OECD/OCDE

2022/06/30

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 (2022), 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-488-2022.pdf.

©OECD(2022)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

OECD/OCDE 488
採択：
2022 年 6 月 30 日

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

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

1. はじめに

1. 経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学の進歩、規制要件の変化および動物福祉への配慮を踏まえて定期的に見直されている。試験ガイドライン 488 の初版は 2011 年に採択された。2013 年、改訂版ガイドラインが採択され、投与開始時の動物の年齢範囲、精子収集のため採取される生殖器系の部分、げっ歯類の精原幹細胞が成熟精子になり精巣上体尾部に到達するまでの正確な期間が変更された。2020 年、改訂版ガイドラインが採択され、雄生殖細胞の突然変異の解析に関する推奨投与計画が変更された。今回の改訂版試験ガイドライン（TG）は、体細胞組織と生殖細胞における突然変異の解析の統合、および、最近改訂された遺伝毒性試験に関する OECD 試験ガイドライン（TG）との調和に焦点を当てている。

2. 遺伝毒性試験と、遺伝毒性試験に関する TG に行われた最近の変更の両方について、その概要を示す文書が作成されている（1）。これらの TG に取り入れられた主要な変更に関する追加情報も発表された（2）。

3. OECD の 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、複数の *in vivo* 遺伝毒性試験のエンドポイント（すなわち、染色体異常、小核、不定期 DNA 合成、および DNA 鎖切断）に関する TG があるが、これらは遺伝子突然変異を調べるものではない。コメットアッセイおよび不定期 DNA 合成試験は、前変異原性病変を検出する指標試験であり、また、*Pig-a* 試験は造血系に限定される一方、トランスジェニックげっ歯類（TGR）遺伝子突然変異試験は、いずれの組織においても、実際的で広く利用可能な遺伝子突然変異測定の *in vivo* 試験法を求める要望を満たすものである。

4. TGR 遺伝子突然変異試験のデータについては、例えば、（3）、（4）、（5）において広範な検討が行われてきた。この試験ではトランスジェニックラットおよびマウスを用いるが、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化学物質によって *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。TGR 遺伝子突然変異試験の目的は、解析対象組織の DNA 損傷により突然変異を生じる物質を特定することにある。

© OECD, (2022)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

5. 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検出する。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既存の制限（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。

6. 証拠の重みから、導入遺伝子は変異原に対して内在性遺伝子と概ね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欠失および挿入の検出に関してはこのことが言える（3）。

7. 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* 検出法に用いることを承認し、その実施のためのプロトコールを推奨している（6）（7）。このプロトコールの使用をさらに裏付ける解析結果は（8）にみることができる。本 TG は、体細胞組織における遺伝子突然変異の評価に関し、上記の推奨事項に基づいており、雄生殖細胞における遺伝子突然変異の評価に関する最新の推奨事項を記載している（5）。

8. TGR 遺伝子突然変異試験では、反復投与毒性試験（TG 407）と同じ投与計画（すなわち、28 日間投与）を用いており、両試験の投与終了翌日の剖検実施が変異の回収に悪影響を及ぼさないことを条件に、両試験を 1 試験に統合する選択肢を許容している。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性能に悪影響がないことを示すデータも必要である。さらに、TGR 試験に、小核および *Pig-a* 変異の評価など追加の遺伝毒性エンドポイントを統合できる（9）。試験の統合は、既存の情報または特定の規制要件を基準に、特定のエンドポイントを検討する必要性に基づくべきである。

9. 主要な用語の定義を補遺 1 に示す。

2. 最初に考慮すべき事項

10. 本 TG での使用を裏付ける十分なデータが得られる TGR 遺伝子突然変異試験は、*lacZ* バクテリオファージマウス（MutaMouse）、*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* バクテリオファージマウスおよびラット（Big Blue®）を用いた試験で、かつ非選択的な条件下で実施されたものである。本試験では、λ ベクターに挿入された細菌の遺伝子（*lacI*、*lacZ*、*gpt*）の突然変異を測定する。さらに、Big Blue®および MutaMouse モデルでのバクテリオファージの *cII* 遺伝子において、また、Spi$^-$選択下での *gpt* delta モデルの *red/gam* 遺伝子において、突然変異を測定できる。複数の選択条件の下で突然変異体同定法が利用可能であり（段落 17 参照）、優先的に使用されるべきである。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うことで追加情報を得ることができる（段落 57～58 参照）。

11. これらの TGR 遺伝子突然変異試験（3）は、その反応が *in vivo* での代謝、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さらなる検討や、癌原性試験由来の腫瘍陽性の結果など、他の *in vivo* 試験を用いた試験の根本的な作用機序の検討に有用である。遺伝子突然変異は、癌誘発との因果関係がある

© OECD, (2022)

ことに加え、突然変異に起因する体細胞組織の非腫瘍性疾患（10）（11）や、生殖細胞系列を介して伝播する疾患（12）の予測においても妥当なエンドポイントである。

12. 被験化学物質または関連する代謝物が、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切ではない。

13. 規制上の目的を意図したデータ生成の場合、混合物について本試験ガイドラインを用いる前に、当該混合物がその目的に十分な結果を提示できるか否か、また提示できる場合にはその理由を検討する。当該混合物の試験に関する規制要件がある場合、こうした検討は不要である。

3. 試験法の原理

14. 段落 10 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 からの回収手段にしている。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（すなわち、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非転写の導入遺伝子が用いられている。

15. 基本的な TGR 遺伝子突然変異実験では、げっ歯類に被験化学物質を一定期間にわたって投与する。被験化学物質は、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われる総期間を投与期間という。通常、投与後安楽殺処分までに一定期間をおき、その間は被験化学物質を投与しない。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（6）（8）。動物の安楽殺処分後、組織を迅速に採取および凍結し、次いで、対象組織からゲノム DNA を分離および精製するまで、組織を -70ºC ± 5ºC 以下で保存できる。投与最終週に安楽殺処分した瀕死動物から組織を採取し、-70ºC ± 5ºC 以下で保存し、必要であれば解析を個別ベースで実施できる。

16. 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集計し、一般に、1 匹当たり合計 10^5～10^6 プラーク形成単位またはコロニー形成単位を用い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または総コロニー形成単位数を求める。

17. 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*⁻（13）（14）（15）］と *lacZ* 遺伝子［MutaMouse または *lacZ* プラスミドマウス（16）（17）（18）（19）］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* 遺伝子の突然変異については、ポジティブセレクション法は利用されず、突然変異は、有色（青色）のプラーク形成により突然変異体を確認する非選択的方法で検出される。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 MutaMouse（20）］に生じた突然変異ならびにバクテリオファージλの *red* および *gam* 遺伝子［*gpt* delta マウスおよびラットでの Spi⁻選択（14）（15）（21）］に

© OECD, (2022)

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体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（段落 57～58）。

18. *lacI*、*lacZ*、*cII* および *gpt* の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、*gpt* delta での Spi⁻選択および *lacZ* プラスミド法でのみ検出される（3）。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うる *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（3）（4）。

4. 試験方法の説明

4.1. 準備

4.1.1. 動物種の選択

19. トランスジェニックマウスおよびラットの遺伝子突然変異検出モデルが、現在利用可能である。マウスモデルとラットモデルの両方が、同等に許容可能であるとみなされる。TGR 試験に用いるモデルの正当化には、以下事項を考慮に入れるべきである。（i）試験実施施設におけるモデルの習熟度。（ii）検討下の組織に関する歴史的データの入手可能性。（iii）検討下の物質に関する動物種間での既知毒性の差（特定の動物種における毒性試験との相関を確認するため、単一のげっ歯類種にのみ認められる腫瘍に関する発癌機序を検討する場合、あるいは、単一のげっ歯類の代謝が典型的なヒト代謝により近いことが知られている場合など）。および、（iv）TGR 試験との併用が予測される場合、他方の毒性試験で好んで用いられる動物種。

4.1.2. 飼育および給餌条件

20. すべての手順は、地域の実験動物管理基準に従う。げっ歯類の場合、動物飼育室の温度は理想的には 22ºC（±3ºC）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。給餌には、通常の実験室飼料を用いてよい。飲水の摂取は制限しない。なお、被験物質を混餌投与する場合は被験化学物質とよく混合できる飼料を選択することが必要となる。攻撃的な行動が予測されない場合、げっ歯類は同性の動物を少数のグループ（通常、マウスでは5匹以下、ラットでは2匹以下）で収容すべきであり、適切な環境エンリッチメントを備えたソリッド底のケージにすることが望ましい。ケージは動物福祉基準（指令 2010/63/EU など）に従い、ケージ設置による影響の可能性を最小化するよう配置すべきである。科学的な正当性がある場合に限り、動物を個別に収容できる。

