

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

哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験

はじめに

1. *In vitro* 小核 (MNvit) 試験は、間期細胞の細胞質内における小核 (MN) の検出を目的とする遺伝毒性試験である。小核は無動原体染色体断片 (セントロメアが欠如していること)、または細胞分裂後期に細胞の極への移動ができない染色体全体から生じる。本試験では、細胞分裂を行っている細胞に被験物質を暴露させ、暴露中または暴露後における当該化学物質の染色体異常誘発活性、または異数性誘発活性を検出する(1)(2)。本試験ガイドラインでは、アクチン重合阻害剤のサイトカラシン B (cytoB) を使用するプロトコール、使用しないプロトコールの 2 種類が使用できるようにしている。標的とする有糸分裂が起こる前に cytoB を添加すると、1 回の有糸分裂を完了した細胞は二核となるため、小核頻度の特定と選択的解析が可能となる(3)(4)。本試験ガイドラインではまた、解析対象の細胞集団が有糸分裂を行っていることが確認された場合には細胞分裂阻害を行わないプロトコールを使用することもできる。
2. MNvit 試験を用いて小核を誘発する化学物質の特定を行う以外に、細胞分裂阻害、動原体への免疫化学的標識、またはセントロメア／テロメア検出用プローブを用いたハイブリダイゼーション（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)）を用いることにより、染色体損傷および小核形成の機構に関する情報を得ることができる(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)。標識およびハイブリダイゼーションの手技は小核形成の増加が認められ、この増加が染色体異常誘発性または異数性誘発性の事象によるものかどうかを研究者が確認したい場合に使用することができる。
3. 小核は娘細胞へ伝わる損傷を表すのに対し、分裂中期に評価される染色体異常は必ずしも娘細胞に伝わるわけではない。また間期細胞内の小核は比較的客観的な評価が可能なため、実験室の研究員は細胞が分裂を行っているかどうかを確認し、小核を含む細胞がどれくらいあるかを測定するだけでよい。このため、標本の数値的評価が比較的速やかに行え、分析の自動化が可能となる。これにより、1 回の処理で計数できる細胞数が数百単位から数千単位にまで増え、分析の検出力が高まり、試験がより実用的なものとなっている。さらに小核は遅延染色体から生じる場合があるため、本試験では従来の染色体異常試験（例：OECD 試験ガイドライン 473）(17)では検討が困難であった異数性誘発物質の検出も可能となった。ただし、MNvit 試験では段落 2 で説明した FISH のような特殊な技術を用いない限り、染色体異常誘発性の化学物質と倍数性誘発性の化学物質とを区別することはできない。
4. MNvit 試験は通常、ヒトまたはげっ歯類の培養細胞を用いる *in vitro* 試験法である。本試験は、異数性誘発物質、染色体異常誘発物質がともに検出可能なため、化学物質の染色体損傷作用を研究する上での包括的な基礎を提供するものといえる。

5. MNvit 試験は cytoB の有無に関わらず、様々な種類の細胞に対応できる堅牢かつ効率的な試験法である。MNvit 試験の妥当性に関しては、げっ歯類の各種細胞株 (CHO、V79、CHL/IU および L5178Y) およびヒトのリンパ球を用いた広範な裏付けデータが得られている(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28)(29)(30)(31)。このうち特に重要なものとして、フランス遺伝毒性学会 (SFTG; Société Française de Toxicologie Génétique) が組織して実施した国際的なバリデーション研究(18)(19)(20)(21)(22)、および遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ (International Workshop on Genotoxicity Testing) での報告書(4)(16)が挙げられる。得られたデータは、欧州委員会 (EC) の欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) が実施した証

拠の重み付けによるレトロスペクティブなバリデーション研究にて見直しがなされており、ECVAM の科学諮問委員会 (ESAC) により本試験法が科学的に妥当であることが承認されている(32)(33)(34)。バリデーション研究には使用されていないが、ヒト TK6 リンパ芽球細胞株(35)、HepG2 細胞(36)(37)、およびシリアンハムスターの初代胚細胞(38)を用いた試験が発表されている。

6. 使用した定義を補遺 1 に示している。

最初に考慮すべき事項

7. *In vitro* で実施する試験では、細胞が被験物質に関して代謝的に反応性である場合を除き、外因性の代謝活性化の使用が一般に必要となる。外因性の代謝活性化系は、*in vivo* の状態を完全に再現するものではない。また内在性の変異原性を反映しない人為的な陽性結果が、pH や浸透圧の顕著な変化のような要素や高い細胞毒性に起因してもたらされる場合があるため、このような状態にならないよう注意を払う必要もある(39)(40)(41)。被験化学物質の添加時に培養液の pH が変化する場合には、望ましくは調製溶液の緩衝化により pH を調整し、すべての試験濃度、またすべての対照における容積が全部同一のままとなるようにする。

8. 小核誘発の分析を行うには、被験物質で処理した細胞培養、未処理の細胞培養のいずれにおいても必ず有糸分裂が起こっている必要がある。小核計数に最も適した時期は、被験物質による処理中または処理後に細胞が有糸分裂を 1 回完了した時点である。

試験の概要

9. ヒトまたは哺乳類に由来する培養細胞を被験物質に暴露する際は、使用する細胞に適切な代謝能が備わっている場合を除き、外因性の代謝活性化系の存在下、非存在下の両方で行う。溶媒／媒体対照および陽性対照を、同時対照としてすべての試験に含める。

