OECD/OCDE

2011/07/28

試験ガイドライン No.488

トランスジェニック齧歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験

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 (2011), Test No. 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assaays, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-488-2011.pdf

©OECD(2011)

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

2011 年 7 月 28 日
採択

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

トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験

はじめに

1. OECD の試験ガイドライン（TG）には、染色体や遺伝子の突然変異を検出できる様々な *in vitro* 突然変異試験が用意されている。また、*in vivo* の評価項目（染色体異常および不定期 DNA 合成）を用いる試験ガイドラインもあるが、これらは遺伝子突然変異を調べるものではない。トランスジェニックげっ歯類（TGR）突然変異試験は、実際的で広く利用可能な遺伝子突然変異の *in vivo* 試験法を求める要望を満たすものである。

2. TGR 突然変異試験については広範な検討が行なわれてきた（24）（33）。この試験ではトランスジェニックラットまたはマウスを用いるが、これらの染色体にはプラスミドまたはファージシャトルベクターが多コピー組み込まれており、その導入遺伝子には被験物質によって *in vivo* で生じる様々な種類の突然変異を検出するためのレポーター遺伝子が含まれている。

3. げっ歯類で生じた突然変異は、導入遺伝子を回収し、レポーター遺伝子の表現型をその遺伝子を持たない細菌宿主で解析することにより計数する。TGR 遺伝子突然変異試験では、事実上げっ歯類のあらゆる組織から回収できる遺伝的に中立な遺伝子に誘発された突然変異を測定する。このため、同試験法は、内在性遺伝子を用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験でみられる制限（解析に適した組織が限られることや、変異に対するネガティブ／ポジティブセレクションなど）の多くを回避できる。

4. 科学的根拠の重要度の検討において、導入遺伝子は変異原に対して内在性遺伝子と同様に反応することが示唆され、特に塩基対置換、フレームシフト突然変異ならびに小さな欠失および挿入の検出に関してはこのことが言える（24）。

5. 「遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ（IWGT）」は、TGR 遺伝子突然変異試験を遺伝子突然変異の *in vivo* 検出法として承認し、その実施のためのプロトコールを推奨している（15）（29）。本 TG はその推奨に基づくものである。このプロトコールの使用をさらに裏付ける検討結果は（16）にみることができる。

6. 将来的には TGR 遺伝子突然変異試験と反復投与毒性試験（TG407）との併合の可能性も考えられている。しかし、TGR 遺伝子突然変異試験では投与期間終了から試料採取時期までの期間を 3 日としているのに対し、反復投与毒性試験ではより短い 1 日であり、この期間短縮が TGR 遺

© OECD（2011 年）
出典が適切に示されている限り、本文書の非営利目的での個人的使用は自由であり、OECD による事前の承諾を必要としない。本文書を営利目的で使用する場合には、OECD の文書による許可を必要とする。

伝子突然変異試験の感度に影響しないことを確認するためのデータが必要である。また、従来のげっ歯類の系統ではなくトランスジェニックげっ歯類の系統を用いても反復投与試験の毒性検出能に悪影響がないことを示すデータも必要である。これらのデータが入手できたとき、本 TG は改訂される予定である。

7. 主な用語の定義を補遺に示す。

最初に考慮すべき事項

8. 本 TG での使用を裏付ける十分なデータがある TGR 遺伝子突然変異試験は、*lacZ* バクテリオファージマウス（Muta^{TM}マウス）、*lacZ* プラスミドマウス、*gpt* delta（*gpt* および Spi$^-$）マウスおよびラット、ならびに *lacI* マウスおよびラット（Big Blue®）を用いた試験で、かつ標準的な条件下で実施されたものである。また、Big Blue®および Muta^{TM}マウスモデルにおける突然変異の評価には、*cII* ポジティブセレクション法を用いることができる。TGR モデルにおける突然変異誘発は、通常突然変異体頻度で評価するが、必要に応じて突然変異の分子解析を行なうことで追加情報を得ることができる（段落 24 参照）。

9. これらげっ歯類の *in vivo* 遺伝子突然変異試験は、その反応が *in vivo* の代謝、薬物動態、DNA 修復過程および損傷乗り越え DNA 合成（translesion DNA synthesis）に依存しているという点で、変異原性のハザードの評価に特に適している。ただし、これらが動物種間や組織間、また DNA 損傷の種類によって異なっている可能性はある。遺伝子突然変異の *in vivo* 試験は、*in vitro* 系で検出された変異原性作用の更なる検討や、他の *in vivo* の評価項目を用いた試験結果の補足に有用である（24）。遺伝子突然変異は、発がんとの因果関係があることに加え、突然変異に起因する体組織の非腫瘍性疾患や生殖細胞系列を介して伝播する疾患の予測においても重要な評価項目である（12）（13）。

