OECD/OCDE

2015/07/28

試験ガイドライン No.478

げっ歯類を用いる優性致死試験

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. 478: Rodent Dominant Lethal Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264823-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

げっ歯類を用いる優性致死試験

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。最初の試験ガイドライン478は1984年に採択された。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、および発生毒性、生殖毒性あるいは遺伝毒性などの他の毒性試験への組込や併合の可能性を反映したものである。しかしながら、この試験の限界と多くの使用動物数のため、本試験は主要な方法としての使用を意図するものではなく、むしろ規制上の要件のため他の方法がない場合にのみ使用する補助的な試験として用いることを意図している。毒性試験の併合は、多数の動物使用を削減できる可能性がある。遺伝毒性に関する試験ガイドラインのガイダンス文書は現在作成中であり、ガイドラインを使用する際の簡潔で有用な手引きとなるだろう。

2. 優性致死試験の目的は、化学物質が、生殖細胞において染色体異常に起因する突然変異を起こすかどうかを検討することである。さらに、優性致死試験は、動物種間で化学物質の反応が異なるとはいえ、*in vivo*での代謝、薬物動態およびDNA修復過程が機能し、その反応に関与していることから、遺伝毒性の評価に妥当なものである。被験物質の投与による優性致死突然変異の誘発は、その物質が供試動物の生殖組織に影響を及ぼしたことを示している。

3. 優性致死突然変異は胚胎児致死を引き起こす。被験物質の投与によって優性致死突然変異が誘発されたときは、その物質が供試動物の生殖細胞に影響を及ぼしたことを示している。

4. 優性致死試験は、体細胞の*in vivo*の評価項目を用いた試験の陽性結果の確認に有用であり、ヒトに対する有害性や生殖細胞を介して子孫に伝わる遺伝性疾患のリスクの予測に妥当な評価項目である。しかしながら、本試験は多くの動物および多大な労力を必要とするため、実施するには高額な経費と時間がかかる。優性致死突然変異の自然誘発頻度は高いため、突然変異頻度のわずかな増加を確認するための試験の感度としては限界がある。

© 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。

5. 用語の定義を補遺1に示す。

最初に考慮すべき事項

6. 本試験には通常マウスが用いられるが(1)(2)(3)、科学的妥当性が示されれば、ラットなど(4)(5)(6)(7)、その他の哺乳動物種も使用できる。優性致死は、通常、染色体異常（構造異常と数的異常）(8)(9)(10)に起因するが、遺伝子突然変異を排除することはできない。優性致死突然変異は、生殖細胞自体に生じた突然変異であり、配偶子に機能障害を起こさずに初期胚において受精後に固定され、受精卵や発育過程の胚に死をもたらす。

7. 各雄を適切な期間、連続して未経産雌と交配する。投与後の交配回数は、優性致死試験の最終的な目的（23項）によるが、雄の生殖細胞の成熟過程（精子形成）の全段階において優性致死が評価できるものでなければならない(11)。

8. 被験物質やその代謝物が精巣に達してい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

9. 一般に、雄動物を適切な投与経路で被験物質に曝露し、無処理の未経産雌と交配する。一定期間ごとに連続して交配することにより、異なる生殖細胞のタイプ（精子形成過程の種々の段階にある細胞）について検査できる。交配後、適切な時期に安楽死させた雌の子宮を調べ、着床数、生存胎児数および死亡胎児数を求める。被験物質の優性致死率は、妊娠雌あたりの生存胎児数を処理群と媒体／溶媒の対照群とで比較して求める。処理群の死亡胎児数が対照群よりも増加している分が被験物質誘発性の着床後胚損失に相当する。着床後胚損失率は全着床数における死亡率を処理群と対照群とで比較することにより計算できる。着床前胚損失率は黄体数から全着床数を引いた数、または妊娠雌あたりの全着床数を処理群と対照群とで比較することにより求めることができる。

試験施設の習熟度の検証

10. 本試験の遂行能力は、表1に示す陽性対照物質（弱陽性反応を含む）が公表データ（例：(12)(13)(14)(15)(16)(17)）での優性致死頻度を再現でき、また媒体対照および陰性対照の頻度が許容範囲データ[1]（上記参照）と一致すること、あるいは、施設の背景対照データの分布（入手可能な場合）を示すことで証明すべきである。