10. 被験物質への暴露中または暴露後には、細胞の染色体または紡錘体に損傷が起き、間期細胞中に小核が形成されるだけの十分な時間にわたり細胞を増殖させる。異数性の誘発を行う場合には通常、被験物質への暴露を有糸分裂の期間中にわたり行う。回収した間期細胞を染色して、小核の有無を分析する。小核の計数は被験物質への暴露中または、もし適用される場合は、暴露後の期間に有糸分裂を完了した細胞についてのみ行うことが望ましい。細胞質分裂阻害剤で処理した培養細胞では小核計測を二核細胞についてのみ行うことで実現できるが、細胞質分裂阻害剤を使用しない場合は、分析対象とする細胞が被験物質への暴露中または暴露後に細胞分裂を行った可能性が高いことを証明できることが重要である。すべてのプロトコールにおいて、対照の細胞培養、処理した細胞培養のいずれでも細胞の増殖が起こっていることが証明できることが重要であり、小核の計数を行う細胞培養（または並行細胞培養）において被験物質により誘発される細胞毒性または細胞増殖抑制性の程度が評価できなければならない。

試験方法

調製

11. ヒトの初代培養末梢血リンパ球(5)(19)(42)(43)および CHO、V79、CHL/IU、L5178Y 等の種々のげっ歯類細胞株を使用することができる(18)(19)(20)(21)(22)(25)(26)(27)(28)(30)。他の細胞株や細胞種を使用する場合は、「許容基準」の章で説明しているように、試験中に細胞が適切に機能することを証明し、使用の正当性を示す必要がある。未処理細胞における小核の出現頻度（背景頻度）により試験の感度が影響を受けるため、小核形成の背景頻度が小さく安定している細胞種を使用することが望ましい。

12. ヒト末梢血リンパ球の採取は、最近、遺伝毒性のある化学物質または放射線に暴露された記録のない若年健常非喫煙者（約 18～35 歳）で行う。複数のドナーから採取した細胞をプールして使用する場合は、ドナー数を明記する必要がある。小核の出現頻度は加齢とともに高まり、この傾向は男性よりも女性の方で明瞭に現れる(44)。プールに用いるドナー細胞の選択にあたっては、このことを考慮に入れる。

培地および培養条件

13. 培養細胞の維持には、適切な培地およびインキュベーション条件（培養容器、CO₂ 濃度、温度および湿度）を用いる。樹立細胞株および細胞系は定期的に検査し、染色体モード数が安定しており、マイコプラズマ汚染がないことを確認する。もし汚染が確認されたり、染色体モード数に変化が認められた場合には、その細胞株／細胞系を使用してはならない。試験を行う実験室で用いられる培養条件下における正常な細胞周期時間を把握しておく必要がある。細胞質分裂阻害法を使用する場合は、細胞質分裂阻害剤の濃度を特定の細胞種にとって最適であり、小核の計数に用いる二核細胞が高い収率で得られるものにする。

細胞培養の調製

14. 樹立細胞株および細胞系：保存細胞培養から採取した細胞を増殖させ、培養細胞が一面に密集した単層を形成せず、また懸濁細胞培養が採取時前に過剰な密度とならないような密度で培地に播種し、37°C で培養する。

15. リンパ球：抗凝固剤（ヘパリン等）で処理した全血、または分離リンパ球を、被験物質および cytoB に暴露する前に、分裂促進因子（フィトヘマグルチニン（PHA 等））の存在下で培養する。

代謝活性化

16. 内因性の代謝能が不十分な細胞を使用する場合は、外因性の代謝系を使用する必要がある。きわめてよく使用される代謝系は、アロクロール 1254 (45)(46) またはフェノバルビタール + β-ナフトフラボンの併用物 (46)(47)(48)(49) のような酵素誘導剤で処理したげっ歯類の肝臓から調製した、補因子添加ポストミトコンドリア（ミクロソーム）画分（S9）である。後者の併用物は、「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(50) に抵触せず、混合機能オキシダーゼの誘導に関してアロクロール 1254 と同等の有効性を示すことが確認されている(46)(47)(48)(49)。S9 画分は一般に、最終的な試験培地において濃度範囲が 1～10% (v/v) となるよう使用される。代謝活性化系の条件は被験化学物質の分類群によって変わり、場合によっては複数の S9 濃度を使用する方が適切なこともある。

17. ヒトまたはげっ歯類の特異的な活性化酵素を発現する遺伝子組換え細胞株では、外因性の代謝活性系を必要とせず、試験細胞として使用できる場合がある。このような場合、使用する細胞株の選択が科学的に妥当であること、たとえば被験物質の代謝に対する混合機能オキシダーゼの関連性(51)や、既知の染色体異常誘発物質および異数性誘発物質に対する細胞の応答性等によって示す必要がある（「許容基準」の章を参照）。被験物質が発現した混合機能オキシダーゼにより代謝されない場合もあり、このような場合には結果が陰性であっても被験物質が小核を誘発しないことを示すことにはならないことを認識しておくこと。

被験物質の調製

18. 固体の被験物質は、適切な溶媒または媒体に溶解し、必要な場合には希釈を行ってから細胞を処理する。液体の被験物質は試験系に直接添加するか、または希釈を行ってから添加する。気体または揮発性の物質の場合は密閉した容器中で処理するなど、標準的なプロトコールに適切な変更を加えてから試験を行う(52)(53)。安定性データによって、保存可能であることが証明されている場合を除き、被験物質は調製後速やかに使用する。

試験条件

溶媒／媒体

19. 溶媒／媒体は、被験物質と反応するものであってはならず、また使用する濃度において、細胞の生存またはS9活性の維持に不適合なものであってはならない。十分に確立されたもの(水、細胞培養液、ジメチルスルホキシド等)以外の溶媒／媒体を使用する場合は、被験物質と適合性があり、遺伝毒性を有さないことを示したデータによって使用の正当性を裏付ける必要がある。可能であれば、水性の溶媒／媒体の使用を優先的に考慮することが望ましい。

