OECD/OCDE

2014/09/26

試験ガイドライン No.487

In vivo 哺乳類細胞小核試験

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 (2023), Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264861-en.

©OECD(2014)

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

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

IN VITRO 哺乳類細胞小核試験

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、科学の進歩や規制上の必要性の変化および動物福祉への配慮などを踏まえて定期的に見直されている。試験ガイドライン487の初版は2010年に採択され、遺伝毒性に関するOECD試験ガイドラインの全面的な見直しに当たり、この試験の数年間の経験とデータの解釈を反映させるために改訂された。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序論として提示されている文書(1)も参照可能であり、一連の試験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。

2. *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可能性がある。したがって、MNvit試験は、被験物質に曝露中または曝露後に細胞分裂した細胞において、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の両方を検出することが可能であるため(2) (3)、*in vitro*での染色体損傷性を調べるための包括的な基盤となる*in vitro*の方法である（詳細は13項参照）。小核の存在は、娘細胞に損傷が伝わったことを意味するが、分裂中期の細胞において認められた染色体異常は、娘細胞に伝わらない可能性がある。いずれにしても、そうした変化があった場合には細胞が生存しない可能性がある。

3. 本試験ガイドラインは、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と使用しないプロトコールのどちらも使用可能である。分裂前にcytoBを添加すると、二核の細胞が生じるため、分裂を1回完了した細胞だけを対象に、小核の同定と分析が可能となる(4) (5)。分析対象の細胞集団が分裂を行ったという証拠がある場合は、本試験ガイドラインでの細胞質分裂阻害を行わないプロトコールの使用が可能である。

4. MNvit試験では小核誘発物質の検出に加え、動原体の免疫化学的標識またはセントロメアプローブやテロメアプローブとの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））を行うことにより、染色体損傷と小核形成の両メカニズムについて、追加の情報を得ることができる(6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17)。小核形成が

©OECD, (2014)
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。

増加し、この増加が染色体構造異常誘発性あるいは異数性誘発性のいずれに起因するのかを確認したい場合、これらの標識法やハイブリダイゼーション法が使用できる。

5. 間期細胞中の小核は評価が比較的客観的に行えるため、いずれの手法でも小核細胞の出現率を調べるだけでよいが、cytoBを使用する場合には二核細胞の数も求める。そのため、スライドの観察が比較的迅速に行え、分析を自動化できる。これにより、1回の処理につき計数できる細胞数が数百単位ではなく数千単位になり、試験の検出力が向上する。小核は分裂の際に取り残された染色体から生じる可能性があるため、従来の染色体異常試験（例：OECD試験ガイドライン473）では調べることが困難であった異数性誘発物質も、検出できる可能性がある(18)。ただし、本試験ガイドラインで述べるMNvit試験は、4項で言及したFISHなどの特殊な技法を用いない限り、染色体数の変化や倍数性を誘発する物質と染色体構造異常を誘発する物質を区別することはできない。

6. MNvit試験は頑健な試験であり、さまざまな細胞種を使うことができ、cytoBの存在下または非存在下で実施できる。MNvit試験の妥当性を裏付けるデータが、さまざまな細胞種（細胞株の培養細胞や初代培養細胞）を用いて数多く得られている(19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36)。これらのデータとして、具体的には、フランス遺伝毒性学会（Société Française de Toxicologie Génétique；SFTG）が組織して実施した国際的なバリデーション研究(19) (20) (21) (22) (23) や、遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ（International Workshop on Genotoxicity Testing）の報告書(5) (17) がある。得られたデータについては、欧州委員会（EC）の欧州代替法バリデーションセンター（European Centre for the Validation of Alternative Methods（ECVAM））が実施した証拠の重み付けによる回顧的なバリデーション試験の中で再評価も行われており、本試験法は、科学的に妥当であることが、ECVAMの科学諮問委員会（Scientific Advisory Committee；ESAC）によって確認されている(37) (38) (39)。

7. 哺乳類細胞を用いるMNvit試験では、ヒトまたはげっ歯類由来の、培養細胞株または初代培養細胞を用いる。小核の背景頻度が試験の感度に影響することが考えられるため、小核形成の背景頻度が安定かつ明らかな細胞種を用いることが推奨される。用いる細胞は、培養中の十分な増殖性、核型（染色体数も含む）の安定性、および小核の自然発生頻度に基づいて選択する(40)。現時点で得られているデータからは強く推奨されるものではないが、化学物質の有害性を評価する際には、試験に選択した細胞の*p53*の状態、遺伝的（核型）安定性、DNA修復能および由来（げっ歯類かヒトか）の検討が重要であると示唆されている。本試験ガイドラインの使用者には、この領域の知識の進歩に伴い、上述した要素および他の細胞特性が使用細胞株の染色体異常誘発の検出能に与える影響について考慮することが求められる。

©OECD, (2014)

8. 用語の定義を補遺1に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

9. *In vitro*で行う試験には、細胞が被験物質に対して代謝能を持つ場合を除き、一般的に外因性の代謝活性化系の使用が必要となる。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。被験物質の遺伝毒性を反映しない人為的な陽性の結果を招く可能性のある状態を避けるように注意すべきである。このような状態には、pHの変化(41) (42) (43)、浸透圧の変化、細胞の培地との相互作用(44) (45)、強い細胞毒性（29項参照）などがある。

10. 小核の誘発を分析するには、処理した培養細胞と無処理培養細胞のいずれも分裂していることが不可欠である。小核計数に最も適した時期は、被験物質で処理中または処理後に、細胞が分裂を1回完了した時点である。産業用ナノ材料について本試験ガイドラインの特別な適用が必要とされる場合もあろうが、ナノ材料への適用については本試験ガイドラインでは言及していない。

11. 混合物について、規制対応の目的でデータを得るために本試験ガイドラインを使用する場合は、その前に、その目的にふさわしい結果が得られるのか、もしそうならその理由についてあらかじめ考慮する必要がある。混合物の試験に関して規制上の要件がある場合は、このような考慮を行う必要はない。

試験の概要

12. 適切な代謝能を有する細胞を使用する場合を除いて、ヒトまたは他の哺乳類に由来する培養細胞を外因性代謝活性化系の存在下および非存在下において被験物質で処理する（19項参照）。