[1]今後発表される遺伝毒性に関するガイダンス文書を参照。

試験方法

準備

動物種の選択

11. 一般的に用いられる実験動物の系統で、健康な性的成熟動物を使用する。マウスが一般的に用いられるが、ラットを用いてもよい。報告書に科学的な妥当性の記載があれば、他の適当な哺乳類を用いてもよい。

飼育および給餌条件

12. 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、続いて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。投与または交配前、げっ歯類では、攻撃行動が予期または確認されない場合、同性の少数群（5匹以下）で飼育し、適切な環境を確保した頑丈なケージを使用することが望ましい。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

13. 健康な性的成熟雌雄動物を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または生体認証が挙げられるが、指切法と断耳は用いない）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との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

14. 固体の被験物質は動物に投与する前に、適切な溶媒か媒体に溶解または懸濁するか、飼料または飲水に混ぜる。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。

試験条件

溶媒／媒体

15. 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疑い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。

陽性対照

16. 試験施設が十分な習熟度を備えていることが示され、最近（例：過去5年以内）日常的に本試験を実施している場合を除いては、通常は試験ごとに陽性対照群用の動物を用いなければならない。しかし、陽性対照群の動物には、被験物質を投与した動物と同じ経路で投与する必要はなく、すべての交配期間について検査する必要もない。陽性対照化学物質は、当該試験条件下で優性致死を誘発することが知られている必要がある。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。

17. 陽性対照物質の用量は、試験法の性能と感度を適切に評価できるように、弱いあるいは中等度の影響を生じさせるが、確実に優性致死が陽性となるように設定する。陽性対照物質の例および適切な用量を表1に示す。

表1：陽性対照物質の例

化学物質［CAS番号］ （参照番号）	有効用量範囲（mg/kg） （げっ歯類）	投与期間 （日数）
トリエチレンメラミン［CAS番号51-18-3］(14)	0.25（マウス）	1
シクロホスファミド［CAS番号50-18-0］(18)	50～150（マウス）	5
シクロホスファミド［CAS番号50-18-0］(4)	25～100（ラット）	1
メタンスルホン酸エチル［CAS番号62-50-0］(12)	100～300（マウス）	5
アクリルアミドモノマー［CAS番号79-06-1］(16)	50（マウス）	5
クロラムブシル［CAS番号305-03-3］(13)	25（マウス）	1

陰性対照

18. 各検査時期に、陰性対照群の動物を含める。陰性対照群には溶媒または媒体のみを投与し、それ以外は被験物質投与群の動物と同様に処理する(19)。選択した溶媒／媒体が優性致死や有害作用を誘発しないことを示す背景データや公表データがない場合は、各検査時期に無処置対照群の動物も含めることで溶媒対照群の適切さを示す。

手順

動物数

19. 各雄は前もって設定した適切な間隔で（例：1週間間隔、21項および23項参照）、原則として1匹の未経産雌と交配し、これを連続的に繰り返す。1群当たりの雄の数は、少なくとも2倍の優性致死誘発頻度を検出するのに必要な統計検出力が得られるように（各交配期間に交配した雌の数との組み合わせで）あらかじめ設定する（44項参照）。

20. 交配期間ごとの雌の数もまた、少なくとも2倍の優性致死誘発頻度（すなわち、全着床数が400以上得られるのに必要な妊娠雌）を統計学的に検出でき(19)(20)(21)(22)、各分析単位（すなわち用量ごとの交配群）の死亡胎児数が1以上となるようにあらかじめ設定する(23)。

投与期間および交配期間

21. 投与後の交配期間数は投与回数に依存しており、雄の生殖細胞の成熟過程の全段階について、優性致死の誘発を評価できるようにしなければならない(11, 24)。1日1回で5日以内の単回投与の場合、最終投与後、1週間間隔で8回（マウスの場合）、または10回（ラットの場合）の交配を行う必要がある。反復投与の場合、交配期間数は、投与期間の増加に比例して少なくできるが、精子形成のすべての段階を評価することを目標とする（例：マウスの場合、精子形成の全段階評価を行うには、28日間の曝露期間後、4週間の交配で十分である）。すべての投与および交配計画は、科学的に正当な理由が必要である。

22. 雌は雄と少なくとも1性周期の間、同居させる（例:マウス、ラットどちらも1週間が1性周期）。1週間交尾しなかった雌は、次の交配期間で用いることも可能である。あるいは膣栓または膣内の精子によって交尾が確認されるまで同居させる。