細胞質分裂阻害剤としてのcytoBの使用

20. MNvit試験の性能に関して考慮すべき最も重要な事項の1つは、小核計数を行う細胞が被験物質での処理期間中または、もし適用される場合は、処理後の培養期間中に有糸分裂を完了したものとなるようにすることである。cytoBは細胞質分裂の阻害剤として広く使用されている薬剤であり、アクチン集合を阻害することで有糸分裂後の娘細胞が分離できないようにし、二核細胞を形成させる性質を有する(5)(54)(55)。この性質を利用してことで、小核の計数を被験物質での処理中または処理後に有糸分裂を終えた細胞のみに限定して行うことができる。また、被験物質が細胞増殖動態に及ぼす作用についても同時に測定することができる。cytoBを細胞質分裂阻害剤として使用するのは、ヒトのリンパ球を用いるときである。これは、リンパ球の場合、培養細胞内においてもドナー間においても細胞周期時間にばらつきがあり、またすべてのリンパ球がPHAに対して応答するわけではないためである。計数を行う細胞が分裂を行ったものかどうかを判定するため、細胞株を試験する際に用いられている方法はこの他にもあり、以下で取り上げている(段落26を参照)。

21. cytoBの濃度は各細胞種に関し、溶媒／媒体対照の培養細胞から最適な頻度で二核細胞が得られるよう実験室が適切に決定する。通常、cytoBの適切な濃度は3~6 µg/mLである。

細胞増殖および細胞毒性の測定ならびに暴露濃度の選択

22. 試験で使用する被験物質の最大濃度を決定する際には、たとえば、過剰な細胞毒性をもたらす、培養液中で沈殿を生じる、またpHや浸透圧に顕著な変化をもたらすなど的人為的な陽性反応を引き起こすような濃度は含めないよう注意する(39)(40)(41)。

23. 細胞増殖の測定を行って処理した細胞が試験中に有糸分裂を確かに行ったこと、また適切な細胞毒性レベルで処理が行われたことを確認する(段落29を参照)。細胞毒性の測定はcytoBを使用しない場合、代謝活性化を必要としない細胞では代謝活性化系の存在下、非存在下において、測定細胞数の相対的増加量(RICC)または相対的な細胞集団倍加数(RPD)を用いて行う(数式については補遺2を参照)。cytoBを使用する場合の細胞毒性の測定は、複製指數(RI)を用いて行う(数式については補遺2を参照)。

24. 培養細胞のcytoBによる処理、および培養細胞中における単核、二核ならびに多核細胞の相対的頻度の測定により、被験物質での処理が細胞増殖に及ぼす影響およびその細胞毒性作用または細胞増殖抑制作用を正確に定量化する手段が得られ(5)、処理中または処理後に分裂を行った

細胞のみについて小核の計数を行うようになる。

25. cytoB を用いる試験では、細胞増殖抑制性および細胞毒性を細胞培養あたり 500 個以上の細胞を用いて細胞質分裂阻害増殖指数 (CBPI) から定量化でき(5)(26)(56)、また RI から導くこともできる（数式については補遺 2 を参照）。cytoB を用いて細胞増殖を評価する場合は、CBPI または RI を細胞培養あたり 500 個以上の細胞を用いて測定する必要がある。これらの測定値は、被験物質処理の細胞培養、対照の細胞培養における値を比較することで細胞毒性を推定するのに特によく使用される。また、細胞毒性の他のマーカー（例：密集度、細胞数、アポトーシス、壊死、分裂中期の計数値）の評価により有用な情報が得られる。

26. cytoB を用いない試験では、細胞培養中で小核計数を行う細胞が被験物質による処理中または処理後に分裂を行ったものであることを証明する必要があり、証明がされていない場合には偽陰性の結果が得られる可能性がある。分裂した細胞を計数の対象としていることを保証するため用いられる方法には、プロモデオキシウリジン (BrdU) を取り込ませ、後に検出する処理により複製した細胞を特定する手法(57)、永久細胞株に由来する細胞を顕微鏡スライド上にて *in situ* で処理し、計数を行ったときのクローンの形成を調べる手法（増殖指数 (PI)) (25)(26)(27)(28)、または相対的な細胞集団倍加数 (RPD) 、測定細胞数の相対的増加量 (RICC) の測定値、もしくは他の証明済みの方法がある(16)(56)(58)(59)（数式については補遺 2 を参照）。また、細胞毒性または細胞増殖抑制性の他のマーカー（例：密集度、細胞数、アポトーシス、壊死、分裂中期の計数値）の評価により有用な情報が得られる。

27. 被験物質は、少なくとも 3 用量以上の分析可能な濃度について評価を行う。そのためには、間隔を小さく取った多くの濃度を用いて実験を行い、各濃度における小核形成を分析して適切な細胞毒性が得られる範囲を把握する必要がある。また別の戦略として、予備的な細胞毒性試験を行い、最終的な試験に用いる濃度範囲を狭める方法がある。

28. 最大濃度は、 $55 \pm 5\%$ の細胞毒性を生じる程度のものとする。これより高い濃度では、細胞毒性の副次的作用としての染色体損傷がもたらされる可能性がある(60)。そのため、被験物質の濃度は $55 \pm 5\%$ の細胞毒性を生じるものから、ほとんどまたはまったく細胞毒性を示さないものまでの範囲をカバーできるように選択する必要がある。

29. 細胞毒性または析出物が認められない場合は、被験物質の最大濃度を 0.01 M、5 mg/mL、5 μ L/mL のうち、最も低いものにあたる濃度とする。分析用に選択する各濃度間の間隔は、一般に $\sqrt{10}$ 以下となるようとする。被験物質が急勾配の濃度反応曲線を示す場合には、被験物質濃度の間隔をより小さく取り、中等度毒性および低毒性の濃度範囲で細胞の計数を行う必要がある。

30. 溶解度が制限要因となる場合は細胞毒性により制限を受けず、また小核計数が影響を受けない限り最大濃度を培養液中にわずかな析出が認められる最小の濃度とする。析出の評価は光学顕微鏡法等の手法により行い、析出が培養中（処理終了時まで）の期間を通じて認められるか、期間中に現れるのを確認する。

