OECD/OCDE

2015/07/28

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.

Reference:

OECD (2016), Test No. 483: Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264847-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

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

哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験

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 483 は 1997 年に採択された。今回の改訂版試験ガイドラインは、長年にわたる本試験の実施経験、ならびに他の毒性試験または遺伝毒性試験との併合の可能性を反映したものである。毒性試験の併合は、使用動物数を削減する可能性につながる。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 1 つである。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. 哺乳類の精原細胞を用いる *in vivo* 染色体異常試験の目的は、精原細胞の染色体に構造異常を誘発する化学物質を特定することにある(1)(2)(3)。さらに、本試験は、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。このガイドラインが企画されたのは、数的異常を観察するためではない。また、そのために試験をルーチンに使用するためでもない。

3. この試験は、分裂中の精原細胞に生じる染色体構造異常（染色体型および染色分体型の両方）を観察する。したがって、これら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。

4. 主な用語の定義を補遺に示す。

最初に考慮すべき事項

5. 本試験では通常げっ歯類が用いられるが、科学的妥当性が示されれば、他の動物種も使用できる。げっ歯類の精巣の標準的な染色体標本は、精原細胞の体細胞分裂および精母細胞の減

© 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。

数分裂を観察できる。体細胞分裂と減数分裂の分裂中期像は、染色体の形態に基づいて特定される(3)。この *in vivo* 細胞遺伝学的試験は、精原細胞の細胞分裂における染色体構造異常を検出するもので、他の生殖細胞は、このガイドラインの対象ではない。

6. 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染色体型異常に変換される前に、処理後の最初の細胞分裂を調べる。処理された精母細胞に関する追加情報は、第一減数分裂前期の移動期（ディアキネシス）から中期および第二減数分裂中期の染色体について検査し、染色体構造異常の有無を知ることにより得られる。

7. 精巣には数世代の精原細胞が存在し(4)、これら世代の異なる生殖細胞のタイプには化学物質処理に対する多様な感受性があると考えられる。したがって、検出された異常は処理された精原細胞集団全体の反応を表している。精巣標本における細胞分裂中期像の大部分は、B 型精原細胞で、その細胞周期は約 26 時間である(2)。

8. 被験物質またはその代謝産物が精巣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. 一般に、動物を適切な経路で被験物質に曝露し、曝露後適切な時間に安楽死させる。安楽死の前に、動物に分裂中期停止剤（例えば、コルヒチンまたはコルセミド®）を投与する。次に、生殖細胞の染色体標本を作製、染色し、分裂中期の染色体異常を分析する。

試験施設の習熟度の検証

10. この試験の遂行能力は、表 1 に示す陽性対照物質（弱陽性反応を含む）により精原細胞に生ずる染色体構造異常の頻度について予測される結果を再現できることを示すこと、および陰性対照データ[1]の許容範囲（例：(1)(2)(5)(6)(7)(8)(9)）と一致していること、または入手可能な場合は、試験施設の背景対照分布と一致する陰性対照頻度を得ることで証明すべきである。公表されているデータに基づく対照値の許容範囲の選択に関する更なるガイダンスは、今後発表される遺伝毒性に関するガイダンス文書に記載される。

試験方法

準備

[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。

動物種の選択

11. 一般的に用いられる実験動物の系統で、健康な若齢成熟動物を使用する。雄マウスが一般的に用いられる。ただし、科学的な妥当性があり、他の試験ガイドラインと併せてこの試験を実施する場合は、他の適切な哺乳類の雄を用いてもよい。げっ歯類以外の動物種を使用する場合は、その科学的根拠を報告書に記載する。

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 22ºC（±3ºC）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、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、適切に混できる飼料を選択する。げっ歯類では、攻撃行動が予期されない場合、少数（ケージあたり 5 匹以下）で飼育し、適切な環境を確保した平底ケージの使用が望ましい。1 匹ずつの個別飼育は、科学的妥当性がある場合は可能である。

動物の準備

13. 通常は健康な雄の若齢成熟動物（投与開始時点で 8～12 週齢）を使用し、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あるいは生体認証が挙げられるが、耳パンチや指切法は用いない）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による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、±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、または媒体に溶解、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おそれのないものを

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。特殊な溶媒／媒体を選択する場合、それによる染色体構造異常および他の悪影響が生じないことを示した背景対照データまたは公表された対照データがないときは、本溶媒／媒体対照が使用できることを証明するための試験を最初に実施する必要がある。

陽性対照

16. 同時陽性対照群用の動物を常に使用する。ただし、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）、日常的にこの試験を実施している場合はこの限りではない。同時陽性対照群を設けない場合は、実験ごとに観察用対照標本（固定した未染色スライド）を含める。これらは、試験施設において、定期的（例：6～18 ヵ月ごと）に別途実施した陽性対照実験、例えば、習熟度検証試験の間やその後必要に応じた定期的試験で作製され保存された適切な陽性対照標本から得ることができる。