10. 被験物質または問題となる代謝物が、対象とするいずれの組織にも到達しないことを示す根拠がある場合、TGR 遺伝子突然変異試験の実施は適当でない。

試験の概要

11. 段落 8 に記載した試験における標的遺伝子は細菌またはバクテリオファージ由来であり、この導入遺伝子をバクテリオファージλまたはプラスミドのシャトルベクターに組み込むことでげっ歯類のゲノム DNA から回収できるようにしている。その手順としては、げっ歯類の対象組織からのゲノム DNA の抽出、ゲノム DNA の *in vitro* 処理（シャトルベクター回収のための、λベクターのパッケージング、またはプラスミドのライゲーションおよびエレクトロポレーション）、ならびにその後の適切な条件下における細菌宿主での突然変異の検出などがある。これらの試験では、ほとんどの組織から容易に回収できる中立な遺伝子が用いられている。

12. 基本的な TGR 遺伝子突然変異実験では、げっ歯類に被験物質を一定期間にわたって投与する。被験物質は、適切な経路であれば、埋植（医療機器の試験など）を含め、いずれの経路でも投与できる。動物に対して投与が行なわれる総期間を投与期間という。通常、投与後屠殺までに一定期間をおき、その間は被験物質を投与しない。修復されなかった DNA 損傷は、この期間中に安定した突然変異に固定される。同期間は文献では表出時間（manifestation time）、固定時間（fixation time）、発現時間（expression time）など、様々に呼ばれているが、その終了時が試料採取時期である（15）（29）。動物を屠殺後、対象組織からゲノム DNA を分離し、精製する。

13. 通常、1 匹の動物の 1 つの組織について複数回のパッケージング／ライゲーションのデータを合わせ、一般に合計 10^5～10^7 プラーク形成単位またはコロニー形成単位について突然変異体頻度を求める。ポジティブセレクション法を用いる場合は、別に非選択性のプレートを設けて総プラーク形成単位数を求める。

14. ポジティブセレクション法は、*gpt* 遺伝子［*gpt* delta マウスおよびラット、表現型 *gpt*$^-$（20）（22）（28）］と *lacZ* 遺伝子［Muta^{TM}マウスまたは *lacZ* プラスミドマウス（3）（10）（11）（30）］両方の突然変異の検出を促進するために開発されてきた。これに対し、Big Blue$^®$動物が持つ *lacI* 遺伝子の突然変異は非選択的方法で検出されるが、これは突然変異体が形成する有色（青色）のプラークによって突然変異を確認するものである。ポジティブセレクション法は、バクテリオファージλシャトルベクターの *cII* 遺伝子［Big Blue$^®$マウスまたはラット、および Muta^{TM}マウス（17）］に生じた点突然変異ならびにλ *red* および *gam* 遺伝子［*gpt* delta マウスおよびラットでの Spi$^-$セレクション（21）（22）（28）］における欠失突然変異の検出でも用いられる。突然変異体頻度は、導入遺伝子中の突然変異を含むプラーク／プラスミド数を、同じ DNA サンプルから回収したプラーク／プラスミドの総数で除して算出する。TGR 遺伝子突然変異試験で報告すべき項目はこの突然変異体頻度である。また、個々に独立した突然変異を有する細胞の割合として突然変異頻度を求めることもできるが、これを算出するためには回収した変異体の塩基配列を決定してクローン性増殖を補正する必要がある（24）。

15. *lacI*、*lacZ*、*cII* および *gpt* の点突然変異試験で計数される突然変異は、主に塩基対置換突然変異、フレームシフト突然変異および小さな挿入／欠失であり、自然発生性の突然変異におけるこれら各種変異の相対的割合は内在性 *Hprt* 遺伝子でみられるものと同様である。一方、大きな欠失は Spi$^-$セレクションおよび *lacZ* プラスミド試験でのみ検出される（24）。なお、対象となる突然変異はマウスまたはラットに生じる *in vivo* の突然変異である。ファージやプラスミドの回収、複製または修復中に生じ得る *in vitro* や *ex vivo* の突然変異は比較的まれであり、一部の系ではこれらを特異的に識別したり、細菌宿主／ポジティブセレクション系で排除したりできる。