13. 被験物質の曝露中または曝露後に、染色体損傷や細胞周期や細胞分裂に対する他の影響により間期細胞に小核が形成されるのに十分な期間、細胞を増殖させる。異数性の誘発には、通常、分裂期間中に被験物質が存在している必要がある。間期細胞を回収、染色して、小核の有無を分析する。小核の計数は、被験物質の曝露中または曝露処理後の期間中に分裂を完了した細胞についてのみ実施するのが理想的である。これは、細胞質分裂阻害剤で処理した培養細胞では、二核細胞についてのみ実施することで、容易に行える。細胞質分裂阻害剤を使用しない場合は、分析対象細胞が、被験物質の曝露中または曝露後に細胞分裂した可能性が高いことを、細胞集団の増加に基づいて示すことが重要である。いずれのプロトコールについても、対照群および処理群の両方で、細胞増殖を証明することが重要であり、被験

©OECD, (2014)

物質によって誘発された細胞毒性や細胞増殖抑制の程度を、小核の計数を行うすべての細胞で評価すべきである。

試験方法

細胞

14. ヒトまたは他の哺乳類の末梢血リンパ球の初代培養細胞(7) (20) (46) (47)、いくつかのげっ歯類の細胞株（CHO細胞、V79細胞、CHL/IU細胞、L5178Y細胞など）およびヒトの細胞株（TK6細胞など）が使用できる(19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36)（6項参照）。小核試験には、HT29細胞(48)、Caco-2細胞(49)、HepaRG細胞(50) (51)、HepG2細胞(52) (53)、A549細胞などの他の細胞株やシリアンハムスター胚細胞の初代培養細胞(54) も用いられているが、これらは現時点では広範な検証が行われていない。したがって、これらの細胞株や細胞種を使用する場合は、「許容基準」の章で述べているように、これらの細胞の試験で示された成績に基づいて妥当性を示すべきである。CytoBは、L5178Y細胞の増殖に影響を及ぼす可能性が報告されているため、この細胞株で用いることは推奨しない(23)。初代培養細胞を使用する場合には、動物福祉の観点から、可能であればヒト由来の初代培養細胞の使用を検討し、ヒトにおける倫理原則および規則に従って試料採取を行う。

15. ヒト末梢血リンパ球採取の対象者は、疾病への罹患が確認されておらず、小核を有する細胞の背景出現率を高めるレベルの遺伝毒性物質（例：化学物質、電離放射線）に最近曝露されていない若年齢（約18～35歳）の非喫煙者とする。これにより、小核細胞の背景出現率を低いレベルに安定して抑えることができる。小核細胞の背景出現率は加齢とともに上昇し、この傾向は男性よりも女性に顕著である(55)。複数のドナーから得た細胞をプールして使用する場合は、ドナー人数を明記する。また、被験物質による処理を開始してから細胞の採取までの間に細胞が分裂したことを証明する必要がある。被験物質に対する各細胞周期の感受性は不明な場合があるため、さまざまな細胞周期にある細胞が曝露されるように、培養細胞は、指数増殖期を維持するか（細胞株の場合）、または刺激して分裂させる（リンパ球の初代培養細胞の場合）。分裂を起こすため分裂促進剤で刺激する必要がある初代細胞は、通常、被験物質に曝露される期間にはもはや同調していない（例：分裂促進剤で刺激した48時間後のヒトリンパ球）。細胞周期が同調している細胞を処理に使用することは推奨されないが、妥当性が示されれば使用可能である。

培地および培養条件

16. 培養の維持には、適切な培地と培養条件（培養容器、必要に応じて5%CO_2の加湿状態、温度37℃）を使用する。細胞株は定期的に染色体モード数の安定性を検査し、マイコプラ

©OECD, (2014)

ズマの汚染がないことを確認する。マイコプラズマ汚染がある場合または染色体モード数が変化した場合にはその細胞を使用しない。試験施設で使用する細胞株または初代培養細胞は、正常な細胞周期時間が把握され、それが公表されている細胞特性に一致している必要がある

培養細胞の調製

17. 細胞株：保存細胞から細胞を増殖させ、細胞が懸濁状態または単層状態のまま回収時点まで対数増殖を維持できる密度で培地に播種する（例：単層培養では、密集状態にならないようにする）。

18. リンパ球：被験物質とcytoBで処理する前に細胞分裂を誘発させるため、抗凝固剤（例：ヘパリン）で処理した全血または分離したリンパ球を、分裂促進剤（例：ヒトリンパ球に対してはフィトヘマグルチニン（PHA））の存在下で培養する（例：ヒトリンパ球の場合は48時間）。

代謝活性化

19. 内因性の代謝能が不十分な細胞を使用する場合は、外因性の代謝系を用いる必要がある。他に妥当な理由がある場合を除き、通常よく用いられ、既知のものとして推奨される代謝系は、アロクロール1254 (56) (57)またはフェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用(58) (59) (60)などの酵素誘導剤で処理したげっ歯類（通常はラット）の肝臓から調製したミクロソーム画分（S9）に、補酵素を添加した溶液である。フェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用は「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(61)に抵触せず、複合機能オキシダーゼの誘導能はアロクロール1254と同程度に高いことが確認されている(58) (59) (60)。S9画分の最終的な試験培地中での濃度は通常1～2%（v/v）を使用するが、10%（v/v）に高める場合もある。処理中に分裂指数を低下させる物質、特にカルシウム錯体形成物質(62)を使用してはならない。使用する外因性代謝活性化系または代謝誘導剤の種類および濃度の選択は、被験物質の種類によっては考慮すべき場合がある。

被験物質の調製

20. 被験物質が固体の場合は、適切な溶媒で溶解し、適宜希釈して細胞を処理する。被験物質が液体の場合は、試験系に直接添加するか、希釈して添加する。被験物質が気体または揮発性の場合は、密封容器内で処理するなど、標準的なプロトコールに適切な修正を加えて試験を実施する(63) (64) (65)。保存可能であることが安定性データによって証明されている場合を除き、被験物質は用時調製する。

©OECD, (2014)

試験条件

溶媒

21. 試験の実施に有害な影響を及ぼす（すなわち、細胞増殖を変化させる、被験物質の完全性に影響する、培養容器と反応する、代謝活性化系を障害する）ことがなく、被験物質の溶解性を最適化できる溶媒を選択する。可能な限り、水性の溶媒（または培地）の使用を第一に考慮する。十分に確立された溶媒は、水またはジメチルスルホキシド（DMSO）である。通常、有機溶媒は最終濃度1%（v/v）を超えないようにする。CytoBをDMSOに溶解する場合、被験物質とcytoBの両方に使用する有機溶媒の総量が1%（v/v）を超えないようにする。そうでない場合は、無処理対照を使用して、その割合の有機溶媒が有害な影響を及ぼさないことを保証する。最終処理培地での、水性の溶媒（生理食塩水または水）は10%（v/v）を超えないようにする。十分に確立されていない溶媒（例：エタノール、アセトン）を使用する場合は、それらが被験物質および試験系に影響しないこと、また使用する濃度で遺伝毒性がないことを示すデータによって、その溶媒の使用の正当性を裏付ける必要がある。正当性を裏付けるデータがない場合は、選択した溶媒によって有害な影響も染色体への影響（例：異数性、染色体構造異常誘発性）も誘発されないことを証明するため、溶媒対照だけでなく無処理対照（補遺1参照）も含めることが重要である。