23. 曝露および交配計画は、優性致死試験の最終目的による。当該物質が優性致死そのものを誘発するかどうかの判定を目的とする場合は、精子形成の全発生段階に曝露し（例：マウスでは1週間に5～7回の投与で7週間）、最後に1度交配する方法でもよい。しかし、優性致死の誘

発に関して感度のよい生殖細胞の発生段階を検出することを目的とする場合は、1日または5日間の曝露後、毎週交配することが望ましい。

用量段階

24. 用量選択に役立つ入手可能な既存の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(25)。この試験の目的は、最大耐量（MTD）を特定することである。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（試験期間の長さに関連する）と定義され、例えば、異常な行動または反応、軽度の体重減少や造血系の細胞毒性は認められるが、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(26)。

25. また、MTDは交配の成立に悪影響を及ぼしてはならない(20)。

26. 毒性のない低用量で特有の生物活性を示す被験物質（ホルモンや分裂促進物質など）およびトキシコキネティクスが飽和を示すような物質は、上記の用量設定基準の例外とみなされる場合もあり、これらについてはケースバイケースで評価する。

27. 用量反応性に関する情報を得るために、完全な試験としては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2000mg/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。被験物質が毒性を示さない場合、14日以上の投与期間の限度用量は1000 mg/kg体重/日とする。14日未満の投与期間の場合、限度用量は2000 mg/kg体重/日とする。

投与

28. 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飼料、飲水、皮下、静脈内、局所、吸入、経口（強制）、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、餌や水の摂取と交配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（31項）。強制経口または注射により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/100g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/100gまで使用可能である。これを超える場合には（動物福祉規制により許容されれば）、その妥当性を示す必要がある。すべての用量段階において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。

観察

29. 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供試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、すべての個体を観察し、不健全な症状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。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、摂水量を飲水交換時毎および少なくとも毎週1回測定する。非致死性だが重篤な毒性症状を示した動物は、試験期間の完了前に安楽死させる(26)。

組織採取および処理

30. 交配した雌は、マウスでは妊娠13日目（GD13）、ラットではGD14～15の妊娠後期に安楽死させる。優性致死作用を調べるため、雌の子宮について着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数および黄体数を調査する。

31. 子宮角および卵巣を切開して黄体数を数え、胎児を取り出し、胎児数とその体重を計測する。生存胎児によって隠されている再吸収胚がないか子宮を観察し、全ての再吸収胚を算出するよう注意を払う。胎児の生死を記録する。妊娠した雌の数、全着床数、着床前胚損失数、および着床後胚損失数（初期および後期の再吸収胚を含む）も記録する。さらに、目視可能な胎児については、ブアン固定液で2週間以上保存した後、主要な外表奇形の検査(27)を行うことで、被験物質の生殖発生に及ぼす影響に関する追加情報を得ることができる。

データおよび報告

結果の処理

32. 試験成績は表にして、交配した雄の数、妊娠雌の数、および不妊雌の数を示す。交配の結果は、それぞれの雄または雌ごとに個体別に報告する。交配期間、投与群の雄への投与用量、生存および死亡胎児数を雌ごとに記載する。

33. 着床後胚損失率は全着床数における死亡率を処理群と媒体／溶媒対照群とで比較することによって求める。

34. 着床前胚損失率は黄体数と着床数との差、または妊娠雌あたりの平均着床数の減少を対照群とで比較することにより計算される。着床前胚損失が推察される場合には、それを報告する。

35. 優性致死率は、（各雌の着床後胚損失数／各雌の全着床数）×100で表される。

36. 29項に示す毒性および症状のデータを報告する。

許容基準

37. 試験の受け入れは、以下の基準で決定する。

a) 同時陰性対照は、陰性対照の背景データの公表されている基準、および入手可能な場合は、試験施設の背景対照データと一致している（10項および18項を参照）。

b) 同時陽性対照は、陽性対照の背景データの公表されている基準、および入手可能な場合は、試験施設の陽性対照の背景データベースと一致した反応を示し、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している（17項および18項を参照）。

c) 適切な全着床数および用量数が分析されている（20項）。

d) 最高用量の選択基準が、24項および27項に述べたものに適合している。

対照値の許容範囲は、今後発表される遺伝毒性試験に関するガイダンス文書に記載される。

結果の評価および解釈

38. 用量反応関係の解析に十分なデータを得るには、少なくとも3投与群について分析する必要がある。

39. すべての許容基準が満たされている条件で、以下の場合、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つの試験用量で、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。

b) 適切な検定による評価で、少なくとも1つの実験条件（週ごとの交配期間の1つなど）で

用量依存性の増加が認められる。

c) 陰性対照データ[2]の許容範囲から外れている、または、入手可能な場合、試験施設の陰性対照背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界）から外れている試験結果が1つでもある。

