OECD/OCDE

1997/07/21

試験ガイドライン No.483

哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (1997), Test No. 483: Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-483-1997.pdf.

©OECD(1997)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験

はじめに

1. 哺乳類の *In vivo* 染色体異常試験の目的は、哺乳類の精原細胞を用いて構造異常をきたす物質を特定することにある(1)(2)(3)(4)(5)。構造異常には 2 つのタイプ、いわゆる染色体異常および染色分体異常がある。染色体異常を誘発する変異原性物質の多くは染色分体型異常であるが、染色体型異常もみられる。このガイドラインが企画されたのは異常数を測定するためではなく、まして、そのために日常的に使用するためでもない。染色体突然変異および関連する現象は、多くのヒト遺伝病の原因である。

2. この試験は精原生殖細胞で生じる染色体関連事象を測定する。したがって、生殖細胞における遺伝的な突然変異の誘発を予想できると期待される。

3. 用いた定義を補遺に提示する。

最初に考慮すべき事項

4. げっ歯動物が、この試験で一般的に使われる。この *in vivo* 細胞遺伝学的試験は、精原細胞分裂における染色体異常を検出する。それ以外に影響を受ける細胞は、このガイドラインの対象ではない。

5. 精原細胞で染色分体型異常を検出するために、これらの異常が以降の細胞分裂で失われる前に、処理後の第 1 有糸分裂を調べる。精原幹細胞に関する更なる情報は、処理した精原幹細胞が精母細胞に分化する途中で減数分裂中の移動期、いわゆる中期 I の染色体について検査し、染色体型異常の有無を知ることにより得られる。

6. この *in vivo* 試験は、体細胞突然変異誘発物質が生殖細胞でも作用するかどうか調べるようにデザインされた。更に、精原細胞試験は変異原性を評価するためにも、それによって *in vivo* 代謝、薬物動態学および DNA 修復過程に係わる因子に関する考察が可能になるという点で重要である。

7. 精巣には何世代もの精原細胞が存在し、化学物質に対する感受性は多種多様である。したがって、検出された異常は化学物質に接触した精原細胞集団全体の応答を表しており、より分化の進んだ精原細胞によるものが大きい。世代の異なる精原細胞は精巣内の位置に依存し、全身循環に暴露される場合とされない場合がある。なぜなら、セルトリ細胞の物理的および生理的細胞関門と血液精巣関門が存在するからである。

8. 被験物質または反応性代謝産物が標的組織に達し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. 動物を適切な経路で被験物質に暴露し、暴露後適当な時間に屠殺する。屠殺の前に、動物に分裂中期停止剤（例えば、コルヒチンまたはColcemid®）を投与する。次に、生殖細胞から染色体標本を作製、染色し、中期細胞の染色体異常を分析する。

試験方法

準備

動物種の選択

10. 雄のチャイニーズハムスターとマウスが一般的に用いられる。ただし、他の適当な哺乳類の雄を用いてもよい。一般的に用いられる実験動物の系統で、若齢健康成熟動物を使用する。試験開始時、使用動物の体重のばらつきは最小限とし、各性の平均体重の±20%を超えないこととする。

飼育および給餌条件

11. 動物飼育室の温度は22°C±3°Cとする。相対湿度は目標値を50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で12時間明期、12時間暗期とする。飼料は、通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合には、被験物質とよく混合できる飼料を選択する必要が生じる場合がある。動物は個別飼育するか、または同性の動物を群飼いする。

動物の準備

12. 健康な若齢成熟動物を対照群と投与群に無作為に割り付ける。ケージの位置による影響を最小限にするように考慮しながら、ケージを配置する。全ての動物を個体識別する。本試験の開始前に、動物は5日間以上飼育室環境に馴化させる。

被験物質の準備

13. 固体の被験物質は細胞に添加する前に適切な溶媒／溶剤に、溶解／懸濁するか、必要に応じて希釈する。液体の被験物質は試験系に直接添加するか、添加前に希釈する。保存有効期間を示す安定性データがない限り、被験物質の新鮮な溶液を用いる。

試験条件

溶剤／溶媒

14. 溶剤／溶媒は、投与に用いる量で毒性効果を生じてはならないし、被験物質との化学反応を起こす疑いがないものを用いる。性質が既知ではない溶剤／溶媒を用いるときは、適合

性を示すデータが助けとなる。可能であれば、まず水溶性の溶剤／溶媒を用いることが推奨される。

対照

15. 試験ごとに、それぞれの性において、陽性および陰性（溶剤／溶媒）対照を同時に設定する。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。

16. バックグラウンドに比較して検出可能な増加となるべき暴露量においては、陽性対照は *in vivo* で精原細胞に染色体構造異常を生じさせるものとする。陽性対照の用量は明らかな効果が発現し、かつ割り付けられたスライドの帰属が研究者にとって自明とならないように設定する。陽性対照を被験物質とは異なる経路で投与すること、および 1 回のサンプリングは容認できる。更に、入手可能な場合、化学クラス関連の陽性対照化学物質の使用を考慮してもよい。陽性対照物質の例を以下に示す。