細胞質分裂阻害剤としてのcytoBの使用

22. MNvit試験が機能するために考慮すべき事項で最も重要なことの1つは、計数する細胞が処理中または処理後の培養期間中（設定した場合）に分裂を完了したことが保証されることである。したがって、小核計数の対象は、処理中または処理後に分裂した細胞に限定する必要がある。CytoBは、アクチン重合を阻害して有糸分裂後の娘細胞の分離を妨げ、二核細胞の形成を引き起こすため(6) (66) (67)、細胞質分裂を阻害するのに最も広く用いられている薬剤である。CytoBを使用した場合、被験物質が細胞増殖動態に及ぼす影響も同時に測定することができる。ヒトリンパ球を使用する場合は、細胞周期がドナーによって異なるため、また、すべてのリンパ球がPHA刺激に反応するとは限らないため、細胞質分裂阻害剤としてcytoBを使用することが必要である。27項で述べたように、他の細胞種については、その細胞が細胞分裂したことが証明できる場合、cytoBの使用は必須ではない。加えて、フローサイトメトリー法で小核を評価する場合、通常、cytoBは使用しない。

23. CytoBの適切な濃度は、細胞種ごとに溶媒対照の培養細胞における二核細胞の頻度が最適になるように試験施設で決定し、その濃度で計数する二核細胞の収率がよいことを示す必要がある。CytoBの適切な濃度は、通常、3～6 µg/mLである(19)。

©OECD, (2014)

細胞増殖および細胞毒性の測定と処理濃度の選択

24. 被験物質の最高濃度を決定する際には、人為的な陽性反応、例えば、過剰な細胞毒性（29項参照）、培養液中の沈殿物（30項参照）、pHや浸透圧の著しい変化（9項参照）などを引き起こす可能性のある濃度は避ける。被験物質を添加した際に培養液のpHが著しく変化する場合は、最終処理培養液を緩衝液で処理してpHを調節することで、人為的な陽性結果の回避や適切な培養条件の維持ができることがある。

25. 細胞増殖の測定を行い、十分な数の処理細胞が試験中に細胞分裂を起こしていること、および処理が適切な細胞毒性レベルで実施されていることを確認する（29項参照）。細胞毒性は細胞死および細胞増殖などの適切な指標を用いて、主試験の代謝活性化系の存在下および非存在下それぞれで決定する。予備試験（用量設定試験）で細胞毒性を評価することは、主試験で使用する濃度をより明確に決定する上で有用であるが、予備試験の実施は義務付けられてはおらず、実施した場合も主試験での細胞毒性の測定の代用にはならない。

26. 培養細胞をcytoBで処理し、単核細胞、二核細胞、および多核細胞の相対頻度を測定することで、被験物質処理が細胞増殖に及ぼす影響および細胞毒性または細胞増殖抑制を正確に定量化することができ(6)、処理中または処理後に分裂した細胞だけを小核計数対象にできる。被験物質処理による細胞毒性または細胞増殖抑制作用を推定するには、1培養につき少なくとも500細胞で細胞分裂阻害増殖指数（CBPI）(6) (27) (68)または複製指数（RI）を求め（計算式については補遺2を参照）、処理した培養細胞と対照培養細胞で値を比較することが推奨される。他の細胞毒性指標（例：細胞の健全性、アポトーシス、壊死、分裂中期細胞数、細胞周期）による評価は、有用な情報が得られる可能性があるが、CBPIやRIの代わりにはならない。

27. CytoBを用いない場合は、計数対象の細胞の大部分が、被験物質で処理中または処理後に分裂したことを証明する必要があり、それができない場合は、偽陰性の結果となる可能性がある。被験物質処理による細胞毒性と細胞増殖抑制作用を推定するには、相対的細胞集団倍加（RPD）または相対的細胞数増加（RICC）を測定することが推奨される(17) (68) (69) (70) (71)（計算式については、補遺2参照）。試料採取が長時間にわたると（例：38および39項で述べるように、正常な細胞周期の1.5～2倍の時間で処理した後、正常な細胞周期の1.5～2倍の時間さらに培養して細胞を回収すると、全体では試料採取時間が正常な細胞周期の3～4倍の時間より長くなる）、RPD値を使用した場合は細胞毒性が過小評価される可能性がある(71)。このような場合には、RICCを測定するほうがよく、あるいは、正常な細胞周期の1.5～2倍の時間後に細胞毒性を評価することが、評価に有用であろう。細胞毒性または細胞増殖抑制の他の指標（例：細胞の健全性、アポトーシス、壊死、分裂中期細胞数の測定、増殖指数（PI）、細胞周期、核質の架橋、核の出芽）は、有用な付加的情報が得られる可能

©OECD, (2014)

性があるが、RPDやRICCの代わりに使用してはならない。

28. 試験許容基準（適切な細胞毒性、細胞数など）を満たす少なくとも3段階（溶媒および陽性対照を除く）の試験濃度を評価すべきである。細胞の種類（細胞株または初代培養リンパ球）に関わらず、試験する各濃度で複数系列または1系列の培養を使用する。2系列で培養した細胞を使用するのが望ましいが、計数する細胞総数が2系列で培養した細胞と同じであれば、1系列で培養した細胞の使用も可能である。1系列の培養の使用は、特に3段階を超える濃度で評価する場合に妥当である（44, 45項参照）。設定した濃度において、それぞれ2系列以上で培養した細胞から得られた結果は、プールしてデータ解析できる (38)。細胞毒性をほとんどまたはまったく示さない被験物質については、通常、公比約2～3で設定した濃度段階の使用が適している。細胞毒性がある場合は、選択した試験濃度が29項に記載したように細胞毒性を示す濃度、中等度の細胞毒性を示す濃度および細胞毒性をほとんどまたはまったく示さない濃度を含む必要がある。被験物質には急勾配の濃度反応曲線を示すものが多く、低い細胞毒性および中等度の細胞毒性でのデータを得るため、または用量反応関係を詳しく調べるためには、とりわけ確認試験が要求される状況では（60項参照）、濃度間隔のより密な設定や3段階を超える濃度の設定（1系列または複数系列の培養）の必要がある。