試験方法

準備

動物種の選択

16. 現在、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異検出モデルは様々あり、これらの系はトランスジェニックラットモデルよりも広く用いられている。ただし、ラットがマウスよりも明らかに適したモデルである場合（ラットのみで認められた腫瘍の発がんメカニズムを調べる場合、ラットの毒性試験と関連付ける場合、またはラットの代謝がヒトの代謝により近いことがわかっている場合など）は、トランスジェニックラットモデルの使用を考慮する。

飼育および給餌条件

17. 動物飼育室の温度は 22℃（± 3℃）とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上で 70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で明暗周期を 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料としては通常の実験動物用飼料を用いてよい。飲料水は自由に摂取させる。なお、被験物質を混餌投与する場合は被験物質とよく混合できる飼料を選択することが必要であろう。攻撃的な行動を示さないと考えられるならば、動物は同性の動物を少数（5匹以下）ずつまとめて収容する。科学的根拠がある場合は個別に収容してもさしつかえない。

動物の準備

18. 健康な若齢成熟動物（投与開始時 8～10 週齢）を対照群と被験物質投与群に無作為に割り付ける。動物には固有の識別番号を付与し、5 日間以上飼育室環境に馴化させる。ケージは、その位置による影響が最小限になるような方法で配置する。動物の試験開始時の体重の変動幅を最小限に抑え、雌雄それぞれに平均体重から± 20%を超えないようにする。

投与の準備

19. 固体の被験物質は適切な溶剤または溶媒に溶解するか懸濁させて、もしくは飼料または飲料水と混合して動物に投与する。液体の被験物質は直接投与するか、投与前に希釈する。吸入曝露の場合は、被験物質をその物理化学的性質に応じてガス、蒸気、または固体／液体のエアロゾルとして投与することができる。保存しても問題ないことを示す安定性データがない限り、調製直後の被験物質を使用する。

試験条件

溶媒／媒体

20. 溶媒／媒体は、使用容量で毒性作用を生じさせず、また被験物質と化学反応を起こす疑いがないものを用いる。性質が既知ではない溶媒／媒体を用いるときは、適合性を示す参照データによってその使用を裏付けること。可能であれば、まず水溶性の溶媒／媒体を用いることが推奨される。

陽性対照

21. 通常は試験ごとに陽性対照群用の動物を用いるべきだが、習熟度を証明し（段落 23 参照）、かつ日常的に本試験を実施している研究室では、以前の陽性対照群の動物の DNA を各試験に含めることで、方法に問題がなかったことを確認してもよい。ただし、この以前の実験の DNA は、同じ動物種および対象組織から得て適切に保存されていたものである必要がある（段落 36 参照）。一方、試験ごとに陽性対照群を設ける場合、陽性対照物質は被験物質と同じ経路で投与する必要はないが、被験物質について検索する 1 つあるいは 1 つ以上の対象組織で突然変異を誘発することが知られている必要がある。陽性対照物質の用量は、試験法の性能と感度をしっかり評価できるように、弱いか、中等度の影響を生じさせるように設定する。陽性対照物質の例およびその標的組織の一部を表 1 に示す。

表 1：陽性対照物質の例およびその標的組織の一部

化学物質［CAS 番号］	特徴	突然変異の標的組織	
		ラット	マウス
N-エチル-*N*-ニトロソウレア［CAS 番号 759-73-9］	直接作用型の変異原	肝臓、肺	骨髄、大腸、大腸上皮、腸、肝臓、肺、脾臓、腎臓、卵巣顆粒膜細胞、雄の生殖細胞
エチルカーバメート（ウレタン）［CAS 番号 51-79-6］	代謝を必要とするが、弱い影響しか生じない変異原		骨髄、前胃、小腸、肝臓、肺、脾臓
2,4-ジアミノトルエン［CAS 番号 95-80-7］	代謝を必要とする変異原。Spi⁻試験でも陽性	肝臓	肝臓
ベンゾピレン［CAS 番号 50-32-8］	代謝を必要とする変異原	肝臓、大網	骨髄、乳腺、大腸、前胃、腺胃、心臓、肝臓、肺、雄の生殖細胞

陰性対照

22. 各試料採取時期には陰性対照群を含める。陰性対照群には溶媒または媒体のみを投与し、それ以外は被験物質投与群と同様に扱う。選択した溶媒／媒体が有害作用や変異原性作用を誘発しないことを示す背景データや公表データがない場合は、各試料採取時期に無処置対照群も含めることで溶媒対照群の適切さを示す。