4.1.3. 動物の準備

21. 生殖細胞データが必要な場合、健康な若齢性的成熟動物（投与開始時 8～12 週

© OECD, (2022)

齢）を用いる（段落 33 参照）。体細胞組織に関する試験では、より若齢の動物（投与開始時 4～6 週齢など）は、十分な科学的正当性または動物福祉上の正当性（例えば、飼育されたが手順に用いられなかった動物の殺処分を回避するなど）があれば、許容可能である。また、こうした年齢の逸脱が生じうる歴史的対照データベースの変更は、いずれも明文化する。動物を対照群と投与群に無作為に割り付ける。動物には、人道的で最も侵襲性の低い方法（リング、タグ、マイクロチップの装着、あるいは生体認証などが挙げられるが、耳または足趾のクリップ装着は用いない）により一意的に識別し、5 日間以上飼育室の条件に馴化させる。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。用いる性別の選択は、生殖細胞データが必要か否か（段落 33）、および／または被験化学物質へのヒト曝露が性特異的か否か（段落 34）に左右される。

4.1.4. 投与の準備

22. 固体の被験化学物質は適切な溶剤または溶媒に溶解または懸濁させ（段落 23 参照）、あるいは、飼料または飲水と混合して動物に投与する。液体の被験化学物質は直接投与するか、投与前に希釈することができる。吸入曝露の場合は、被験化学物質をその物理化学的特性に応じてガス、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。それ以外の曝露経路については、科学的に正当化すること。安定性データから保存の許容性が立証されない限り、被験化学物質の新たな調製物を用いる。

4.2. 試験条件

4.2.1. 溶剤／溶媒

23. 溶剤／溶媒は、用いる投与量で毒性作用を生じず、また、被験化学物質と化学反応を起こす疑いがないこと。水溶性の溶剤／溶媒の使用を、可能な限り最初に検討すべきであることが推奨される。適合性の高いよく用いられる溶剤／溶媒の例には、水、生理食塩水、メチルセルロース溶液、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩溶液、オリーブ油、およびコーン油が挙げられる（22）。既知以外の溶剤／溶媒を用いる場合、適合性を示す参照データによりその使用を裏付けること。選択された非典型的な溶剤／溶媒が、突然変異やそれ以外の有害な作用を誘発しないことを示す歴史的対照データまたは公表済み対照データがない場合、溶剤／溶媒対照の許容性を確立するため、初回の試験を実施する。

4.2.2. 陽性対照

24. 同時陽性対照動物を通常用いる。試験実施施設が、本試験の実施に際し習熟度検証済みであることを立証し（段落 27 参照）、また、検討下の組織に関する歴史的対照の範囲を確立している場合（段落 28～32 参照）、この手順は免除できる。こうした状況では、突然変異体頻度の増加を検出する継続的な習熟度を確実にするため、試験実施施設は、段落 27 記載の変異原投与動物由来の組織による追加試験を、時に（少なくとも年1回）実施する。同時陽性対照群を用いない場合、その方法の信頼性を確認するため、過去の陽性対照処置動物由来の組織を試験ごとに含める。これらの試料は、年齢および対象組織が類似した同一の動物種に由来し、適切に保存され（段落 53 参照）、過去の実験と一致する突然変異体頻度を生成すること。

25. 同時陽性対照を用いる場合、被験化学物質と同じ経路または期間で投与する必要はないが、陽性対照は、被験化学物質に対し1つまたは複数の対象組織で突然変異を誘発することが知られていること。陽性物質は、自然発生レベルを超える検出可

© OECD, (2022)

能な突然変異体頻度の増加を確実に生じること。陽性対照化学物質の用量は、本試験法の性能と感度を決定的に評価できるように、弱いか、中等度の影響を生じさせるように選択する。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。科学的に正当化される場合、表 1 記載以外の物質を選択できる。

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／細胞型	
		ラット	マウス
N-エチル-N-ニトロソウレア［759-73-9］	直接作用型の変異原	肝臓、腺胃、十二指腸、空腸、骨髄、脾臓、肺、鼻粘膜上皮、腎臓、膀胱、精巣生殖細胞	肝臓、前胃、腺胃、十二指腸、結腸、骨髄、脾臓、肺、鼻粘膜上皮、腎臓、濾胞顆粒膜細胞、精巣生殖細胞、精子
カルバミン酸エチル（ウレタン）［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		肝臓、骨髄、脾臓、前胃、小腸、肺
2,4-ジアミノトルエン［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[a]ピレン［50-32-8］	代謝を必要とする変異原	肝臓、腺胃、十二指腸、空腸、骨髄、脾臓、肺、鼻粘膜上皮、腎臓、膀胱、大網	肝臓、前胃、腺胃、十二指腸、空腸、結腸、骨髄、胸部、心臓、肺、腎臓、膀胱、精巣生殖細胞、精子

4.2.3. 陰性対照

26. 溶剤または溶媒のみを投与し、それ以外は投与群と同じ方法で扱う陰性対照は、組織および試料採取時期ごとに対象とする（ただし、非典型的な溶剤または溶媒に関しては段落 23 参照）。

5. 試験実施施設の習熟度の検証

5.1. 習熟度の検証

27. 定常的な試験に本試験を用いるのに先立ち、十分な本試験法実施経験を確立するため、試験実施施設は、突然変異体頻度とゲノム DNA からの導入遺伝子回収（パッケージング効率など）の両方について、公表データ（3）（23）から予測結果の再現能を立証しておく必要がある。表 1 収載の物質（段落 25 参照）および適合性の高い溶媒／溶剤対照（段落 23 参照）など、最低 2 種類の陽性対照物質（低用量の陽性対照により誘発される弱い反応を含む）を用いる。最初に、2 つ以上の組織、望ましくは肝臓など緩徐に分裂する組織について 1 つ、および骨髄、腺胃または十二指腸など急速に分裂する組織について 1 つ、習熟度を立証する（7）（24）。生殖細胞の評価を実施することになる場合、その評価も試験実施施設の習熟度調査に含める。こうした実験では、対象組織において、再現可能かつ用量依存的な増加をもたらし、

© OECD, (2022)

また、試験系の感度およびダイナミックレンジを立証する複数の用量を用いる。この要件は、経験がある試験実施施設、すなわち、段落 28～32 に定義された歴史的データベースを提供できる施設には適用されない。過去に検討されていない組織については、試験実施に先立ち試験実施施設は、（経験がある場合でも）可能性のある突然変異体頻度およびパッケージング効率を確立するため、当該組織特異的な DNA 抽出および導入遺伝子回収技術に関する習熟度の確立を要すると考えられる。さらに、試験実施施設は、当該組織において既知変異原（表 1 参照）による許容可能な陽性反応を入手できることについて、立証する必要があると考えられる。

5.2. 歴史的対照データ

28. 習熟度調査の過程で、試験実施施設は調査する各組織について、以下を確立すること。

- 歴史的陽性対照の範囲および分布。ならびに、
- 歴史的陰性対照または無処置対照の範囲および分布。

29. 歴史的陰性対照の分布データを初めて取得する際、同時陰性対照が存在する場合には公表データと一致していること。より多くの実験データが歴史的対照の分布に追加されるため、同時陰性対照は、その分布の下限値と上限値の範囲内にあることが理想的である（段落 32 参照）。試験実施施設の歴史的陰性対照データベースは、文献の推奨事項（24 など；補遺 2 も参照）に従って編集、解析、および定期的な更新を行う。このことについては、頑健な分布の確立に必要なデータセットの最小数の考慮（最低 30 匹の動物が望ましい）、また、最新および／または関連データを確保する更新頻度および複数の方法が、試験法の許容性およびデータの評価に用いられることなどを対象とすべきである（段落 61 参照）。これらの推奨事項からの重大な逸脱については、正当化すること。試験実施施設は、データの分布に関し適切な管理図などの品質管理法［C 管理図や X-bar 管理図など（25）（26）（27）（28）］、すなわち、管理データの単純な分布範囲ではない方法を用い、データにいかなるばらつきがあるか特定し、当該試験実施施設の方法が「管理下」にあることを示すべきである。

