 試験での）gpt が機能する細胞には TG に感受性があり、細胞代謝の阻害およびさらなる細胞分裂の停止をもたらす。したがって、突然変異細胞は TG 存在下で増殖できるが、（HPRT 試験での）Hprt 酵素あるいは（XPRT 試験での）gpt 酵素を含有する正常細胞は増殖できない。

8. 浮遊培養細胞または単層培養細胞を、外因性代謝活性化系（14 項参照）の存在下および非存在下の両方で適切な時間（3～6 時間）被験化学物質に曝露後、継代培養により細胞毒性を判定し、表現型発現を可能にしてから突然変異体を選択する（14）（15）（16）（17）。細胞毒性は相対生存率（RS）、すなわち、処理直後に測定され、処理中の何らかの細胞喪失について補正されたクローニング効率と、陰性対照との比較により判定される（18 項および補遺 2 参照）。処理された培養物は、誘発される突然変異の表現型発現が最適に近くできるよう、各細胞型特有の十分な期間（通常は最低 7～9 日間）増殖培地で維持する。表現型発現後、突然変異コロニー検出のため選択薬剤を含有する培地、および、クローニング効率（生存率）判定のため選択薬剤を含有しない培地に、既知細胞数を播種することで突然変異の頻度を判定する。適切なインキュベーション時間後に、コロニーを計測する。突然変異の頻度は、突然変異体選択時のクローニング効率により補正された突然変異コロニー数に基づき算出される。

## 試験方法に関する説明

### 準備

#### 細胞

9. HPRT 試験および XPRT 試験に用いられる細胞型は、変異原性化学物質に関する感受性が立証されていること、クローニング効率が高いこと、核型が安定していること、および自然発生突然変異頻度が安定していることが必要である。HPRT 試験で最もよく用いられる細胞には、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 が挙げられる（18）（19）。XPRT 試験では、*gpt* 導入遺伝子を含有（*Hprt* 遺伝子を欠損）している CHO 由来の AS52 細胞が用いられ（20）（21）、hprt 遺伝子を欠損しているため、AS52 細胞では HPRT 試験を実施できない。他の細胞株を用いる場合には、その正当性を示しバリデートする必要がある。

10. 細胞株では定期的に染色体モード数の安定性、およびマイコプラズマ汚染がないことを確認し（22）（23）、汚染されている場合または染色体モード数が変化した場合、その細胞を使用



© OECD, (2016)

すべきではない。試験施設で用いられる正常細胞の周期時間が確立され、公表されている細胞特性と一致している必要がある。マスター細胞ストックの自然発生突然変異頻度も確認し、突然変異の頻度が許容不能である場合、このストックは使用すべきではない。

11. 本試験での使用に先立ち、例えば、HPRT 試験では HAT 培地、XPRT 試験では MPA 培地における培養により、培養物では既存の突然変異細胞を除去する必要があると考えられる（5）（24）（補遺 1 参照）。除去した細胞を凍結保存後、作業用ストックとして解凍することで使用できる。新たに解凍した作業用ストックは、通常の倍加時間に到達後、本試験で使用できる。XPRT 試験を実施する場合、AS52 細胞の定期的な培養では、*gpt* 導入遺伝子の維持を保証する条件を用いる必要がある（20）。

### 培地および培養条件

12. 培養物の維持には、適切な培地ならびにインキュベーション条件（培養容器、5% $CO_2$ の加湿雰囲気、および 37℃ のインキュベーション温度）を用いる。細胞培養物は、対数期の増殖を確保する条件下で常に維持する。発現期間中の最適な細胞増殖、および突然変異細胞と非突然変異細胞の両方の最適なクローニング効率を確保する、培地と培養の条件選択が特に重要である。

### 培養物の準備

13. 細胞株は保存培養物から増殖させ、浮遊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指数関数的増殖を継続すると考えられる密度で培地に播種する（例：単層で増殖する細胞にはコンフルエンスを回避する）。