29. 最高濃度が細胞毒性に基づく場合、最高濃度は、推奨する細胞毒性パラメータを用いて、細胞毒性が55±5%になるように設定する（cytoBを使用しない場合は細胞株についてはRICCとRPDが、cytoBを使用する場合はCBPIまたはRIの減少が、同時陰性対照の45±5%となるようにする）(72)。陽性の結果がこの55 ± 5%の細胞毒性範囲の上限においてのみ見られる場合には、結果の解釈に注意を払う必要がある(71)。

30. 被験物質が難溶性で、最低不溶濃度より低い濃度で細胞毒性がない場合は、観察した最高濃度において被験物質処理の終了時に、肉眼または倒立顕微鏡で混濁や沈殿が確認される必要がある。たとえ最低不溶濃度より高い濃度で細胞毒性が生じたとしても、人為的影響が沈殿によって生じる可能性があるため、観察対象としては濁りまたは目に見える沈殿を生じる濃度を1濃度含めるだけにすることが望ましい。沈殿を生じる濃度では、沈殿が試験の実施（例：染色や計数）を妨げないよう注意する。実験前に培地での溶解性を測定しておくと、有用である。

31. 沈殿も処理濃度を規定する細胞毒性も認められない場合、最高試験濃度は10 mM、2 mg/mLまたは2 µL/mLのうち、最も低い濃度とする(73) (74) (75)。組成が不明な被験物質、例えば、組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料（すなわち、UVCB [Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials]物質）(76)、環境抽出物などの場合、十分な細胞毒性を示さない場合は、最高濃度を高くして（5 mg/mLにするなど）、各成分の濃度を高める必要がある。ただし、上記の要

©OECD, (2014)

件は、ヒト用医薬品では異なる場合があるので注意する(93)。

対照

32. 細胞の回収時期ごとに、処理培地に溶媒のみを添加したもので、被験物質処理と同じ方法で処理した同時陰性対照（21項参照）を設ける。

33. 同時陽性対照は、試験施設が用いた試験プロトコールの条件下で染色体構造異常誘発物質を検出する能力を備えていること、および外因性代謝活性化系の有効性（使用した場合）を証明するために必要である。陽性対照の例を表1に示す。妥当性が示されれば代わりの陽性対照物質を使用してもよい。

34. 遺伝毒性作用の発現に代謝活性化が必要な異数性誘発物質は、現在のところ知られていない(17)。哺乳類細胞を用いる*in vitro*遺伝毒性試験は、代謝活性化系の存在下と非存在下において同じ処理時間で同時に実施する短時間処理法が十分に標準化されているため、代謝活性化を必要とする染色体構造異常誘発物質を陽性対照として使用すればよい。この場合、1つの染色体構造異常誘発性陽性対照の結果で、代謝活性化系の活性と試験系の反応性の両方が証明されると考えられる。ただし、長時間処理（S9なし）については、代謝活性化系を用いる試験とは処理時間が異なるため、それ自体の陽性対照が必要である。代謝活性化の存在下と非存在下における短時間処理で、ただ1つの陽性対照として、染色体構造異常誘発物質を選択する場合は、代謝活性化の非存在下における長時間処理の陽性対照には、異数性誘発物質を選択すべきである。S9を必要としない代謝能を持つ細胞を使用する場合は、染色体構造異常誘発性と異数性誘発性について、それぞれの陽性対照を置く。

35. 試験系の感度を証明するため、それぞれの陽性対照は、再現性があり検出できる背景出現率を超える増加が期待される1つ以上の濃度を設定し（すなわち、作用は明らかであるが、観察者によってコード化されたスライドが直ちに特定されない）、その反応が、本試験ガイドラインに規定された限度を超える細胞毒性によるものではないようにする。

©OECD, (2014)

表1. 試験施設の習熟度評価用および選択する陽性対照として推奨される参照物質

カテゴリー	物質	CASRN
1. 代謝活性化なしで活性のある染色体構造異常誘発物質		
	メタンスルホン酸メチル	66-27-3
	マイトマイシン C	50-07-7
	4-ニトロキノリン-N-オキシド	56-57-5
	シトシンアラビノシド	147-94-4
2. 代謝活性化を必要と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
	ビンブラスチン	143-67-9

手順

処理計画

36. 細胞周期の特定の時期に作用する異数性誘発物質や染色体構造異常誘発物質の検出確率を最大限に高めるには、細胞周期のさまざまな時期がすべて含まれている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。いずれの処理も細胞の対数増殖期に開始および終了する必要があり、細胞の増殖が回収の時点まで持続する必要がある。したがって、細胞株および初代培養細胞の処理計画は、細胞周期の開始に細胞分裂促進的な刺激が必要なリンパ球の処理計画とは、やや異なる可能性がある(17)。リンパ球の場合、細胞が非同調的に分裂していると考えられるPHAによる刺激後44～48時間で被験物質への処理を開始するのが、最も効率的な方法である(6)。

37. 公表データ(19)によると、ほとんどの異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質は、S9の存在下および非存在下において3～6時間の短時間処理後被験物質を除去し、処理開始から正常な細胞周期の約1.5～2.0倍の長さに等しい時間経過後に、試料採取することで検出される(7)。

38. ただし、結果を陰性と判定するのに必要となる厳密な評価を行うには、代謝活性化の存在下および非存在下での短時間処理、ならびに代謝活性化の非存在下での長時間処理による、次の3つ試験条件をすべて実施する必要がある（56～58項参照）：

- 代謝活性化の非存在下で、細胞を被験物質に3～6時間曝露し、処理開始から正常な細

©OECD, (2014)

胞周期の約1.5～2.0倍時間後に試料採取を行う(19)。

- 代謝活性化の存在下で、細胞を被験物質に3～6時間曝露し、処理開始から正常な細胞周期の約1.5～2.0倍時間後に試料採取を行う(19)。
- 代謝活性化の非存在下で、正常な細胞周期の約1.5～2.0倍時間後に試料採取を行うまで被験物質の曝露を続ける。

上記のいずれかの実験条件で陽性反応が認められた場合､残りの試験条件で試験する必要はない。

被験物質が細胞周期に影響を及ぼす（特にp53正常細胞）ことがわかっているか疑われる（例：ヌクレオシド類似体を試験する）場合は(35) (36) (77)、試料採取時間または回復時間を最大で正常な細胞周期の1.5～2.0倍の時間（すなわち、短時間処理、長時間処理のいずれの場合も、全体では、処理開始から正常な細胞周期の3.0～4.0倍の時間の経過後まで）延長してよい。これらのオプションは、被験物質とcytoBに相互作用が起こる懸念がある場合に対応できる。試料採取時間を延長する（すなわち、全体で細胞周期の3.0～4.0倍の時間にわたって培養する）場合、細胞がまだ活発に分裂していることを確認するよう注意が必要である。例えば、リンパ球の場合、指数関数的増殖は刺激後96時間で衰え、単層培養する細胞では密集状態になる可能性がある。