30. 習熟度調査（段落 27 記載）において、試験実施施設が統計学的に頑健な陰性対照分布の確立（段落 29 参照）に十分な数の実験を完了していない場合、最初の定常的な試験の際に分布を構築することは許容可能である。この方法は、文献（24）に示された推奨事項に従って行うべきであり（補遺 2）、これらの実験で得られた陰性対照の結果は、公表済み陰性対照データと一致していること。

31. 実験プロトコールに変更があれば、得られたデータが、試験実施施設の既存の歴史的対照データベースとなお一致していることについて、その影響の観点から検討する。重大な不一致があり、専門家の判断により、その不一致が過去の分布とは異なることが判明した場合にのみ、新たな歴史的対照データベースを確立する（段落 29 参照）（25）（26）（27）（28）。再確立の間、その同時陰性対照の値が、過去のデータベースか対応する公表データのいずれかと一致していることを当該試験実施施設が立証できる場合には、実際の試験実施を可能にするための完全な陰性対照データベースは不要であると考えられる。

32. 陰性対照データは、各動物の組織当たりの突然変異体頻度からなる。同時陰性対照は通常、試験実施施設の歴史的陰性対照データベースの分布の下限値と上限値の範囲内にあること。同時陰性対照データがこれらの管理限界の範囲外となる場合でも、これらのデータが（例えば、外れ値検定により特定される）極端な外れ値で

© OECD, (2022)

なく、当該試験系が「管理下」にあるという証拠があり（段落 29 参照）、また、技術的にも人的にも失敗を示す証拠がない限り、歴史的対照の分布に組み入れることは許容可能であると考えられる。

6. 手順

6.1. 動物数および性別

33. 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十分に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。試験デザインに生殖細胞データが必要な場合、TGR 試験実施のために十分な雌生殖細胞数の収集は不可能であるため、雄を用いる（29）。

34. 体細胞データのみが必要な場合、突然変異反応は雌雄の動物間で類似しているため、そうした試験はいずれかの性別で実施することが考えられる。化学物質へのヒト曝露が、例えば一部の医薬品と同様に性特異的であると考えられる場合、本試験は適切な性別により実施する。雌雄間に重要な差があることを示すデータ（例えば、用量設定試験を含む全身毒性、代謝、バイオアベイラビリティなどの差）がある場合、雌雄両性の使用が奨励されると考えられる。TGR 試験を実施して、陽性腫瘍またはその他の毒性所見の経過観察を行う場合、動物種および性別の選択は、最初の試験の動物種および性別に基づくこと。

6.2. 投与期間

35. 突然変異は投与ごとに蓄積するという観察結果に基づき、1 日 1 回 28 日間投与による反復投与計画が必要である。この投与計画は、弱い変異原による突然変異の十分な蓄積と、増殖の緩徐な器官での突然変異検出に適した曝露期間の提示のいずれにも、許容可能であると通常みなされる。評価によっては別の投与計画が適切な場合もあるが、こうした代替投与スケジュールについてはプロトコール中で科学的正当性を示すこと。投与は、関連するすべての代謝酵素の完全な誘導に必要な期間より短縮すべきではない。より短期の投与であると、増殖速度の異なる器官に適した複数の試料採取時期を用いる必要が生じうる。いずれの場合でも、プロトコールを正当化する場合、特に、上記の標準的な推奨事項から逸脱する場合、入手可能なすべての情報（一般毒性または代謝、および薬物動態など）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上の増加が生じることもあるため、明確な説明と正当性を示すべきである（7）。

6.3. 用量段階

36. 用量段階設定の際には、既存の毒性およびトキシコキネティクスに関するデータを考慮する。用量選択の指標とするには、既に入手可能な適切なデータが不十分であるとの理由で、予備的な用量設定試験を実施する場合、主試験での使用と同一の系統（非トランスジェニック動物の使用可）、性別、および投与経路により、同一の試験実施施設において実施する。

37. 主試験では、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 26 参照）と、被験化学物質について適切な間隔の最低 3 つの用量段階

© OECD, (2022)

（限界用量（段落 40 参照）を用いた場合を除く）を設ける。限界用量が適用可能な場合を除き、最高用量は、試験期間の持続との関係で、試験を制限する毒性の証拠なしに忍容性が認められると考えられる用量、すなわち、毒性作用を誘発するが、死亡も安楽殺処分を要する疼痛、苦痛の証拠ももたらさない用量とする（30）。ほとんどの被験化学物質では、用いる用量段階は、最大の毒性から毒性がほとんどまたは全くない範囲を網羅する。

38. 毒性のない低用量で特定の生物活性を示す被験化学物質（ホルモンや分裂促進因子など）、およびトキシコキネティクス特性において飽和性を示し、あるいは長期投与後の曝露低下につながりうる解毒過程に導く物質は、用量設定基準の例外であると考えられ、これらについては個別ベースで評価する。

39. 用量設定試験で特定された最高用量が、対象組織に過剰な毒性をもたらさないことを確保するよう注意する。このことにより、突然変異解析用の導入遺伝子回収に適切な質と量の DNA を抽出するのに十分な細胞の入手可能性が、阻まれるおそれがある。こうした場合、突然変異解析に必要な3つの投与群が利用可能であることを保証するため、最高用量に近い間隔で追加の用量群組み入れを考慮できる。強制経口投与試験では、過剰な毒性につながる影響を最小化することが正当化された場合、代替の溶媒または分割投与（2〜3 時間以内の間隔で同日に複数回投与）の使用を考慮できる。

6.4. 限度試験

40. 用量設定試験または関連するげっ歯類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）での投与計画で観察可能な毒性作用を生じないことが示される場合、また、*in vitro* 遺伝毒性試験または構造的に関連のある物質のデータに基づき、遺伝毒性が予測されないと考えられる場合、3 つの用量段階を用いた完全な試験は必要なしとみなされうる。代わりに、単一の用量段階（すなわち、限界量の使用）による試験で十分であるとみなされる。これに応じ、投与期間が 28 日間（すなわち、1 日 1 回 28 回投与）では、その限界用量は 1000 mg/kg 体重/日とする。投与期間が 14 日間以内では、その限界用量は 2000 mg/kg 体重/日とする（なお、1 日 1 回 28 回投与と異なる投与計画については、プロトコールにおいて科学的に正当化すること；段落 35 参照）。

6.5. 用量の投与

41. 投与経路は、対象組織への曝露を確保するよう選択する。選好される経路は、予測されるヒト曝露経路とし、それ以外の経路は別経路にしたことを正当化する。したがって、混餌投与、飲水投与、局所投与、皮下投与、静脈内投与、（強制）経口投与、吸入投与、気管内投与、または埋植投与などの曝露経路を正当であるとして選択できる。腹腔内投与は、生理学的に適切なヒト曝露経路ではなく、科学的正当性がある場合にのみ用いるべきであるため、一般に推奨されない。一度に投与できる液体の最大量は、被験動物の大きさおよび投与経路に左右され、動物福祉関連の国際基準（31）（32）を指針とすべきである。強制経口投与の場合、マウスおよびラットでの最大量は 1 mL/100 g 体重以内とするが、水溶液の場合は例外で、最大 2 mL/100 g を使用できる。これを超える量を用いる場合には、その正当性を示すこと。より高濃度で悪化作用を通常どおり示す刺激性または腐食性の被験化学物質を除き、すべての用量段階で体重に関連した一定量を確保するため、試験量のばらつきを濃度調整により最小限に抑える。

© OECD, (2022)

6.6. 試料採取時期

6.6.1. 体細胞

42. 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時間に関連していると思われ（33）、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。（段落 35 に示した）1 日 1 回 28 回連続投与後における、増殖の速い組織と遅い組織両方での突然変異体頻度の測定に推奨されるプロトコールが、最終投与から 28 日後（すなわち、28+28 日）での組織採取である（34）。最終投与から 3 日後（すなわち、28+3 日）での組織採取は、本 TG 改訂前の版で推奨されていたとおり、生殖細胞データが必要とされない場合には、依然として妥当な試料採取時期である。

6.6.2. 生殖細胞

43. TGR 試験は雄生殖細胞における遺伝子突然変異誘発の検討に十分適しており（5）（35）（36）（37）（38）、雄生殖細胞の精子形成のタイミングおよび動態は明確に定義されている（39）（40）（41）。一方、雌生殖細胞については、過排卵後でも解析に利用可能な卵子が少数であること、また、卵母細胞では DNA 合成が行われないことから、雌生殖細胞をトランスジェニック試験による突然変異の測定に用いることはできない（29）。TGR 試験により得られる入手可能な生殖細胞変異原性データが、マウスおよびラットの精子形成モデリング（41）と共に最近検討され（5）、生殖細胞における変異原性評価に適切な実験デザインの選択について情報が提供された。このモデリングでは、精子形成の有糸分裂期（すなわち、幹細胞、増殖、精原細胞の分化）が、突然変異を導入遺伝子に固定するのに必要な、DNA 複製と細胞増殖の両方が生じている唯一の精子形成期であると考察された（42）。