### 代謝活性化

14. 内因性の代謝能が不十分な細胞を採用する場合、外因性の代謝系を用いる必要がある。初期設定で推奨され最もよく用いられる代謝系は、他に正当化される場合を除き、アロクロール 1254（25）（26）（27）（28）またはフェノバルビタールと β-ナフトフラボンの併用（29）（30）（31）（32）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、補因子添加ポストミトコンドリア画分（S9）である。後者の併用は「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」（33）に抵触せず、混合機能オキシダーゼの誘導ではアロクロール 1254 と同程度の有効性を示している（29）（31）。S9 画分は濃度 1～2%（v/v）の範囲で通常用いられるが、最終試験の培地では 10%（v/v）に上昇させることができる。採用され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、試験中の物質のクラスにより影響を受ける可能性がある（34）（35）（36）。

### 被験化学物質の調製

15. 固体の被験化学物質は、適切な溶媒で調製し適宜希釈してから細胞を処理する（16 項参照）。液体の被験化学物質は、試験系に直接添加できる、および／または希釈してから試験系を処理できる。気体または揮発性の被験化学物質は、密封した培養容器での処理など、標準的なプロトコールの適切な修正により検討する（37）（38）。安定性データにより保存の許容性が立証されている場合を除き、被験化学物質の調製は処理直前に行う。



© OECD, (2016)

## 試験条件

### 溶媒

16. 試験の実施に悪影響（例：細胞増殖の変化、被験化学物質の完全性への影響、培養容器との反応、代謝活性化系の障害）を及ぼすことなく、被験化学物質の溶解度を最適化できる溶媒を選択する。可能な限り、まず水溶性の溶媒（または培地）の使用を検討すべきであることが推奨される。十分に確立されている溶媒は、例えば、水およびジメチルスルホキシドである。一般に、最終処理の培地については、有機溶媒は 1%（v/v）を超えず、水性溶媒（生理食塩水または水）は 10%（v/v）を超えないこと。用いる溶媒が十分に確立されていない場合（例：エタノールまたはアセトン）、被験化学物質と試験系との適合性、および、使用濃度での遺伝毒性の欠如を示すデータにより、その使用について裏付ける必要がある。こうした裏付けデータがない場合、選択した溶媒により有害作用も変異原性作用も誘発されないことを立証するため、無処理対照（補遺 1 参照）を加え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. 被験化学物質の最高濃度を決定する場合、人為的な陽性反応を引き起こす可能性のある濃度、例えば、過剰な細胞毒性（20 項参照）、培地の沈殿物（21 項参照）、あるいは pH または浸透圧の著しい変化（5 項参照）をもたらす濃度は回避する。被験化学物質の添加時に培地の pH に著しい変化が生じる場合、人為的な陽性結果を回避し適切な培養条件を維持するため、最終処理培地の緩衝により pH を調整することが考えられる。

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。最初の試験での細胞毒性の評価は、主試験で用いられる濃度のより正確な定義に有用であると考えられるが、最初の試験では要求されていない。最初の試験において細胞毒性の評価を実施した場合でも、主試験における培養物ごとの細胞毒性の測定はなお必要である。細胞毒性は RS を用いて評価する。すなわち、細胞数に基づき、処理直後に播種された細胞のクローニング効率（CE）を処理期間中の細胞喪失により補正し、（生存率 100%を割り当てられた）陰性対照の補正後のクローニング効率と比較する（式については補遺 2 参照）。

19. 許容基準（適切な細胞毒性、細胞数など）を満たす 4 段階以上（溶媒対照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 系列の培養物の使用が望ましいが、試験濃度ごとに同型または 1 系列で処理された培養物を用いることもできる。所定の濃度で個別の同型培養において得られた結果は、区別して報告すべきであるが、データ解析ではプールできる（17）。細胞毒性をほとんどまたは全く示さない被験化学物質については、公比約 2～3 の濃度間隔が通常適切であると考えられる。細胞毒性を生じる場合、選択される試験濃度の範囲は、細胞毒性をもたらす濃度から、中等度および細胞毒性をほとんどまたは全く示さない濃度まで網羅する必要がある。被験化学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網羅するため、あるいは濃度反応関係を詳細に検討するため、より細かな濃度間隔や 4 段階を超える濃度を用いる必要が、とりわけ再試験を要する状況ではありうる（43 項参照）。4 段階を超える濃度の使用は、1 系列での培養を用いる場合、特に重要となりうる。

20. 最高濃度が細胞毒性に基づく場合、最高濃度は 10～20%の RS 到達を目標にする必要がある。10%以下の RS のみ認められる陽性結果を解釈する場合、注意を払う必要がある（43 項参照）。



© OECD, (2016)

