OECD/OCDE

2016/07/29

試験ガイドライン No.489

In vivo 哺乳類アルカリコメットアッセイ

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2016), Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264885-en.

©OECD(2016)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

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

2016年 7 月 29 日採択

化学物質の試験に関するOECDガイドライン

IN VIVO 哺乳類アルカリコメットアッセイ

はじめに

1. *In vivo*アルカリコメットアッセイ（単細胞ゲル電気泳動法）（以下、コメットアッセイと略）は、遺伝毒性を示す可能性のある物質に曝露した動物（通常、げっ歯類）の複数組織から単離した細胞または細胞核内のDNA鎖切断を検出するのに用いられる。さまざまな専門家グループによって、コメットアッセイはレビューされ、推奨方法が発表されている(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10)。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。遺伝毒性試験に関する簡潔な情報と、この試験ガイドラインに加えられた最近の変更点の概要を説明する文書を作成しました (11)。

2. コメットアッセイの目的は、DNA損傷を引き起こす物質を特定することである。アルカリ条件下（>pH 13）において、コメットアッセイは、例えば、DNAとの直接相互作用、アルカリ不安定部位、あるいはDNA除去修復によって生じる一過性のDNA鎖切断などに起因するDNAの一本鎖切断や二本鎖切断を検出できる。これらのDNA鎖切断は、修復されて影響が残らない可能性や、細胞を致死させる可能性、あるいは突然変異として固定されて生体に永続的な変化をもたらす可能性があり、また、がんを含む多くのヒト疾患とも関連する染色体損傷を引き起こす可能性もある。

3. げっ歯類を用いる*in vivo*コメットアッセイの公式のバリデーション試験は、日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM：Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）によって組織され、欧州代替法評価センター（ECVAM：European Centre for the Validation of Alternative Methods）、米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会（ICCVAM：Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）および代替法評価に関する毒性学プログラム省庁間センター（NICEATM：NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods）の協力の下に、2006～2012年に実施された(12)。本試験ガイドラインは、バリデーション試験で用いられた最終プロトコール(12)と公表および未公表（試験施設の知的所有権下にある）のデータに基づき、コメットアッセイの推奨方法と限界を示すものである。

4. 重要な用語の定義を補遺1に示す。なお、本試験には、多種多様なプラットフォーム

©OECD, (2016)
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。本ガイドラインは、2016 年 7 月 29 日に OECD 理事会が手順書に従って採択したものである［C（2016）103］。

（顕微鏡スライド、ゲルスポット、96ウェルプレートなど）が使用できる。便宜上、本文書の以下、全体にわたって「スライド」という用語を用いているが、この用語には他のプラットフォームもすべて含まれる。

最初に考慮すべき事項および限界

5. コメットアッセイは、真核細胞におけるDNA鎖切断を測定するための方法である。スライド上のアガロースに包埋した単一の細胞・核を、界面活性剤と高濃度の塩で溶解する。この溶解段階で、細胞膜と核膜が消化され、一般に「核様体」と呼ばれるコイル状のDNAループとDNA断片が放出される。高pH下で電気泳動すると、コメット（彗星）に似た構造体が形成され、この構造体は、適切な蛍光染色法を用いると、蛍光顕微鏡で観察できる。 DNA断片は、それらの大きさに基づいて「ヘッド（頭部、head）」から「テール（尾部、tail）」に向かって移動し、コメットの全輝度（intensity, ヘッドの輝度＋テールの輝度）に対するテールの輝度は、DNA切断量を反映している(13) (14) (15)。

6. *In vivo*アルカリコメットアッセイは、反応が*in vivo*のADME（吸収、分布、代謝、排泄）やDNA修復過程に依存しているという点で、特に遺伝毒性有害性を評価するのに適している。これらは、動物種、組織、DNA損傷の種類によって異なる可能性がある。

7. 動物福祉の要件（3Rs；削減（Reduction）、改善（Refinement）、代替（Replacement）の原則）、特に、実験動物の使用数削減の要件を満たすため、本試験を他の毒性試験（例：反復投与毒性試験(10) (16) (17)）に組み込むことや、評価指標を他の遺伝毒性評価指標（哺乳類を用いる*in vivo*赤血球小核試験(18) (19) (20)など）と組み合わせることもできる。コメットアッセイは、ほとんどの場合、げっ歯類を用いて実施されるが、げっ歯類以外の哺乳類や哺乳類以外の動物種も用いられている。げっ歯類以外の動物種の使用には、科学的かつ倫理的な妥当性を示す必要がある。コメットアッセイでげっ歯類以外の動物種を使用するのは、コメットアッセイを単独の試験としてではなく別の毒性試験の一部として実施する場合に 限ることを強く推奨する。

8. 曝露経路と検討する組織の選択は、被験物質について利用可能な既存情報のすべて、例えば、ヒトにおいて意図／想定される曝露経路、代謝および分布、接触部位への影響の可能性、警告構造の有無、他の遺伝毒性などの毒性データ、試験の目的などに基づいて決定する。したがって、必要に応じ、被験物質の遺伝毒性の評価を、発がん性や他の毒性作用の標的組織を用いて行うことができる。また、本試験は、*in vitro*試験系によって検出された遺伝毒性のさらなる検討にも有用であると考えられる。目的の組織が適切に曝露されていることが合理的に予想できる場合は、その組織を用いて*in vivo*コメットアッセイを実施するのが妥当である。

©OECD, (2016)

9. JaCVAM試験(12)やRothfussら(10)などの共同研究において、本試験が最も広範に実施されたのは、雄ラットの体細胞組織である。JaCVAM国際バリデーション試験では、肝臓と胃が用いられた。肝臓は、物質の代謝が最も活発な臓器であり、発がん性の標的臓器であることも多い。胃は通常、経口曝露後に最初に接触する部位であるが、胃以外の消化管部位（十二指腸や空腸など）も接触部位の組織と考えるべきであり、げっ歯類の腺胃よりもヒトとの関連が深いと考えられる。過剰な高濃度の被験物質に上記の組織を曝露しないように注意を払う(21)。本試験は、分析可能な単一細胞・核の懸濁液が得られれば、原理的にどのような組織にも適用可能である。いくつかの試験施設のデータにより、本試験は、多種多様な組織にうまく適用できることが示されている。また、本試験は、肝臓と胃以外の臓器や組織、例えば、空腸(22)、腎臓(23) (24)、皮膚(25) (26)、膀胱(27) (28)、肺および気管支肺胞洗浄細胞（吸入物質の試験に適切）(29) (30)にも適用可能であることを示す発表が多数なされており、複数の臓器でも実施されている(31) (32)。

10. 生殖細胞における遺伝毒性作用に関心があるだろうが、本ガイドラインで述べる標準的なアルカリコメットアッセイは、成熟した生殖細胞におけるDNA鎖切断の測定には適切でないことに注意する必要がある。生殖細胞の遺伝毒性を調べるためのコメットアッセイの使用に関する文献レビューで、DNA損傷の背景レベルが高く、かつ変動しやすいことが報告されている(33)。そのため、標準化を伴うプロトコールの変更およびバリデーション試験を行わないと、成熟した生殖細胞（例：精子）を用いるコメットアッセイを本試験ガイドラインに含めることはできない。加えて、本試験ガイドラインで述べる推奨曝露計画は最適ではなく、成熟した精子におけるDNA鎖切断の意義のある分析には、より長い曝露時間や試料採取時間が必要となる。分化の様々な時期の精巣細胞における遺伝毒性作用について、コメットアッセイで測定したものが、文献(34) (35)で述べられている。ただし、生殖腺には体細胞と生殖細胞が混在していることに注意する。そのため、生殖腺全体（精巣）における陽性結果は、生殖細胞の損傷を必ずしも反映していないが、被験物質やその代謝物が生殖腺に達していることを示している。