研究室の習熟度の証明

23. これらの試験の遂行能力は、1）表 1 に示すような陽性対照物質（弱陽性反応を含む）、非変異原物質、および溶媒対照の突然変異体頻度、ならびに 2）DNA ゲノムからの導入遺伝子の回収（パッケージング効率）について、公表されているデータから予測される結果を再現できると示すことで証明すべきである（24）。

変異体の塩基配列決定

24. 規制当局への申請に際して変異体 DNA の塩基配列を決定する必要はない（特に、明らかな陽性または陰性結果が得られた場合）。しかし、大きな個体間のばらつきが認められたときは塩基配列データが役立つことがある。このような場合、塩基配列の決定を行なうことで、特定の組織における特有の突然変異体の割合を明らかにし、それによってジャックポットやクローン性の事象の可能性を除外することができるためである。単にクローン性の突然変異体が突然変異体頻度に影響を与えているかを調べるためであれば 1 匹 1 組織当たり約 10 個の突然変異体の塩基配列決定で十分であるが、クローン性に関して突然変異体頻度の数学的補正をしようとするなら 25 個もの突然変異体の塩基配列決定が必要になる可能性がある。また、突然変異体の塩基配列決定は、突然変異体頻度の小さな増加がみられたとき（無処置対照群の値をわずかに超えるようなとき）にも考慮したほうがよいことがある。これは、投与動物と無処置動物の突然変異体コロニー間における突然変異体のスペクトルの違いが変異原性作用を裏付けるのに役立つことがあるためである（29）。さらに、突然変異スペクトルは機序に関する仮説を構築するのにも役立つ場合がある。なお、塩基配列決定をプロトコールの一部として含める場合、試験デザインには特別な注意が必要で、特に塩基配列を決定するサンプル当たりの変異体数については、用いる統計モデルに応じて適切な検出力が得られるようにする（段落 43 参照）。

手順

動物数および性別

25. 1 群当たりの動物数は、少なくとも 2 倍の突然変異体頻度の変化を検出するのに必要な統計検出力が得られるようにあらかじめ設定する。1 群の動物数は最低 5 匹であるが、統計検出力が不十分な場合には必要に応じて動物数を増やす。通常雄動物を使用する。ただし、雌での試験のみが妥当と考えられる場合もある（ヒトの女性用の薬剤を試験する場合や、雌（女性）に特異的な代謝を調べる場合など）。毒性や代謝に顕著な性差がある場合は、雌雄両方が必要となる。

投与期間

26. 突然変異は投与ごとに蓄積するという観察結果があることから、1 日 1 回 28 日間の反復投与は必須である。この投与計画は、一般に、弱い変異原による突然変異を十分蓄積させるために

も、増殖の遅い器官での突然変異の検出に適した曝露期間を置くためにも適切であると考えられている。評価によっては別の投与計画が適切な場合もあるが、そのような投与スケジュールについてはプロトコール中で科学的妥当性を示すこと。投与は、関連するすべての代謝酵素の誘導が完了するための期間より短くてはならない。また、投与期間が短い場合、増殖速度の異なる器官に適した複数の試料採取時期を設定する必要が生じることもある。いずれの場合でも、プロトコールの妥当性を示す際（特に上記の標準的な推奨法以外を用いる場合）には、入手できるすべての情報（一般毒性、代謝、薬物動態など）を用いること。なお、8 週間を超える投与期間については、感度が増加する可能性はあるものの、長期投与でクローン性増殖による突然変異体頻度の見かけの増加が生じることもあるため、明確な説明と妥当性を示すことが必要である（29）。

用量段階

27. 用量段階は、同じ曝露経路で一般毒性を評価した用量設定試験の結果に基づいて、または既存の亜急性毒性試験の結果に基づいて設定する。用量範囲の設定では、同じ系統のげっ歯類のトランスジェニックではない動物を用いてもよい。本試験では、用量反応関係の情報が得られるように、完全な試験としては陰性対照群（段落 22 参照）と、適切な間隔の最低 3 つの用量段階（限界用量（段落 28 参照）を用いる場合を除く）を設ける。最高用量は最大耐量（MTD）とする。MTD は、毒性徴候を生じさせる用量で、それより高い用量を同じ投与法で投与すると死亡が生じることが予測されるような用量として定義される。なお、毒性のない低用量で特有の生物活性を示す物質（ホルモンや分裂促進物質など）およびトキシコキネティクスが飽和を示すような物質は、上記の用量設定基準の例外とみなされる場合もあり、これらについてはケースバイケースで評価するが、用いる用量段階は、最大の毒性がみられる用量から、毒性がほとんど、または全くみられない用量までの範囲を含む必要がある。