21. 難溶性の被験化学物質で、最低不溶濃度未満の濃度で細胞毒性を示さない場合、分析される最高濃度では、被験化学物質の処理終了時点において、目視または倒立顕微鏡の活用により混濁または沈殿を生じている必要がある。細胞毒性が最低不溶濃度超で生じても、この沈殿に起因する人為的な影響の可能性があるため、混濁または目視可能な沈殿を生じる 1 濃度のみで検討することが望ましい。沈殿を生じる濃度では、この沈殿が確実に試験の実施を妨げないよう注意する。実験前の培地での溶解度測定が、有用であると考えられる。

22. 沈殿も限定的な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 のうち最低濃度に合わせる（39）（40）。被験化学物質の組成が定義されていない場合、例えば、組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生物材料（すなわち、組成が不明または不定の化学物質［UVCB］）（41）、環境抽出物などの場合、十分な細胞毒性がなければ、最高濃度をより高くする（例：5 mg/mL）ことで、各成分の濃度を上昇させる必要があると考えられる。ただし、上記の要件は、ヒト用医薬品では異なる場合があるので注意する（42）。

### 対照

23. 処理培地への溶媒のみの添加からなり、被験化学物質処理培養物と同じ方法で取り扱った同時陰性対照（16 項参照）を、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条件下での変異原同定能、および、適用可能な場合、外因性代謝活性化系の有効性を立証するのに必要である。陽性対照の例を以下の表 1 に示す。正当化されれば、代わりの陽性対照物質を使用できる。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用いた試験は、代謝活性化を要する陽性対照のみにより実施できる。この場合、この単一の陽性対照の反応が、代謝活性化系の活性と試験系の反応性の両方を立証することになる。試験系の感度を立証するため、各陽性対照は、バックグラウンドを上回る再現可能で検出可能な上昇が期待される 1 つまたは複数の濃度を用い、その反応は、本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り損なわれてはならない（20 項参照）。



© OECD, (2016)

**表 1.** 試験施設の習熟度評価および陽性対照の選択に推奨される参照物質

| 代謝活性化条件 | 遺伝子座 | 物質名および 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］<br>エチルニトロソ尿素［CAS 番号 759-73-9］<br>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］<br>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］<br>7,12-ジメチルベンズアントラセン［CAS 番号 57-97-6］<br>ベンゾ[a]ピレン［CAS 番号 50-32-8］ |
| | *xprt* | ベンゾ[a]ピレン［CAS 番号 50-32-8］ |

## 手順

### 被験化学物質による処理

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化学物質で処理する。適切な時間（通常、3〜6 時間が適切）曝露する必要がある。

26. 試験の各段階で各試験の培養物（対照培養物および処理培養物）に用いる最小細胞数は、自然発生突然変異頻度に基づく必要がある。一般的な目安として、試験のすべてのフェーズで培養物ごとに、10 個の自然発生突然変異体を維持するのに十分な細胞を処理し継代する（17）。自然発生突然変異頻度は、通常 $5〜20\times10^{-6}$ である。処理中 90%の細胞毒性（10% RS）を引き起こす濃度で処理された培養物でも、$5\times10^{-6}$ の自然発生突然変異頻度で、十分な数の自然発生突然変異体（10 個以上）を維持するには、$20\times10^{6}$ 以上の細胞を処理する必要があると考えられる。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、変異体選択用に播種しなければならない（17）。

### 表現型発現期間および突然変異頻度の測定

27. 処理期間後、突然変異の表現型発現を可能にするため細胞を培養する。新たに誘発された *Hprt* と *xprt* 突然変異体の最適に近い表現型発現を可能にするには、通常は最低 7〜9 日間で十分である（43）（44）。この期間中、細胞の指数関数的増殖を維持するため、細胞を定期的に継代培養する。表現型発現後、選択薬剤（6-チオグアニン）を含有する培地および含有しない培地で細胞を再播種し、それぞれ選択時の突然変異体数およびクローニング効率を判定する。この播種は、単層培養ではディッシュ、浮遊細胞ではマイクロウェルプレートを用いて達成できる。突然変異体の選択では、最適な変異体回収を保証する（すなわち、代謝協同を回避する）密度で細胞



© OECD, (2016)