対照

31. 実験を行うごとに同時対照として、陽性対照および溶媒／媒体対照を代謝活性化系の存在下、非存在下の両条件で含める。

32. 陽性対照は使用する細胞および試験プロトコールによって、染色体異常誘発物質および異数性誘発物質が識別できることを証明し、また S9 標品の代謝能を確認するために必要となる。陽性対照は既知の小核形成誘導剤をバックグラウンドに対して小さいながら再現性のある小核数の増加をもたらすことが予想される濃度で使用し、試験系の感度を証明できる必要がある。陽性対照の濃度は作用が明らかなものを選択する必要があるが、コード化したスライドが何であるかが

判読者に直ちに分かる濃度は避けるものとする。

33. 代謝活性化を必要とする染色体異常誘発物質（シクロホスファミド、ベンゾ[a]ピレン等）を用いて、試験系の代謝能および染色体異常誘発物質の検出能を証明する。正当な根拠があれば、他の陽性対照物質を使用してもよい。代謝活性化を必要とする陽性対照の中には、特定の処理条件下において、または特定の細胞株に対して外因性の代謝活性化系がない場合でも活性を示すものもあるため、代謝活性化の必要性およびS9標品の活性については選択した細胞株を用い、選択した濃度で試験を行って確認する必要がある。

34. 現在のところ、異数性誘発物質に関して遺伝毒性活性の発現に代謝活性化を必要とするものは知られていない(16)。異数性誘発活性を示す陽性対照として現在認められている物質には、コルヒチンやビンブラスチン等がある。他の物質であっても、異数性誘発活性により小核誘発のみを起こす、または主として小核誘発を起こすものであれば使用してもよい。代謝活性化なしの条件で2種類の陽性対照（染色体異常誘発性と異数性誘発性）を使用しなくてすむよう異数性誘発性の対照をS9なしでの陽性対照として用い、染色体異常誘発性の対照を用いて使用する代謝活性化系の適切性を試験することができる。S9を必要としない細胞では、染色体異常誘発性と異数性誘発性の両方についての陽性対照を使用しなければならない。陽性対照として推奨される化学物質を補遺3に示す。

35. 適当な物質がある場合は、被験物質と化学的分類上関連性のある化学物質を陽性対照として使用するよう検討する。陽性対照として使用する物質は必ず、細胞の種類および活性化条件に適したものでなければならない。

36. 各回収時期には、溶媒／媒体対照を必ず含める。また選択した溶媒が使用する濃度において遺伝毒性作用やその他の有害作用を引き起こさないことを証明した公表データ、もしくは実験室の背景対照データがない限り、未処理の（溶媒／媒体を含まない）陰性対照も同時に使用する。

手順

処理計画

37. 細胞周期の特定の時期に作用を發揮する異数性誘発物質、または染色体異常誘発物質を検出できる確率を最大限に高めるためには、細胞周期のすべての時期を通じて十分な数の細胞を被験物質で処理することが重要である。このため、細胞株および初代培養細胞に対する処理計画は、細胞周期を開始させるための有糸分裂促進刺激を必要とするリンパ球に対する場合とは多少異なり、この点については段落41～43で論じている(16)。

38. 公表データ(18)と併せた理論的考察により、大部分の異数性誘発物質および染色体異常誘発物質は、S9の存在下、非存在下で、被験物質による3～6時間の短時間処理を行った後、被験物質を除去し、1.5～2.0細胞周期の増殖期間を設けるという手順により検出できることが示されている(6)。細胞試料の回収は、処理開始後または処理終了時に正常な（すなわち未処理の）細胞周期時間の約1.5～2.0倍に相当する時間が経過した時点で行う（表1参照）。被験物質が細胞周期時間に影響を与えることが分かっている、または疑われる場合には、試料採取すなわち回収までの時間を延長する場合がある（ヌクレオシド類似体の試験時など）。

39. S9標品には培養哺乳類細胞に対する潜在的細胞毒性があるため、正常細胞周期の1.5～2.0倍まで延長した暴露処理はS9を使用しない場合にのみ適用する。延長処理の場合、手順のオプションを準備して、cytobの存在下または非存在下で細胞を被験化学物質で処理できるようにしている。このオプションは、被験物質とcytobとの間に相互作用が生じる懸念があるような状況に対応するためのものである。

40. 推奨される細胞処理計画を表 1 に示す。これらは一般的な処理計画であり、被験物質の安定性や反応性または使用する細胞特有の増殖特性に応じて変更を加えてもよい。すべての処理は、細胞が指数関数的に増殖している間に開始し、終了する。これらの計画については、この後の段落 41~47 で詳しく説明する。

表 1. MNvit 試験における細胞の処理および回収時間

<u>cytob 処理を行うリンパ球、初代細胞および細胞株</u>	+S9	S9 の存在下で 3~6 時間処理； S9 および処理培地を除去； 新鮮培地と cytob を添加； 1.5~2.0 正常細胞周期の経過後に回収。
	-S9 短時間暴露	3~6 時間処理； 処理培地を除去； 新鮮培地と cytob を添加； 1.5~2.0 正常細胞周期の経過後に回収。
	-S9 延長暴露	<u>オプション A</u> : cytob の存在下で、1.5~2.0 正常細胞周期にわたり処理； 暴露期間の終了時に回収。 <u>オプション B</u> : 1.5~2.0 正常細胞周期にわたり処理； 被験物質を除去； 新鮮培地と cytob を添加； 1.5~2.0 正常細胞周期の経過後に回収。
<u>cytob 処理を行わない細胞株</u> (cytob を添加しないことを除き、処理計画は上記と同一)		

cytob 処理を行うリンパ球、初代細胞および細胞株

41. リンパ球に対しては、細胞周期同調が終了するころと考えられる PHA 刺激後 44~48 時間が経過した時点から被験物質への暴露を開始するという手順が最も効率的である(5)。初回試験では S9 の存在下および非存在下で、細胞を被験物質により 3~6 時間にわたり処理する。処理培地を除去し、cytob を含む新鮮培地と置き換え、1.5~2.0 正常細胞周期の経過後に細胞を回収する。