44. 雄生殖細胞は、精巣上体尾部から成熟精子、あるいは精細管から発生中の生殖細胞のいずれかとして採取できる。精細管から発生中の生殖細胞は、単に精巣を被包する白膜を除去するか、あるいは、酵素的分離か物理的分離のいずれかを用い精細管から押し出すことにより採取できる（43）。精巣に存在する体細胞（例：ライディッヒ細胞およびセルトリ細胞）は精細管から容易に分離できないため、生殖細胞の採取集団に富む場合、後者の方法が選好される。

45. マウス（39）およびラット（40）の両方における精子形成のタイミングは、十分に確立されている。発生中の生殖細胞が曝露された精原幹細胞から精巣上体尾部に到達した成熟精子になるまでの進行期間は、マウスで約 49 日間（38）（40）、ラットで約 70 日間（40）（41）である。したがって、28+3 日でのマウスおよびラット尾部の精子試料の採取は、これらの細胞が曝露中の DNA 複製を行っていない生殖細胞集団に相当するため、意味のある変異原性データとはならず、よって実施すべきではない。マウスの場合、この 28+3 日デザインでは、強力な生殖細胞変異原である N-エチル-N-ニトロソウレア（5）およびベンゾ[a]ピレン（44）を検出しないことを立証した実験データもある。尾部の精子試料の採取は、精原幹細胞の突然変異を評価することが重要な場合、28 日間の投与期間終了後最低でも 49 日間（マウス）または 70 日間（ラット）でのみ実施する（5）（41）。

46. 精細管から押し出した生殖細胞は、精原細胞、精母細胞および精子細胞の混合集団からなる（35）（36）（41）。既知精子形成動態を考慮した様々な試料採取時期について、マウスおよびラットの精細管から採取された生殖細胞集団の構成が、精子形成の増殖期に受ける投与日数に応じて詳述されている（41）。28+3 日での投与計画後における精細管生殖細胞の陽性結果は有益な情報であるが、28+3 日での投

© OECD, (2022)

与計画後の陰性結果については、精子形成の増殖期の間、28 日間の投与期間すべてで連続投与を受けているのは、採取される生殖細胞のごく少数に限定されるため、被験化学物質が生殖細胞突然変異原であるという可能性を否定するには不十分である（5）（41）。

47. 主に精子形成の広範なモデリング（41）および限定的な実験データ（5）に基づくと、3 日を超える試料採取時期での精細管由来生殖細胞の採取の方が、生殖細胞の変異原性の評価には優れている。このモデリングによれば、28+28 日での投与計画では、精子形成の増殖期に 28 日間の投与の 99.6%を受けたマウス生殖細胞集団の突然変異の評価が可能になるのに対し、28+3 日での投与計画では 42.2%にすぎない（41）。本精子形成モデルは、曝露は生殖細胞のアポトーシス、および精子形成の進行における遅延の有意な誘導をもたらさないという仮説に基づいている。ただし、こうした影響が生じた場合、28+28 日での投与計画の提示など、試料採取時期のさらなる延長により、精子形成の増殖期に被験化学物質を 28 日間すべてで投与された、生存している幹細胞および分化中の精原細胞の再配置を精巣が可能にすることで、精子形成の回収は可能であると考えられる。これらの理由から、この 28+28 日での投与計画で得られたマウス生殖細胞の陽性結果および陰性結果は、いずれも確定的であるとみなされる。

48. マウスに対しラットでは精子形成の広範なモデリングがみられ（41）、精子形成期間がより長期であることに基づくと、ラットにおける 28+28 日での投与計画は、同じ投与計画を用いたマウスと同程度の細胞増殖段階の曝露とはならない（段落 47）。ラット精子形成モデリングの場合、28+28 日での投与計画では、精子形成の増殖期に 28 日間の投与期間の 80.3%を受けた細胞集団の突然変異の評価が可能になるのに対し、28+3 日での投与計画では 21.6%にすぎないことが示される（41）。理論的には最適でないが、28+28 日でのデザインは、生殖細胞変異原性の評価には適切であるとみなされ、本デザインにより、同一動物由来の体細胞組織および精細管生殖細胞における突然変異の評価が可能になる。本デザインで得られた結果を評価する場合、可能性として完全な曝露量未満の投与となった増殖中のラット生殖細胞の影響を考慮すべきである。

49. 28 日以外での生殖細胞の試料採取時期も許容可能であると考えられるが、マウスとラット両方の生殖細胞増殖段階の曝露度合いが低下する、28 日未満での試料採取時期を用いた影響（41）については考慮し、科学的に正当化すべきである。十分な数の試験結果が入手可能となり、生殖細胞について別の投与計画の有益性が確認された場合、本 TG を再検討し、必要であれば得られた経験に照らし改訂する。

50. 全体では、規制要件または毒性情報に基づき、体細胞と生殖細胞両方の採取および／または試験を要する場合、28+28 日での投与計画により、同一動物由来の体細胞組織および精細管生殖細胞における突然変異の試験が可能となる。

6.7. 観察

51. 一般的な臨床観察は 1 日 1 回以上、望ましくは毎日同時刻に行い、投与後に予測される影響がピークになる期間を考慮する。動物の健康状態を記録する。すべての動物の病的状態および死亡について、1 日 2 回以上観察する。また、すべての動物について体重を試験開始時、週 1 回以上、および安楽殺処分時に測定する。摂餌量は週 1 回以上測定する。被験化学物質を飲水投与する場合、摂水量を各換水時および週 1 回以上測定する。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（30）。

© OECD, (2022)

6.8. 組織採取

52. 組織採取の根拠を明確に定義する。事実上いずれの組織でも突然変異の誘発を検討できるため、採取組織の選択は、試験実施理由および検討下の被験化学物質に関する既存の遺伝毒性、発癌性または毒性データに基づいて行うべきである。考慮すべき重要な因子は、（ヒト曝露経路の可能性が高いことに基づく）投与経路、予測される組織曝露、および可能性としての標的器官での毒性などとする。背景情報がない場合、対象となりうる複数の体細胞組織を採取し、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こと。また、（段落 44 および 46 記載の）精細管から発生中の生殖細胞を採取し、今後、生殖細胞における変異原性の解析が必要になり、適切な試料採取時期を用いた場合に備えて保存する。関連する器官重量を入手し、より大型の器官については、すべての動物から同じ部位を採取する。

6.9. 組織および DNA の保存

53. 組織（または組織ホモジネート）は速やかに凍結し、−70ºC ± 5ºC 以下で保存し、良好な高分子量 DNA が回収可能な限り用いる。分離した DNA は tris-EDTA など適切な緩衝液中で 4ºC ± 1ºC 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。

6.10. 突然変異体解析用組織の選択

54. 組織の選択は、（i）投与経路または最初の接触部位（経口投与の場合には腺胃または十二指腸、吸入曝露の場合には肺または鼻粘膜上皮、あるいは、局所適用を行った場合には皮膚など）、（ii）一般毒性試験で認められた ADME（吸収、分布、代謝、排泄）パラメータ（毒性に関する組織での分布、滞留または蓄積、あるいは標的器官を示す）、および、（iii）生殖細胞データの必要性の有無などの考慮に基づいて行う。試験が癌原性試験に続いて行われる場合は、発癌性の標的組織を検討する。解析用組織では、直接作用型の変異原である化学物質、迅速に代謝される化学物質、反応性が高いかほとんど吸収されない化学物質、または投与経路により標的組織が判定される化学物質の検出を最大化する選択を行う（45）。

55. 背景情報がない場合、また、投与経路による接触部位を考慮した場合、肝臓および少なくとも 1 種類の分裂の速い組織（腺胃、十二指腸、または骨髄など）について変異原性を評価すべきである。ほとんどの場合、上記の要件は慎重に選択した 2 種類の組織の解析により達成できるが、場合によっては、3 種類以上を要することが考えられる。生殖細胞も評価できる（段落 52 参照）。