を播種する（17）。プレートを最適なコロニー増殖に合わせた適切な期間（例：7～12 日間）インキュベートし、コロニーを計数する。突然変異頻度は、変異体選択時のクローニング効率により補正された突然変異コロニー数に基づき算出される（式については補遺 2 参照）。

**試験施設の習熟度**

28. この試験を日常的に用いるのに先立ち、試験について十分な経験を積むため、試験施設は、異なる機序を介し作用する複数の陽性対照物質（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とを少なくとも 1 つ選択）、および各種陰性対照（種々の溶媒／媒体を使用）により、一連の実験を実施する必要がある。これらの陽性対照および陰性対照の反応は、文献と一致している必要がある。上記事項は経験のある、すなわち、30～33 項で定義される入手可能な背景データベースを有する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）の選択については、変異原性物質検出に関する習熟度の立証、代謝活性化系の有効性の判定、ならびに、処理中、表現型発現中および突然変異体選択中の細胞増殖条件と、スコアリング手順の適切性の立証を行うため、代謝活性化系の非存在下および存在下で検討する必要がある。試験系の感度およびダイナミックレンジを示すため、選択された物質の濃度範囲は、バックグラウンドを上回る再現可能で濃度依存的な増加をもたらすよう選択する。

**背景対照（historical control）データ**

30. 試験施設は、下記事項を確立する必要がある。

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

31. まず陰性対照の背景データの分布データを得る場合、同時陰性対照が、公表されている対照データと一致している必要がある（22）。背景対照の分布にはより多くの実験データが追加されるため、同時陰性対照は、理想的には背景対照の分布の 95%管理限界内とする（17）（45）（46）。

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 回の実験により構築すべきであるが、望ましくは、同程度の実験条件下で実施された 20 回以上の実験からなることが考えられる。試験施設では、管理図（例：C 管理図または X バー管理図（47））などの品質管理方法を用い、当該施設の陽性対照および陰性対照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（46）。背景データの構築方法および使用方法（すなわち、背景データに関するデータの組み入れ基準および除外基準、ならびに所定の実験の許容基準）について、さらなる推奨事項が参考文献（45）に見出せる。

33. 陰性対照データは、23 項記載のとおり、1 系列での培養か望ましくは同型培養由来の突然変異頻度からなる必要がある。同時陰性対照は、理想的には、試験施設の陰性対照の背景データベースの分布の 95%管理限界内とする（17）（45）（46）。同時陰性対照データがこの 95%管理限界から外れた場合、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」（上記参照）という証拠があり、技術的および人的な過誤がないという証拠がある限り、そのデータを背景対



© OECD, (2016)

照の分布に組み入れるのは許容可能であると考えられる。

34. 実験プロトコールに何らかの変更を加える場合には、試験施設の既存の背景対照データベースとの整合性という観点から考察する必要がある。何らかの重大な不一致があれば、新たな背景対照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 として表示）の算出に必要なデータをすべて含める。処理群と対照群の両培養物のデータには、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なしのウェル数）を含める必要がある。各培養物の RS は、同時溶媒対照に対する割合（%）として表す（定義については補遺 1 参照）。

36. 結果の提示は、突然変異頻度の算出に必要なデータもすべて含める。処理群と対照群の両培養物のデータには、（1）（突然変異体選択に向けた細胞播種時での）選択薬剤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のプレートから計数されたコロニー数（または、マイクロウェル法ではコロニーなしのウェル数）を含める必要がある。突然変異頻度を、（選択薬剤非存在下のプレートの）クローニング効率により補正された（選択薬剤存在下のプレートにおける）突然変異コロニー数に基づき算出する。突然変異頻度は、生存細胞 100 万個あたりの突然変異細胞数として表す（定義については補遺 1 参照）。

37. 個体ごとの培養データを示す。加えて、すべてのデータを表形式に要約する。

### 許容基準

38. 試験の許容性は以下の基準に基づく。

- 同時陰性対照について、33 項で述べたとおり、試験施設の陰性対照の背景データベースへの追加が許容可能とみなされる。
- 同時陽性対照（24 項参照）が、陽性対照の背景データベースで生成された反応と適合する反応をもたらし、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を生じている。
- 2 つの実験条件（すなわち、代謝活性化の存在下および非存在下）の一方が陽性結果になっていない限り、両条件で試験が実施された（25 項参照）。
- 適切な細胞数および濃度数により解析可能である（25、26、19 項参照）。
- 最高濃度の選択基準が、20、21、22 項記載内容と一致している。