11. コメットアッセイの標準的な実験条件では、架橋を確実に検出することはできない。修正された特定の実験条件下では、DNA-DNA架橋、DNA-タンパク質架橋、および他の塩基修飾（酸化塩基など）を検出できる場合がある(23) (36) (37) (38) (39)。ただし、どのようなプロトコールの修正が必要かを十分に吟味するには、さらなる研究が必要となる。した がって、架橋物質の検出は、本文書で述べる本試験法の主要目的ではない。本試験法は、プロトコールを修正したとしても、異数性誘発物質の検出には適していない。

12. 現時点の知見により、*in vivo*コメットアッセイには、いくつかの付加的な限界（補遺3参照）がある。本試験ガイドラインは、将来的な見直し、ならびに必要な場合には、得られ

©OECD, (2016)

た経験を踏まえて改訂が行われることが予想される。

13. 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

14. 動物を適切な経路で被験物質に曝露させる。投与および試料採取の詳細については、36～40項で説明する。選択した試料採取時間に、目的の組織を摘出し、単細胞・核の懸濁液を調製し（肝臓など、*in situ*灌流が有用であると考えられる部位については、*in situ*灌流を実施してもよい）、ソフトアガーに包埋してスライド上に固定化する。細胞または核を溶解緩衝液で処理して細胞膜や核膜を除去し、強アルカリ（例：pHが13以上）に曝露してDNAを巻き戻し、緩んだDNAループやDNA断片を遊離させてから、ソフトアガー中の核DNAを電気泳動にかける。断片化していない正常なDNA分子は、ソフトアガー内で核DNAがあった位置に止まるが、断片化したDNAとほどけたDNAループは、陽極に向かって移動する。電気泳動後、適切な蛍光染色法を用いてDNAを可視化する。顕微鏡と全自動または半自動画像解析システムを使用して標本を解析する。電気泳動中に移動したDNA量と移動距離は、DNA断片の量と大きさを反映している。コメットアッセイには、いくつかの指標がある。テールのDNA含量（% tail DNAまたは% tail intensity）をDNA損傷の評価に使用することが推奨されている(12) (40) (41) (42)。十分な数の核を解析した後、適切な方法を用いてデータを分析し、試験結果を判定する。

15. 試料の作製、電気泳動の条件、視覚分析のパラメータ（例：染色強度、顕微鏡の電球の光度、顕微鏡フィルターとカメラ装置の使用）、周囲の条件（例：背景照明）など、方法の様々な点の変更が検討されており、これらは、DNAの移動に影響を及ぼす可能性があることに注意する(43) (44) (45) (46)。

試験施設の習熟度の検証

16. 各試験施設は、使用する動物種の標的組織ごとに、十分な質の単細胞・核の懸濁液を得ることができることを示し、コメットアッセイに関する実験能力を証明する必要がある。標本の質は、まず、媒体処理動物の% tail DNAが再現性のある低い範囲内に収まるかにより評価される。現在のデータによると、ラット肝臓における群平均%tail DNA（中央値の平均に基づく。これらの用語の詳細は、57項を参照）は、6%を超えないことが望ましい。これはJaCVAMバリデーション試験結果(12)やその他の公開、非公開データとも整合するもので

©OECD, (2016)

ある。現時点で、他の組織については、最適なまたは許容できる範囲を推奨する十分なデータがない。データがなくても根拠があれば、他の組織の使用は可能である。試験報告書には、公表文献や非公開データを参照し、これらの組織を用いたコメットアッセイの能力について適切なレビューを記載する。第一に、陽性反応を検出できる十分な定量範囲を得るため、対照の% tail DNAが低い範囲にあることが望ましい。第二に、各試験施設は、表1（29項参照）に示す異なる作用機序を有する直接変異原と代謝活性型変異原について、期待される反応を再現することができなければならない。

17. 陽性対照物質は、それが適切で正当な根拠があり、かつ、目的の組織において明らかな陽性反応が示されている場合は、例えば、JaCVAMバリデーション試験(12)または他の公表データ（9項参照）に基づいて選択してよい。既知の変異原（例：EMS）の弱い作用を低用量で検出する能力も、例えば、投与の適切な回数と間隔で用量反応関係を示すことによって、証明する必要がある。既存のデータや期待される結果と比較する場合、最初の取り組みは、最も一般的に用いられる組織（例：げっ歯類の肝臓）を用いて習熟度を証明することに集中すべきである(12)。他の組織（例：胃・十二指腸・空腸、血液など）におけるデータも、同時に収集できる。試験施設は、検討する予定のすべての動物種の個々の組織について、習熟度を検証する必要があり、既知の変異原（例：EMS）を用いて、組織ごとに容認できる陽性反応が得られることを証明する必要がある。

18. 陰性（媒体）対照のデータの収集は、陰性データの反応の再現性を証明し、かつ試験の技術的側面が適切に管理されていたことを確認できるように、あるいは陰性対照の背景データ範囲を再構築する必要があることを示せるように行う（22項参照）。

19. 試験施設は、複数の組織を剖検で採取し、コメット解析用に調製することができるだけでなく、1匹の動物から複数の組織を採取することに熟練していることを示し、潜在的なDNA損傷が失われないこと、およびコメット解析が損なわれないことを保証する必要がある。安楽死させてから、調製のために組織を摘出するまでの時間の長さは重要である（44項参照）。

20. 本試験の習熟過程においても、動物福祉について考慮しなければならない。そのため、本試験の様々な局面における能力を身に付けるために、他の試験で用いた動物の組織が使用できる。さらには、試験施設において新規試験ガイドラインの方法を確立する段階では、必ずしも完全な試験を実施する必要はなく、必要な技能を身につけるために使用する動物数と用量数を減らすことができる。

©OECD, (2016)

対照の背景データ

21. 試験施設は、習熟度の検証過程で背景データベースを構築して、検討対象の組織と動物種について、陽性対照および陰性対照の範囲と分布を確認する。背景データの構築および使用方法に関する推奨事項（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と、試験の許容基準）については、参考文献(47)を参照されたい。組織や動物種が異なる場合だけでなく、媒体や投与経路が異なる場合も、陰性対照の% tail DNA値は異なってくる。したがって、組織および動物種ごとに、陰性対照の範囲を確立することが重要である。試験施設は、管理図（例：C管理図、Xバー管理図(48)）などの品質管理の方法を用いて、試験施設 のデータの変動の様子を明らかにし、その品質管理の方法が試験施設で「管理下」にあることを示す必要がある。弱い作用を検出するため、適切な陽性対照物質、用量範囲、および実験条件（例：電気泳動の条件）の選択も最適化する必要がある（17項参照）。

22. 実験プロトコールに変更がある場合は、試験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すべきである。