6.11. 測定方法

56. 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得られている（*lacZ* バクテリオファージ λ およびプラスミド（19）、*lacI* マウス（46）（47）、*gpt* delta マウス（14）、*gpt* delta ラット（15）（48）、*cII*（20））。修正を加える場合にはその正当性を示し、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、複数のパッケージングのデータを集計して使用できる。ただし、十分なプラーク数を得るために多数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おそれがあるため、慎重な考慮が必要である。DNA サンプル当たりの最適な総プラーク数または総コロニー数は、所定の自発的な

© OECD, (2022)

突然変異体頻度において、十分な数の変異体を検出する統計学的確率により決まる。一般に、バックグラウンドの突然変異体頻度が 3×10^{-5} の範囲にある TGR モデルの場合、最低 125,000～300,000 個のプラークが必要である。バックグラウンドの突然変異体頻度のより低い *gpt* delta などのモデルでは、十分な統計検出力を確保するために、比例してより多くのコロニー形成単位を観察する必要がある。組織およびそこから得られた試料は、ブロックデザインを用いて処理および解析を行い、その場合、望ましくは溶媒／溶剤対照群、陽性対照群（用いた場合）または陽性対照 DNA（適切な場合）由来の同数の試料、および各投与群を同時に処理する。

6.12. 変異体の塩基配列決定

57. 早期に自発的に発生する変異体のクローン増幅はいずれの動物にも生じ、個別の組織における突然変異体頻度を、わずかな増加から多大な増加に導く可能性がある。歴史的対照の分布外にあり、かつ、当該群内の他の動物とは異なる高い突然変異体頻度の動物に由来する組織は、そうした結果をもたらすジャックポットまたはクローン事象に当たる可能性がある。こうした事象は組織内に局在化することが多いため、同一組織の異なる部分の再解析が、こうした異常を評価する 1 つの方法となりうる。多くの場合、早期死亡またはジャックポット変異の存在により失われた動物に対応するため、余分な代替動物が試験に組み入れられる。こうした場合、余分な動物の解析が適切と考えられる。

58. 規制当局への申請では、変異体 DNA の塩基配列決定は不要であり、特に、明確な陽性結果または陰性結果が得られている場合（段落 62 および 63 参照）には必要ないが、大きな個体間のばらつきが認められた場合、塩基配列決定データは有用となりうる。こうした場合、塩基配列決定を用いて、特定の組織に由来する特有の突然変異体の割合を明らかにすることで、ジャックポットあるいはクローン事象の可能性を除外できる。クローン性変異が突然変異体頻度に寄与する場合、単純な判定では、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となるはずであるが、クローン性に関する突然変異体頻度を数学的に補正するには、25 個もの突然変異体の塩基配列決定が必要となりうる。突然変異体の塩基配列決定は、突然変異体頻度のわずかな増加が認められた場合（すなわち、溶媒対照群の値をわずかに超過した場合）にも考慮できる。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スペクトルの差から、変異原性作用の裏付けを取ることができる（7）。突然変異スペクトルは、機序に関する仮説の構築にも有用となりうる。塩基配列決定を試験計画書の一部として組み入れることになる場合、用いる統計モデルに従って十分な検出力を達成するには、当該試験のデザインに特に注意を払い、とりわけ配列を決定する 1 試料当たりの変異体数に関しては留意すべきである（段落 67 参照）。この点に関して、次世代シーケンシング法は、*cII*（49）遺伝子と *lacZ*（50）遺伝子の両方で利用可能であり、多数の突然変異体の塩基配列決定を大いに促進する。

7. データおよび報告

7.1. 結果の提示

59. 動物の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。報告書では、パッケージング／レスキュー反応数も記載し、DNA サンプル当たりの反応数を報告する。個別の

© OECD, (2022)

各反応データは保持すべきであるが、報告の必要があるのは、突然変異体および pfu／cfu の総数のみである。段落 51 のとおり、毒性および臨床徴候のデータを報告する。塩基配列決定の結果を、解析した突然変異体ごとに提示し、得られた突然変異頻度の算出結果を動物ごとおよび組織ごとに示す。

7.2. 統計学的評価および結果の解釈

7.2.1. 許容基準

60. 以下の基準により、本試験の許容性が判定される。

a. 試験実施施設の歴史的対照データベースへの追加に関し、同時陰性対照データが許容可能とみなされる（段落 28～32、補遺 2 参照）。

b. 同時陽性対照またはスコアリング対照（scoring control）が、歴史的陽性対照データベースで生じた反応と適合する反応を誘発し、同時陰性対照に比べ統計学的に有意な増加を生じること（段落 24 および 25 参照）。

c. 適切な用量数、用量当たりの動物数、およびプラーク形成単位またはコロニー形成単位が解析されている（すなわち、段落 16、33、および 37）。

d. 最高用量および投与経路の選択基準が、段落 36～39 記載内容と一致している。

7.2.2. 結果の評価および解釈

61. 用いる統計検定では動物を実験単位とみなす。適切な統計手法は、参考文献（6）、（51）、（52）、（53）、（54）、および補遺 2 に見出せる。反応を評価する場合、すべてのデータを考慮し、すべての場合に専門家の判断を適用する。少なくとも 3 つの用量および陰性（溶剤／溶媒）対照のデータが入手可能である場合、適切な傾向検定を用いて用量反応解析を実施すべきである。

62. 上記すべての許容基準が満たされる場合、所定の組織について、被験化学物質が以下の基準をすべて満たせば、明らかな陽性とみなされる。

a. 同時陰性対照との比較により、少なくとも 1 つの投与群が、突然変異体頻度について統計学的に有意な増加を示す。
b. 傾向について評価した場合（段落 61 参照）、結果は用量依存性である（限度試験に適用できない）。

c. いずれの投与群の突然変異体頻度の増加も、適切な歴史的陰性対照分布の上限値の範囲外である（段落 28～32 および補遺 2 参照）。

陽性結果から、被験化学物質は、解析された組織において遺伝子突然変異を誘発したことが示される。

63. すべての許容基準が満たされる場合、所定の組織について、被験化学物質が、検討されたすべての実験条件において以下の基準をすべて満たせば、明らかな陰性とみなされる。

a. 同時陰性対照との比較により、いずれの投与群も、突然変異体頻度について統計学的に有意な増加を示さない。

b. 傾向について評価した場合（段落 61 参照）、結果は用量依存性でない。

c. すべての結果が、適切な歴史的陰性対照データの下限値および上限値の範囲内

© OECD, (2022)

にある（段落 28～32 および補遺 2 参照）。

d. 被験化学物質またはその代謝物への組織曝露が生じた。

陰性結果から、本試験条件下で、被験化学物質は、被験組織において遺伝子突然変異を誘発しないことが示される。

64. 被験化学物質またはその代謝物への被験組織曝露の証拠は、一般毒性（体重／器官重量の減少など）または同一試験での測定から得られた形態学的もしくは病理組織学的データ、あるいは同等の毒性試験、あるいはそれ以外の *in vivo* 遺伝毒性試験から入手できる。代わりに、同一経路および同一動物種による同一もしくは別の試験において得られた、ADME もしくはトキシコキネティクスに関するデータ、または血漿解析結果を用いて、組織曝露を立証できる（1）。

65. 明らかな陽性または明らかな陰性の反応について、さらに検証する必要はない（段落 62～63 参照）。

66. 明らかな陰性反応でも陽性反応でもない場合、または限度試験に用いられた用量でのみ陽性結果が得られた場合、および結果（わずかな増加もしくは境界線上の増加など）の生物学的関連性確立の補助とするため、既存の実験のさらなる検討が必要となりうる。これには、より多くのプラークまたは変異体コロニーの解析、およびより多くの動物での解析が挙げられる。専門家の判断を適用し追加データを解析しても、反応が陽性か陰性のいずれか解決できない場合、改変した実験条件を用いた反復実験が必要と考えられる。

67. 被験化学物質により誘発される突然変異スペクトルのシフトの有無を判定する変異体プラークの塩基配列決定は、反応が陰性か陽性か結論付ける際の補助となりうる。段落 58 記載のとおり、塩基配列決定はジャックポット変異の特定にも役立ちうる。DNA の塩基配列決定の解析については、結果の解釈の補助となる多くの統計手法が入手可能である（55）（56）（57）（58）。

68. まれに、さらなる調査後も、データから被験化学物質が陽性結果か陰性結果のいずれかをもたらすと結論を下せないため、試験は不確定と結論付けられることが考えられる。

7.3. 試験報告書

69. 試験報告書には、以下の情報を記載する。

被験化学物質：

- 既知の場合、識別データおよび CAS 番号
- 入手可能である場合、供給元、ロット番号
- 物理的性質および純度
- 本試験実施に関連する物理化学的特性
- 既知の場合、被験化学物質の安定性