### 結果の評価および解釈

39. すべての許容基準が満たされ、検討したいずれの実験条件でも以下に該当する場合、被験化学物質は明らかに陽性であると判断される。

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



© OECD, (2016)

られる。

b) 適切な傾向検定で評価した場合、濃度依存性の増加が認められる。

c) これらの結果のいずれか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；33 項参照）から外れている。

上記基準をすべて満たす場合、被験化学物質は、本試験系で哺乳類培養細胞において遺伝子突然変異を誘発可能であると判断される。最適な統計学的手法に関する勧告が参考文献（46）（48）に見出せる。

40. すべての許容基準が満たされ、検討したすべての実験条件で、以下に該当する場合、被験化学物質は明らかに陰性であると判断される。

a) いずれの試験濃度でも、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。

b) 適切な傾向検定で評価した場合、濃度依存性の増加が認められない。

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；33 項参照）内に収まる。

この場合、被験化学物質は、本試験系で哺乳類培養細胞において遺伝子突然変異を誘発不能であると判断される。

41. 明らかな陽性反応または陰性反応については、検証の必要はない。

42. 得られた反応が上述どおりの明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、または、ある結果の生物学的妥当性の確立を支援するため、そのデータについて、専門家の判断および／または追加調査により評価する必要がある。可能性として、実験条件（例：濃度間隔、他の代謝活性化条件［すなわち、S9 の濃度または S9 の起源］）の変更による再試験の実施が有用であると考えられる。

43. まれに、追加調査を行っても、得られたデータセットから陽性または陰性の結果に関して結論を出せないことがある。そのため、被験化学物質の反応が不明確（陽性または陰性の可能性が同等と解釈）であると結論付けられる必要がある。

## 試験報告書

44. 試験報告書は、以下の情報を含む。

被験化学物質：

- 入手可能である場合、供給元、ロット番号、使用期限
- 既知の場合、被験化学物質それ自体の安定性
- 既知の場合、溶媒中での被験化学物質の溶解度および安定性
- 必要に応じ、被験化学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：

- 物理的外観、水溶性、およびさらに関連する物理化学的特性



© OECD, (2016)

- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合など、IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、純度、不純物の化学的同一性などでの化学物質の識別

多成分物質、UVCB 物質（組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生物材料）および混合物

- 成分の化学的識別（上記参照）、定量的発生、関連する物理化学的特性により、可能な限り特徴付ける。

溶媒：

- 溶媒選択の正当性
- 最終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
- 入手可能である場合、継代数、試験施設の継代履歴
- 核型の特徴および／または染色体のモード数
- 細胞培養物の維持方法
- マイコプラズマがないこと
- 細胞倍加時間

試験条件：

- 濃度および培養数の選択根拠（例：細胞毒性データおよび溶解度限界など）
- 培地の組成、$CO_2$ 濃度、湿度レベル
- 培地中での最終濃度として表される被験化学物質の濃度（例：培地中の µg/mL、mg/mL または mM）
- 培地に添加される溶媒と被験化学物質の濃度（および／または容量）
- インキュベーション温度
- インキュベーション時間
- 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
- 発現期間の長さ（適切な場合、播種細胞数、ならびに継代培養およびフィーディングに関するスケジュールなど）
- 選択薬剤の内容およびその濃度
- 試験の許容基準
- 生存細胞数および変異細胞数の計数に用いた方法
- 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
- 播種後のインキュベーション時間の長さ
- 試験結果を陽性、陰性または不明確と判断する基準
- pH、浸透圧および沈殿の測定に用いた方法



© OECD, (2016)

結果：

- 各培養物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、および、もしあればその他の知見
- 沈殿の徴候およびその測定時間
- 選択培地と非選択培地に播種された細胞数
- 非選択培地のコロニー数および選択培地の耐性のコロニー数、ならびに関連する突然変異頻度
- 可能な場合、濃度反応関係
- 同時陰性（溶媒）対照および陽性対照のデータ（濃度および溶媒）
- 陰性（溶媒）対照および陽性対照の背景データ（範囲、平均値、標準偏差、信頼区間（例：95%）およびデータ数）
- （個別の培養物、および適切な場合プールした同型培養物に関する）統計解析結果、ならびにもしあれば p 値

結果の考察

結論



© 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) 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.

