OECD/OCDE

2016/07/29

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.

Original work:

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(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

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

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。試験ガイドライン 478 の初版は 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経験、および本試験と発生毒性、生殖毒性または遺伝毒性など他の毒性試験との統合または併合の可能性を反映したものである。ただし、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できる補助的な試験法として用いることを意図している。毒性試験の併合は、毒性試験において、多数の動物の使用を削減できる可能性がある。遺伝毒性試験およびその試験ガイドラインに対して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. 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否かを検討することである。さらに、優性致死試験は、動物種間に差がありうるとはいえ、*in vivo* での代謝、薬物動態および DNA 修復過程という要因が機能し、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。被験化学物質の曝露による優性致死突然変異の誘発は、その化学物質が被験動物の胚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。被験化学物質の曝露による優性致死突然変異の誘発は、その化学物質が被験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。ただし、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きわめて高いため、突然変異頻度のわずかな増加を検出するための試験の感度としては一般に限界がある。

5. 重要な用語の定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項

6. 本試験はほとんどの場合マウスで実施されるが（2）（3）（4）、科学的正当性が示され

© 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］。

れば、一部の例ではラットなど（5）（6）（7）（8）その他の種も適切と考えられる。優性致死は、通常、肉眼的染色体異常（構造異常と数的異常）（9）（10）（11）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、あるいは、配偶子に機能障害を起こさない初期胚において受精後に固定されるが、受精卵や発生中の胚に死をもたらす。

7. 各雄を適切な間隔で、連続して未交尾雌と交配させる。投与後の交配回数は優性致死試験の最終目的（23 項）により決まり、優性致死について雄生殖細胞の成熟の全段階が評価されるよう確保すべきである（12）。

8. 被験化学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切である。

試験法の概要

9. 一般に、雄動物を適切な曝露経路で被験化学物質に曝露させ、無処理の未交尾雌と交配させる。連続的な交配間隔を用いることにより、様々な生殖細胞種を検査できる。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。被験化学物質の優性致死率は、投与群の雌 1 匹あたりの生存着床数と、媒体／溶媒対照群の雌 1 匹あたりの生存着床数との比較により求める。投与群の雌 1 匹あたりの死亡着床数が対照群の雌 1 匹あたりの死亡着床数より増加した分が、被験化学物質誘発性の着床後胚損失率を示す。着床後胚損失率は、投与群の全着床数に対する死亡率と、対照群の全着床数に対する死亡率との比較結果を求めることにより算出できる。着床前胚損失率は黄体数から全着床数を引いた数、または雌 1 匹あたりの全着床数を投与群と対照群とで比較することにより推定できる。

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）および媒体対照など公表データ（例：（13）（14）（15）（16）（17）（18））での優性致死の頻度を再現できることを立証し、また、許容範囲データ（上記参考文献参照）と一致するか、あるいは、試験施設の背景対照データ（historical control）（入手可能な場合）の分布と一致する陰性対照の頻度を得ることで確立すべきである。

試験方法に関する説明

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、ラットも適切であると考えられる。報告書に科学的正当性の記載があれば、他の適切な哺乳類種を用いてもよい。

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、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

© OECD, (2016)

工照明で 12 時間明期、12 時間暗期の順序とする。給餌には、通常の実験室飼料を用いてよい。飲水の摂取は制限しない。被験化学物質を混餌投与する場合、適切な混合飼料確保の必要性により、飼料の選択が影響を受ける可能性がある。投与または交配前、げっ歯類では、攻撃行動が予測および確認されない場合、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とすることが望ましい。科学的正当性がある場合、動物を個別に飼育できる。

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、指切法と耳パンチは用いない）により個体識別し、5 日間以上飼育室環境に馴化させる。またケージは、その位置による影響の可能性が最小限になるよう配置する。陽性対照と被験化学物質による交差汚染を回避する。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. 固体の被験化学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。液体の被験化学物質は直接投与するか、希釈してから投与できる。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。安定性データにより保存の許容性が立証され、適切な保存条件が定義されている場合を除き、被験化学物質は用時調製する。