42. 短時間（3~6 時間）処理で行った 2 つの初回試験がいずれも陰性または境界域であった場合、次に S9 の非存在下で、暴露期間を延長した処理を行う。2 種類の処理オプションがあり、どちらも同等に使用できるが、刺激を行うリンパ球では刺激から 96 時間後には指数関数的増殖が低下するためオプション A の方がより適切と考えられる。またオプション B の場合、培養した細胞が最終的な試料採取時点までに最大密集状態とならないよう注意する。

- オプション A：細胞を被験物質により 1.5~2.0 正常細胞周期にわたり処理し、処理期間終了時に回収する。
- オプション B：細胞を被験物質により 1.5~2.0 正常細胞周期にわたり処理する。処理培地を除去し、新鮮培地と置き換え、さらに 1.5~2.0 正常細胞周期が経過した時点で細胞を回収する。

43. 初代細胞および細胞株については、PHA による 44~48 時間の刺激が不要であることを除き、リンパ球と同一の手順で処理する。リンパ球以外の細胞に対する暴露は、試験終了時に細胞がまだ対数増殖期にあるように行う必要がある。

cytob 処理を行わない細胞株

44. 細胞を、S9 の存在下および非存在下で 3~6 時間にわたり処理する。処理培地を除去し、新鮮培地と置き換え、さらに 1.5~2.0 正常細胞周期が経過した時点で細胞を回収する。

45. 短時間（3~6 時間）処理で行った 2 つの初回試験がいずれも陰性または境界域であった場合、次に（S9 の非存在下で）暴露期間を延長した処理を行う。2 種類の処理オプションがあり、どちらも同等に使用可能である。

- オプション A：細胞を被験物質により 1.5~2.0 正常細胞周期にわたり処理し、処理期間終了時に回収する。
- オプション B：細胞を被験物質により 1.5~2.0 正常細胞周期にわたり処理する。処理培地を除去し、新鮮培地と置き換え、さらに 1.5~2.0 正常細胞周期が経過した時点で細胞を回収する。

46. 3~6 時間の処理の終了時には、単層中に有糸分裂細胞が認められる（円形をし、表面に接着していないことで識別できる）。有糸分裂細胞は容易に表面から剥がれてしまうため、被験物質を含む培地を除去する際に失われてしまう可能性がある。培養細胞を洗浄するときには、これらの細胞を慎重に収集して細胞培養中に戻すようにし、試料回収の際に有糸分裂中で小核を形成しているおそれのある細胞が失われていることのないようにする。

細胞培養の数

47. 被験物質の各濃度に対し、また溶媒／媒体対照、陰性対照については、それぞれ 2 系列の細胞培養を使用する。試験施設背景データから 2 系列の細胞培養間のばらつきがきわめて小さいことが証明できる場合は、1 系列だけの細胞培養の使用も認められる。1 系列の細胞培養を使用する場合は、濃度の種類を増やして分析を行うことが望ましい。

細胞試料の回収およびスライドの調製

48. 細胞試料の回収および処理は細胞培養ごとに実施する。細胞の調製には低張処理を使用するが、細胞が適切に拡散できている場合にはこの処理は必要ない。スライドの調製に関しては、小核計数用の高品質な細胞標品を得るために様々な技術が使用可能である。また小核を検出し、（細胞質分裂阻害法の場合には）二核細胞を確実に識別できるよう、細胞質部分が保たれるようにする必要がある。

49. スライドの染色は、ギムザ液や DNA 特異的な蛍光色素などの様々な方法を用いて行える(59)。DNA 特異的な染色剤（例：アクリジンオレンジ(61)、ヘキスト 33258 + ピロニン Y(62)）を使用すると、DNA 非特異的な染色剤の使用に伴う人為的影響の問題を一部排除することができる。また小核形成の機構に関する情報に关心がある場合には、抗動原体抗体、セントロメア検出

用 DNA プローブを用いる FISH、またはセントロメア特異的プライマーを用いるプライムド *in situ* 標識を適當な DNA 対比染色と併せて使用することで、小核内容（染色体／染色体断片）の同定が可能となる(15)(16)。このほか有効性が確認されている場合は、染色体異常誘発物質と異数性誘発物質とを区別する方法を使用してもよい。

分析

50. 顕微鏡分析を行う前に、溶媒／媒体および対照の分を含めたすべてのスライドを独立にコード化する。もしくは、コード化した試料を検証済みの自動フローサイトメトリー・システム、または画像解析システムを用いて分析してもよい。

51. cytoB で処理した細胞では、小核の出現頻度を各濃度につき少なくとも 2000 個の二核細胞を用いて算出する（各濃度につき 2 系列の細胞培養がある場合は、各細胞培養につき 1000 個以上の二核細胞を用いる）。1 系列の細胞培養のみを使用する場合は、当該細胞培養の各濃度につき少なくとも 2000 個の二核細胞を用いて計数を行う。各濃度において計数に使用できる二核細胞の数が細胞培養あたり 1000 個より（細胞培養が 1 系列の場合 2000 個より）かなり少なかつた場合、また小核の有意な増加が検出されなかった場合は細胞数を増やすか、より毒性の低い濃度を用いるかのいずれか適切な方法により試験をやり直さなければならない。二核細胞のうち不規則な形状をしたものや、2 つの核の大きさが大きく異なるものは計数に用いないよう注意し、二核細胞を拡散が不十分な多核細胞と混同しないようにする。主核が 3 個以上ある細胞では小核出現頻度のベースライン値が高まる可能性があるため、このような細胞は小核の分析に用いないようとする(63)(64)。被験物質が cytoB の活性を妨害することがわかっている場合は、単核細胞を計数に用いてもよい。