溶剤／溶媒：

- 溶媒選択の正当性
- 既知の場合、溶剤／溶媒中での被験化学物質の溶解性および安定性
- 飼料、飲水、または吸入を介した投与に伴う調合など、用量の調合に関する調

© OECD, (2022)

製内容

- 調合物解析による判定結果（例：安定性、均一性—不溶性物質の場合、名目濃度）

被験動物：

- 用いた動物種および系統、ならびに選択の根拠
- 動物数、週齢および性別
- 供給元、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：

- 試験実施施設の習熟度の証拠
- 陽性および陰性（溶媒／溶剤）対照データ
- 用量設定試験のデータなど、用量段階選択の根拠
- 被験化学物質調製の詳細
- 被験化学物質投与の詳細
- 投与経路の選択根拠
- 解析対象の組織／細胞型の選択根拠
- 入手可能な場合、病理組織学的または血液学的解析、ならびに動物の観察結果および体重の入手頻度など、動物に対する毒性の測定法
- 陰性結果が得られた場合、被験化学物質が標的組織に到達したこと、あるいは全身循環に入ったことの検証方法
- ほとんどの投与経路または飼料／飲水曝露経路での実用量（mg/kg 体重/日）。単位は、百万分率（ppm）か実用量のいずれかとし、化学物質の濃度（ppm）および該当する場合、摂餌量または摂水量の平均値に基づく。
- 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述およびその選択理由
- 安楽死の方法
- 組織の分離および保存手順
- 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レスキュー、およびトランスジェニック DNA の細菌宿主への移行の方法
- すべての細胞、キットおよび試薬の供給元およびロット番号（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、ならびにクローン性の補正および／または突然変異頻度の算出に用いた方法（該当する場合）

結果：

- 試験期間前および試験期間全体の動物の状態（毒性徴候を含む）

© OECD, (2022)

- 試験期間全体での体重および体重の変化
- 混餌投与または飲水投与での試験に該当する場合、試験期間全体での摂餌量および／または摂水量
- 安楽殺処分時の体重、および該当する場合、器官重量
- 組織曝露の証拠
- 各組織／動物について、突然変異体数、評価したプラーク数またはコロニー数、パッケージング反応の数およびパッケージング効率の数値、突然変異体頻度
- 各組織／動物群について、突然変異体の総数、平均突然変異体頻度、標準偏差
- 可能な場合、用量反応関係
- 突然変異の分子レベルでの解析が行われた場合、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
- 範囲、平均値、標準偏差、範囲限界、および管理限界に関する同時および歴史的陰性対照データ
- 同時および歴史的陽性対照データ
- 入手可能な場合、解析による判定結果（パッケージングに用いた DNA 濃度、DNA 塩基配列決定データなど）
- 適用した統計解析およびその手法

結果の考察

結果の考察および結論の正当化を行い、特に、結果が明らかな陽性でも明らかな陰性でもない場合には実施する

結論

© OECD, (2022)

8. 参考文献

(1) OECD (2017), Overview on genetic toxicology TGs, OECD Series on Testing and Assessment, No. 238, OECD, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264274761-en.

(2) Thybaud, V, E. Lorge, D.D. Levy, J. van Benthem, G.R. Douglas, F. Marchetti, M.M. Moore and R. Schoeny (2017), Main issues addressed in the 2014-2015 revisions to the OECD genetic toxicology test guidelines", *Environ. Mol. Mutagen*., 58:284-295.

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

(4) 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, OECD, Paris.

(5) Marchetti, F., M. Aardema, C. Beevers, J. van Benthem, R. Godschalk, C.L. Yauk, B. Young, A. Williams and G.R. Douglas (2018), "Identifying germ cell mutagens using OECD test guideline 488 (transgenic rodent somatic and germ cell mutation assay) and integration with somatic cell testing", Mutation Res., 832-833: 7-18. Corrigendum: Mutation Res., 2019, 844: 70-71.

(6) 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.

(7) 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.

(8) 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.

(9) Maurice, C., D.S. Dertinger, C.L. Yauk and F. Marchetti (2019) "Integrated in vivo genotoxicity assessment of procarbazine hydrochloride demonstrates induction of Pig-a and *lacZ* mutations, and micronuclei, in MutaMouse hematopoietic cells", *Environ. Mol. Mutagen*., 60: 505-512.

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

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

(12) Jackson, M., L. Marks, G.H.W. May and J.B. Wilson (2018) "The genetic basis of disease", *Essays Biochem*., 62:643-723.

(13) 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.

(14) 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.

(15) 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.

© OECD, (2022)

(16) 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.

(17) 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.

(18) 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.

(19) 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.

(20) 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.

(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) Gad, S.C., C.D. Cassidy, N. Aubert, Spainhour B. and H. Robbe (2006) "Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species", Int. J. Toxicol., 25(6): 499-521.

(23) OECD (2009), Part 2: Annexes to the Detailed Review Paper on Transgenic *Rodent Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)29, OECD, Paris.

(24) 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., 732(2): 87-90.

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

(26) Fang, Y. (2003), "C-chart, X-chart, and the Katz Family of Distributions", J. Quality Technology, 35:1-15, 2003.

(27) Lovell D.P., M. Fellows, F. Marchetti, J. Christiansen, A. Elhajouji, K. Hashimoto, S. Kasamoto, Y. Li, O. Masayasu, M.M. Moore, M. Schuler, R. Smith, L.F. Stankowski Jr, J. Tanaka, J.Y. Tanir, V. Thybaud, F. Van Goethem and J. Whitwell (2018), "Analysis of negative historical control group data from the in vitro micronucleus assay using TK6 cells", Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen., 825:40-50.

(28) Dertinger S.D., J.A. Bhalli, D.J. Roberts, L.F. Stankowski Jr, B.B. Gollapudi, D.P. Lovell, L. Recio, T. Kimoto, D. Miura and R.H. Heflich (2021) "Recommendations for conducting the rodent erythrocyte Pig-a assay: A report from the HESI GTTC Pig-a Workgroup", *Environ Mol Mutagen*., 62(3):227-237.

(29) 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.

(30) 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.

© OECD, (2022)

(31) Diehl K.H., R. Hull, D. Morton, R. Pfister,Y. Rabemampianina, D. Smith, J.M. Vidal, C. van de Vorstenbosch and European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods, (2001) "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes", J. Appl. Toxicol., 21(1):15-23.

(32) Turner P.V., T. Brabb, C. Pekow and M.A. Vasbinder, (2011) "Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider", J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., 50(5):600-613.

(33) White, P.A., G.R. Douglas, D.H. Phillips and V.M. Arlt (2017) "Quantitative relationship between lacZ mutant frequency and DNA adduct frequency in Muta™Mouse tissues and cultured cells exposed to 3-nitrobenzanthrone. *Mutagenesis*, 32(2): 299-312.

(34) Marchetti F., G. Zhou, D. LeBlanc, P.A. White, A. Williams, C.L. Yauk and G.R. Douglas (2021) "The 28 + 28 day design is an effective sampling time for analyzing mutant frequencies in rapidly proliferating tissues of MutaMouse animals", Arch. Toxicol., 95(3):1103-1116

(35) 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.

(36) 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.

(37) 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.

(38) Olsen, A.K., A., Andreassen, R., Singh, R., Wiger, N., Duale, P.B., Farmer, and G. Brunborg (2010), "Environmental exposure of the mouse germ line: DNA adducts in spermatozoa and formation of de novo mutations during spermatogenesis". PLoS One, 28;5(6):e11349

(39) Oakberg, E.F. (1956), "Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium", Am. J. Anat., 99: 507–516.

(40) Clermont, Y. (1972), "Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal". Physiol. Rev. 52: 198-236.

(41) Marchetti, F., M. Aardema, C. Beevers, J. van Benthem, G.R. Douglas, R. Godschalk, C.L. Yauk, B. Young and A. Williams (2018), "Simulation of mouse and rat spermatogenesis to inform genotoxicity testing using OECD test guideline 488", Mutation Res., 832-833: 19-28. Corrigendum: Mutation Res., 2019, 844: 69.

(42) Bielas, J.H. and J.A. Heddle (2000) Proliferation is necessary for both repair and mutation in transgenic mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 11391-11396.