試験方法

準備

動物種の選択

23. 通常は、一般的な実験用系統の健康な若齢成熟げっ歯類（処理開始時に6～10週齢、これをやや過ぎていても可）を使用する。げっ歯類の動物種は、(i) 他の毒性試験で用いられている動物種（データを関連させることができ、試験に組み入れることができるため）、(ii) 発がん性試験において腫瘍を生じた動物種（発がんのメカニズムを調べるため）、または (iii) 既知であれば、ヒトの代謝に最も近い動物種、に基づいて選択する。本試験では、通常ラットが用いられる。ただし、倫理的かつ科学的に妥当な場合は、他の動物種も使用できる。

動物の飼育および給餌条件

24. げっ歯類の場合、動物飼育室の温度は、22℃（±3℃）が理想的である。相対湿度は50～60%が理想的で、少なくとも30%あり、飼育室の清掃時を除いて70%を超えないことが望ましい。照明は人工照明とし、12時間明期、12時間暗期に設定する。給餌については、通常の実験動物用飼料を用い、飲水は自由摂取とする。被験物質を混餌投与する場合には、適

©OECD, (2016)

切な混合飼料が得られるように飼料を選択する。げっ歯類では、攻撃的行動が予期されない場合、同性の小集団（通常、5匹以下）で飼育する。動物の個別飼育は、科学的に正当化できる場合に限る。メッシュの床は、重大な怪我を引き起こす可能性があるため、可能な限り板床を使用する(49)。適切な環境改善用具（エンリッチメント）を提供しなければならない。

動物の準備

25. 動物を対照群と処理群にランダムに割り付ける。動物を個体識別し、処理開始の少なくとも5日前から飼育環境に馴化させる。個体識別には、必ず侵襲性の最も低い方法を用いる。適切な方法として、足環、タグ、マイクロチップの装着、生体認証などがある。指切り法や耳パンチは、本試験においては、科学的に正当化できない。ケージは、配置による影響ができる限り小さくなるように配置する。試験開始時には、体重のばらつきをできる限り小さくし、±20%を超えないようにする。

投与の準備

26. 被験物質が固体の場合は、適切な媒体に溶解または懸濁するか、飼料または飲水に混合してから、動物に投与する。被験物質が液体の場合は、直接または希釈してから投与する。吸入曝露する場合、被験物質の物理化学的特性によって、気体、蒸気、または固体と液体のエアロゾルとして投与できる(50) (51)。

27. 保存可能であることが安定性データによって証明され、かつ適切な保存条件が設定されない限り、被験物質は用時調製とする。

試験条件

媒体

28. 媒体は、用いる容量で毒性影響が認められず、被験物質と化学反応を起す疑いがないものを使用する。性質が既知以外の媒体を使用する場合は、その媒体について、実験動物、投与経路、およびエンドポイントに関する適合性を示す参照データで、その選択を裏付ける。可能な限り、水性の溶媒/媒体の使用を第一に考慮することが推奨される。一部の媒体（特に、粘稠な溶媒）は、接触部位において炎症の誘発やDNA鎖切断の背景頻度の上昇を引き起こす可能性があり、投与が複数回に及んだ場合には特にその可能性が高い。

©OECD, (2016)

対照

陽性対照

29. 現時点では、雌雄いずれか一方のみを用いる場合も両性を用いる場合も、分析可能な同性の個体3匹以上で構成される陽性対照物質処理群を、通常、試験ごとに設ける（32項参照）。将来的には、十分な習熟度が示されれば、陽性対照の必要性を減らせるかもしれない。試料採取時間を複数設ける（例えば、単回投与プロトコールを用いる）場合は、いずれか1つの試料採取時間に陽性対照を設けるだけでよいが、バランスの取れた計画にすべきである（48項参照）。同時陽性対照物質の投与は、必ずしも被験物質と同じ経路で行う必要はないが、接触部位での影響を測定する場合は、同じ経路で投与する必要がある。陽性対照物質については、検討するいずれの組織においてもDNA鎖切断を誘発することを示す必要があるが、EMSは、これまで検討されたいずれの組織においてもDNA鎖切断を引き起こしているため、最適な陽性対照と考えられる。陽性対照物質の用量は、本試験の性能と感度を正確に評価できる中等度の影響を引き起こすような用量とし、習熟度の検証期間中に試験施設で確立した用量反応曲線に基づいて選択する。同時陽性対照の動物における各組織および試料採取時間ごとの% tail DNAは、その動物種について事前に確立された試験施設の範囲と一致している必要がある（16項参照）。陽性対照物質の例とそれらの標的組織（げっ歯類）の一部を表1に示す。表1に示したもの以外の物質も、それが科学的に妥当であれば選択できる。

表 1：陽性対照物質の例とその標的組織の一部

物質名と CAS 登録番号
メタンスルホン酸エチル（CAS 番号 62-50-0）：あらゆる組織
エチルニトロソ尿素（CAS 番号 759-73-9）：肝臓、胃、十二指腸、空腸
メタンスルホン酸メチル（CAS 番号 66-27-3）：肝臓、胃、十二指腸、空腸、肺・気管支肺胞洗浄（BAL）細胞、腎臓、膀胱、肺、精巣、骨髄／血液
N-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン（CAS 番号 70-25-7）：胃、十二指腸、空腸
1,2-ジメチルヒドラジン 2HCl（CAS 番号 306-37-6）：肝臓、腸
N-メチル-*N*-ニトロソ尿素（CAS 番号 684-93-5)：肝臓、骨髄、血液、腎臓、胃、空腸、脳

陰性対照

30. 媒体のみで処理し、それ以外は処理群と同様に処理する陰性対照群を、各試験において、試料採取時間ごとおよび組織ごとに設ける。陰性対照の動物における各組織および試料採取時間ごとの% tail DNAは、その動物種について事前に確立された試験施設の背景データの範囲内である必要がある（16項を参照）。選択した媒体、投与回数、投与経路のいずれによっても有害作用や遺伝毒性作用が誘発されないことを示す背景または公表された対照

©OECD, (2016)

データがない場合は、完全な試験を行う前に予備試験を行い、媒体対照の許容性を確立しておく。

手順

動物数および性

31. コメットアッセイに関しては、性差をみるための雌動物のデータがほとんどないが、一般に、他の*in vivo*遺伝毒性反応は雌雄で同様であるため、雌雄いずれにおいても、ほとんどの試験を実施できると考えられる。性差（例：全身毒性、代謝、生物学的利用能などにおける差など。例として用量設定試験を含む）があることを示すデータがある場合は、雌雄両性を用いることが推奨される。この場合、例えば、反復投与毒性試験の一部として、雌雄を用いて試験することが適切である。雌雄を用いる場合は、要因計画を用いるのが適切である。要因計画を用いるデータの分析方法については、詳細を補遺2に示す。

32. 試験開始時（および習熟度の検証中）の試験群の規模は、雌雄いずれか一方のみを用いる場合も両性を用いる場合も、1群につき同性の分析可能な個体5匹以上（同時陽性対照群は、これより少ない個体数、29項参照）で構成することを目標とする。例えば、一部の医薬品のように被験物質のヒトへの曝露が性特異的な場合、試験は該当する性の個体を用いて行う。参考のため、典型的な試験の最大動物数は、33項に述べる項目に従って、投与群（3群）、同時陰性対照群および同時陽性対照群で行う試験（片性5匹/群）では、25～35匹の動物が必要となる。