この場合、被験物質は供試動物の生殖細胞に優性致死突然変異を誘発すると判定される。なお、最適な統計学的手法に関する勧告は44項に記載されており、その他の統計手法に関する勧告も、文献に発表されている(19)(20)(21)(23)(28)。統計的検定では動物を実験単位と考える。

40. すべての許容基準が満たされている条件で、以下の場合、被験物質は明確に陰性であると判定される。

a) いずれの試験用量においても、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ていない。

b) いずれの実験条件においても用量依存性の増加が認められない。

c) すべての結果が、陰性対照データ[1]の許容範囲内である、または、入手可能な場合、試験施設の陰性対照背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界）内に収まる。

この場合、被験物質は供試動物の生殖細胞に優性致死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、明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、また、結果の生物学的妥当性を確認する必要がある場合（例：わずかな増加、または境界線上の増加）には、専門家判断により、あるいは、陽性結果が陰性対照データ[3]または試験施設の陰性対照背景データの許容範囲から外れているかどうかの考慮など、既存の実験データを用いた追加検証を行うことにより、データを詳細に評価する必要がある(29)。

43. まれに、追加検証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「不明確」と結論される場合もある。

[2] 今後発表される遺伝毒性に関するガイダンス文書を参照。
[3] 今後発表される遺伝毒性に関するガイダンス文書を参照。

44. 統計学的検定では雄の動物を実験単位と考える。測定データ（例：妊娠雌あたりの着床数）はポアソン分布を、また比率データ（例：死亡胎児の割合）は二項分布を示すと考えられるが、このようなデータは、過大分散であることが多い(30)。そのため、まず、コクランの二項分布検定(31)や二項過大分散を解析するタローンのC(α)検定(30､32)のような分散検定を使用して、過大/過小分散を解析する。二項分布から逸脱していない場合は、コクラン・アーミテージの傾向検定(33)を用いて用量依存性を解析し、対照群との群間比較は、フィッシャーの正確検定(34)を用いて解析する。同様に、ポアソン分布から逸脱していない場合は、測定データの傾向はポアソン回帰式で解析する(35)。また、対照群との群間比較は、ポアソンモデルの式で解析できる(35)。著しい過大分散または過小分散が検出された場合は、ノンパラメトリック検定を推奨する(22, 30)。これは、傾向検定のヨンクヒール=タプストラの検定(36)や、媒体／溶媒対照群との群間比較をするマン･ホイットニーの検定(37)のように順位を検定する手法で、傾向検定および対照群との群間比較を行う並べ替え法、リサンプリング法、ブートストラップ法も同様である(30, 38)。

45. 優性致死試験の陽性結果は、被験物質が供試動物種の投与された雄の生殖細胞に遺伝毒性を示す証拠をもたらす。

46. 認められた数値が背景対照の範囲内か範囲外かを検討することにより、得られた反応の生物学的意義を評価する指針が得られる(39)。

試験報告書

47. 試験報告書には以下の情報を含める。

要約

被験物質：

－入手可能な場合、供給元、ロット番号、使用期限
－既知の場合、被験物質の安定性
－既知の場合、溶媒中における被験物質の溶解性と安定性
－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

単一成分の物質：
－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 [Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction

products or Biological materials]および混合物：

－可能な範囲での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特性

被験物質の調製：

－媒体の選択理由

－既知の場合、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、調製物の分析項目（例：安定性、均一性、目標濃度）

供試動物：

－使用した動物種／系統および選択理由

－動物数、週齢および性

－供給元、飼育条件、飼料など

－動物の個体識別方法

－短期試験の場合：試験開始時および終了時における各雄の体重、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）対照データ

－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

－投与経路の設定根拠

－動物に対する毒性の測定方法。可能な場合は、病理組織学的または血液学的分析および動物観察と体重測定の頻度を含む。

－陰性結果が得られた場合、被験物質が標的組織または全身循環に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）

－飼料および飲水の品質の詳細

－ケージ環境の改良に関する詳細

－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

－鎮痛方法

－安楽死の方法

－組織の分離および保存手順

－すべてのキットおよび試薬の供給元とロット番号（該当する場合）

－優性致死の算出方法
－交配計画
－使用した交尾確認方法
－安楽死の時期
－優性致死作用の算定基準：黄体数、着床数、再吸収胚数、着床前胚損失、生存胎児数、死亡胎児数を含む。