17. 陽性対照物質は、染色体構造異常を有する細胞の出現頻度において、自然発生レベルと比較して、増加が確実に検出できるものでなければならない。陽性対照の用量は、作用は明らかであるが、コード化された標本が測定者によって直ちに特定されないよう選択する必要がある。陽性対照化学物質の例を表 1 に示す。

表 1. 陽性対照化学物質の例

化学物質［CAS 番号］（参照文献）
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）] (8)
シクロヘキシルアミン[CAS 番号 108-91-8] (6)
マイトマイシン C[CAS 番号 50-07-7] (5)
アクリルアミドモノマー[CAS 番号 79-06-1] (9)
トリエチレンメラミン[CAS 番号 51-18-3] (7)

陰性対照

18. 溶媒または媒体のみで処理する以外は、処理群と同様に扱う陰性対照動物群を各試料採取時に設定する。選択された溶媒／媒体による染色体異常または他の悪影響が生じないことを示した背景対照データまたは公表された対照データがないときは、本溶媒／媒体対照が使用できることを証明するために各試料採取時に無処理対照群も含める。

手順

動物数

19. 動物数は、試験開始時に 1 群当たり雄 5 匹以上となるように設定する。これは適切な統計検出力を得るために十分とされている数である（つまり、一般的には陰性対照の染色体異常頻度が 1.0%以上のとき、少なくとも 2 倍の染色体異常頻度を有意水準 0.05 で、80%の確率で検出できる）(2)(10)。動物の最大必要数の目安として、3 用量群および同時陰性対照群ならびに陽性対照群（各群とも 5 匹から構成）を設け、2 回の試料採取を行う試験では、45 匹の動物が必要となる。

投与スケジュール

20. 被験物質は、通常単回投与（すなわち、1 回の処理）する。それ以外の投与法も可能であるが、科学的に正当な理由が必要である。

21. 最高用量群において、投与後 2 回の試料採取を行う。被験物質の摂取および代謝に必要な時間は、細胞周期の動態への影響と同様、染色体異常検出に最適な時間に影響するため、早期と後期に 1 回ずつ、すなわち投与後約 24 時間と 48 時間に試料採取する。最高用量以外の用量については、早期の投与後 24 時間に 1 回試料を採取する（B 型精原細胞の細胞周期と同等か短いものとし、これによって処理後の最初の分裂中期を観察できる可能性を最適なものにする）。ただし、より適切な時間とその妥当性が分かっている場合はこの限りでない。

22. 他の試料採取時間を使用する場合もある。例えば、S 期に依存しないで影響を及ぼす化学物質については、より早期の試料採取（つまり、24 時間未満）が適切であろう。

23. 28 日間の投与期間を用いた別の評価項目に対する試験（例：OECD TG 488）と併合して、反復投与計画を使用する場合もある。ただし、異なる試料採取時を設けるため、追加動物群が必要となる場合がある。そのため、反復投与計画が適切かどうかは、それぞれの状況で科学的に判断する必要がある。

24. 動物を、安楽死させる前に分裂中期停止剤（例えば、コルセミド®またはコルヒチン）の適切な用量を腹腔内投与する。その後適切な時間間隔で動物を安楽死させ、試料採取する。この間隔はマウスとラットの場合は約 3～5 時間である。

投与量

25. 用量選択に役立つ既存の入手可能な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、用量設定試験実施の勧告にしたがい、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、系統および投与計画を用いて行う(11)。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、試験期間の長さに関連する軽微な毒性作用（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）を誘発するが、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と定義される(12)。

26. 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できる（例えば、精母細胞の第一および第二減数分裂中期に対する精原細胞の体細胞分裂の比率の減少）。この減少は 50%を超えてはならない。

27. ホルモンや分裂刺激物質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被験物質およびトキシコキネティクスが飽和を示す物質は、このような用量設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。

28. 用量反応性に関する情報を得るために、陰性対照群（18 項参照）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生じない場合、最高用量は単回投与の場合 2000 mg/kg 体重とする。一方、被験物質が毒性を示す場合、MTD を最高投与量とし、用量段階は、この最大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含めるのが望ましい。試験したすべての用量で標的組織（つまり精巣）に対する毒性が認められた場合、非毒性用量での試験を追加することが望ましい。定量的用量反応性をより詳細に明らかにすることを意図した試験では、さらに多くの用量群が必要となる。特別な要件が適用されるある種の被験物質（例：ヒト用医薬品）の場合、限界量が上記とは異なる場合がある。被験物質が毒性を生じる場合は、限界用量ならびにそれより低い 2 用量段階（上記参照）を選択すべきである。限度用量は投与期間が 14 日以上の場合には 1000 mg/kg 体重/日、投与期間が 14 日未満の場合には 2000 mg/kg 体重/日とする。