投与スケジュール

33. 動物への投与を、2日以上にわたって毎日（すなわち、約24時間おきに2回以上）行い、試料採取を、最後の投与から2～6時間後に（またはTmax時に）1回行う(12)。長期間にわたる投与（例：28日間連日投与）での試料採取も許容される。コメットアッセイと赤血球小核試験の組み合わせの成功例が報告されている(10) (19)。ただし、コメットアッセイのための組織の試料採取に関わる実施手順については、別の種類の毒性評価のための組織採取の要件に沿って、慎重に考慮する必要がある。最後の投与から24時間後の試料採取は、一般的な毒性試験では典型的な操作であるが、コメットアッセイではほとんどの場合、適切ではない（試料採取時間については、40項を参照）。投与および試料採取を別のスケジュールで行う場合は、その妥当性を示すこと（補遺3参照）。例えば、複数回の試料採取と組み合わせた単回投与を行うことはできるが、複数の試料採取時間が必要なため、必要とされる動物数が増すことに注意する。ただし、例えば、被験物質の反復投与により、過剰な毒性が誘発される場合などには、その方が望ましいことがある。

©OECD, (2016)

34. 本試験をどのような方法で行うにしても、被験物質が陽性反応を示す、陰性反応を示す場合は、標的組織への曝露または毒性を裏付ける直接的・間接的証拠が示されている、または、限界用量を投与している場合は、受け入れ可能である（37項参照）。

35. 大用量を投与しやすくするため、被験物質を分割投与、すなわち、1日に2回、間隔を2～3時間以上開けずに投与する場合もある。このような場合は、最終投与の時間に基づいて、試料採取のスケジュールを立てる必要がある（40項参照）。

用量段階

36. 用量設定に役立つデータが他の関連試験から得られないために用量設定試験を実施する場合には、同一試験施設において、主試験で使用するのと同じ動物種、系統、性、投与法を使用し、用量設定試験を実施するための現行の方法に従って実施する。この試験の目的は、最大耐量（MTD）を決定することである。最大耐量は、試験期間の長さに相関した軽微な毒性作用（例：明らかな臨床症状（異常な行動や反応など）、軽度の体重増加抑制、標的組織に対する細胞毒性）を誘発するが、死亡も、安楽死を必要とする疼痛・苦痛・障害も認められない用量と定義される。毒性を示さない被験物質の最大用量（限界量）は、投与期間が14日以上の場合、1000 mg/kg体重/日とし、投与期間が14日未満の場合は、2000 mg/kg体重/日とする。特別な要件が適用されるある種の被験物質（例：ヒト用医薬品）の場合、限界量が上記とは異なる場合がある。

37. トキシコキネティクスが飽和を示す物質または長期投与後に曝露量が低下するような解毒過程を誘導する物質は、用量決定基準の例外と考えられ、個別の状況により評価する。

38. 急性および亜急性によるコメットアッセイでは、いずれの場合も、用量相関反応を確認するために、最大用量（最大耐量、投与可能最大量、最大曝露量、または限界量）に加えて、試料採取時ごとに適切な間隔（望ましくは公比√10未満）で少なくともさらに2用量選択する必要がある。ただし、用いた用量段階は、最大用量から毒性をほとんどまたは全く生じない用量までの範囲を含むことが望ましい。試験したすべての用量で標的組織に対する毒 性が認められた場合は、非毒性用量でさらに試験を実施することが望ましい（54～55項参照）。用量反応曲線の形をより詳細に調べることを目的とした試験では、投与群を追加する必要が ある。

投与

39. 試験を計画する際には、ヒトへの曝露が想定される経路を考慮する。したがって、混

©OECD, (2016)

餌、飲水、局所、皮下、静脈内、経口（強制経口投与による）、吸入、気管内、埋植などの曝露経路から、妥当な経路を選択できる。いずれの経路を選択するにしても、標的組織への十分な曝露が保証される必要がある。腹腔内投与は、ヒトへの曝露に関連する経路として一般的ではなく、特別な正当性がある場合（例：研究目的の陽性対照物質あるいは腹腔内投与する医薬品）にのみ使用すべきであり、一般的には推奨されない。一回の強制経口投与または注射により投与が可能な液体の最大容量は、動物の大きさによって異なる。一回の最大容量は、2 mL/100 g体重が使用できる水溶液の場合を除いて、1 mL/100 g体重を超えてはならない。これを超える容量を使用するには（ただし、動物福祉の法律で認められる場合）、正当な根拠が必要である。投与する溶液の濃度を調整して、可能な限りすべての用量で体重あたりの投与容量が一定になるようにする。

試料採取時間

40. 試料採取時間は、被験物質が標的組織において最大濃度に達し、DNA鎖切断が誘発されるのに必要な時間であり、かつ、DNA鎖切断の除去も修復も細胞死も起こらない時間でなければならないため、重要な変数である。コメットアッセイで検出されるDNA鎖切断に至る損傷の中には、持続時間が非常に短いものがある可能性があり、*in vitro*で試験された少なくともいくつかの物質について、そのことが示されている(52) (53)。したがって、このような一過性のDNA損傷が疑われる場合は、試料採取を十分早く（できれば、下記に述べる推奨時間よりも早く）行うようにして、損傷の消失を減らす措置を取る必要がある。最適な試料採取時間は、物質または経路によって異なる可能性があり、例えば静脈内投与や吸入曝露では、組織への急速な曝露が起こる可能性がある。したがって、可能であれば、試料採取時間は、薬物動態データ（例：最高血漿中または組織中濃度(C_{max})に達する時間(T_{max})あるいは複数回投与において定常状態に達する時間）に基づいて決定する。薬物動態データがない場合、遺伝毒性を測定するための適切な妥協案は、2回以上投与するときは最後の投与から 2～6時間後に、また単回投与するときは投与から2～6時間後と16～26時間後の2回、試料採取を行う。ただし、各個体とも、投与（2回以上投与するときは最後の投与）から剖検までの時間が同じになるように注意する。入手可能であれば、標的臓器における毒性作用の発現に関する情報も、適切な試料採取時間の選択に用いることができる。

観察

41. 動物の健康に関連した一般臨床観察を、1日に少なくとも2回、可能であれば毎日同じ時刻に投与後の予測される作用のピーク時間を考慮して実施し、記録する(54)。1日に少なくとも2回、各個体の疾病状況と死亡の有無について観察する。長期の試験の場合は、各個体とも、体重測定を週に少なくとも1回および試験期間の完了時に実施する。飼料交換時に毎回、および少なくとも週1回、摂餌量を測定する。被験物質を飲水投与する場合には、飲

©OECD, (2016)

水交換時に毎回、および少なくとも週1回、摂水量を測定する。致死的ではないが、過剰な毒性が認められる個体は、試験期間の完了前に安楽死させ、通常はコメット分析に用いない。