限度試験

28. 用量設定試験または関連するげっ歯類の系統で得られた既存のデータでは少なくとも限界用量（下記参照）での投与計画で明確な毒性作用が示されない場合、かつ、構造的に関連のある化合物のデータからは遺伝毒性が予想されない場合には、3 用量段階を用いた完全な試験は必要ないであろう。投与期間が 28 日間（1 日 1 回 28 回投与）の場合の限度用量は 1000 mg/kg 体重/日、14 日間以下の場合の限度用量は 2000 mg/kg 体重/日である（なお、1 日 1 回 28 回投与以外の投与計画については、プロトコールにおいて科学的妥当性を示すこと（段落 26 参照））。

投与

29. 被験物質は通常、胃管または適切な挿管カニューレを用いて強制経口投与する。試験をデザインする際には原則としてヒトの予想曝露経路を考慮する。このため、妥当性が示されるならばその他の曝露経路（飲水、皮下、静脈内、局所、吸入、気管内、混餌、埋植投与など）を選択

することも可能である。ただし、腹腔内投与は、ヒトの曝露経路に生理的に関連しているとは言えないため、推奨されない。1 回で強制経口投与または注射できる液体の最大容量は供試動物の大きさによるが、その容量は 2 mL/100 g 体重を超えてはならず、これより大きな容量を用いる場合にはその妥当性を示す必要がある。通常、濃度が高くなるにつれて影響の増悪がみられる刺激性物質または腐食性物質の場合を除き、すべての用量で容量が一定になるように濃度を調節して、投与容量の変動を最小限にする。

試料採取時期

体細胞

30. 試料採取時期は突然変異の固定に必要な期間によって決まるため、極めて重要な変数である。この期間は組織特異的で、細胞集団のターンオーバーに関連しているようであり、骨髄と腸は速やかに反応するが、肝臓の反応ははるかに遅い。増殖の速い組織と遅い組織での突然変異体頻度の測定をうまく両立させるひとつの方法が、28 日間の連続投与（段落 26 に示した通り）と最終投与の 3 日後の試料採取である。ただし、増殖の遅い組織ではこの条件下で最大突然変異体頻度にならない可能性がある。このため、増殖の遅い組織が特に重要な場合には、28 日間の投与期間の 28 日後という、より遅い試料採取時期の方が適切かもしれない（16）（29）。この場合、3 日後の試料採取時期の代わりにより遅い試料採取時期を採用することになるが、それには科学的な妥当性が必要である。

生殖細胞

31. 雄の生殖細胞については精子形成のタイミングと動態が明らかにされているが（27）、TGR 試験は雄の生殖細胞における遺伝子突然変異の誘発を調べるのに非常に適している(7) (8) (27)。一方、雌の生殖細胞については、過排卵後でも少数の卵子しか得られないこと、また卵細胞では DNA 合成が行なわれないことから、トランスジェニック試験を用いた雌の生殖細胞における突然変異の検出は不可能である（31）。

32. 雄の生殖細胞の試料採取時期は、生殖細胞の発生過程全体のうち、曝露された部分の細胞が採取でき、かつ採取対象のステージが十分な曝露を受けるように設定する。発生中の生殖細胞が精原幹細胞から精管に到達して成熟精子となるまでの時間は、マウスで約 41 日間、ラットで約 57 日間である（27）。28 日間の曝露期間から 3 日おいて採取する場合、精管から採取される貯蔵精子（7）（8）は精子形成の概ね後半に曝露された細胞集団に相当する。この期間には減数分裂および減数分裂後の時期は含まれるが、精原細胞や幹細胞の時期は含まれない。このため、曝露期間中に精原幹細胞であった細胞を精管から適切に採取するには、最低約 8 週後（ラット）または 6 週後（マウス）という試料採取時期を追加する必要がある。

33. 28 日間の曝露後に精細管から採取した細胞は、生殖細胞発生の全ステージの細胞を含む混合集団からなる（7）（8）。遺伝子突然変異検出用にこれらの細胞を採取した場合、生殖細胞の突然変異が誘発されたステージについては、精管から精子を採取した場合ほど正確な評価はできない（採取される細胞のステージに幅があり、また細胞集団には少数の体細胞も混在しているため）。しかし、28 日間の曝露を行ない、その 3 日後という 1 回の試料採取時期に同じ動物の精管から精子を、精細管から発生中の生殖細胞を採取すれば、雄の生殖細胞の全発生ステージについて誘発された突然変異を検出することができる（7）（8）。