52. cytoB 処理を行わない試験の細胞株では、小核の計数を各濃度につき少なくとも 2000 個の細胞を用いて行う（各濃度につき 2 系列の細胞培養がある場合は、各細胞培養につき 1000 個以上の細胞を用いる）。各濃度につき 1 系列の細胞培養のみを使用する場合は、細胞培養ごとに少なくとも 2000 個の細胞を用いて計数を行う。

53. cytoB を使用する場合は、CBPI または RI を各細胞培養につき 500 個以上の細胞を用いて測定し、細胞の増殖状況を評価する（補遺 2 を参照）。cytoB を使用せずに処理を行う場合は、段落 24～27 で説明したように、計数に用いる細胞が増殖を行ったものであることが必ず証明できなければならない。

許容基準

54. 本試験ガイドラインで取り扱う MNvit 試験の使用を検討している試験施設は、補遺 3 に示した参考物質を用いて本試験を行い、当該試験施設で異数性誘発活性および染色体異常誘発活性を有することが知られている物質を代謝活性化の有無に関わらず、確実かつ正確に検出でき、また既知の陰性物質についても同様に検出できることを証明する。本試験方法を正確に実施できることの証拠として、当該試験施設は cytoB を使用せずに試験を行った場合、小核形成に関する計数の対象とした細胞が 1 回の核分裂を完了していることを示す証拠を得る必要がある。

55. 参照化学物質としては、補遺 3 に示す化学物質の使用が望ましい。ただし、これら以外の化学物質であっても活性が分かっており、同様の作用機序で小核を誘発し、さらに MNvit 手技により試験を行う予定の化学物質との間に関連性があることが示されていれば、代用もしくは追加して使用することができる。妥当性確認の手段としては、広範囲にわたる様々な物質を用いた検証試験、または被験物質の化学的分類もしくは試験する損傷の発生機構に基づき、より狭い範囲の物質に的を絞った検証試験が挙げられる。

56. 溶媒／媒体対照および未処理の細胞では、低く一定した小核の出現頻度が再現性よく得られる必要がある（段落 11 で特定した細胞種の場合、通常、細胞 1000 個あたり 5～25 個の小核）。

これら以外の細胞種では反応の範囲が異なる場合があるため、MNvit 試験への使用についての検証試験を行う際に、その範囲を確認する必要がある。陰性、溶媒および陽性の各対照から得たデータを用いて、背景対照の数値範囲を確立する。この値は、同時対照として実験に用いる陰性／陽性対照の適切性の判定に使用する。

57. プロトコールに若干の変更（手動計数法から自動計数法への変更、新しい細胞種の使用等）を加えて試験を行おうとする場合は、その変更の有効性が証明されて初めて変更したプロトコールを使用可能であるとみなすことができる。有効性の証明とは、染色体切断および染色体の獲得、喪失の主要な機構が検出可能であること、また個々の被験物質の化学的クラス、もしくはより広範囲の物質について陽性、陰性の結果が適切に得られることの証明等をいう。

データおよび報告

結果の処理

58. 細胞質分裂阻害法を使用する場合、小核誘発の評価には二核細胞中において小核を有するものの割合（細胞あたりの小核数は考慮しない）のみを用いる。細胞を、1 個、2 個、さらに多数の小核を有するものに分けて計数することからも有用な情報は得られるが、必須事項ではない。

59. 被験物質で処理した細胞、溶媒／媒体対照の細胞のすべてについて、細胞毒性あるいは細胞増殖抑制性の同時測定を行う(58)。細胞質分裂阻害法を使用する場合は、すべての処理・対照細胞培養について細胞周期遅延の測定値として CBPI または RI を算出する。一方、cytoB 処理を行わない場合は、RPD または RICC（もしくは PI）を使用する（補遺 2 を参照）。

60. 個々の細胞培養についてデータを得るとともに、すべてのデータを表形式に要約する。

61. MNvit 試験で小核を誘発する化学物質でこのような誘発現象が起こるのは、染色体の切断や喪失、もしくはその両方が誘発されることによる。抗動原体抗体、セントロメア特異的な *in situ* プローブ、またはその他の方法を用いたさらなる解析により、小核誘発の機構が染色体異常誘発活性あるいは異数性誘発活性によるものかどうかの判定ができる。

結果の評価および判定

62. 明確な陽性または陰性の反応に対しては、追加の試験を行って検証を行う必要はない。結果が境界域の場合は、すべての細胞培養からさらに 1000 個ずつ細胞を採取し、盲検性を失わないよう解析を行うことで明確な結果が得られる場合がある。この方法でもはつきりした結果が得られない場合は、さらに試験を実施する。追加試験では、必要に応じて条件の範囲を拡大したり、狭くしたりして試験パラメータを修正することを考慮する。修正が可能な試験パラメータには、被験物質濃度の間隔、処理および細胞回収の時期、代謝活性化の条件等がある。

63. 結果を陽性と判定するには、小核を含む細胞数の濃度依存性の増加または統計学的に有意な増加等、いくつかの基準がある。第一に考慮しなければならないのは、試験結果の生物学的意義である。得られた反応の生物学的意義を評価する場合、観測された数値が背景対照の範囲内か範囲外かの検討により、その指針が得られる。試験結果の評価には適切な統計学的手法の使用が有用である(65)。ただし、統計学的検定の結果は用量反応関係に関して評価する。また、再現性和背景データも考慮に入れる必要がある。

64. 大部分の実験では陽性または陰性の結果が明確に得られるが、データセットによっては被験物質の活性に関する明確な判定を行うことができない場合もある。このような境界域反応または不確実な反応は、実験の反復回数に関係なく起こりうる。

65. MNvit 試験での結果が陽性であることは、被験物質により培養哺乳類細胞で染色体の切断・喪失が誘発されることを意味する。また陰性の結果は、適用した試験条件下では被験物質が培養哺乳類細胞に染色体の切断あるいは獲得もしくは喪失を誘発しないことを意味する。