組織採取

42. 実質的には全ての組織でDNA鎖切断（コメット）の誘発を検討することが可能なため、採取する組織を選択するための理論的根拠を明確にし、それを当該被験物質についての既存のADME、遺伝毒性、発がん性、その他の毒性データを考慮した上での試験実施理由に基づいている必要がある。考慮すべき重要な要因には、被験物質の投与経路（ヒトへの曝露の可能性がある経路に基づく）、予測される組織分布と吸収、代謝の役割、および推定される作用機序などがある。肝臓は、最もよく研究され、かつ最もデータが得られている組織である。したがって、特に背景情報がない場合や、標的組織が特定されていない場合は、肝臓の試料採取が妥当と考えられる。これは、肝臓が異物代謝の主要部位であり、親化合物と代謝物の両方に高濃度で曝露されることが多いためである。場合によっては、直接接触部位（例えば、被験物質の経口投与における腺胃または十二指腸・空腸、吸入曝露における肺）での検討が、最も適切である可能性がある。追加または代替組織の選択は、その試験を行っている具体的な理由に基づいて行う。ただし、試験施設がこれらの組織を扱う習熟度や同時に複数の組織を扱う能力が示されている場合は、同じ個体の複数の組織で検討するのが有用である。

標本作製

43. 下記の44～49項で述べる手順では、溶液または安定な懸濁液はいずれも、有効期限内に使用するか、あるいは必要に応じて用時調製することが重要である。また、下記の項において、(i) 剖検後に各組織を摘出するのにかかる時間、(ii) 各組織を処理して細胞・核の懸濁液にするのにかかる時間、および (iii) 懸濁液を処理し、スライドを作製するのにかかる時間は、いずれも重要な変数と考えられ（補遺1の定義参照）、この3つのステップについては、方法の確立と習熟度の検証を行っている間に、それぞれの許容できる時間を決定しておく必要がある。

44. 被験物質の最終投与後、適切な時点で、動物福祉に関する法令と3Rの原則に則って動物を安楽死させる。選択した組織を摘出して切断し、一部をコメットアッセイ用に採取する。同時に、標準的な方法に従って、組織の同じ部分から切片を切り出し、病理組織学的分析用にホルムアルデヒド溶液または適切な固定液に浸ける（55項参照）(12)。コメットアッセイ用の組織は、ホモジナイズ用緩衝液中に入れ、冷やしたホモジナイズ用緩衝液で十分に洗浄して残留血液を除去し、次の操作まで、冷却したホモジナイズ用緩衝液中に保存する。肝臓や腎臓などについては、*in situ*灌流も可能である。

©OECD, (2016)

45. 細胞や核の単離の方法について多くの論文が発表されている。これらの方法には、肝臓や腎臓などの組織の細切、消化管の粘膜表面の剥離、ホモジナイズ、酵素による消化などがある。JaCVAMバリデーション試験は、単離細胞でしか試験を行っていないため、方法の確立の観点と、習熟度の検証のためにJaCVAM試験のデータを参照できるという観点から、単離核よりも単離細胞のほうが望ましい。ただし、単離細胞と単離核のいずれを使用しても、試験結果に本質的な違いはないことが示されている(8)。また、細胞や核を単離する方法が異なっても（例：ホモジナイズ、細切、酵素による消化、メッシュ濾過）、同様の結果が得られている(55)。したがって、単離細胞と単離核のいずれも使用可能である。試験施設は、組織特異的に単細胞・核を単離する方法について十分な評価と検証を行う必要がある。40 項で述べたように、コメットアッセイで検出できるDNA鎖切断を引き起こす損傷の中には、持続時間が非常に短いものがある可能性がある(52) (53)。したがって、単細胞・核の懸濁液を調製するのにどのような方法を用いるにしても、動物を安楽死させた後、可能な限り早く組織を処理し、損傷の除去を削減できる条件下（例：低温での組織維持）に置くことが重要である。細胞懸濁液は、使用時まで氷冷保存し、試料間のばらつきを最小限に抑え、かつ適切な陽性および陰性の対照反応が示されるようにする。

スライド標本の作製

46. スライド標本の作製は、単細胞・核の調製後、できる限り早く（理想的には、1時間以内)行うことが望ましいが、動物の死亡からスライド標本の作製までの間の温度と時間を、試験施設の条件下で厳格に管理および検証する必要がある。スライド標本を作製するための低融点アガロース（通常、0.5～1.0%）に添加する細胞懸濁液の量は、低融点アガロースの濃度が0.45%より低くならないようにする。適切な細胞密度は、コメット（彗星）の測定に用いられる画像解析システムによる。

細胞溶解

47. 細胞溶解条件も重要な変数であり、ある種のDNA修飾（特定のDNAアルキル化や塩 基付加体）に起因するDNA鎖切断を妨げる可能性がある。したがって、実験中、すべてのスライド標本について、細胞溶解条件をできる限り一定にすることが推奨される。作製したスライド標本は、紫外線成分が含まれている可能性のある白色光への曝露をできるだけ抑えることのできる照明条件（黄色灯や遮光など）下において、約2～8℃で、冷却した溶解液中に1時間以上（または一晩）浸漬する。このインキュベーション後、アルカリ巻き戻しに進む前に、スライド標本を洗浄して残留界面活性剤と塩分を除去する。この操作では、精製水、中和緩衝液、またはリン酸緩衝液の使用が可能である。電気泳動緩衝液も使用が可能であり、電気泳動槽をアルカリ条件で維持できる。

©OECD, (2016)

巻き戻しと電気泳動

48. スライド標本の表面が完全に覆われるように（覆う深さも、泳動間で一致していること）、電気泳動液を十分に満たしたサブマリン型電気泳動装置のプラットフォーム上にスライド標本をランダムに置く。サブマリン型以外のコメットアッセイ用電気泳動装置で、能動冷却・循環、大容量電源を備えたものは、覆う溶液の高さが高くなるので、電圧を一定に保つために電流が大きくなる。電気泳動槽内の傾向や周辺効果の影響を軽減し、かつ、バッチ間のばらつきを最小限に抑えるため、バランスを考えて電気泳動槽にスライド標本を配置する。すなわち、電気泳動実施毎に、各動物のスライド標本が同数含まれ、かつ、異なる用量群、陰性対照、および陽性対照から採取した試料が含まれるように配置する。スライド標本は、DNAを巻き戻すために少なくとも20分間放置してから、電気泳動にかける。電気泳動は、コメットアッセイの感度と定量範囲が最大限となる（すなわち、陰性対照および陽性対照の% tail DNAが許容レベルで、感度が最大限となる）管理された条件下で行う。DNAの移動度は、電気泳動時間とも電位（V/cm）とも直線的相関関係がある。JaCVAM試験に基づくと、0.7 V/cmで少なくとも20分間の電気泳動を実施する。電気泳動時間は重要な変数と考えられ、定量範囲が最適化されるように、電気泳動時間を設定する。電気泳動時間を長くすると（感度を最大にする場合は30～40分）、通常は、既知の変異原に対する陽性反応が強くなる。ただし、泳動時間を長くすると、対照試料において過剰な移動も引き起こされる。いずれの実験においても、電圧は一定に保ち、電圧以外のパラメータもばらつきを小さくして指定範囲内とする（例えば、JaCVAM試験では、0.7 V/cmで開始時電流300 mAであった）。緩衝液の深さは、必要条件を満たすように調整し、泳動時間中維持する必要がある。電気泳動の開始時および終了時の電流を記録しておく。したがって、最適条件の決定は、試験施設が検討を行う各組織の取扱いに習熟することを検証する最初の段階で行う。電気泳動液の温度は、巻き戻しおよび電気泳動時間中、低温（通常は2～10℃）で維持する (10)。巻き戻しの開始時、電気泳動の開始時および終了時の温度を記録する。