(43) O'Brien, J.M., M.A. Beal, J.D. Gingerich, L. Soper, G.R. Douglas, C.L. Yauk and F. Marchetti (2014), "Transgenic rodent assay for quantifying male germ cell mutant frequency", *J. Vis. Exp.*, 90: e51576

(44) O'Brien J.M., Beal M.A., Yauk, C.L. and F. Marchetti (2016) "Benzo(a)pyrene is mutagenic in mouse spermatogonial stem cells and dividing spermatogonia. Toxicol. Sci., 152: 363-371.

© OECD, (2022)

(45) 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.

(46) 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.

(47) 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.

(48) Nohmi, T., K. Masumura and N. Toyoda-Hokaiwado (2017), "Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis", Genes and Environ., 39:11.

(49) Besaratinia, A., H. Li, J. Yoon, A. Zheng, H. Gao and S. Tommasi (2012) "A high-throughput next-generation sequencing-based method for detecting the mutational fingerprint of carcinogens", *Nucleic Acids Res*., 40(15):e116-6.

(50) Beal, M.A., R. Gagne, A. Williams, Marchetti F. and C.L. Yauk (2015) " Characterizing benzo(a)pyrene-induced lacZ mutation spectrum in transgenic mice using Next Generation Sequencing, BMC Genomics, 16: 812.

(51) 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.

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

(53) 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.

(54) 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.

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

(56) 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.

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

(58) 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.

(59) Kluxen FM, Weber K, Strupp C, Jensen SM, Lothorn LA, Garcin J-C, Hofmann T (2021) Using historical control data in bioassays for regulatory toxicology. Regulatory Toxicology and Pharmacology 125:105024.

(60) InfinityQS International (2014) A practical guide to selecting the right control chart. Available. at:

© OECD, (2022)

http://www.infinityqs.com/sites/infinityqs.com/files/files/PDFs/InfinityQS_Practical_Guide_to_Selecting_the_Right_Control_Chart_Oct2013.pdf. Successfully accessed October 7, 2021.

(61) Vardeman S.B. (1992) What about the other intervals? The American Statistician 46:193-197.

© OECD, (2022)

補遺 1：定義

投与期間：動物に対して投与を行う総期間。

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置換を引き起こす型の変異。

カプシド：ウイルス粒子を取り囲むタンパク質の殻。

クローン性増殖：単一の（変異体）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）：生菌数を表す尺度。

信頼区間（CI）：一定の信頼度で母集団値を含んでいる可能性が高い値の範囲

管理限界：統計における管理図に描かれる水平方向のライン。このラインは研究者により定義され、使用事例に左右される値である。品質管理の分野では、通常この値は試料の平均±3 標準偏差であるが、それ以外に、標準偏差に対するいくつかの倍数（例：2 倍または 1.96 倍）が有用である場合がある

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：1 つまたは複数の（連続した）ヌクレオチドが、ゲノム単位で失われる変異。

エレクトロポレーション：細胞膜の透過性を増加させるために電気パルスを適用する方法。

内在性遺伝子：そのゲノムが本来有している遺伝子。

超過二項変動：母集団が二項分布をするとした場合、予測されうる値より母集団比率の繰り返し推定のばらつきがより大きくなること。

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 配列内に、3 で割り切れない複数のヌクレオチドが挿入または欠失することで生じる遺伝子突然変異。

挿入：DNA 配列に 1 つまたは複数のヌクレオチド塩基対が加わること。

ジャックポット：単一の変異からクローン性増殖により生じた多数の突然変異体。

大きな欠失：数キロ塩基対を超える DNA の欠失（Spi⁻選択および *lacZ* プラスミド法により効率的に検出される）。

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。

© OECD, (2022)

分裂促進因子：細胞を刺激して細胞分裂を開始させ、有糸分裂（すなわち、細胞分裂）の誘因となる化学物質。

中立な遺伝子：正または負の選択圧に影響されない遺伝子。

パッケージング：ファージのカプシドと尾部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合成すること。λ ベクターでクローニングした DNA（cos 部位で切断）を感染性のλ粒子に充填するため通常用いられる。

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宿主細菌において回収される効率。

プラーク形成単位（pfu）：生存バクテリオファージ数を表す尺度。

点突然変異：小規模な DNA 配列にのみ影響を及ぼす突然変異の一般的用語であり、小さな挿入、欠失、および塩基対置換が挙げられる。

ポジティブセレクション：突然変異体のみを生存可能にする方法。

レポーター遺伝子：突然変異体の遺伝子産物を容易に検出する遺伝子。

試料採取時期：被験化学物質を投与せず、未処理の DNA 損傷が安定した変異に固定される、安楽殺処分前の期間の最終時点。

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。したがって、シャトルベクターに挿入された DNA は、2 種類の細胞型または 2 種類の生物において試験または操作を行うことができる。

被験化学物質：被験化学物質という用語は、試験の対象となる物質を指すのに用いられる。

トランスジェニック：別の種の 1 つまたは複数の遺伝子の導入により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。

© OECD, (2022)

補遺 2：統計解析、データ解釈、および歴史的陰性対照データの分布

1. 統計解析およびデータ解釈

1.1 TGR 試験データの評価に関する推奨事項

段落 61～63 記載の TGR データについて、3 種類の統計解析実施の正しい方法は 1 つではない。その際、選択肢となる方法を用いることになる場合、研究者は、試験開始前にその方法（すなわち、書面による試験計画書またはバリデーション計画書）を明記し、また、健全な統計学的論拠を用いてその方法を正当化する準備を行う。

以下記載の統計手法は、すべて考慮すべきであるという重要な基本原則があることに留意されたい。具体的には、これらおよびそれ以外の統計検定では、実験デザインは、無作為抽出法または少なくともブロック法に基づくと仮定する。無作為化および／またはブロック化は、実験結果に微妙な影響を及ぼす場合もあれば、それほど微妙でない影響を及ぼす場合もありうる要因の影響を軽減するのに役立つ重要な方法であるが、検討対象の主要な要因ではない。

1.2 対比較

一連の統計検定は、同時溶媒／溶剤（陰性）対照群における突然変異体頻度と、被験化学物質投与群で測定されたその頻度との対比較である。適切な多重比較検定による分散分析（ANOVA）を用いるパラメトリック解析が通常用いられるが、他の方法も等しく許容可能である。一般に、これらの種類のパラメトリック検定は、分散の正規性および均一性に関する仮定が妥当な場合にのみ実施する。正規性および／または不等分散が特定された場合、その要件を満たすために、対数（$\log_{10}$）または順位変換など適切なデータ変換をしばしば使用できる。この変換により等分散性が得られない場合、重み付き（分散補正）ANOVA および／または t 検定を適用でき、あるいは、ノンパラメトリック法の適合性を検討できる。最後に、試験に雌雄両性別を用いる場合、投与と性別の両方を考慮する要因計画法が通常有益である。これについては、以下でさらに詳述する。

1.3 要因計画

要因計画は、例えば、性別および被験化学物質の用量段階を主効果とする二元配置分散分析に相当する。データは、JMP、SPSS、SAS、STATA、Genstat、ならびに R および R Studio など、多くの標準的な統計ソフトウェアパッケージを用いて解析できる。基本的な方法の全詳細は、多くの標準的な統計学のテキストや、統計パッケージと共に提供されている「ヘルプ」機能で入手可能である。

© OECD, (2022)

1.4 傾向検定

本試験ガイドライン記載の2種類目の解析は、用量反応関係を特定する傾向検定である。傾向検定を実施する場合、突然変異体頻度データが同時陰性対照群および各実験用量群から入手可能であること。本解析は、段落 51 記載の限度試験（すなわち、単一の被験化学物質の用量段階に関する試験）には通常適用できないことに留意されたい。これらの解析を採用する場合、一部の種類の傾向検定結果を解釈する際に注意が必要である。例えば、単純な線形傾向検定では、用量反応が非単調である場合、傾向を検出できないことがある。こうした場合、Bretz and Hothorn（2003）により提唱された Downturn Protection（曲線担保）検定など、非単調性を検出できる傾向検定が有用であると考えられる。用量反応を示すグラフは、適切な傾向検定の種類、および／または変換の必要性の有無を判定する際に役立ちうる。

2. 歴史的陰性対照データの分布

歴史的陰性対照データの分布は、アッセイの許容性の評価に重要である。2 番目に重要な機能は、いずれかの被験化学物質曝露処置群について、突然変異体頻度の平均値が、歴史的陰性対照データの分布の上限値を超えるか否か判定することである。その重要性を考慮し、歴史的陰性対照データセットの構築に関するガイダンスを以下に示す。