化学物質および CAS 番号
シクロホスファミド（一水和物）[CAS 番号 50-18-0（CAS 番号 6055-19-2）]
シクロヘキシルアミン[CAS 番号 108-91-8]
マイトマイシン C[CAS 番号 50-07-7]
アクリルアミドモノマー[CAS 番号 79-06-1]
トリエチレンメラミン[CAS 番号 51-18-3]

17. 陰性対照物質のきたす染色体異常の動物間変動および出現頻度に関する背景のデータが満足すべきものでない限り、溶剤または溶媒のみで処理する以外は、処理群と同様に扱う陰性対照を全てのサンプリング時に設定する。更に、選択した溶剤／溶媒が無害であることを証明する背景データまたは公表された対照データがない限り、無添加の対照を用いる。

手順

動物数

18. 各群とも、5 匹以上の分析可能な雄動物を含める。

投与スケジュール

19. 被験物質は単回投与または 2 回投与（すなわち、1 回または 2 回の処理として投与）するのが望ましい。被験物質を分割して 2、3 時間を超えない間隔で同じ日に投与すれば、容量の大きな物質の投与も容易になる。上記以外の投与法の場合には、科学的に正当な理由が必要である。

20. 最高用量群において、投与後 2 回のサンプリングを行う。細胞周期の動態は被験物質によって影響されるので、初期と後期に 1 回ずつ、すなわち投与後約 24 時間と 48 時間にサンプリングする。最高用量以外の用量については、投与後 24 時間または 1.5 細胞周期長に 1 回サ

ンプルを採取する。ただし、効果を検出するうえで、より適切な時間が分かっている場合はこの限りでない(6)。

21. 更に、他のサンプリング時間を使用する場合もある。例えば、染色体の移動を遅らせるもの、または S 期に依存しない効果を及ぼす化学物質については、より初期のサンプリングが適切であろう(1)。

22. 繰り返し投与スケジュールが適切かどうかは、それぞれの状況で判断する必要がある。繰り返し投与スケジュールに従った場合、最終投与後 24 時間（1.5 細胞周期長）に動物を屠殺する。必要に応じて、更にサンプリング時間を加えてもよい。

23. 動物は、屠殺前に分裂中期停止剤（例えば、Colcemid®またはコルヒチン）を腹腔内注射する。その後適当な間隔で動物を屠殺し、サンプリングする。この間隔はマウスの場合は約 3～5 時間、チャイニーズハムスターの場合は約 4～5 時間である。

投与量

24. 適切なデータがないため用量設定試験を実施する場合は、本試験実施機関で、本試験で使用するのと同じ種、系統、性および投与計画によって実施する(7)。毒性がある場合、最初のサンプリング時には 3 つの用量を設定する。これらの用量は、最大からほとんどか、あるいは全く毒性を示さない量までをカバーする。以後のサンプリング時には、最高用量のみを行えばよい。最高用量は毒性の徴候を呈す用量で、同じ投与計画で更に高用量の投与を続ければ致死を引き起こすと予想される用量と定義する。ホルモンやマイトジェンのように毒性を表さない低用量で特異的な生物活性を示す物質は、このような用量決定基準の適用外であり、それぞれの状況によって評価する。最高用量は、精原細胞に対して何らかの毒性発現の徴候をもたらす用量と定義することも可能である（例えば、精原細胞の第 1 および第 2 減数分裂中期に対する精原細胞有糸分裂の比率の減少であれば、この減少は 50%を超えてはならない）。

限度試験

25. 少なくとも 2000 mg/kg 体重の用量を 1 日 1 回または 1 日 2 回に分けて投与する試験において毒性の徴候が全く認められず、かつ構造的に関連する物質のデータに基づいて遺伝毒性が予想できない場合には、3 用量を用いる完全な試験の必要はないと考えてよい。ヒトで想定される暴露量によっては、限度試験においても更に高用量の使用が必要になる可能性はある。

投与

26. 被験物質は、通常、胃ゾンデまたは適切な挿管カニューレを用いた強制投与によって、または腹腔内注射によって投与される。正当な理由があるなら、他の暴露経路も受け入れ可能である。強制投与または注射により 1 回に投与できる液体の最大体積は、供試動物の大きさに依存し、2 mL/100g 体重を超えてはならない。より大きい体積の使用は、正当な理由が必要である。通常高濃度ほど影響が顕著になる刺激性または腐食性物質の場合を除き、被験物質溶液の濃度を調節して量のばらつきを最小限にし、全用量で投与容量が一定になるようにする。

染色体の準備

27. 屠殺後直ちに、一方または両方の精巣から細胞懸濁液を調製し、低張溶液に暴露して固定する。次に、細胞をスライド上に広げて、染色する。

分析

28. 動物あたり少なくとも 100 のよく広がった中期像を分析する（すなわち、各群で最低 500 の中期像）。異常が多数観察される場合、この数を減らすことができる。陽性および陰性対照を含む全てのスライドを顕微分析する前に、それぞれコード化する。固定の手順により染色体を欠失した分裂中期細胞の割合が崩れることがあるため、全細胞種についてセントロメア数が染色体数± 2 に等しい数を含むようにする。