49. 電気泳動の完了後、スライド標本の浸漬/洗浄を中和緩衝液中で少なくとも5分間行う。ゲルを染色し、「新鮮」（例：1～2日以内）なうち、あるいは後で（例：染色後1～2週間以内）計測するために脱水することもできる(56)。ただし、条件は、習熟度の確認中に検討し、検討条件ごとに背景データを分けて収集・保持する。後者の場合、スライド標本を無水エタノール中に少なくとも5分間浸漬して脱水し、風乾後、計測まで室温または容器に入れて冷蔵庫内で保存する。

測定法

50. 自動または半自動画像解析装置を用いて、コメットを定量的に計測する。スライド標本は、適切な蛍光染色液（SYBR Gold、Green I、ヨウ化プロピジウム、臭化エチジウムなど）

©OECD, (2016)

で染色し、落射蛍光装置と適切な検出器またはデジタル（例：CCD）カメラを備えた顕微鏡を用いて適切な倍率（例：200倍）で測定する。

51. 細胞は、コメット像のアトラス(57)に従って3種類、すなわち計測に値する（scorable）、計測に値しない（non-scorable）、「ヘッジホッグ」に分類される（詳細については、56項を参照）。アーチファクトを避けるため、計測に値する細胞（隣接している細胞と干渉せずに、ヘッドとテールが明確に定められる）のみを、% tail DNAの計測に用いる。計測に値しない細胞については、頻度を報告する必要はない。ヘッジホッグの頻度は、1試料につき少なくとも150細胞の目視計測（ヘッジホッグは明確に定められるヘッドが存在せず、画像解析による検出が容易ではないため）に基づき算出し（詳細については、56項を参照）、別途記載する。

52. 解析用のすべてのスライド標本は、陽性対照と陰性対照のスライド標本も含めて、個別にコード化し、処理条件がわからないように盲検下で計測する。試料ごとに（各動物の各組織当たり）少なくとも150細胞（ヘッジホッグを除く、56項参照）を解析する。Smithら(5)の分析によると、1用量につき動物5匹以上を用い（同時陽性対照群は、これより少ない動物数。29項を参照）、1匹につき150細胞を計測すれば、十分な統計学的検出力が得られる。スライド標本を用いる場合は、1群につき5匹を用い、1試料につき2枚または3枚のスライド標本を計測すればよい。スライド標本の観察は、テールの重なりのない密度の場所数箇所で行う。スライド標本の辺縁での計測は避ける。

53. コメットアッセイにおけるDNA鎖切断は、% tail DNA、tail length、tail momentなどの独立した指標によって測定できる。適切な画像解析装置を使用すれば、これらはいずれも測定が可能である。ただし、% tail DNA（別称% tail intensity）は、結果の評価および解釈に使用することが推奨されており(12) (40) (41) (42)、テールにおけるDNA断片の輝度によって求められ、当該細胞の全輝度に対する割合として表示される (13)。

組織損傷と細胞毒性

54. コメットアッセイにおける陽性の結果は、遺伝毒性だけに起因するものではない可能性があり、標的組織の毒性も、DNA移動度が増加する原因となることがある(12) (41)。逆に、既知の遺伝毒性物質においては、弱いまたは中等度の細胞毒性が認められる場合が多く(12)、コメットアッセイのみでは、DNAの移動が遺伝毒性によって誘発されたものであるのか、細胞毒性によって誘発されたものであるのかの区別が不可能である。ただし、DNA移動度の増加が認められた場合は、結果の解釈に役立つため、1つ以上の細胞毒性指標の検討を行うことが推奨される。細胞毒性の明らかな証拠がある場合、DNA移動度の増加は、慎重に解釈しなければならない。

©OECD, (2016)

55. 多くの細胞毒性指標が提案されており、とりわけ病理組織学的変化は組織への毒性を示す適切な指標と考えられる。炎症、細胞浸潤、アポトーシス性変化、壊死性変化などの所見は、DNA移動度の増加と関連しているが、JaCVAMバリデーション試験 (12) によって示されたように、DNA移動度の増加と必ず関連している病理組織学的変化の決定的なリストは得られていない。生化学検査値（例：AST、ALT）の変化からも、組織損傷について有用な情報が得られる可能性があり、また、カスパーゼ活性、TUNEL染色、Annexin V染色などの付加的な指標も考慮に入れてよい。ただし、後者の指標を*in vivo*試験に適用した発表データは限られており、他の指標よりも信頼性で劣る可能性がある。

56. ヘッジホッグ（またはcloud、ghost細胞）とは、小さい（または存在しない）ヘッドと拡散した大きなテールからなる顕微鏡画像を示す細胞である。重大な損傷を受けた細胞であると考えられるが、ヘッジホッグの原因は不明である（補遺3参照）。ヘッジホッグの出現が認められれば、画像解析による% tail DNA測定値は信頼できず、したがってヘッジホッグの評価は別に行う必要がある。ヘッジホッグの出現を記録および報告する必要があり、被験物質に起因すると考えられる意味のある増加があれば、注意して検討し、解釈すべきである。被験物質の作用機序に関する知見が、そのような解釈の際に役立つ可能性がある。

データおよび報告

結果の処理

57. 動物を実験単位とし、個体ごとのデータと要約した結果の両方を表形式で示す。データは階層的性質を有するため、スライド標本ごとに% tail DNAの中央値を算出し、個体ごとに% tail DNAの中央値の平均値を算出し，個体の平均値とすることを推奨する(12)。各個体の平均値から群ごとに平均値を算出し、群の平均値とする。報告書には、これらの値をすべて含める。科学的かつ統計学的妥当性を示すことができれば、他の方法（53項参照）を用いてもよい。統計解析は、さまざまな方法(58) (59) (60) (61)で行うことができる。これらの参考文献で述べられているように、使用する統計学的方法を選択する時は、細胞測定値がゼロである場合の影響を軽減するために、データの変換（例：対数変換、平方根変換）や小さい数（例：0.001）を全ての値に（ゼロでない値にも）加算する必要性について考慮する。雌雄両性を用いる場合の、性差の分析についての詳細、および差が認められた場合または認められない場合に続けて行うデータの解析は、補遺2に示す。毒性および臨床所見に関するデータも報告する。

©OECD, (2016)

許容基準

58. 試験の許容基準は、下記に基づく。

a. 同時陰性対照は、16項で述べたように、試験施設の陰性対照背景データベースに追加できるとみなせること。
b. 同時陽性対照（29項参照）が、陽性対照背景データベースと一致するものであり、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こと。
c. 適切な細胞数および用量数を分析していること（50項、36～38項参照）。
d. 最高用量の選択基準が、36項に述べたものと一致していること。

結果の評価と解釈

59. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陽性と判定される。

a) 少なくとも1用量で、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を示しており、
b) この増加を適切な傾向検定で評価した場合に、用量依存性がみられ、
c) 当該結果は、実施した動物種、媒体、投与経路、組織および投与回数での陰性対照背景データの分布外である。

上記の許容基準をすべて満たす被験物質は、本試験系で検討した組織においてDNA鎖切断の誘発能があると考える。上記基準のうち1つまたは2つしか満たさない場合には、62項を参照のこと。

