OECD/OCDE

2016/07/29

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 (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

OECD/OCDE 483
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

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。試験ガイドライン 483 の初版は 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経験、および本試験と他の毒性試験または遺伝毒性試験との統合または併合の可能性を反映している。毒性試験の併合は、毒性試験に用いる動物数の削減となる可能性がある。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. 哺乳類の精原細胞を用いる *in vivo* 染色体異常試験の目的は、哺乳類の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（2）（3）（4）。さらに、*in vivo* での代謝、薬物動態および DNA 修復過程の諸要因が動物種間で異なりうるとはいえ、機能し遺伝毒性反応に寄与していることから、本試験は、遺伝毒性の評価に妥当である。本ガイドラインは数値の異常の測定を目的とはせず、本試験法をこの目的で日常的に用いることはない。

3. 本試験では、分割中の精原細胞における染色体構造異常（染色体型および染色分体型の両方）を評価するため、これらの生殖細胞における遺伝的な突然変異誘発の予測が期待される。

4. 重要な用語の定義を補遺に示す。

最初に考慮すべき事項

5. 本試験にはげっ歯類が日常的に用いられるが、科学的正当性がある場合、一部の例では他の動物種が適切であると考えられる。げっ歯類の精巣の標準的な細胞遺伝学的標本から、有糸分裂中期（精原細胞）および減数分裂中期（精母細胞）が明らかにされる。有糸分裂中期と減数分裂中期は、染色体の形態に基づいて特定される（4）。本 *in vivo* 細胞遺伝学的試験は、精原細胞の有糸分裂における染色体構造異常を検出する。それ以外の標的細胞は、このガイドラインの対象ではない。

6. 精原細胞の染色分体型異常を検出するため、これらの異常がその後の細胞分裂で染色体型異常に変換される前に、投与後の最初の有糸細胞分裂を検討する。投与後の精母細胞の追加情

© 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］。

報は、移動期～第一分裂中期および第二分裂中期における、染色体構造異常に関する減数分裂の染色体分析により入手できる。

7. 精巣には数世代の精原細胞が存在し（5）、これらの様々な生殖細胞型には、化学物質投与に対し広範な感受性があると考えられる。したがって、検出された異常は投与後の精原細胞集団全体の反応を表している。精巣標本における有糸分裂細胞の大多数は B 型精原細胞で、その細胞周期は約 26 時間である（3）。

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、適切な曝露経路により動物を被験化学物質に曝露させ、投与後適切な時期に安楽死させる。安楽死の前に分裂中期停止剤（例：コルヒチンまたはコルセミド®）を動物に投与する。次に、生殖細胞から染色体標本を作製、染色し、染色体異常について分裂中期細胞を分析する。

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）など精原細胞の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立証し、また、公表文献（例：（2）（3）（6）（7）（8）（9）（10））の対照データの許容範囲と一致するか、あるいは、入手可能な場合、試験施設の背景対照（historical control）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. 一般に用いられている実験室系統の健康な若齢成獣を使用する。雄マウスが一般的に用いられるが、科学的正当性がある場合、また、別の試験ガイドラインと併せた本試験の実施を可能にするため、他の適切な哺乳類種の雄を使用できる。げっ歯類以外の動物種を用いる場合には、その科学的正当性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 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。げっ歯類では、攻撃行動が予測されない場合、少数群（1 ケージあたり 5 匹以下）で飼育し、適切な環境を確保した頑丈な床の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。

© OECD, (2016)

動物の準備

13. 健康な雄の若齢成獣（投与開始時点で 8～12 週齢）を通常用い、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、個体間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、被験物質との化学反応の可能性がないものを用いる。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。特殊な溶媒／媒体の選択により、染色体構造異常も他の悪影響も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場合、本溶媒／媒体対照の許容性を確立するため、最初の試験を実施する必要がある。