観察

34. 一般状態の観察は 1 日 1 回以上、望ましくは毎日同時刻に行なう。その際、予想される影響が投与後に最も強く表れるまでの期間を考慮する。動物の健康状態を記録する。すべての動物について疾病状況および死亡の有無を 1 日 2 回以上確認する。また、すべての動物について体重を週 1 回以上および屠殺時に測定する。摂餌量は週 1 回以上測定する。飲水投与の場合は、摂水量を週 1 回以上換水時に測定する。致死的ではないが過度の毒性徴候を示している動物は、試験期間終了前に安楽死させる（23）。

組織採取

35. 組織の採取理由を明確に示す必要がある。事実上あらゆる組織での突然変異の誘発を調べることができるため、採取組織の選択は試験実施理由および被験物質に関する既存の変異原性、発がん性または毒性データに基づいて行なうべきである。考慮すべき重要な因子としては、（ヒトでの曝露経路の可能性が高いという理由で選択された）投与経路、予測される組織分布、および推定作用機序などがある。参考にできる情報がない場合は、対象とすべき可能性のあるものとして数種類の体組織を採取するが、これらは増殖の速い組織、増殖の遅い組織および接触部位の組織を代表するものとする。また、（段落 33 に述べたように）精管から精子を、精巣から精細管を採取し、将来、生殖細胞における変異原性の解析が必要になった場合に備えて保存する。器官重量を測定する。なお、大きな器官については、全動物から同じ部位を採取する。

組織および DNA の保存

36. 組織（または組織のホモジネート）は-70℃以下で保存し、5 年以内に DNA の分離に用いる。分離した DNA は適切な緩衝液中で 4℃にて冷蔵保存し、望ましくは 1 年以内に突然変異の解析に用いる。

突然変異体解析用組織の選択

37. 組織の選択は、1）投与経路または最初の接触部位（経口投与では腺胃、吸入投与では肺、局所投与では皮膚など）、および 2）一般毒性試験で得られた薬物動態パラメータ（体内動態、滞留または蓄積、もしくは毒性の標的器官を示す）などの考察に基づいて行なう。試験が発がん性試験に続いて行なわれる場合は、発がん性の標的組織を考慮する。解析用組織は、直接作用型の *in vitro* 変異原、代謝が速い物質、反応性が高い物質、ほとんど吸収されない物質、さらには投与経路によって標的組織が決まるような物質を最大限検出できるように選択する（6）。

38. 参考にできる情報がない場合、投与経路による接触部位を考慮すると、肝臓および少なくとも 1 種類の分裂の速い組織（腺胃、骨髄など）について変異原性を評価すべきである。多くの場合、上記の必要条件は注意深く選択した 2 種類の組織を解析することで達成できるが、ときには 3 種類以上が必要となることもある。生殖細胞に対する影響を特に懸念すべき理由がある場合（体細胞における陽性反応を含む）は、生殖組織について突然変異を評価する。

測定方法

39. 推奨されているトランスジェニックモデルについては、突然変異体検出のための標準的な実験方法や公表された方法がある（*lacZ* バクテリオファージλおよびプラスミド（30）、*lacI* マウス（2）（18）、*gpt* delta マウス（22）、*gpt* delta ラット（28）、*cII*（17））。修正を加える場合にはその妥当性を示し、適切に記載する。十分なプラーク数またはコロニー数を得るため、複数回のパッケージングのデータを統合して用いることもできる。ただし、適切なプラーク数を得るために多くのパッケージング反応が必要であるということは、DNA の質の悪さを示している可能性がある。このような場合、データは信頼できない恐れがあるため、慎重な考慮が必要である。DNA サンプル当たりの総プラーク数または総コロニー数の最適値は、その系における自然突然変異体頻度をもとに、十分な数の変異体を検出できる統計的確率によって決まるが、一般に自然突然変異体頻度が 3×10^{-5} レベルの場合、最低 125,000～300,000 個のプラークが必要である（15）。なお、Big Blue® *lacI* 試験では、ファージを各プレートにまく時に適切な色対照（カラーコントロール）を設けることにより、突然変異体の色の表現型の範囲をすべて検出できることを示すことが重要である。組織およびそこから得られた試料（項目）はブロックデザインを用いて処理および解析を行なう。これらの作業では、溶媒／媒体対照群、陽性対照群（用いた場合）または陽性対照 DNA（該当する場合）、および各投与群を一緒に処理する。