試験条件

溶媒／媒体

15. 溶媒／媒体は用いる投与量で毒性作用を示さず、被験化学物質との化学反応を起こす疑いのないものを用いる。既知以外の溶媒／媒体を用いる場合、採用するには、その適合性を示す参照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べきであることが推奨される。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. 試験施設が本試験実施に関する習熟度を立証し、ここ最近（例：過去 5 年以内）日常的に本試験を用いている場合を除き、同時陽性対照群を常に用いるべきである。ただし、陽性対照群には、被験化学物質投与群と同じ経路で投与する必要はなく、すべての交配間隔の試料を採取する必要もない。陽性対照物質は、当該試験での使用条件下で優性致死を生じ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、本試験法の性能と感度を臨界的に評価する軽微または中等度の作用を生じるが、一貫して優性致死作用が陽性となるよう選択する。陽性対照物質の例および適切な用量を表 1 に示す。

© OECD, (2016)

表 1. 陽性対照物質の例

化学物質［CAS 番号］（参考文献番号）	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［51-18-3］(15)	0.25（マウス）	1
シクロホスファミド［50-18-0］(19)	50～150（マウス）	5
シクロホスファミド［50-18-0］(5)	25～100（ラット）	1
メタンスルホン酸エチル［62-50-0］(13)	100～300（マウス）	5
アクリルアミドモノマー［79-06-1］(17)	50（マウス）	5
クロラムブシル［305-03-3］(14)	25（マウス）	1

陰性対照

18. 溶媒または媒体のみを投与し、それ以外は投与群と同様に処理する陰性対照群を、試料採取時ごとに設定する（20）。優性致死やそれ以外の有害作用は、選択した溶媒／媒体により誘発されないことを示す背景対照データや公表された対照データがない場合、媒体対照群の許容性を確立するため、試料採取時ごとに無処置対照群も含める。

手順

動物数

19. 各雄は予め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）、望ましくは 1 匹の未交尾雌と連続的に交配する。1 群あたりの雄の数は、優性致死の頻度について 2 倍以上検出するのに必要な統計的検出力とするため、（各交配間隔で交配した雌の数との組み合わせで）十分になるよう予め設定する（44 項参照）。

20. 交配間隔ごとの雌の数も、統計的検出力の算出により、優性致死の頻度について 2 倍以上の検出を可能にし（すなわち、全着床数が 400 以上となるのに十分な妊娠雌数）（20）（21）（22）（23）、また、分析単位ごと（すなわち、用量ごとの交配群）の死亡着床数が 1 以上と予測されるよう、予め設定する（24）。

投与期間および交配間隔

21. 投与後の交配間隔数は投与スケジュールにより管理され、雄生殖細胞成熟の全段階について、優性致死誘発の評価を確保すべきである（12）（25）。1 日 5 回までの単回投与の場合、最終投与後、1 週間で 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、交配間隔数は、投与期間の延長に比例して減らせるが、精子形成の全段階

© OECD, (2016)

を評価するという目標は維持する（例：マウスの場合、精子形成の全段階を評価するには、28 日間曝露後週 4 回の交配のみで十分である）。すべての投与および交配スケジュールには、科学的正当性が必要である。

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、ラットいずれも 1 週間が 1 性周期）。ある 1 週間で交尾しなかった雌は、次の交配間隔で用いることも可能である。あるいは、膣内の精子の存在または膣栓の存在により判断される交尾が済むまで同居させる。

23. 用いる曝露および交配計画は、優性致死試験の最終目的により左右される。所与の物質が優性致死突然変異そのものを誘発するか否かの判定を目標とする場合、許容される方法には、精子形成の全過程に曝露させ（例：マウスでは週 5〜7 回の投与で 7 週間）、最後に 1 回交配させることが考えられる。一方、優性致死誘発に高感受性の生殖細胞種を特定することが目標である場合、単回曝露または 5 日間曝露後、週 1 回の交配が望ましい。