試験報告書

66. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験物質：

- 識別情報および CAS 登録番号 (CASRN) ;
- 物理的性質および純度；
- 試験の実施に関連した物理化学的特性；
- 被験物質と溶媒／媒体または細胞培地との反応性；

溶媒／媒体：

- 選択した溶媒／媒体の妥当性；
- 被験物質の溶媒／媒体への溶解度および安定性；

細胞：

- 使用した細胞の種類および供給元；
- 使用した細胞種の適切性；
- 該当する場合、マイコプラズマの汚染がないこと；
- 細胞周期の長さ、倍加時間または増殖指数に関する情報；
- リンパ球使用時には、該当する場合、血液ドナーの性別、年齢および人数；
- リンパ球使用時には、被験物質に暴露させたのは全血と分離リンパ球のどちらか；
- 該当する場合、継代数；
- 該当する場合、培養細胞の維持方法；
- 染色体モード数；
- 正常な（陰性対照の）細胞周期時間；

試験条件：

- 細胞質分裂阻害物質 (cytoB 等) を使用した場合は、その識別情報、濃度、および細胞を暴露した時間；
- 設定した濃度および細胞培養の数についての理論的根拠（もしあれば、細胞毒性データ、溶解度の限界等を含める）；
- 該当する場合、培地の組成、CO₂ 濃度；
- 被験物質の濃度；
- 添加した溶媒および被験物質の濃度（あるいは容積）；
- 培養温度および培養時間；
- 処理時間；
- 処理後から試料回収までの時間；
- 該当する場合、播種時の細胞密度；
- 代謝活性化系の種類および構成成分（許容基準を含む）；

- 陽性および陰性対照；
- スライド調製の方法および使用した染色法；
- 小核同定の基準；
- 分析した細胞数；
- 細胞毒性の測定方法；
- 細胞毒性に関する補足情報；
- 試験結果を陽性、陰性または境界域と判定する際の基準；
- 使用した統計解析の手法；
- 該当する場合、小核が染色体全体、染色体断片のいずれを含むかを明らかにするための方法（動原体抗体の使用等）；

結果：

- 使用した細胞毒性の測定値（例：細胞質分裂阻害法を使用する場合は CBPI または RI、使用しない場合は RICC、RPD または PI）；該当する場合、その他の観察所見（例：細胞密集度、アポトーシス、壊死、分裂中期の細胞計数、二核細胞の出現頻度）；
- 析出の徵候；
- 測定を行った場合、処理培地の pH および浸透圧に関するデータ；
- 解析対象となりうる細胞の定義；
- 細胞質分裂阻害法を用いる場合、単核細胞、二核細胞および多核細胞の分布；
- 各処理細胞培養、対照細胞培養について個別に算出した小核を有する細胞数、また必要に応じ、二核細胞、単核細胞のいずれから算出したかを明示；
- 可能な場合は、濃度反応関係；
- 同時陰性（溶媒／媒体）・陽性対照のデータ（濃度および溶剤）；
- 背景陰性（溶媒／媒体）・陽性対照のデータ（範囲、平均値および標準偏差と信頼区間 [95%等] で示す）；
- 統計解析（もしあれば、p 値）；

結果の考察：

結論

参考文献

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.
- (2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.
- (3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- (5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- (6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.
- (7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
- (8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.
- (9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.
- (11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.
- (13) Eastmond, D.A., Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite

hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [\[www.oecd.org/env/testguidelines\]](http://www.oecd.org/env/testguidelines)

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjuu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.

- (26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.
- (27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.
- (28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.
- (29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.
- (30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.
- (31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.
- (32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006, Available at: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Available at: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.
- (35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.
- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328. .

- (38) Gibson, D.P., Brauning, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
- (39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
- (43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
- (44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarff, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.
- (45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- (46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

- (50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [<http://www.pops.int/>]
- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.*, 564, 97-100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.
- (59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.
- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.

- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.

補遺 1**定義**

異数性誘発物質（異数性誘発処理）：有糸分裂および減数分裂の細胞分裂周期の構成要素との相互作用を通じて、細胞または生物に異数性をもたらす物質または処理。

異数性：染色体本数に、正常な二倍体数（または一倍体数）から 1 本ないし数本の増減があること。ただし、染色体の完全な組の 1 セットまたは数セットの変動（倍数性）は含めない。

アポトーシス：一連の段階を踏むことを特徴とするプログラム化された細胞死のことをいい、細胞は分解されて膜結合粒子となり、その後、貪食作用または脱落により除去される。

細胞増殖：細胞の有糸分裂の結果、細胞数が増加すること。

セントロメア：染色体内で 2 本の染色分体が結び付けられている DNA 領域であり、その上には 2 個の動原体が両側に付着している。

染色体異常誘発物質（染色体異常誘発処理）：細胞または生物の集団中に、染色体の構造異常を引き起こす物質または処理。

細胞質分裂：有糸分裂後、直ちに起こる細胞分裂の過程であり、それぞれ 1 つの核を含む 2 個の娘細胞を形成する。

細胞質分裂阻害増殖指数（CBPI）：処理した集団における第二分裂細胞の、未処理対照と比較した割合（数式については補遺 2 を参照）。

細胞増殖抑制性：細胞増殖の阻害（数式については補遺 2 を参照）。

細胞毒性：細胞の構造または機能に対する有害作用で、最終的には細胞死をもたらす。

遺伝毒性の（ある）：DNA または染色体に対するあらゆる種類の損傷を包含する一般的な用語であり、切断、付加体、再配列、突然変異、染色体異常、異数性等が含まれる。遺伝毒性による作用のすべてが、突然変異または安定した染色体に対する損傷を引き起こすとは限らない。