60. すべての許容基準が満たされ、以下に該当する場合は、被験物質は明らかに陰性と判定される。

a) いずれの試験用量でも、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加を認めず、
b) 適切な傾向検定で評価した場合、用量依存性の増加が認められず、
c) すべての結果が、実施した動物種、媒体、投与経路、組織、および投与回数での陰性対照背景データの分布内にあり、
d) 標的組織への曝露や標的組織に対する毒性を裏付ける直接的または間接的証拠が示されている。

このような場合、被験物質は、本試験系で検討した組織においてDNA鎖切断の誘発能がないと考える。

61. 明らかな陽性反応または明らかな陰性反応の場合、その結果を確認する必要はない。

62. 反応が明確な陰性でも陽性でもない（すなわち、59項あるいは60項に挙げた基準をすべて満たしているわけではない）場合に、結果の生物学的妥当性を明確にするには、専門

©OECD, (2016)

家による試験データの判定やこれまでに完了した試験のさらに詳細な分析により評価する必要がある。追加の細胞計測（適切な場合）あるいは、場合によっては実験条件を最適化して（例：用量間隔、他の投与経路、他の試料採取時間、他の組織）再試験を行うことが、有用である。

63. まれに、より詳細な検討を行っても、被験物質が陽性、陰性のいずれか結論を出せず、したがって、試験の結論が不明確（equivocal）とされる場合がある。

64. 陽性または不明確な結果の生物学的妥当性を評価するには、標的組織における細胞毒性に関する情報が必要である（54～55項参照）。陽性または不明確な結果が、明らかな細胞毒性の証拠がある場合にのみ認められる場合は、最終的な結論を裏付けるのに十分な情報がない限り、その試験は、遺伝毒性について不明確と結論される。試験結果が陰性で、試験したいずれの用量でも細胞毒性徴候が認められた場合、追加試験を非毒性用量で行うことが望ましい。

試験報告書

65. 試験報告書には以下の情報を含める。

被験物質：

- 供給元、入手可能であればロット番号
- 既知であれば、被験物質の安定性、使用期限あるいは再分析日

単一成分物質：

- 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IUPAC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、混合物：

- 構成成分の化学的特定名（上記参照）、含有量および関連のある物理化学的性質によるできる限りの特徴付け

溶媒／媒体：

- 溶媒／媒体の選択理由
- 既知であれば、溶媒／媒体中の被験物質の溶解性および安定性
- 投与液の調製法

©OECD, (2016)

- 投与液の分析結果（例：安定性、均一性、目標濃度）

供試動物：

- 使用した動物種／系統および選択の科学的かつ倫理的妥当性
- 動物数、週齢、性
- 供給元、飼育条件、飼料、エンリッチメントなど
- 試験の開始時と終了時における各個体の体重（群ごとの体重の範囲、平均値、標準偏差を含む）

試験条件：

- 陽性対照および陰性（溶媒）対照のデータ
- 用量設定試験の結果（実施した場合）
- 用量設定の理論的根拠
- 被験物質調製の詳細
- 被験物質投与の詳細
- 投与経路選択の理論的根拠
- 注射部位（皮下投与試験または静脈内投与試験の場合）
- 試料調製の方法、利用可能な場合、特にコメットアッセイで陽性反応が認められた物質では、病理組織学的分析の方法
- 組織選択の理論的根拠
- 陰性の結果が得られた場合、被験物質が標的組織に達したことまたは全身循環の確認方法
- 該当する場合、飼料／飲水中の被験物質濃度（ppm）と摂餌量／摂水量から算出した実際の用量（mg/kg体重/日）
- 飼料および飲水の品質についての詳細
- 処理および試料採取のスケジュールについての詳細な記述と、選択の妥当性（可能であれば、トキシコキネティクスのデータなど）
- 鎮痛・無痛の方法
- 安楽死の方法
- 組織の分離と保存の方法
- 単細胞・核の懸濁液を調製する方法
- 各試薬の供給元およびロット番号（可能な場合）
- 細胞毒性の評価の方法
- 電気泳動の条件
- 用いた染色法
- コメットの計測方法

©OECD, (2016)

結果：

- 個々の実験動物について試験前と試験期間中に一般状態観察を行った場合は、その結果
- 実施した場合は、細胞毒性の証拠
- 試験の投与期間が1週間を超える場合：試験中の各個体の体重（各群の体重の範囲、平均値、標準偏差を含む）；摂餌量
- 該当する場合、用量反応関係
- 組織・個体ごとの、% tail DNA（または他の評価基準 (選択した場合)）、スライド標本ごとの中央値、動物ごとの平均値、群ごとの平均値
- 評価した組織ごとの範囲、平均値・中央値、標準偏差を伴う、同時および陰性対照の背景データ
- 同時および陽性対照の背景データ
- 肝臓以外の組織の場合、陽性対照を用いた用量反応曲線。これは、習熟度の検証中に収集したデータから作成することが可能であり（16～17項参照）、現時点での参考文献の引用とともに、その組織における対照に対する反応の大きさとばらつきの妥当性を示す。
- 用いた統計解析および方法
- 反応を陽性、陰性、または不明確と判定する際の基準
- 各群および動物1匹あたりのヘッジホッグの出現頻度

結果の考察

結論

文献

©OECD, (2016)

参考文献

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. et al. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp.143-63.

(5) Smith, C.C, et al. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A.et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. et al (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R.et al.(2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro*and *in vivo*genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

(9) Singh, N.P.et al. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. et al. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2-and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990),Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “Comet” assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R(2004),The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol.26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology*

©OECD, (2016)

and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. et al. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z.(2010),Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. et al. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

(25) Toyoizumi,T. et al. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. et al. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) Wada, K. et al. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) Wang, A. et al. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. et al. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and*

©OECD, (2016)

Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. et al.(2012),Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. et al. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32)Sekihashi, K.et al. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33)Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34)Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35)Cordelli, E. et al. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36)Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37)Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B. et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. et al. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. et al. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp.

©OECD, (2016)

109-11.

(45) Forchhammer, L. et al. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46)Azqueta, A. et al. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

(47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

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

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) OECD (2009), *Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

(51) OECD (2009), *Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co. Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. et al. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

©OECD, (2016)

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

©OECD, (2016)

補遺 1

用語の定義

アルカリ単細胞ゲル電気泳動：初期のDNA損傷を個々の細胞/核のレベルで検出するための高感度な手法。

コメット：核様体が1つの電気泳動電場をかけられた後にとる形。コメット（彗星）に似ているため、こう呼ばれる。ヘッド（head、頭）の部分は核であり、テール（tail、尾）の部分は電場内で核から移動したDNAで構成されている。

重要な変数・パラメータ：プロトコールの変数のうち、小さな変更がコメットアッセイの結論に大きな影響を与え得るもの。重要な変数は、組織特異的である可能性がある。重要な変数の変更は、特に試験内では、その変更によってアッセイの反応（例えば、陽性および陰性対照の強さやばらつきによって示されるような反応)がどのように変化するかを考慮せずに行わないこと。試験報告書には、試験中および試験施設の標準プロトコールと比較して実施した重要な変数の変更を一覧表示し、それぞれの変更の妥当性を示す。

tail intensity または% tail DNA：コメットの全輝度（ヘッド＋テール）に対するテールの輝度の割合に相当する。DNA 切断の量を反映し、百分率（%）で示す。