39. 推奨する細胞処理の計画を表2に要約する。一般的なこれらの処理計画は、被験物質の安定性や反応性、あるいは使用する細胞特有の増殖特性に応じて変更してよい（妥当性を説明のこと）。

表2. MNvit試験における細胞の処理および回収の時間

cytoB 処理を行うリンパ球、初代培養細胞、および細胞株	+ S9 短時間処理	S9 存在下で 3～6 時間処理； S9 と処理用培地を除去； 新鮮な培地と cytoB を添加； 処理開始から正常な細胞周期の 1.5～2.0 倍の時間後に回収
	- S9 短時間処理	3～6 時間処理； 処理用培地を除去； 新鮮な培地と cytoB を添加； 処理開始から正常な細胞周期の 1.5～2.0 倍の時間後に回収
	- S9 長時間処理	cytoB の存在下で正常な細胞周期の 1.5～2.0 倍の時間処理； 処理終了時に回収
cytoB 処理を行わない細胞株 （cytoB を添加しないこと以外、上記の処理計画と同じ）		

40. 単層培養の場合、3～6時間処理の終了時に、分裂細胞（球形を呈し、単層表面から剥離しかけている細胞として認識される）が認められる。これらの分裂細胞は容易に表面から

©OECD, (2014)

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る可能性がある。そのため、分裂細胞数が対照と比較して大幅に増加しており、分裂が停止している可能性がある場合は、分裂期にあって小核や染色体異常を形成している可能性のある細胞の喪失を避けるために、細胞回収の際に遠心分離によって細胞を集め、これを培養液に戻す必要がある。

細胞の回収およびスライド標本の調製

41. 細胞培養ごとに、細胞を回収して処理する。細胞の標本作製時に低張処理を行ってもよいが、細胞が十分に広がるのであれば、この処理は必要ない。計数用の高品質の細胞標本が作製できるのであれば、別の手法を用いてスライドを作製してよい。小核の検出および（細胞質分裂阻害法では）二核細胞の信頼できる同定を行うためには、細胞は細胞膜と細胞質が無傷に保たれている必要がある。

42. スライドは、ギムザ染色やDNA特異的蛍光染色など、さまざまな方法で染色できる。適切な蛍光染色剤（例：アクリジンオレンジ(78)、ヘキスト33258＋ピロニンY(79)）を使用すれば，DNA非特異的染色剤の使用に伴う人為的影響の一部を、で排除できる。小核形成の機構的情報に関心がある場合は、適切なDNA対比染色とともに、抗動原体抗体、汎セントロメア（pancentromeric）DNAプローブを用いるFISH、または汎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*標識を使用することで、小核の内容（染色体全体による小核は染色されるが、無動原体染色体断片による小核は染色されない）を同定できる(16) (17)。染色体構造異常誘発物質と異数性誘発物質を区別するための別の方法も、有効性が示され、検証が済んでいれば、使用してかまわない。例えば、特定の細胞株については、画像解析、レーザースキャニングサイトメトリー、フローサイトメトリーなどの手法を用い、低倍数性のものとしてDNA量が2n未満の核を計数することで、有用な情報を得ることができる(80) (81) (82)。核の形態を観察することでも、異数性の可能性を示すことができる。さらに、分裂中期細胞での染色体異常試験（同じ細胞種で同等の検出感度を有するプロトコールの試験が望ましい）も、小核が染色体の切断によるものであるかどうかを判定するための有用な方法である（染色体異常試験では、染色体の損失が検出されないことが知られている）。

分析

43. 小核頻度を顕微鏡分析する前に、溶媒、無処理（使用した場合）および陽性対照のスライドも含めたすべてのスライドを個別にコード化する。自動計数システム（例：フローサイトメトリー、レーザースキャニングサイトメトリー、画像解析）を使用する場合は、適切な技法を用いて、あらゆる偏りや変動を制御する。小核の計数に自動システムを使用するか否かに関係なく、CBPI、RI、RPDあるいはRICCを同時に評価する。

©OECD, (2014)

44. CytoB処理を行った培養細胞では、各濃度および対照について少なくとも2000個（2系列以上で培養した場合は、この数を系列数で割った数）の二核細胞について、小核の頻度を分析する(83)。用量ごとに1系列で培養した場合（28項参照）は、1培養につき少なくとも2000個の二核細胞について計数する(83)。各濃度での計数対象となる二核細胞の数が、それぞれ1培養につき2系列培養で1000個（あるいは1系列培養で2000個を大きく下回り、かつ小核数の有意な増加が検出されなかった場合は、細胞数を増やすかあるいはより細胞毒性の低い濃度を設定するかのいずれか適切な方法を用いて再試験を行う。2つの核の形が不規則あるいは大きさが大きく異なる二核細胞は、計数の対象にしないように気をつける。また、二核細胞と広がりの悪い多核細胞を混同しないようにする。主核を3つ以上有する細胞は、小核頻度の背景値が高い可能性があるため、小核の分析には用いない(84)。被験物質がcytoBの作用を妨げることが示されている場合は、単核細胞を計数の対象にしてよい。このような場合には、cytoBを用いないで再試験を行うと、有用であることがある。二核細胞の他に単核細胞を計数することで、有用な情報が得られる可能性があるが(85) (86)、実施を強制するものではない。

45. CytoB処理を行わないで試験する細胞株では、1つの試験濃度および対照について少なくとも2000個(83)（2系列以上で試験する場合は、この数を系列数で割った数）の細胞について、小核を計数する。各濃度1系列で培養する場合（28項参照）は、1培養につき少なくとも2000個の細胞について計数する。各濃度での計数可能な培養細胞が、それぞれ1培養につき2系列培養で1000個、1系列培養で2000個を大きく下回り、かつ小核数の有意な増加が検出されなかった場合は、細胞数を増やすかあるいはより細胞毒性の低い濃度を設定するかのいずれか適切な方法で再試験を行う。

46. CytoBを使用する場合は、1培養につき少なくとも500個の細胞を用いて、CBPIまたはRIを算出して細胞増殖を評価する（補遺2参照）。CytoB非存在下で処理を行う場合は、24～28項で述べたように、培養中の細胞が分裂したことを証明する必要がある。