投与量

24. 用量選択に役立つ既に入手可能な適切なデータがないため、予備的な用量設定試験を実施する場合、同一試験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（26）。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、試験を制限する毒性の証拠を示すことなく、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する（例：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）が、死亡や人道的な安楽死を必要とする疼痛、苦痛、疲弊の証拠は認められない用量である（27）。

25. MTD はまた、交配の成功に悪影響を及ぼしてはならない（21）。

26. 毒性のない低用量で特定の生物活性を示す被験化学物質（ホルモンや分裂促進物質など）および毒物動態特性の飽和を示す化学物質は、上記の用量設定基準の例外と考えられ、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、完全な試験では、陰性対照群および通常公比 2 で分けられるが 4 を超えない最低 3 段階の投与量を設ける必要がある。用量設定試験、または既存のデータに基づき被験化学物質が毒性を生じない場合、単回投与の最高用量は 2000 mg/kg 体重とする。一方、被験化学物質が毒性を生じる場合、MTD を最高投与量とし、用いる投与量は、この最高投与量から毒性をほとんどまたは全く生じない用量までの範囲を対象とするのが望ましい。毒性を生じない物質の場合、14 日以上の投与期間の限界用量は 1000 mg/kg 体重/日とし、14 日未満の投与期間の限界用量は 2000 mg/kg 体重/日とする。

用量の投与

28. 試験を設計する際には、想定されるヒト曝露経路を考慮する。このため、正当性が示された場合、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、標的組織の適切な曝露が確保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、特定の科学的正当性がある場合のみ用いる。被験化学物質を飼料または飲水に混ぜる場合、特に単回投与の例では、食餌

© OECD, (2016)

や水の摂取から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、被験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、例外として、水溶液の場合は、最大で 2 mL/100 g を使用可能である。これを超える容量を用いる場合（動物福祉法により可能であれば）、その正当性を示す必要がある。すべての投与量において体重に関して一定の容量を確保するため、濃度の調節により検討容量のばらつきを最小限に抑える。

観察

29. 望ましくは毎日同じ時点で、投与後に予測される作用が最大となる時間を考慮に入れた上で、1 日に少なくとも 1 回、被験動物の全身的な臨床観察を行い、臨床徴候を記録する。投与期間中は 1 日 2 回以上、すべての個体の病的状態や死亡について観察する。試験開始時、反復投与試験の間は週 1 回以上および安楽死の時点ですべての個体の体重を測定する。摂餌量の測定を週 1 回以上行う。被験化学物質を飲水を介し投与する場合、水消費量を水交換時ごとおよび週 1 回以上測定する。非致死性だが過度の毒性の指標を示した動物は、試験期間の完了前に安楽死させる（27）。

組織の採取および処理

30. 雌は、マウスでは妊娠 13 日目（GD13）、ラットでは GD 14～15 の妊娠後期に安楽死させる。着床数、生存胚数、死亡胚数および黄体数を測定するため、子宮の優性致死作用について検討する。

31. 黄体数計数のため子宮角および卵巣を露出し、胎児を取り出し、計数し体重を測定する。生存胎児によって隠されている再吸収がないか子宮を検査し、すべての再吸収の計数を確保するよう注意を払う。胎児の死亡を記録する。順調に妊娠した雌の数、全着床数、着床前胚損失数、および着床後死亡数（初期および後期の再吸収を含む）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（28）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. データは表にして、交配した雄の数、妊娠雌の数、および不妊雌の数を示す。各交配結果は、雄および雌ごとの同一性を含め、個体別に報告する。交配間隔、雄投与群への投与量、生存着床数および死亡着床数を雌ごとに計数する。

33. 着床後胚損失率は、投与群の全着床数に対する死亡率と、媒体対照群／溶媒対照群の全着床数に対する死亡率との比較結果を求めることにより算出できる。

© OECD, (2016)

34. 着床前胚損失率は黄体数と着床数との差として、または、対照群の交配との比較における雌 1 匹あたりの平均着床数の減少として算出される。着床前胚損失が推定される場合には、そのことを報告する。