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。同時陽性対照群を設けない場合、実験ごとにスコアリング対照（scoring control）（固定した未染色スライド）を含める。この対照は、本試験のスコアリング範囲内に適切な基準試料を含めることで入手できる。基準試料は、本試験を実施する試験施設において、定期的（例：6～18 ヵ月ごと）に別途実施する陽性対照実験（例：習熟度検証試験の間や、その後必要に応じ定期的間隔）から入手され保存されている。

17. 陽性対照物質では、染色体構造異常細胞の頻度について、自然発生レベルを上回る検出可能な増加が確実に生じる必要がある。陽性対照の用量は、作用は明確であるが、コード化された試料の内容が測定者に直ちに明らかにされないよう選択する。陽性対照物質の例を表 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）
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）］(9)
シクロヘキシルアミン［CAS 番号 108-91-8］(7)
マイトマイシン C［CAS 番号 50-07-7］(6)
アクリルアミドモノマー［CAS 番号 79-06-1］(10)
トリエチレンメラミン［CAS 番号 51-18-3］(8)

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。染色体異常やそれ以外の有害作用が選択した溶媒／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対象とする。

手順

動物数

19. 試験開始時の動物数は、1 群あたり最低雄 5 匹となることを目的として確立する。1 群あたりのこの動物数は、適切な統計検出力を示すのに十分であるとみなされる（すなわち、陰性対照の染色体異常頻度のレベルが 1.0%以上の場合、その 2 倍以上の染色体異常頻度を有意水準 0.05、80%の確率で通常検出できる）（3）（11）。動物の通常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＋陽性対照群（各群とも 1 群あたり 5 匹から構成）を用いた 2 回の試料採取時点による試験では、45 匹の動物が必要となると考えられる。

投与スケジュール

20. 被験化学物質は通常単回投与（すなわち、1 回の処理）するが、科学的正当性があれば、それ以外の投与計画も使用できる。

21. 最高用量群では、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ならびに細胞周期の速度に及ぼす影響に要する時間は、染色体異常検出の至適時間に影響を及ぼしうるため、投与後約 24 時間および 48 時間の早期 1 回および後期 1 回の試料採取時間を用いる。最高用量以外の用量については、別の試料採取時間がより適切であり正当化されることが知られている場合を除き、投与後 24 時間の早期 1 回の試料採取時間を用いる（B 型精原細胞の細胞周期の時間内であり、これにより、投与後最初の分裂中期をスコア化する確率が最適化される）。

22. 別の試料採取時間を用いることは可能である。例えば、S 期に依存しないで影響を及ぼす化学物質の場合、より早期の試料採取時間（すなわち、24 時間未満）が適切であると考えられる。

© OECD, (2016)

23. 反復投与計画では、28 日間の投与期間を用いる別の評価項目の試験（例：OECD TG488）と併用するなどの使用が可能であるが、様々な試料採取時間に対応するには、追加の動物群が必要になると考えられる。そのため、こうしたスケジュールの適切性について、ケースバイケースで科学的に正当化する必要がある。

24. 安楽死の前に、動物に適切な用量の分裂中期停止剤（例：コルセミド®またはコルヒチン）を腹腔内投与する。その後適切な間隔で動物から試料を採取する。マウスおよびラットでは、この間隔は約 3～5 時間である。

投与量

25. 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、用量設定試験実施の勧告に従い、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、系統および投与計画を用いて行う（12）。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、軽微な毒性作用を誘発する用量と定義され、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、死亡や動物の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（13）。

26. 最高用量は、精原細胞にある程度の毒性の徴候をもたらす用量とも定義できる（例：第一および第二減数分裂中期に対する精原細胞の有糸分裂の比率の低下）。この低下は 50%を超えてはならない。

27. 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。

28. 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（18 項参照）および公比 2 で通常分けられるが 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。検討したすべての投与量で標的組織（すなわち、精巣）に対する毒性が認められた場合、非毒性用量でのさらなる試験が望ましい。定量的用量反応に関する情報をより完全に明らかにすることを意図した試験では、追加の用量群が必要と考えられる。特定の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、その限度が変わる場合がある。被験化学物質が毒性を生じる場合、限界用量およびそれより低い 2 用量（上記参照）を選択すべきである。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