試験施設の習熟度

47. 試験施設は、本試験法を日常的に実施するに先立ち、本試験法の経験を十分に積むため、それぞれ異なる機序で作用する陽性対照物質（表1に示す物質から、代謝活性化の存在下で用いるもの、非存在下で用いるもの、異数性誘発機序を介して作用するものをそれぞれ1つ以上選択する）と、各種陰性対照（無処理培養および種々の溶媒を含む）を用いて一連の実験を行っておく。これらの陽性対照および陰性対照の反応は、文献と一致していなければならない。この項は、経験のある、すなわち、49～52項で定義した背景データが得られている試験施設には適用されない。

©OECD, (2014)

48. 陽性対照物質（表1）の選択は、代謝活性化系の非存在下における短時間および長時間処理、さらに代謝活性化の存在下における短時間処理で行う。これによって、染色体構造異常誘発物質と異数性誘発物質の検出、代謝活性化系の有効性の判定、および計数手順（顕微鏡を用いた目視による分析、フローサイトメトリー、レーザースキャニングサイトメトリー、画像分析）が妥当であることの習熟度が示される。試験系の感度と検出範囲を示すため、選択した物質の濃度範囲は、再現性と濃度依存性があり、背景値を超える増加が認められるように設定する。

背景対照データ

49. 試験実施機関は、下記について確立しておく必要がある：

- 陽性対照の背景データの範囲および分布
- 陰性（無処理、溶媒）対照の背景データの範囲および分布

50. 最初に背景陰性対照の分布データを得る場合は、公表されている陰性対照データがあれば、このデータと同時陰性対照のデータが一致していなければならない。対照の分布に追加する実験データの増加に伴い、同時陰性対照は、その分布の95%管理限界の範囲内に収めるのが理想的である (87) (88)。試験施設の陰性対照の背景データベースは、最初は最低10回の実験によって構築すべきだが、できれば同等な条件下で実施された少なくとも20回の実験によって構築することが望ましい。試験施設は、管理図（例：C管理図、X-bar管理図(88)）などの品質管理の方法を用いて、試験室の陽性、陰性の両対照データの変動の様子を明らかにし、その試験方法が当該施設で「管理下にある」ことを示す必要がある(83)。背景データの構築および使用の方法に関するさらなる推奨事項（すなわち、背景データにおけるデータの選択および除外基準ならびに所定の実験の許容基準）が、文献(87) に示されている。

51. 実験プロトコールに変更がある場合は、試験実施施設の既存の対照背景データベースのデータとの整合性を考慮すべきである。重大な不一致があった場合には、新たに対照の背景データベースを構築しなければならない。

52. 陰性対照のデータは、28項で述べたように、1系列で培養した培養細胞または2系列以上で培養した場合は合計した培養細胞における小核を有する細胞の出現率から構成される。同時陰性対照は、試験施設の陰性対照の背景データベース分布の95%管理限界内に収まるのが望ましい(87) (88)。同時陰性対照のデータが95%管理限界から外れた場合は、そのデータが極端な外れ値ではなく、試験系が「管理下にある」こと（50項参照）および手技的あるいは人為的なミスがなかったという証拠があれば、対照の背景データの分布に含めることができる。

©OECD, (2014)

データおよび報告

結果の提示

53. 細胞質分裂阻害法を用いる場合、小核誘発性の評価には1細胞当たりの小核数は関係なく、小核を有する二核細胞の頻度のみを用いる。小核を1個、2個、または3個以上有する細胞の計数は、有用な情報が得られる可能性があり、別途報告すればよいが必須ではない。

54. 全ての被験物質処理群、陰性対照および陽性対照の培養細胞について、細胞毒性や細胞分裂抑制作用を同時測定する(16)。細胞質分裂阻害法を用いる場合は、すべての処理培養細胞と対照培養細胞について、細胞周期遅延の指標としてCBPIまたはRIを算出する。CytoBを使用しない場合は、RPDまたはRICCを使用する（補遺2参照）。

55. 個々の培養のデータを示し、さらに、すべてのデータを表形式に要約する。

許容基準

56. 試験が許容できるかどうかは以下の基準に基づく。

- 同時陰性対照は、50項で述べたように、試験施設の陰性対照の背景データベースに追加できる。
- 同時陽性対照（50項参照）は、試験施設の陽性対照の背景データベースで得られる反応に一致し、同時陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。
- 溶媒対照における細胞増殖基準が満たされている（25～27項参照）。
- いずれかの実験条件によって陽性結果が得られていない限り、全ての条件で試験を実施している（36～40項参照）。
- 適切な細胞数および濃度数で分析可能である（28, 44～46項参照）。
- 最高濃度の選択基準が、24～31項に述べたものに適合している。

結果の評価および解釈

57. すべての許容基準が満たされている条件で、検討した実験条件（36～39項参照）のいずれかで以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陽性であると判定される。

- 少なくとも1つの試験濃度で、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(89)。

©OECD, (2014)

- 適切な傾向検定で評価し、少なくとも1つの実験条件で、用量依存性の増加が認められる（28項参照）。
- 当該結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界；52項参照）から外れている。

上記基準をすべて満たす場合､被験物質は本試験系で染色体の切断や増減を誘発すると判定される。なお、最適な統計学的手法に関する勧告が文献に発表されている(90) (91) (92)。

58. すべての許容基準が満たされている条件で、検討したすべての実験条件（36～39項参照）で以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陰性であると判定される。

- 試験した濃度のいずれにおいても、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。
- 適切な傾向検定の評価で、濃度依存性の増加が認められない。
- すべての結果が陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った95%管理限界；52項参照）内に収まる。

この場合、被験物質は、本試験系に染色体の切断も増減も誘発しないと判定される。なお、最適な統計学的手法に関する勧告が文献に発表されている(90) (91) (92)。

59. 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。

60. 得られた結果が上述したような明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、あるいは、結果の生物学的妥当性を確認する必要がある場合には、専門家判断や追加試験によりデータを詳細に評価する必要がある。追加の細胞を計数（適切な場合）あるいは実験条件の変更（濃度間隔、他の代謝活性化条件[すなわち、S9の濃度またはその由来]）を考慮した再試験の実施が、有用な場合がある。

61. まれに、追加試験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、そのため被験物質の反応が「不明確」と結論される場合もある。

62. MNvit試験において小核を誘発する被験物質は、染色体切断、染色体損失、またはその両方を誘発する可能性があることを示している。抗動原体抗体やセントロメア特異的*in situ*プローブなどの方法を用いたさらなる分析が、小核誘発のメカニズムが染色体構造異常誘発性や異数性誘発性に起因しているかどうかを判定するために使用できる。

試験報告書

63. 試験報告書には以下の情報を含める。

©OECD, (2014)