データおよび報告

結果の処理

40. 個体ごとのデータを表形式で示す。実験単位は動物とする。報告書には各動物の各組織におけるプラーク形成単位（pfu）またはコロニー形成単位（cfu）の総数、突然変異体数、および突然変異体頻度を示す。複数のパッケージング／回収反応がある場合には、DNA サンプル当たりの

反応数を報告する。各反応のデータは保存しておく必要があるが、報告は総 pfu または総 cfu についてのみ行なえばよい。段落 34 に示す毒性および症状のデータを報告する。塩基配列を決定したデータがあれば、解析した突然変異体ごとに示し、そこから得られる突然変異頻度の計算結果を各動物および組織ごとに示す。

統計学的評価および結果の解釈

41. 陽性結果の判定基準は、突然変異体頻度の用量依存性のある増加や、単一の用量群における突然変異体頻度の溶剤／溶媒対照群と比較しての明らかな増加など、いくつかある。用量反応関係の解析に十分なデータを得るには、少なくとも 3 投与群について分析する必要がある。結果の生物学的意義をまず考慮すべきであるが、試験結果を評価する一助として適切な統計手法を用いることもできる（4）（14）（15）（25）（26）。なお、統計解析では動物を実験単位と考える。

42. 被験物質がいずれの組織においても上記の基準を満たす結果を示さなかった場合、その物質は本試験法では変異原性なしと考えられる。ただし、陰性結果が生物学的に意味のあるものであるためには、組織曝露の確認が必要である。

43. DNA の塩基配列の解析については、結果の解釈に役立つ多くの統計手法がある（1）（5）（9）（19）。

44. 観察された値が背景データの範囲内にあるか否かを考慮することは、反応の生物学的意義を評価する上での目安となる（32）。

試験報告書

45. 試験報告書には、以下の情報を記載する。

被験物質：

- 識別情報と、わかっている場合は CAS 番号
- 入手先および（あれば）ロット番号
- 物理的性質と純度
- 試験の実施に関連する物理化学的性状
- 分かっている場合、被験物質の安定性

溶媒／媒体：

- 溶媒選択の妥当性
- わかっている場合、溶媒／媒体中の被験物質の溶解性と安定性
- 被験物質混合飼料／飲料水または吸入用調製物の調製法
- 調製物の分析（安定性、均一性、名目濃度など）

供試動物：

- 使用した動物種および系統ならびに選択理由
- 動物数、週齢および性別
- 入手先、飼育条件、飼料など
- 試験開始時の個体ごとの体重（各群の体重範囲、平均および標準偏差を含む）

試験条件：

- 陽性および陰性（溶媒／媒体）対照データ
- 用量設定試験データ
- 用量設定根拠
- 被験物質調製の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 投与経路選択理由

- 動物に対する毒性の検査方法（該当する場合には病理組織学的または血液学的検査を含む。また、観察および体重測定の頻度を含む）

- 結果が陰性であった場合、被験物質が標的組織に達したこと、または全身循環に入ったことを証明する方法

- 該当する場合には、飼料／飲料水中の被験物質濃度（ppm）および摂餌量／摂水量から算出した実際の投与量（mg/kg 体重/日）

- 飼料の品質および水質の詳細

- 投与および試料採取スケジュールの詳細およびその選択理由

- 安楽死の方法

- 組織の採取および保存手順

- げっ歯類のゲノム DNA の分離、ゲノム DNA からの導入遺伝子の回収、および導入遺伝子の細菌宿主への伝播の方法

- すべての細胞、キットおよび試薬の入手先とロット番号（該当する場合）

- 突然変異体の計数方法

- 突然変異体の分子レベルでの解析方法およびクローン性の補正や突然変異頻度の算出における使用の有無（該当する場合）

結果：

- 試験期間前および期間中の動物の状態（毒性徴候を含む）

- 屠殺時の体重および器官重量

- 各組織／動物について、突然変異体数、評価したプラークまたはコロニー数、突然変異体頻度

- 各組織／動物群について、DNA サンプルあたりのパッケージング反応の数、突然変異体の総数、平均突然変異体頻度、標準偏差

- 可能であれば、用量反応関係

- 突然変異の分子レベルでの解析が行なわれた場合、各組織／動物について、個々に独立した突然変異体の数および平均突然変異頻度

- 当該試験の陰性対照群のデータおよび陰性対照の背景データ（範囲、平均および標準偏差を含む）

- 当該試験の陽性対照群（または以前実施した試験の陽性対照群の DNA）のデータ

- （分析が行なわれた場合）分析結果（パッケージングに用いた DNA 濃度、DNA 塩基配列データなど）

- 使用した統計解析方法とその結果

結果の考察

結論

参考文献

(1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), "Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra", *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002), "A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement", *Mutation Res.*, 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), "Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations" *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), "Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), "Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency", *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), "Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens", *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995), "Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

(8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), "Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells", *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), "Bayesian Analysis of Mutational Spectra", *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989), "Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), "A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host", *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer", *Mutation Res.*, 543: 125-136.