©OECD, (2016)

補遺2

*In vivo*コメットアッセイにおいて性差を特定するための要因計画

要因計画およびその解析

1. 要因計画においては、各濃度で雌雄各5匹以上を試験するため、最低40匹（雌雄各20匹+関連する陽性対照）を使用するデザインとなる。

2. ここで述べる要因計画は，単純な要因分析法の一つであり、主効果として性別と濃度を用いた二元配置分散分析法である。データの分析には、統計ソフトウェアRだけでなく、多くの標準的な統計ソフトウェアパッケージ（SPSS、SAS、STATA、Genstatなど）も用いることができる。

3. 分析では、データセットのばらつきを、性別間のばらつき、濃度間のばらつき、および性別と濃度間の相互作用に関連するばらつきに分割する。同濃度・同性別の複数動物間のばらつきの推定値に対して、各項を検定する。基本的な方法論については、多くの標準的な統計学の教科書（参考文献を参照）や統計ソフトウェアパッケージに搭載されている「ヘルプ」を参照されたい。

4. まず、分散分析（ANOVA）表[1]の性別×濃度の交互作用項を調べる。有意な交互作用項がない場合は、雌雄または全濃度レベルを通した総数値を用いて、分散分析のプールした群内のばらつきに基づき、用量間の有効な統計学的検定を行うことができる。

5. 次に、濃度間のばらつきの推定値を分割して、全濃度にわたる反応の線形対比および二次対比の検定を行う。性別×濃度の交互作用が有意である場合は、この項も、線形×性別および二次×性別の交互作用の対比に分割できる。これらの項を用いると、濃度反応は雌雄で同じ傾向があるか、あるいは雌雄間で異なる反応があるかについて検定が行える。

6. 群内にプールしたばらつきの推定値は、平均値の差のペアワイズ検定に用いることができる。これらの比較は、陰性対照群との比較のように雌雄間や各濃度間でその平均値で行うことができる。有意な交互作用が認められた場合、片性の各濃度間あるいは同一濃度の雌雄間の平均値を比較することができる。

[1] 一般線形モデル（general linear model：GLMs）を用いるなどのモデル化法を採用する統計専門家は、当該手法とは異なるが同等の方法で分析を進めることもある。この方法は、コンピュータの無い時代に開発された統計値を計算するためのアルゴリズム法に遡る従来の分散分析表を常に求めるとは限らない。

©OECD, (2016)

参考文献

実験計画法で用いられる最も簡単な2因子解析からより複雑な解析までを含めて、要因計画の理論、デザイン、方法論、分析および解釈について説明した統計のテキストが多数ある。すべてを網羅しているわけではないが、下記にそのような参考書を示す。参考書によっては、比較可能なデザインの製作例を掲載したり、さまざまなソフトウェアパッケージを用いて分析を実行するためのコードが付属している。

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

©OECD, (2016)

補遺3

現時点における本試験法の限界

現状の知見により、*in vivo*コメットアッセイにはいくつかの限界が伴う。規制上の安全性に関する問題に応えるべく、本試験を適用してより多くの経験を積み、これらの限界が減ることや、その定義が狭まることが期待される。

1. DNA損傷の種類によっては存続時間が短く、修復が速すぎて最後の投与から24時間以上経過すると認められなくなるものもある。存続時間の短いDNA損傷については、その種類や引き起こす可能性のある物質を特定することのできるリストがなく、また、検出可能な時間についてもわかっていない。最適な試料採取時間も物質または経路特異的である可能性があり、試料採取時間は、動態データ（例えば、T_{max} (最高血漿中または組織中濃度に達する時間)）が得られるのであれば、そのデータから決定すべきである。本ガイドラインを裏付けるほとんどのバリデーション試験では、剖検は最終投与から2または3時間後と明記されている。また、公表文献のほとんどの試験では、最終投与は屠殺の2～6時間前と記述されている。したがって、本試験ガイドラインでは、これらの経験を根拠として、最終投与は、特段の断りのない限り剖検の2～6時間前の特定の時点に行うことを推奨する。

2. 短命なDNA損傷の検出について、本試験の感度を調べた試験データで、混餌投与や飲水投与後と強制経口投与後で比較したものは確認できなかった。DNA損傷は混餌・飲水投与の後でも検出されているが、その報告は、強制経口や腹腔内投与の経験がはるかに多いのに比べると、相対的に少ない。したがって、存続時間の短いDNA損傷を誘発する物質を混餌または飲水投与した場合、本試験法の感度は低下する可能性がある。

3. 施設間試験で、肝臓および胃以外の組織を用いて実施されたものがないため、肝臓以外の組織で感度良くかつ再現性のある反応を得る方法に関する推奨事項（陽性対照および陰性対照の範囲など）は確立されていない。肝臓の場合、陰性対照値の下限を設けることについても、意見の一致が得られていない。

4. *In vitro*での細胞毒性の交絡影響を証明する発表はいくつかあるが、*in vivo*でのデータで発表されたものがほとんどないため、細胞毒性の基準として1つだけを推奨することはできない。炎症、細胞浸潤、アポトーシス性変化、壊死性変化などの病理組織学的変化は、DNA移動度の増加に関与しているが、JaCVAMバリデーション試験（OECD、2014）で証明されたとおり、これらの変化は必ずしも陽性のコメットアッ

©OECD, (2016)

セイ結果をもたらすわけではなく、DNA移動度の増加に必ず関与している病理組織学的変化の決定的なリストも得られていない。細胞毒性の指標として、以前にヘッジホッグ（またはcloud、ghost細胞）が提案されているが、ヘッジホッグの原因は不明である。ヘッジホッグの原因が、物質依存性の細胞毒性や、試料調製中に始まる機械的・酵素誘発性損傷（Guerardら、2014）や被験物質の遺伝毒性のより極端な影響である可能性を示唆するデータがある。他のデータでは、ヘッジホッグは、広範囲におよぶおそらく修復可能なDNA損傷によるものであることが示されている（Lorenzoら、2013）。

5. 後の分析のために、組織または細胞核を凍結することに成功している。凍結により、通常は、媒体対照と陽性対照に対する反応に測定可能な影響がもたらされる（Recioら、2010：Recioら、2012：Jacksonら、2013）。凍結した組織や細胞核を使用する場合、試験施設は、凍結方法の適用性を確認し、媒体処理群の標的組織における% tail DNAが許容可能な低い範囲にあることおよび陽性反応の検出がまだ可能であることを確認する必要がある。参考文献には、組織の凍結方法としてさまざまなものが記述されている。ただし、組織を凍結・解凍するための最良の方法と、反応の潜在的な変化が本試験の感受性に影響を及ぼすかどうかを評価するための方法について、現在のところ、合意は得られていない。

6. 近年の研究によると、重要な変数のリストは引き続き短縮され、重要な変数に関するパラメータはより正確に定義されるようになることが期待される（Guerardら、2014）。

参考文献

Guerard,M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig(2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

Jackson, P. et al. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

Lorenzo ,Y. et al. (2013),The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead,*Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on

©OECD, (2016)

Testing and Assessment, Nos. 195 and196, OECDPublishing, Paris.

Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

Recio, L. et al. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

©OECD, (2016)