35. 優性致死率は、（雌 1 匹あたりの着床後死亡数/雌 1 匹あたりの全着床数）× 100 として推定される。

36. （29 項のとおり）毒性および臨床徴候のデータを報告する。

許容基準

37. 試験の許容性は、以下の基準で判定する。

a) 同時陰性対照が、陰性対照（historical negative control）の背景データの公表基準、および入手可能な場合、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 項参照）。

b) 同時陽性対照が、陽性対照（historical positive control）の背景データの公表基準、または入手可能な場合、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もたらし、陰性対照に比べ統計学的に有意な増加となっている（17 項および 18 項参照）。

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 項記載内容と一致している。

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、3 投与群以上について解析する必要がある。

39. すべての許容基準が満たされ、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) 適切な検定により評価した場合、少なくとも 1 つの実験条件（例：週 1 回の交配間隔）での増加が用量依存的である。かつ、

c) これらの結果のいずれかが陰性対照データ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。

この場合、被験化学物質は被験動物の生殖細胞に優性致死突然変異を誘発可能であると判断される。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、その他の推奨される統計手法も、参考文献（20）（21）（22）（24）（29）に見出せる。用いる統計検定では、動物を実験単位とみなす。

© OECD, (2016)

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、被験化学物質は明確に陰性であると判断される。

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ない。

b) いずれの実験条件においても用量依存的な増加が認められない。かつ、

c) すべての結果が、陰性対照データ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）内に収まる。

この場合、被験化学物質は被験動物の生殖細胞に優性致死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明らかな陰性反応については、検証の必要はない。

42. 得られた反応が明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、また、ある結果（例：わずかな増加、または境界線上の増加）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／または既存の実験データを用いた追加調査（陽性結果が、陰性対照データまたは試験施設の陰性対照の背景データの許容範囲外か否かの検討など）により評価する必要がある（30）。

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ず、そのため不明確と結論付けられる場合もある。

44. 用いる統計検定では、雄の動物を実験単位とみなす。計数データ（例：雌 1 匹あたりの着床数）はポアソン分布、および／または割合（例：死亡着床数の割合）は二項分布としうることが考えられる一方、こうしたデータは過分散であることが多い（31）。そのため、統計解析では、コクランの二項分布検定（32）か、二項分布過分散用のタローンの C（α）検定（31）（33）などの分散検定を用いた、過分散／過小分散用の検定をまず採用する。二項分布からの逸脱が認められない場合、投与量全体での割合の傾向にはコクラン・アーミテージの傾向検定（34）を用いた検討が考えられ、対照群との対比較には、フィッシャーの正確検定（35）を用いた検討が考えられる。同様に、ポアソン分布からの逸脱が認められない場合、計数の傾向にはポアソン回帰（36）を用いた検討が考えられ、対照群との対比較には、ペアワイズ対比を用いたポアソンモデル（36）の範囲内での検討が考えられる。著しい過分散または過小分散が認められた場合、ノンパラメトリック法が推奨される（23）（31）。これは順位に基づく検定で、例えば、傾向に関するヨンクヒール・タプストラ検定（37）や媒体／溶媒対照群との対比較に関するマン・ホイットニー検定（38）、また、傾向および対照群との対比較に関しては、並べ替え検定、リサンプリング検定、あるいはブートストラップ検定が挙げられる（31）（39）。

45. 優性致死試験の陽性結果は、被験動物種の雄投与群の生殖細胞について、被験化学物質が遺伝毒性である証拠を示す。

46. 得られた反応の生物学的意義を評価する場合、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、指針が得られる（40）。

試験報告書

© OECD, (2016)

47. 試験報告書には以下の情報を含める。

要約

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
- 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。

被験化学物質の調製：

- 媒体選択の正当性
- 既知の場合、溶媒／媒体中の被験化学物質の溶解度および安定性
- 飼料、飲水または吸入用製剤の調製
- 実施した場合、製剤の分析判定（例：安定性、均一性、名目濃度）