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
- 被験物質と溶媒／媒体または細胞培養培地との反応性
- 既知の場合、溶媒中における被験物質の溶解性と安定性
- 必要に応じ、被験物質添加した培地のpH、浸透圧および沈殿の測定結果

単一成分の物質：

- 外観、水溶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UPAC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 [Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials]物質および混合物：

- 構成物質の化学的識別（上記参照）、定量的組成率および関連のある物理化学的性質によるできる範囲での特性

溶媒：

- 溶媒選択の妥当性
- 最終的な培地中の溶媒の割合（%）

細胞：

- 使用した細胞種と供給元
- 使用した細胞の適合性
- 細胞株の場合、マイコプラズマ汚染のないこと
- 細胞株の場合、細胞周期の長さや増殖指標に関する情報
- リンパ球を使用した場合は、血液のドナーの性別、年齢および関連する情報、全血か分離リンパ球か、使用した分裂促進剤
- 正常な（陰性対照の）細胞周期の時間
- 細胞株の場合、情報があれば継代数
- 細胞株の場合、細胞培養を維持する方法
- 細胞株の場合、染色体モード数

試験条件：

- 細胞質分裂阻害物質（例：cytoB）を使用した場合、その名称、濃度、細胞への曝露時間

©OECD, (2014)

- 培地中での被験物質の最終濃度（例：培地のμg/mL、mg/mLまたはmM）
- 濃度および培養系列数の選択の根拠（細胞毒性データと溶解限界値を含む）
- 培地の組成、該当する場合は CO_2 濃度、湿度
- 培地に添加する溶媒と被験物質の濃度（や容量）
- 培養温度と時間
- 処理時間
- 処理後の回収時間
- 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組成、S9の供給元、S9 mixの調製法、最終培地におけるS9 mixとS9の濃度または容量、S9の品質管理（例：酵素活性、無菌性、代謝能）
- 陽性および陰性対照物質、最終濃度、処理の条件と時間、回収時間
- スライド標本の作製方法および使用した染色法
- 小核を持つ細胞の計数基準（分析対象とする細胞の選択と小核の識別）
- 分析した細胞の数
- 細胞毒性の測定方法
- 細胞毒性と使用した方法に関する補足情報
- 試験結果を陽性、陰性、または不明確と判定する基準
- 用いた統計解析の方法
- 該当する場合、小核に含まれているのが染色体全体であるのか断片であるのかの判別方法（動原体抗体や汎セントロメア特異的プローブの使用など）
- pH、浸透圧および沈殿の測定に用いた方法

結果：

- 解析対象とする細胞の定義
- CytoB非存在下における細胞株の場合、培養ごとに処理した細胞数と回収した細胞数
- 用いた細胞毒性の測定結果（例：細胞質分裂阻害法を用いた場合のCBPIまたはRI、細胞質分裂阻害法を用いなかった場合のRICCまたはRPD）、もしあれば他の観察結果（例：細胞密集度、アポトーシス、壊死、分裂中期細胞数、二核細胞の頻度）
- 沈殿の有無およびその観察時期
- 測定した場合、処理培地のpHと浸透圧に関するデータ
- 細胞質分裂阻害法を用いた場合、単核細胞、二核細胞、および多核細胞の分布
- 小核を持つ細胞数（処理培養、または対照培養ごとに別々に算出し、必要に応じ、二核細胞と単核細胞のいずれから算出したかを明示する）
- 可能な場合、濃度反応関係
- 同時陰性（溶媒）対照と陽性対照のデータ（濃度および溶媒）
- 陰性（溶媒）対照および陽性対照の背景データ（範囲、平均、標準偏差、分布の

©OECD, (2014)

95%管理限界ならびにデータ数を含める）

－ 統計解析、もしあればp値

結果の考察

結論

©OECD, (2014)

参考文献

(1) OECD, Draft Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays. Under preparation.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. et al. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. et al. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome

©OECD, (2014)

breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. et al. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. et al. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders et al. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) OECD (1997), *Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264071261-en.

(19) Lorge, E. et al. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. et al. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. et al. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

(26) Miller, B. et al. (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 Research*, Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. et al. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. et al. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.

©OECD, (2014)

(29)von der Hude, W. et al. (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*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30)Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (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 Research*, Vol. 517/1-2 , pp. 123-134.

(31)Matsushima, T. et al. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32)Elhajouji, A., E. Lorge (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33)Kirkland, D. (2010), Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial, *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34)Hashimoto K. et al. (2011), Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the in vitro micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells, *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35)Honma, M., M. Hayashi (2011), Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36)Zhang, L.S. et al. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37)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.

(38)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.

(39)Corvi, R. et al. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, Vol 23/4, pp. 271-283.

(40)ILSI paper (draft), Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

(41)Scott, D. et al. (1991), International Commission for Protection Against Environmental

©OECD, (2014)

Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. et al. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. et al. (2010), Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis, *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. et al. (2010), Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. et al. (2010), Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays, *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. et al. (2012), An adaptation of the human HepaRG cells to the in vitro micronucleus assay, *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. et al. (2002), Fumonisin B1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. et al. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. et al. (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 Research*, Vol. 392/1-2 , pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. et al. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of

©OECD, (2014)

laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

(58) Elliott, B.M. et al. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. et al. (1976), "A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J. et al. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.

(61) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int/]

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in Genotoxic Effects of Airborne Agents, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(64) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(65) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (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 Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. et al. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay

©OECD, (2014)

working group", *Mutation Research*, 564, 97-100.

(69) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. et al. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. et al. (2011), In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OECD (2014) Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Available upon request.

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. et al. (2012), Development and validation of an in vitro micronucleus assay platform in TK6 cells, *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. et al. (2011), Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.

(81) Nicolette, J. et al. (2011), In vitro micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010), Further evaluation of a flow cytometric in vitro

©OECD, (2014)

micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies, *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. et al. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998), Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. et al. (2011), The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. et al. (2010), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003), "*In vitro* micronucleus test', in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed., Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(92) Richardson, C. et al. (1989), "Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

©OECD, (2014)

補遺 1

用語の定義

異数性誘発物質：体細胞分裂や減数分裂の細胞分裂周期装置の構成要素と相互作用して、細胞や生物に異数性を引き起こす物質または作用。

異数性：正常な二倍体（または半数体[一倍体ともいう]）の染色体数から単一もしくは複数の染色体の増減があること。ただし、染色体数の全体での倍加（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で、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：細胞分裂の結果、細胞数が増加すること。