間期細胞：有糸分裂期にない細胞。

動原体：染色体のセントロメア領域に構成される蛋白質含有構造で、細胞分裂期間中は紡錘糸が付着し、娘染色体を娘細胞の両極へ整然と移動させる。

小核：細胞の主核から分離し、追加的に形成される小さな核のことで、有糸分裂または減数分裂の終期において、染色体断片または染色体全体の移動の遅れにより形成される。

有糸分裂：細胞核の分裂のことをいい、通常、前期、前中期、中期、後期および終期に分けられる。

分裂指数：ある細胞集団中に観察される中期にある細胞数を全細胞数で割った比をいい、当該細胞集団の細胞増殖の程度を示す指標となる。

変異原性の（ある）：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（染色体の場合、染色体異常）を引き起こす性質。

染色体不分離：対になった染色分体が切り離され、形成中の娘細胞に適切に配分される過程がうまく行われず、異常な数の染色体を含む娘細胞が形成されること。

倍数性：細胞または生物に起こる染色体の数的異常のうち、1 本ないし数本の個別の染色体に関する異常ではなく、染色体全体の 1 セットまたは数セット単位で起こるもの。

増殖指数（PI）：cytoB を使用しない場合における細胞毒性の測定方法（数式については補遺 2 を参照）。

測定細胞数の相対的増加量（RICC）：cytoB を使用しない場合における細胞毒性の測定方法（数式については補遺 2 を参照）。

相対的な細胞集団倍加数（RPD）：cytoB を使用しない場合における細胞毒性の測定方法（数式については補遺 2 を参照）。

複製指数（RI）：暴露期間から回収までに、処理細胞培養において分裂周期を完了した細胞の未処理対照における割合（数式については補遺 2 を参照）。

補遺 2

細胞毒性評価のための数式

1. cytoBを使用する場合、細胞毒性の評価は、細胞質分裂阻害増殖指数（CBPI）または複製指数（RI）に基づいて行う(16)(58)。CBPIは、cytoBへの暴露期間中における細胞あたりの平均細胞分裂周期数を表し、細胞の増殖度を算出するのに用いられる。RIは、処理細胞培養における細胞核の数の対照細胞培養における場合の割合を表し、細胞増殖抑制率（%）の計算に用いる。

$$\text{細胞増殖抑制率（%）} = 100 - 100 \{ (\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1) \}$$

ここにおいて、

T = 被験化学物質による処理細胞培養

C = 溶媒対照細胞培養

であり、また、

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{単核細胞数}) + (2 \times \text{二核細胞数}) + (3 \times \text{多核細胞数}))}{(\text{全細胞数})}$$

すなわち、CBPIが1（すべての細胞が単核）ということは、細胞増殖抑制率が100%であることと同義である。

$$\text{細胞増殖抑制率} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{二核細胞数}) + (2 \times \text{多核細胞数})) \div (\text{全細胞数})_T}{((\text{二核細胞数}) + (2 \times \text{多核細胞数})) \div (\text{全細胞数})_C} \times 100$$

T = 処理細胞培養

C = 対照細胞培養

2. すなわち、RIが53%であるということは対照細胞培養において分裂を起こし、二核および多核細胞を形成した細胞数と比較して、処理細胞培養では、その53%にあたる細胞のみが分裂を起こしたこと意味し、細胞増殖抑制率が47%であることを示す。

3. cytoBを使用しない場合、細胞毒性の評価は、測定細胞数の相対的増加量（RICC）または相対的な細胞集団倍加数（RPD）に基づいて行うことが望ましい(58)。RICCとRPDは、分裂した細胞集団の割合を考慮に入れた方法であるからである。

$$\text{RICC} = \frac{(\text{処理細胞培養における細胞数の増加量} \quad (\text{終了時} - \text{開始時}))}{(\text{対照細胞培養における細胞数の増加量} \quad (\text{終了時} - \text{開始時}))} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{処理細胞培養における細胞集団倍加数})}{(\text{対照細胞培養における細胞集団倍加数})} \times 100$$

ここにおいて、

$$\text{細胞集団倍加} = [\log (\text{処理後の細胞数} \div \text{開始時の細胞数})] \div \log 2$$

4. すなわち、RICC または RPД が 53%であるということは、細胞傷害率／細胞増殖抑制率が 47%であることを示す。

5. 増殖指数（PI）を使用した細胞毒性の評価は、1 細胞（cl 1）、2 細胞（cl 2）、3～4 細胞（cl 4）、5～8 細胞（cl 8）の各クローンの数を測定することによって行う。

$$PI = \frac{(1 \times cl\ 1) + (2 \times cl\ 2) + (3 \times cl\ 4) + (4 \times cl\ 8))}{(cl\ 1 + cl\ 2 + cl\ 4 + cl\ 8)}$$

6. PI は cytoB を使用せず、*in situ* で培養した細胞株においても有用で信頼できる細胞毒性パラメータとして使用されている(25)(26)(27)(28)。

補遺 3

試験性能の評価用として推奨される参照化学物質¹

分類	化学物質	CAS 番号
1. 代謝活性化系なしで活性を示す染色体異常誘発物質		
	シトシンアラビノシド	147-94-4
	マイトイシン C	50-07-7
2. 代謝活性化を要する染色体異常誘発物質		
	ベンゾ[a]ピレン	50-32-8
	シクロホスファミド	50-18-0
3. 異数性誘発物質		
	コルヒチン	64-86-8
	ビンプラスチン	143-67-9
4. 隱性物質		
	フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	117-81-7
	ナリジクス酸	389-08-2
	ピレン	129-00-0
	塩化ナトリウム	7647-14-5

¹. 参照化学物質とは、使用が推奨される化学物質のことである。参照化学物質の一覧に含まれない化学物質であっても、活性がわかつており、同様の作用機序で小核を誘発し、さらに MNvit 手技により試験を行う予定の化学物質との間に関連性があることが示されていれば、代用もしくは追加して使用することができる。目的に応じ、妥当性確認の手段として広範囲にわたる様々な物質を用いた検証試験、または被験物質の化学的分類ならびに試験する損傷の発生機構に基づき、より狭い範囲の物質に的を絞った検証試験等も行われる。