2.1 歴史的陰性対照データセットの構築

習熟度調査の過程で、各試験実施施設は、突然変異体頻度について、歴史的陰性対照での範囲および分布を確立する。陰性対照データは、被験化学物質投与動物と共に陰性対照として試験された動物（本 TG では、同時陰性対照と呼ぶ）から入手できる。これらの動物には、通常、溶剤／溶媒のみ投与されることになる。

歴史的陰性対照の突然変異体頻度の分布データを初めて取得する際、陰性対照は公表データが存在する場合には、そのデータと一致していること（3, 23）。後の試験の妥当性評価を容易にする統計学的に頑健なデータベース、ならびに、歴史的陰性対照の分布に対する被験化学物質曝露動物の突然変異体頻度の比較を達成するため、実験データを引き続き追加する。

理想的には、試験実施施設では、30 匹以上の同時陰性（溶剤／溶媒）対照動物から個別の突然変異体頻度の測定値を取得するよう努力する。可能な限り、様々な繁殖周期から得られた動物をそれぞれ用いる、3 回以上の独立した実験からデータを取得し、規制上の試験と同程度の条件下で実験を実施する。

試験実施施設は管理図などの品質管理法［例：I-bar および X-bar 管理図（26）（27）］を用いることで、そのデータにいかにばらつきがあるか特定し、試験実施施設の方法が「管理下」にあることを示す。歴史的データの構築方法および使用方法（すなわち、歴史的データベースにおけるデータの選択基準および除外基準、ならびに、所定の実験の許容基準確立）に関するさらなる推奨事項については、文献（例：25）に見出すことができ、以下考察する。

実験プロトコールに変更があれば、得られたデータが、試験実施施設の既存の歴史的陰性対照データベースとなお一致しているか否かについて、その影響の観点から検討する。大きな不一致があった場合のみ、新たな歴史的陰性対照データベースを確立する。再確立の間、その同時陰性対照の値が、過去のデータベースか対応する公表データのいずれかと一致していることを当該試験実施施設が立証できる場合には、実際の試験実施を可能にするための完全な陰性対照データベースは不要である

© OECD, (2022)

と考えられる。

TGR 試験の陰性対照データは、各動物由来の突然変異体頻度からなる。個別の陰性対照動物由来データが歴史的陰性対照の分布から外れている場合、（i）これらのデータが極端でないこと（例：異常に高い突然変異体頻度を持つ、時に認められる「ジャックポット」変異が予測され、除外できること）、（ii）試験系が「管理下」にあるという証拠があること、および（iii）技術的にも人的にも誤りを示す証拠がないことを条件に、データベースへの組み入れは許容可能であると考えられる。

2.2 歴史的陰性対照の分布の特徴付け

歴史的陰性対照データの分布の特徴付けには複数の妥当な方法があり、各試験実施施設はそのデータを記述する適切な方法を用いるべきである。その特徴付けは、陰性対照動物の値の大多数が範囲内におさまると予測される境界を記す、上限値および／または下限値を算出する形式を一般にとることになる。考慮すべき要因には、サンプルサイズおよびデータが正規分布か否かなどがある。上限値および／または下限値の算出方法について、概要を以下に示す。さらなる情報については、（59）、（60）、（61）に見出せる。

不適切な方法。

範囲：範囲とは、実測値の最小値と最大値の差である。有用な上限値および／または下限値の確立を目的とした場合、範囲は、歴史的陰性対照の分布の十分な説明にならない。その理由は、サンプル数の増加につれ範囲は拡大し、2 つの極値（異常値／外れ値）に左右されうるからである。範囲の拡大により、試験実施施設の実行不良という「報い」を受けるおそれがある。

信頼区間：信頼区間とは、定義された（例：95%）信頼度での平均値など、母集団の値（パラメータ）を含んでいる可能性が高い推定値の範囲のことである。母集団の平均値に関する信頼区間は、有用な上限値および／または下限値の確立との関連では、歴史的陰性対照の分布の十分な説明に有用ではない。第1に、信頼区間は、今後の観察結果ではなく現在のデータセットを説明しており、また、第2に、サンプルサイズの増加につれ信頼区間が狭まり、母集団推定値（パラメータ）について高い精度が反映されるためである。

適切な方法。

管理限界：品質管理の分野では、標準偏差の倍数、通常は平均±3 標準偏差を管理限界として用いる。これらの値は管理図上にプロットされた線であり、警戒限界と呼ばれる別の標準偏差の倍数（例：2x）を伴う場合がある。管理図と併せて、管理限界および警戒限界は、反復処理または反復試験が「管理下」に置かれている程度の評価に有用なツールである。正規分布および「管理下」にある処理と仮定した場合、データの99.73%が3標準偏差内にあり、データの約95%が2標準偏差内にあること。したがって、管理限界および／または警戒限界は、歴史的陰性対照データの評価に有用な資源であり、試験データの解釈に役立つ有用な上限値および／または下限値を提供できる。とはいえ、正規分布データの約 95%がおさまること（±2 標準偏差）を表す限界の方が、通常、3 標準偏差に基づく限界よりも適切である。前者は他のOECD試験ガイドライン（例：OECD TG 474）と一致しており、後者は非常にまれな／異常なデータポイントを特徴付けているため、意図する目的には広すぎる間隔を生じる。経験則では、当該処理が「管理下」にある場合、有用な管理限界および警戒限界を得るには、個別のデータポイントが25個以上で十分となる。

© OECD, (2022)

予測区間：予測区間は、既存のデータに基づいて、1 つまたは複数の将来の観察結果を予測するよう意図されている。例えば、95%予測区間であれば、新たな結果は95%の確率の範囲内に入ることが予測されると考えられる。（信頼区間の場合と同じく、これは単純化された定義であり、正確な定義はより複雑であることに留意されたい。） 非正規データを必要に応じて変換し、報告および使用のために元の単位に逆変換する。あるいは、一部のコンピュータソフトウェアプログラムでは、正規分布を仮定しないノンパラメトリックな算出が可能である。経験則では、個別のデータポイントが 30 個以上でより優れた機能を果たすため、予測区間の算出には、より小さなサンプルサイズを用いるべきではない。

許容区間：許容区間は、ユーザーが定義した「適用範囲」内で、多くの将来的な観察結果を予測するよう意図されている。例えば、将来の観察結果の95%は、95%許容区間内におさまることになる。（本用語についても、これは単純化された定義であり、正確な定義はより複雑である。） 非正規データを必要に応じて変換し、報告および使用のために元の単位に逆変換する。あるいは、一部のコンピュータソフトウェアプログラムでは、正規分布を仮定しないノンパラメトリックな算出が可能である。許容区間は、類似用語である予測区間に比べ、範囲がより広くなる傾向がある（前者は、高い割合での将来の値を予測するよう意図されているが、後者は、1 つまたは少数の新たな観察結果を予測するために通常用いられるため）。許容区間は、予測区間に比べ、はるかに大きなサンプルサイズを通常要すると認識することも重要である。経験則では、データポイントが 100 個以上でより優れた機能を果たすため、許容区間の算出には、より小さなサンプルサイズを用いるべきではない。

分位数：分位数は、何らかの特定の確率分布を仮定せずに、その大きさに従って、データポイントの順位を要約するのに用いられる。分位数は、外れ値および／または歪度のため非正規性がよくみられる、多くの生物医学的用途に広く用いられている。試験結果の解釈に役立つよう、分位数は、例えば、パーセンタイルに基づいて区間が定められる。分位数測定結果に関する不確実性の推定値を示すため、分位数の信頼区間を算出できる。信頼区間は、根底にあるデータセットの質の評価に役立つと考えられる。サンプルサイズが大きい場合を除き、分位数の信頼区間は、特に分布のテール部分では広くなると考えられる。経験則では、個別のデータポイントが100個以上でより優れた機能を果たすため、分位数の算出には、より小さなサンプルサイズを用いるべきではない。

上記区間は、個別の動物の変異細胞頻度を用いて通常算出されることになるが、基準 C（段落 62～63）記載の一次比較は、投与群の平均値が上限値に比べ低くなる場合を考慮していることに留意されたい。これは実践的な推奨事項であり、個別の動物データに基づいた場合、*in vivo* 試験系として、サンプルサイズがより大きく、歴史的対照の分布がより頑健と考えられる前提を認めている。それでも、これが比較を行うことができる唯一の手段ではない。例えば、個別の動物の変異細胞頻度と歴史的陰性対照の上限値との関係を検討することが、有用と考えられる場合はありうる。

© OECD, (2022)