セントロメア：両染色分体が結合している染色体のDNA領域、ここで両方の動原体が接して付着している。

濃度：培地中の被験物質の最終濃度をいう。

染色体異常誘発物質：細胞集団または真核生物に染色体の構造異常を引き起こす物質。

細胞質分裂：有糸分裂の直後に起こる細胞分裂の過程。これによって、それぞれ核を1個有する娘細胞が2個形成される。

細胞質分裂阻害増殖指数（CBPI）：処理した細胞集団における2回目の分裂細胞の無処理対照に対する割合（計算式については、補遺2参照）。

細胞増殖抑制：細胞増殖の阻害（計算式については、補遺2参照）。

細胞毒性：本試験ガイドラインで述べる試験において、サイトカラシンBの存在下で行う場合は、処理した細胞の細胞質分裂阻害増殖指数（Cytokinesis-Blocj Proliferation Index; CBPI）または複製指数（Replication Index; RI）が陰性対照よりも減少する事象として示される（26項および補遺2参照）。サイトカラシンBの非存在下で行う場合は、処理した細胞の相対的細胞集団倍加（relative population doubling; RPD）または相対的細胞数増加（relative increase in cell count; RICC）が陰性対照よりも減少する事象として示される（27項および補遺2参照）。

©OECD, (2014)

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、遺伝子突然変異、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。

間期細胞：細胞分裂期にない細胞。

動原体：染色体のセントロメアに構成される蛋白質を含む構造体で、細胞分裂中に紡錘糸が付着し、これによって娘染色体が娘細胞の極に正しく移動できる。

小核：細胞の主核から分離した、付加的な小さな核。有糸分裂または減数分裂の終期に、染色体の断片または全体が取残されることによって生じる。

体細胞分裂：細胞核の分裂。一般に、前期、前中期、中期、後期、終期に分けられる。

有糸分裂指数：細胞集団中の分裂中期細胞を観察した細胞総数で割った割合。その細胞集団における細胞増殖の度合いの指標となる。

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。

染色体不分離：対になった染色分体の分離および形成中の娘細胞への適切な配分の失敗。娘細胞での染色体の数の異常を引き起こす。

p53の状態：p53蛋白質は、細胞周期調節、アポトーシス、DNA修復に関与する。p53タンパク質の機能が欠損している細胞は、DNA損傷に応答するp53の機能が関与するアポトーシスまたは他のメカニズム（例：DNA修復の誘発）による細胞周期の停止や、損傷細胞の除去ができず、理論上、遺伝子突然変異や染色体異常を起こしやすくなる。

倍数性：細胞または生物における数的染色体異常のうち、全染色体セットを含むもの。1本あるいは数本の染色体の数の異常（異数性）の対義語。

増殖指数（PI）：cytoBを使用しない場合の、細胞毒性測定法（計算式については、補遺2参照）。

相対的細胞数増加（RICC）：cytoBを使用しない場合の、細胞毒性測定法（計算式については、補遺2参照）。

©OECD, (2014)

相対的細胞集団倍加（RPD）：cytoBを使用しない場合の、細胞毒性測定法（計算式については、補遺2参照）。

複製指数（RI）：曝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、無処理対照に対する割合（計算式については、補遺2参照）。

S9肝画分：肝ホモジネートを9000×gで遠心分離した後の上清で、生の肝臓抽出物。

S9 mix：肝S9画分と代謝酵素の活性化に必要な補因子の混合物。

溶媒対照：被験物質を溶解するのに用いた溶媒のみを添加する対照培養細胞を指す一般的用語。

無処理対照：いずれの物質も添加しない（すなわち、被験物質でも溶媒でも処理しない）が、それ以外は、被験物質で処理する培養細胞と同じ方法で同時に処理する対照培養細胞。

©OECD, (2014)

補遺2

細胞毒性評価のための計算式

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(17) (69)。CBPIは、細胞あたりの核の平均数を表し、細胞増殖率の計算に用いることができる。RIは、cytoBで処理中の、処理培養細胞の細胞あたりの細胞周期の、対照培養細胞に対する相対数を表し、細胞増殖抑制率の計算に用いることができる。

$$\text{細胞増殖抑制率} = 100\text{-}100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

T = 被験物質処理培養細胞
C = 対照培養細胞

ここで

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

したがって、CBPIが1（全ての細胞が単核）であることは、細胞増殖抑制率が100%と同等。

$$\text{細胞増殖抑制率} = 100\text{-RI}$$

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

T= 処理した培養細胞
C = 対照培養細胞

2. したがって、RIが53%であるということは、対照培養細胞における分裂して二核細胞と多核細胞を形成した細胞数に比較して、処理した培養細胞では53%が分裂したことすなわち47%の細胞増殖抑制率であることを意味する。

3. ***cytoBを使用しない場合***、細胞毒性の評価は、**相対的細胞数増加（RICC）**または**相対的細胞集団倍加（RPD）**に基づいて行うことが推奨される(69)。これは、どちらの指数も、分裂した細胞集団の割合が考慮されているためである。

©OECD, (2014)

$$\textbf{RICC} = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 – 開始時))}}{\text{(対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 – 開始時))}} \times 100$$

$$\textbf{RPD} = \frac{\text{(処理した培養細胞における細胞集団の倍加数)}}{\text{(対照培養細胞における細胞集団の倍加数)}} \times 100$$

ここで

細胞集団倍加（PD）＝［log（処理後の細胞数÷処理開始時の細胞数）］÷ log 2

4. したがって、53%のRICCまたはRPDは、細胞毒性または細胞増殖抑制が47%であることを意味する。

5. **増殖指数（PI）**を用いた評価は、1細胞（cl1）、2細胞（cl2）、3～4細胞（cl4）、5～8細胞（cl8）からなるクローンの数を数えることで、細胞毒性を評価することができる。

$$\textbf{PI} = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PIは、cytoBの非存在下において*in vitro*で培養した培養細胞のための、重要かつ信頼できる細胞毒性パラメータとしても使用されており[35) - 38)]、有用な付加的パラメータとみなすことができる。

いずれの場合も、処理前の細胞数は、被験物質処理培養細胞と陰性対照の培養細胞で同じである必要がある。

相対的細胞数（RCC）（処理した培養細胞での細胞数／対照の培養細胞での細胞数）は、以前細胞毒性パラメータとして用いられていたが、細胞毒性が過小評価される可能性があるため、今は推奨されない。

自動計数システム（例：フローサイトメトリー、レーザースキャニングサイトメトリー、画像解析）を使用するときは、計算式中の細胞の数に代えて、核の数を使用することができる。

陰性対照の培養細胞のでは、細胞集団倍加または複製指数は、処理後、正常な細胞周期の約1.5～2.0 倍の長さに相当する時間に細胞の試料採取を行うための要件に適合する必要がある。

©OECD, (2014)