(3) 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.

(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. Mutagen. Res.,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) 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.

(8) 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.

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

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

(11) 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.

(12) 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.

(13) 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.

(14) 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



© OECD, (2016)

Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) 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.

(16) 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.

(17) 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.

(18) 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.

(19) 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.

(20) 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.

(21) 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.

(22) 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).

(23) 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.

(24) 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.

(25) 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.

(26) 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.



© OECD, (2016)

(27) 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.

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

(29) 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.

(30) 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.

(31) 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.

(32) 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.

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

(34) 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.

(35) **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.

(36) 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.

(37) 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.

(38) 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.

(39) 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.

(40) 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.



© OECD, (2016)

(41) 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 ].

(42) 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].

(43) **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.

(44) 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.

(45) 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.

(46) 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.

(47) 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.

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



© OECD, (2016)

## 補遺 1

## 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。

クローニング効率：低密度で播種され、計数可能なコロニーに増殖可能な細胞の割合。

濃度：培地中の被験化学物質の最終濃度をいう。

細胞毒性：本試験ガイドラインの対象となる試験では、細胞毒性は、処理細胞の相対生存率が陰性対照に比べ低下することとして確認される（特定の項を参照）。

前進突然変異：親型から突然変異型への遺伝子突然変異のことで、酵素活性またはコード化タンパク質の機能の変化または喪失を生じる。

フレームシフト型変異原物質：DNA 分子において、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。

遺伝毒性：DNA や染色体のあらゆる種類の損傷を網羅する一般的な用語で、DNA 切断、付加体、再編成、突然変異、染色体異常および異数性などが挙げられる。すべての種類の遺伝毒性作用により、突然変異や一貫した染色体損傷が生じるわけではない。
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で、Hprt 突然変異体の除去に用いられる。

有糸分裂組み換え：有糸分裂中の相同染色分体間の組み換えで、DNA 二本鎖切断の誘発またはヘテロ接合体の喪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で、Xprt 突然変異体の除去に用いられる。

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

突然変異頻度（MF）：観察された突然変異コロニー数を、選択培地に播種された細胞数で除した値で、選択時のクローニング効率（または生存率）で補正される。

表現型発現期間：遺伝的変化がゲノム内で固定される処理を行ってから、既存の遺伝子産物が枯渇して表現型形質の変化に至るまでの期間。

相対生存率（RS）：RS は処理関連の細胞毒性の尺度として用いられる。RS は、処理直後に播種された細胞のクローニング効率（CE）を処理期間中の細胞喪失により補正し、（生存率 100%を割り当てられた）陰性対照のクローニング効率と比較した値である。

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



© OECD, (2016)

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：被験化学物質の溶解に用いた溶媒のみを添加する対照培養物を定める一般的な用語。

無処理対照：いかなる処理も受けない（すなわち、被験化学物質でも溶媒でも処理しない）が、被験化学物質を受けた培養物と同時に同じ方法で処理される培養物。



© OECD, (2016)

## 補遺 2

## 細胞毒性と突然変異頻度の評価に関する式

細胞毒性は相対生存率により評価される。すなわち、処理直後に播種された細胞のクローニング効率（CE）を処理期間中の細胞喪失により補正し、（生存率 100%を割り当てられた）陰性対照の補正後のクローニング効率と比較する（RS の式については以下参照）。

被験化学物質で処理された培養物の補正後の CE の算出：

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

被験化学物質で処理された培養物の RS の算出：

$$\text{RS} = \frac{\text{処理された培養物の補正後の CE}}{\text{溶媒対照の補正後の CE}} \times 100$$

突然変異頻度は、選択培地の突然変異コロニーのクローニング効率を、選択時点での同一培養物について測定される、非選択培地のクローニング効率で除した値である。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{選択培地における突然変異コロニーのクローニング効率}}{\text{非選択培地におけるクローニング効率}}$$

プレートがクローニング効率に用いられる場合：

CE = コロニー数/播種された細胞数

マイクロウェルプレートがクローニング効率に用いられる場合：

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。

クローニング効率 = -lnP（0） / 1 ウェルあたり播種された細胞数

ここで、-ln P（0）は播種されたウェルのうち空の可能性が高いウェル数で、以下の式で記述される。

lnP（0） = -ln（空のウェル数/播種されたウェル数）



© OECD, (2016)