被験動物：

- 使用した動物種／系統および選択の正当化
- 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
- 投与量選択の根拠
- 被験化学物質調製の詳細
- 被験化学物質投与の詳細
- 投与経路の根拠
- 動物に対する毒性の測定方法。入手可能な場合、病理組織学的または血液学的分析および動物の観察と体重測定の頻度を含む。
- 陰性結果が得られた場合、被験化学物質が標的組織または全身循環に達したことの検証方法
- 該当する場合、飼料／飲水中の被験化学物質の濃度（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）

© OECD, (2016)

- 飼料および水の品質の詳細
- ケージ環境改善に関する詳細
- 投与および試料採取スケジュールの詳細な記述およびその選択の正当化
- 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およびロット番号（該当する場合）
- 優性致死の算出方法
- 交配スケジュール
- 交尾済みの判断に用いた方法
- 安楽死の時期
- 優性致死作用のスコアリング基準：黄体数、着床数、再吸収数、着床前胚損失数、生存着床数、死亡着床数を含む。

結果：

- 試験期間前および期間全体の動物の状態（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
- 可能な場合、用量反応関係
- 同時陰性対照および陰性対照の背景データ（範囲、平均値および標準偏差）
- 同時陽性対照データ
- 以下の項目を含む表形式データまたは各雌親のデータ：雌親 1 匹あたりの黄体数、雌親 1 匹あたりの着床数、雌親 1 匹あたりの再吸収数および着床前胚損失数、雌親 1 匹あたりの生存着床数、雌親 1 匹あたりの死亡着床数、および胎児の体重
- 優性致死頻度と共に、交配期間ごと投与量ごとに要約された上記データ
- 統計解析結果および適用した方法

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) 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

(3) 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 .

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

(5) 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.

(6) 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.

(7) 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.

(8) 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.

(9) 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.

(10) 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.

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

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

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

(14) 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.

© OECD, (2016)

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

(16) 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.

(17) 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.

(18) 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.

(19) 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.

(20) 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.

(21) 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.

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

(23) 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 .

(24) 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.

(25) 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.

(26) 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.

(27) 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.

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

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

© OECD, (2016)

(30) 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

(31) 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.

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

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

(34) 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.

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

(36) 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

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

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

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

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

© OECD, (2016)

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、排卵された卵子数と一致する。

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：交配した妊娠雌数/交配した雌数。

交配間隔：雄投与群の最終曝露から交配までの期間。この間隔を管理することで、様々な生殖細胞種に及ぼす化学物質の作用を評価できる。マウスの場合、最終曝露後 1、2、3、4、5、6、7、8 週間の交配により、精子、凝縮精子細胞、円形精子細胞、パキテン期精母細胞、初期精母細胞、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おける作用が測定される。

着床前胚損失数（率）：着床数と黄体数の差。雌 1 匹あたりの全着床数を、投与群と対照群とで比較することによる推定もできる。

着床後胚損失数（率）：対照群での全着床数に対する死亡率との比較による、投与群での死亡着床率。

© OECD, (2016)

補遺 2

哺乳類における精子形成のタイミング

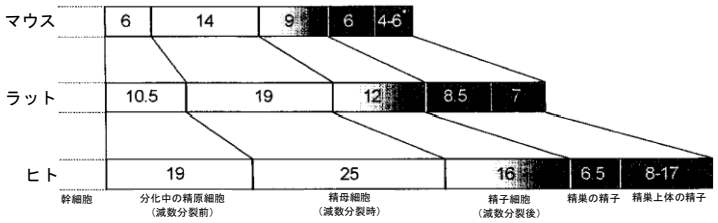


図 1. マウス、ラット、ヒトにおける雄生殖細胞発生期間（日数）の比較。陰影で示された期間には、DNA 修復は発生しない。

マウス、ラット、ヒトの精子形成の概略図を上記に示す（Adler, 1996 より引用）。未分化型精原細胞には A-single、A-paired、A-aligned の各精原細胞が挙げられる（Hess and de Franca, 2008）。A-single 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、被験化学物質の最終投与から交配まで 49 日以上（マウスの場合）経過していなければならない。

参考文献

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.

© OECD, (2016)