29. 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、局所皮下、静脈内、経口（強制）、吸入、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。腹腔内投与は通常生理的に妥当なヒト曝露経路ではないため、科学的正当性がない限り、通常は推奨されない。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、食餌や水の摂

© OECD, (2016)

取から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 体重を使用可能である。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

30. 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。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。1 週間以上持続する試験の場合、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（13）。

染色体標本

31. 安楽死直後、確立されたプロトコール（例：（2）（14）（15））に従って、一方または両方の精巣から生殖細胞浮遊液を入手し、低張液に曝露させ固定する。次に、細胞をスライド上に広げ染色する（16）（17）。測定者がスライドの内容を入手できないよう、すべてのスライドをコード化する。

分析

32. 動物ごとに 200 個以上の十分に広がった分裂中期像をスコア化する（3）（11）。陰性対照の背景データ（historical negative control）の頻度が 1%未満の場合、統計検出力を増加させるため、1 個体あたり 200 cell 超をスコア化する必要がある（3）。セントロメアを識別できる染色法を用いる。

33. 染色体型と染色分体型の異常を区別して記録し、さらにサブタイプ（切断、交換）に分類する。ギャップは記録すべきであるが、化合物が染色体異常を有する細胞の発現率に有意な増加をもたらすか否か判定する場合、考慮すべきでない。試験施設が用いる手順では、染色体異常の分析が十分な訓練を受けた測定者により実施されることを確保する。スライド標本作製手順により、一定の割合で分裂中期にしばしば切断を生じ、その結果染色体を喪失することが認められるため、スコア化する細胞は $2n\pm2$（n は使用動物種の染色体の一倍体数）以上の多数のセントロメアを対象とする。

34. 本試験の目的は染色体構造異常を検出することであるが、倍数体細胞および核内倍加染色体を有する細胞が認められた場合、それらの頻度を記録することが重要である（44 項参照）。

データおよび報告

結果の処理

35. 動物のデータは、個体別に表形式で提示する。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

© OECD, (2016)

常をサブタイプに分類（切断、交換）し、投与群および対照群の出現数および頻度を区別して記載する。ギャップは区別して記録する。ギャップの頻度は報告するが、通常、染色体構造異常の総頻度の分析には含めない。倍数性および核内倍加染色体を有する細胞が認められた場合、その割合（%）を報告する。

36. （30 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、陰性対照の背景データの公表基準（一般に、染色体異常を有する細胞が 0%超かつ 1.5%以下と予測）、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、陽性対照の背景データ（historical positive control）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) 適切な細胞数および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 項記載内容と一致している。

38. 有糸分裂と減数分裂の両方が観察される場合、1 個体あたり 100 個の分裂細胞試料全体における投与群および陰性対照群すべての細胞毒性の尺度として、第一および第二減数分裂中期に対する精原細胞の有糸分裂の比率を判定する。有糸分裂のみ観察される場合、個体ごとに 1000 個以上の細胞で分裂指数を判定する。

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、3 投与群以上について解析する必要がある。

40. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合、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. その増加が、少なくとも 1 回の試料採取時点で用量依存的である。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精原細胞に染色体異常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（11）（18）にも見出せる。用いる統計検定では、

© OECD, (2016)

動物を実験単位とみなす。

41. 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精原細胞に染色体異常を誘発不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（11）（18）にも見出せる。陰性結果であっても、当該化合物が検討されないより後期の発達期（developmental phase）の染色体異常、あるいは遺伝子突然変異を誘発しうるという可能性は除外されない。