投与

29. 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混餌、飲水、局所皮下、静脈内、経口（強制）、吸入、または埋植などの投与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は生理的に適切な投与経路ではないため、科学的妥当性がある場合を除いては、通常は推奨されない。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、餌や水の摂取と試料採取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（33 項参照）。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 体重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。すべての用量段階で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

30. 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動物の全身的な臨床観察を行い、一般症状を記録する。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を確認する。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。1 週間以上を要する試験の場合、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ごと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(12)。

染色体標本

31. 安楽死後直ちに、一方または両方の精巣から生殖細胞懸濁液を調製し、確立されたプロトコールに従って、低張液で処理した後に固定する（例：(1)(13)(14)）。次に、細胞をスライド上に広げて、染色する(15)(16)。観察者が標本の処理群を特定できないようすべてのスライドをコード化する。

分析

32. 動物あたり少なくとも 200 個のよく広がった分裂中期像を観察する(2)(10)。陰性対照の背景出現頻度が 1%未満の場合は、統計検出力を増加させるために各個体 200 細胞以上を観察する必要がある(2)。動原体を識別できる染色法を使用する。

33. 染色体型および染色分体型の異常はそれぞれ区別して記録し、さらに細分類（切断、交換）する。ギャップについては記録されるべきだが、染色体異常を有する細胞の出現率に有意な増加をもたらす物質かどうか判定する際には考慮に入れない。試験施設で使用する手順書には、染色体異常の分析について十分に訓練を受けた観察者により実施されることを規定しておく必要がある。スライド標本作製手順により、分裂中期像の一部に破損を生じることがしばしばあり、その結果として染色体を失うことが知られているため、分析する細胞は 2n±2（n は使用動物種の染色体の半数体の数）以上の数の動原体を含むこととする。

34. 試験の目的は染色体の構造異常を検出することであるが、倍数体の細胞および染色体の核内倍加の細胞が観察された場合には、それらの頻度を記録しておくことが重要である（44 項参照）。

データおよび報告

結果の処理

35. 動物の個体ごとのデータは表で示す。各動物について、染色体構造異常を有する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。染色分体型および染色体型の異常を細分類（切断、交換）し、それぞれについて処理群および対照群における出現数およびその頻度を記録する。ギャップは他の異常とは区別して記録する。ギャップの頻度は報告するが、一般に全染色体構造異常頻度の分析には含めない。倍数体の細胞および核内倍加の細胞が観察された場合はその割合（%）を報告する。

36. 毒性および症状のデータを（30 項に示す通り）報告する。

許容基準

37. 以下に試験が許容できるか否かを判定するための基準を示す。

a) 同時陰性対照は、一般に染色体異常を有する細胞が 0%を上回り、1.5%以下と予想される陰性対照背景データの公表された基準と、入手可能な場合、試験施設の陰性対照背景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、陽性対照背景データの公表された基準、または入手可能な場合、試験施設の陽性対照背景データと一致した反応を誘発し、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) 適切な細胞数および投与用量数の解析が行われている（28 項および 32 項参照）。
d) 最高用量の選択基準が、25 項および 26 項に記載の基準と合致している。

38. 精原細胞の体細胞分裂と精母細胞の減数分裂の両方を観察する場合、精母細胞の第一および第二減数分裂中期像に対する精原細胞分裂中期像の比率を決定する。これは細胞毒性の尺度となるので、すべての処理動物および陰性対照動物における、動物あたり 100 個の分裂細胞について測定する。精原細胞の分裂のみを観察する場合は、動物あたり 1000 個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

39. 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。

40. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陽性と判定される。

a. 少なくとも 1 つの試験用量で、同時陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加を示しており、
b. その増加が少なくとも 1 つの試料採取時点で用量依存性である。さらに、
c. 当該結果は陰性対照データ [2]の許容範囲外である。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：ポアソン分布に基づく 95%管理限界）から外れている。

この場合、被験物質は供試動物の精原細胞において染色体異常を誘発すると判定される。適切な統計学的手法に関する勧告も文献に発表されている(10)(17)。使用した統計学的検定では動物個体を実験単位とする。

41. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陰性と判定される。

a. いずれの試験用量においても、同時陰性対照群と比較して、統計学的に有意な増加を示さず、
b. いずれの実験条件においても、用量依存性の増加がみられない。さらに、
c. すべての結果が陰性対照データ [3]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（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、被験物質は供試動物の精原細胞において染色体異常を誘発しないと判定される。適切な統計学的手法に関する勧告も文献に発表されている(10)(17)。陰性の結果は、化合物が試験されていないより後期の発生時期に染色体異常や遺伝子突然変異を誘発するという可能性を除外しない。