データおよび報告

結果の処理

29. 動物の個体ごとのデータは総括表として示す。実験単位は動物ごとに成立っている。各動物について、染色体構造異常を伴う細胞数および細胞あたりの染色体異常数について評価する。染色体構造異常の型の違いについても、各群ともに、その数および出現頻度を表に示す。ギャップについては別に記録し報告されるべきだが、一般に全異常頻度には含めない。

30. 減数分裂と同時に細胞分裂を観察する場合、第 1 および第 2 減数分裂中期に対する精原細胞分裂の比率を決定する。これは細胞毒性の尺度となるので、細胞毒性効果の有無を確立するためには、全ての処理動物および対照動物について、動物あたり 100 の分裂中の細胞について測定する。細胞分裂のみを観察する場合は、動物あたり 1000 以上の細胞で分裂指数を決定する。

結果の評価および解釈

31. 染色体異常のある相対的な細胞数が用量依存的に増加するとか、1 回のサンプリング時にある用量群の染色体異常細胞数が明らかに増加するなど、陽性結果を決定する基準がいくつかある。結果の生物学的関連をまず考慮する。統計解析は結果を評価する目的で用いる(8)。ただし、統計学的な有意差は陽性反応を決定付ける唯一の因子ではない。結果が不確定な場合は、更に試験を繰り返して明らかにすべきであるが、その際実験条件を修正することが望ましい。

32. 結果が上記の基準と合致しない被験物質は、本試験系では変異原性を有さないと考えられる。

33. 多くの実験で明らかな陽性または陰性結果を示していても、データセットから被験物質の活性を明確に判定できないことがまれにある。繰り返される実験回数に限らず、不確かな結果や疑問のある結果が解決されないことがある。

34. *In vivo* 精原染色体異常試験の陽性結果は、試験に用いた種の胚細胞で被験物質が染色体異常を誘発することを意味する。一方、試験条件下で示す陰性の結果は、被験物質が試験に用

いた種の胚細胞で、被験物質が染色体異常を誘発しないことを意味する。

35. 被験物質またはその代謝産物が標的組織に達する可能性について、議論しなければならない。

試験報告書

36. 試験報告書は、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
- 分かっている場合、特定データと CAS 番号
- 物理的性質と純度
- 試験の実施に関連する物理化学的性状
- 分かっている場合、被験物質の安定性

溶剤／溶媒
- 溶媒選択の妥当性
- 分かっている場合、溶剤／溶媒中の被験物質の溶解性と安定性

供試動物
- 使用する種、系統
- 動物数、週齢および性
- 供給元、飼育状況、飼料、その他
- 試験開始時の動物の個体ごとの体重、各群の体重範囲、平均および標準偏差

試験条件
- 実施した場合、用量設定試験のデータ
- 用量選択の妥当性
- 投与経路の妥当性
- 被験物質調製の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 屠殺時間の妥当性
- 必要に応じて、飼料／飲水中の被験物質濃度（ppm）から実際の用量（mg/kg 体重/day）への換算方法
- 飼料および水の質の詳細
- 投与およびサンプリングスケジュールの詳細な説明
- 毒性の測定方法
- 分裂中期停止剤の特定、濃度および暴露期間
- スライド標本作製方法
- 異常をスコア化するための基準
- 動物あたりの分析した細胞数
- 陽性、陰性、不確かな結果を示す試験の基準

結果
- 毒性の徴候

- 分裂指数
- 第 1 および第 2 減数分裂中期に対する精原細胞分裂の比率
- 各動物の染色体異常の型と数
- 各群の異常の総数
- 各群の異常を伴う細胞数
- 可能な場合、用量反応関係
- もしあれば、統計解析
- 同時に実施した陰性対照データ
- 背景の陰性対照データ、範囲、平均および標準偏差
- 同時に実施した陽性対照データ
- 観察された場合、倍数体の変化

結果の考察

結論

参考文献

(1) Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(2) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J.Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(6) 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.

(7) 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. Mutagenesis, 7, 313-319.

(8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub- Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

補遺

定義

染色分体型異常：1 つの染色分体の破損または染色分体間の切断と再結合として表される構造染色体の損傷。

染色体型異常：2 つの染色分体の同一部位における破損、または同一部位における切断と再結合として表される構造染色体異常。

ギャップ:1 染色分体の幅よりも小さい非染色性部位で、染色分体の最小のずれ。

数的異常：使用した動物において染色体数の正常数からの変化。

倍数体：2 倍体以外の半数体染色体(n)の複数（すなわち、3n、4n など）

構造異常：細胞分裂中期に顕微鏡で確認できる染色体構造の変化。欠失、断片、構造内変化、構造間変化としてみられる。