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）
－投与期間と交配期間の雄の体重
－交配した雌の数
－可能であれば、用量反応関係
－範囲、平均および標準偏差を含む同時陰性対照群および陰性対照の背景データ
－同時陽性対照群データ
－表形式データまたは以下の項目を含む各雌親のデータ：黄体数、着床数、再吸収胚数、着床前胚損失率、生存胎児数、死亡胚・胎児数、および胎児の体重
－上記のデータは、優性致死誘発頻度とともに交配期間と投与量ごとにまとめる。
－統計解析結果および適用した方法

結果の考察

結論

LITERATURE

(1) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(2) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J. , Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185 .

(3) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(4) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(5) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(6) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(7) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983) Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(8) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones ,K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(9) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J.. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(10) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(11) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172 .

(12) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(13) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(14) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(15) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(16) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

(17) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(18) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(19) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417 :19–30.

(20) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(21) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(22) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288 .

(23) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(24) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(25) 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. Mutagen., 7:313-319.

(26) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306, .

(28) Kirkland D.J., (Ed.).(1989) . Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press,

(29) 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

(30) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(31) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

(32) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(33) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(34) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(35) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(36) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(37) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(38) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(39) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

補遺1

定義

黄体：卵巣の排卵した卵胞部位に形成されるホルモン分泌構造。卵巣の黄体数は、排卵数と一致する。

優性致死突然変異：生殖細胞に生じた突然変異、あるいは受精後に固定された突然変異で、胚死亡または胎児死亡を引き起こす。

受精率：妊娠雌数／交配した雌の数

交配期間：投与された雄の最終投与から交配までの期間。この期間を管理することで精子形成における種々のタイプの生殖細胞への化学物質の作用を評価できる。マウスでは、最終投与後1, 2, 3, 4, 5, 6, 7および8週間までの交配で、それぞれ精子、縮合精子細胞、円形精子細胞、パキテン期精母細胞、初期の精母細胞、分化した精原細胞、分化中の精原細胞、および精原幹細胞に対する作用を測定できる。

着床前胚損失(率)：着床数と黄体数の差。妊娠雌あたりの全着床数を処理群と対照群とで比較することにより求めることもできる。[訳注：着床前胚損失率は以下の式で求める：（(黄体数－着床数)／黄体数）×100]

着床後胚損失(率)：処理群での死亡と対照群での全着床数における死亡について比較した率。[訳注：着床後胚損失率は以下の式で求める：（(着床数－生存胎児数)／着床数）×100]

補遺2

哺乳類における精子形成のタイミング

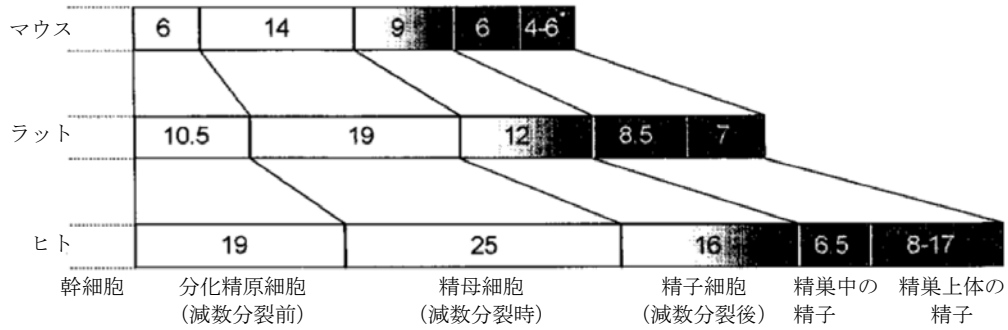


図1. マウス、ラット、ヒトにおける雄生殖細胞の成熟期間（日数）の比較。陰影部分の期間、DNA修復は発生しない。

マウス、ラット、ヒトの精子形成の模式図を上記に示す（Adler, 1996より）。未分化型精原細胞にはA-single（個々に1つで存在）、A-paired（2つの細胞が連結）、A-aligned（3個以上の細胞が連結）の4つの型の精原細胞が含まれる（Hess and de Franca, 2008）。A-single型は真の幹細胞と考えられるため、幹細胞への作用の評価には、被験物質の最終投与から交配までの間にマウスでは少なくとも49日経過していなければならない。

REFERENCES

Adler, ID (1996) Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science+Business Media, pp 1-15.