42. 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。

43. 得られた反応が明らかに陰性でも陽性でもない場合、また結果の生物学的妥当性を確認する

[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。

必要がある場合（例：わずかな増加、または判断困難な境界線上の増加）には、専門家判断によってそのデータを詳細に評価しなければならない。さらに、陽性結果が陰性対照データ[1]または試験施設の陰性対照背景データの許容範囲外かどうかを考慮のうえ、既存の実験データを用いた追加検証を行い、そのデータを詳細に評価する必要もある(18)。

44. 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。

45. 倍数体の細胞数の増加は、被験物質が分裂過程を阻害し、染色体数的異常を誘発する可能性を示唆する(19)。核内倍加の細胞数の増加は、被験物質が細胞周期過程を阻害する可能性を示し(20)(21)、それは分裂過程の阻害とは異なる機序によって染色体の数的変化を誘発している（2 項参照）。そのため倍数体の細胞と核内倍加の細胞の出現頻度はそれぞれ別に報告する。

試験報告書

46. 試験報告書は、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、溶媒中の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
－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、処方物の分析項目（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、および週齢
－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動物の体重；1週間を超える試験の場合：試験中の各動物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
－実施した場合、用量設定試験のデータ
－投与用量段階選択の根拠
－投与経路の設定根拠
－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
－動物に対する毒性の検査方法、該当する場合には病理組織学的または血液学的検査ならびに動物の観察および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に達したこと、または全身循環に入ったことを証明する方法
－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
－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
－安楽死の方法
－鎮痛方法（使用した場合）
－組織の分離手順
－分裂中期停止剤の特定、濃度および曝露期間
－スライド標本作製方法
－異常の判定基準
－動物あたりの分析した細胞数
－陽性、陰性、不明確と判断する基準

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）
－屠殺時の体重および器官重量（複数の曝露を行った場合は、投与期間中の体重）
－毒性の徴候
－分裂指数
－精母細胞の第一および第二減数分裂中期に対する精原細胞の分裂中期の比率、または標的組織が曝露された他の証拠
－各動物における染色体異常の型と数
－平均値および標準偏差を含む各群の染色体異常の総数
－平均値および標準偏差を含む各群の染色体異常を伴う細胞数
－可能な場合、用量反応関係
－統計解析と適用した方法
－同時に実施した陰性対照データ
－範囲、平均および標準偏差を含む陰性対照背景データ、および95%の信頼区間（該当する場合）、または試験結果の許容に用いた公表された陰性対照背景データ
－同時に実施した陽性対照データ
－観察された場合、倍数性の変化（倍数体および核内倍加の細胞の出現頻度を含む）。

結果の考察

結論

LITERATURE

(1) 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.

(2) 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.

(3) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(4) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008) Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(5) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.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.

(6) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(7) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(8) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

(9) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(10)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.

(11)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.

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

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

(14)Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(15)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.

(16)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.

(17)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 SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(18)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.

(19)Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(20)Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(21)Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells During Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

補遺

用語の定義

異数性：正常な二倍体（または半数体）の染色体数から 1 個もしくは複数の染色体の増減があること。ただし、染色体全体（セット）での倍加（倍数体）は含めない。

動原体：細胞分裂中に紡錘糸が染色体と結合する部位。これにより娘細胞の極に向かって娘染色体が規則正しく移動することができる。

染色体の多様性：染色体の形（中部動原体型、端部動原体型など）および大きさの多様性。

染色分体型異常：片方の染色分体の切断または染色分体間の切断と再結合による染色体の構造的損傷。

染色体型異常：両方の染色分体の同一部位における切断または同一部位における切断と再結合による染色体の構造的損傷。

染色体異常誘発物質：細胞集団または生物に染色体の構造異常を引き起こす物質。

ギャップ：染色分体の幅よりも小さい非染色性部位で、染色分体の最小の不連続性。

遺伝毒性：DNA や染色体のあらゆる種類の損傷の総称。切断、欠失、付加体、ヌクレオチドの修飾や架橋、再配列、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。

分裂指数（MI）：細胞集団中の観察した細胞総数に対する分裂中期細胞の割合。その細胞集団における細胞増殖の度合いの指標となる。

体細胞分裂：細胞核の分裂で、通常、前期、前中期、中期、後期、終期に分けられる。

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

数的異常：使用動物の正常な染色体数からの数的変化。

倍数体：2 倍体（2n）を除く、半数体の染色体数(n)の整数倍加（すなわち、3n、4n など）

構造異常：細胞分裂中期に顕微鏡観察で検出される染色体の構造の変化で、欠失、断片および交換として観察される。