42. 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。

43. 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（19）。

44. 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される場合もある。

45. 倍数体細胞数の増加は、被験化学物質に有糸分裂過程の阻害能、および染色体数的異常の誘発能があることを示しうる（20）。核内倍加染色体を有する細胞数の増加は、被験化学物質に細胞周期過程の阻害能があることを示しうる（21）（22）。この阻害能は、有糸分裂過程の阻害とは異なる機序での染色体の数的変化を誘発する（2 項参照）。そのため、倍数体細胞および核内倍加染色体を有する細胞の発現率は、区別して記録する。

試験報告書

46. 試験報告書は、以下の情報を含む。

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：

© OECD, (2016)

- 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
- 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／系統および使用の正当化
- 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個体別の体重；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
- 実施した場合、用量設定試験のデータ
- 投与量選択の根拠
- 投与経路の根拠
- 被験化学物質調製の詳細
- 被験化学物質投与の詳細
- 屠殺時間の根拠
- 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）
- 飼料および水の品質の詳細
- 投与および試料採取スケジュールの詳細な記述およびその選択の正当化
- 安楽死の方法
- 鎮痛方法（使用した場合）
- 組織の分離手順
- 分裂中期停止に用いた化学物質の内容、その濃度、および投与期間
- スライド標本作製方法
- 異常のスコア化基準
- 1 個体あたり分析した細胞数
- 試験結果を陽性、陰性または不明確と判断する基準

© OECD, (2016)

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）
- 屠殺時の体重および臓器重量（複数回の投与を行った場合、投与計画中に測定した体重）
- 毒性の徴候
- 分裂指数
- 第一および第二減数分裂中期に対する精原細胞の有糸分裂の比率、またはそれ以外の標的組織曝露の証拠
- 個体ごとに区別して示された異常の型および数
- 1群あたりの異常の総数、その平均値および標準偏差
- 1群あたりの異常を有する細胞数、その平均値および標準偏差
- 可能な場合、用量反応関係
- 統計解析結果および適用した方法
- 同時陰性対照データ
- 範囲、平均値、標準偏差、95%信頼区間（入手可能な場合）を備えた陰性対照の背景データ、または、試験結果の許容性に用いる公表された陰性対照の背景データ
- 同時陽性対照データ
- 確認された場合、倍数体細胞および／または核内倍加細胞の頻度などの倍数性の変化

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) 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) 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.

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

(5) 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.

(6) 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.

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

(8) 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.

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

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

(11)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.

(12)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.

(13)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.

© OECD, (2016)

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

(15)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.

(16)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.

(17)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.

(18)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.

(19)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.

(20)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.

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

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

© OECD, (2016)

補遺

定義

異数性：1 本または複数の染色体により、正常な二倍体（または一倍体）の染色体数に生じる逸脱。ただし、完全なセット単位での染色体の倍加による場合（倍数性）は除く。

セントロメア：細胞分裂中に紡錘糸が結合する染色体領域で、これにより、娘染色体が娘細胞の極に規則正しく移動できる。

染色体の多様性：染色体の形状（例：中部動原体、末端動原体など）および大きさの多様性。

染色分体型異常：1 本の染色分体の切断または染色分体間の切断および再結合として発現する染色体の構造的損傷。

染色体型異常：2 本の染色分体の同一部位における切断、または切断および再結合として発現す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集団に染色体構造異常を引き起こす物質。

ギャップ：1 本の染色分体の幅より狭く、染色分体のずれが最小限に留まる非染色性の損傷部位。

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、切断、欠失、付加体、ヌクレオチドの修飾および結合、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。

分裂指数（MI）：細胞集団において観察される分裂中期細胞数を細胞の総数で除した比率で、その集団の増殖度合いの指標となる。

有糸分裂：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、遺伝的変化を引き起こす性質（染色体異常）。

数的異常：用いた動物特有の正常な染色体数と、実際の染色体数とに生じる差。

倍数性：二倍体の数を除く一倍体の染色体数（*n*）の倍数（すなわち、3*n*、4*n* など）

構造異常：細胞分裂中期の顕微鏡検査により検出可能な染色体の構造変化で、欠失および断片化、交換として観察される。

© OECD, (2016)