(13) Erikson, R.P. (2010), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update", *Mutation Res.*, 705: 96-106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), "Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays", *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), "Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), "Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), "The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing", *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), "Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis", *Carcinogenesis,* 29(4): 772-778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), "A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi$^-$ and 6-thioguanine Selections", *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), "Spi$^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), "Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays", *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) 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, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), *Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), "Study Design and Sample Sizes for a *lacI* Transgenic Mouse Mutation Assay", *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), "Sources of Variability in Data from a Positive Selection *lacZ* Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study", *Mutation. Res.*, 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), "Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays", *Mutation. Res.*, 598: 164-193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), "Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 *gpt* delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers", *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), "*In vivo* Transgenic Mutation Assays", *Mutation Res.*, 540: 141-151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), "Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*" in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), "A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells", *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", *Mutation Res.,* doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.

補遺

定義

投与期間：動物に対して投与を行なう総期間。

塩基対置換：1 つの DNA ヌクレオチド塩基と別の DNA ヌクレオチド塩基の交換を引き起こす型の変異。

カプシド：ウイルス粒子を覆うタンパク質の殻。

クローン性増殖：1 つの（変異）細胞から多数の細胞が産生されること。

コロニー形成単位（cfu）：生菌数を表わす単位。

コンカテマー：同じコピーが多数連なったもので構成される長い連続的な生体分子。

Cos 部位：バクテリオファージλの 2 本鎖ゲノムの両端に存在する 1 本鎖 DNA の 12 ヌクレオチドからなる部位。

欠失：ゲノムから 1 つ以上の（連続した）ヌクレオチドが失われる変異。

エレクトロポレーション（電気穿孔法）：細胞膜の透過性を増加させるために電気パルスを用いる方法。

内在性遺伝子：そのゲノムが本来有している遺伝子。

割り増し二項変動：母集団が二項分布をすると仮定したときに予測される値より母比率の繰り返し推定のばらつきが大きくなること。

フレームシフト突然変異：タンパク質／ペプチドをコードする DNA 配列に 3 で割り切れない数のヌクレオチドの挿入または欠失が起きることによって生じる遺伝子突然変異。

挿入：DNA 配列に 1 つ以上のヌクレオチド塩基対が加わること。

ジャックポット：1 つの変異からクローン性増殖によって生じた多数の突然変異体。

巨大欠失: 数キロ塩基を超える DNA の欠失（Spi⁻セレクション法および *lacZ* プラスミド法によって効率的に検出可能）。

ライゲーション: DNA リガーゼを用いて DNA 分子の 2 つの末端を共有結合させること。

分裂促進物質: 細胞を刺激して分裂を開始させることで細胞分裂を誘発する化学物質。

中立遺伝子: ポジティブまたはネガティブな選択圧に影響されない遺伝子。

パッケージング（充填）：ファージの*カプシド*と尾のタンパク質の調製物およびファージ DNA 分子の*コンカテマー*から感染性のファージ粒子を作り出すこと。一般に、λベクターにクローニングした DNA（*cos 部位*で仕切られている）を感染性のλ粒子に充填するときに用いられる。

パッケージング効率：パッケージングされたバクテリオファージが細菌宿主から回収される効率

プラーク形成単位（pfu）：生存バクテリオファージ数を表わす単位。

点突然変異: 短い DNA 配列における突然変異を示す一般的用語。小さな挿入、欠失、および塩基対置換を含む。

ポジティブセレクション（正の選択）：突然変異体のみが生存できるようにする方法。

レポーター遺伝子: 変異遺伝子産物を容易に検出できる遺伝子。

試料採取時期: 屠殺前の被験物質の投与を行なわない期間の最後で、その間にプロセシングされていない DNA 損傷が安定した変異に固定される。

シャトルベクター: 2 つの異なる種の宿主で増殖できるように構築されたベクター。すなわち、シャトルベクターに挿入された DNA は 2 つの異なる種類の細胞や 2 つの異なる生物種で試験や操作を行なうことができる。

トランスジェニック（の）：他種の 1 つまたは複数の遺伝子を導入することでゲノムを変化させた生物、またはその生物に関連した生物。