OECD/OCDE

2016/07/29

試験ガイドライン No.490

チミシンキナーゼ遺伝子を用いた
哺乳類細胞の *in vivo* 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 (2016), Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264908-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

OECDの化学物質の試験に関するガイドライン

チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞のin vitro遺伝子突然変異試験

はじめに

1. 経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドラインは、科学の進歩、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し、改訂が行われている。マウスリンフォーマ試験（MLA）、およびチミジンキナーゼ（TK）遺伝子座を用いたヒトリンパ 芽球株化細胞（TK6）試験は、もともと 1984 年に採択された試験ガイドライン 476 に含まれており、このガイドライン 476 は 1997 年にその当時までにもたらされた科学の進歩に基づき改訂された。その後、遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ（IWGT）の MLA 専門家作業グループが、MLA の試験許容基準およびデータ解釈に関する国際的な調和を図った勧告を策定した(1) (2) (3) (4) (5)。これらの勧告は、今回新たに作成された試験に関するガイドライン（TG 490）に組み込まれている。TG 490 は MLA ならびに TK 遺伝子座を使用する TK6 試験のために作成された。MLA が規制対応目的に広く使用されている一方、TK6 の使用はかなり少ない。評価項目の類似性にもかかわらず、2　つの細胞株には互換性がなく、ある特定の規制目的への使用に対しては他方よりも一方を望ましいとしていることに注意すべきである。例えば、MLA　の妥当性は、遺伝子突然変異だけでなく、被験物質の染色体構造異常誘発能を検出することでも確認された。遺伝毒性試験およびその試験ガイドラインに対して行われた近年の変更概要について、簡潔な情報を示す文書が作成されている (6)。

2. 哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験は、被験物質によって誘発される遺伝子突然変異を検出することを目的としている。これらの試験に用いられる細胞株で、レポーター遺伝子、特に内因性チミジンキナーゼ遺伝子（ヒト細胞では *TK*、げっ歯類細胞では *Tk* で、本試験ガイドラインでは *TK* と総称する）の前進突然変異を測定する。本ガイドラインでは以下の 2 つの細胞株の使用を意図している：マウスリンパ腫細胞 L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C（一般にはL5178Yと呼ぶ）およびヒトリンパ芽球様細胞 TK6（一般には TK6 と呼ぶ）。2 つの細胞株は、それぞれの由来、細胞増殖、p53 の状態などが異なっているが、*TK* 遺伝子突然変異試験については、本ガイドラインに記載されている通り、どちらの細胞種においても同様の方法で実施することができる。

© OECD, (2016)
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。
本ガイドラインは、書面による手続により 2016 年 7 月 29 日に OECD 理事会で採択された［C(2016)103］。

3. チミジンキナーゼ遺伝子の常染色体ヘテロ接合性は突然変異後に *TK*$^{+/-}$-から *TK*$^{-/-}$-へ変化し、細胞はチミジンキナーゼ酵素欠損細胞となることで生存コロニーの検出が可能となる。この欠損は、遺伝子突然変異（点突然変異、フレームシフト突然変異、小さな欠失など）ならびに染色体に生ずる事象（大きな欠失、染色体再配列、および体細胞組み換え）の両方に起因する。染色体に生ずる事象は、ヒト腫瘍形成における腫瘍抑制遺伝子の一般的な遺伝的変化であるヘテロ接合性の消失として表される。理論上、紡錘体の損傷や有糸分裂の不分離から生じる、*TK* 遺伝子をもつ染色体全体の消失は、MLA で検出することができる。実際に、分子細胞遺伝学的解析によると、MLA における *TK* 突然変異体のいくつかは、染色体不分離の結果であることが明らかになっている。しかしながら、標準的な細胞毒性基準（本ガイドラインに記載）を適用した場合、*TK* 遺伝子突然変異試験は異数性誘発物質を確実には検出できないことが、証拠の重み付けをもって示されている。したがって、これらの試験を異数性誘発物質検出のために用いるのは不適当である(7) (8) (9)。

4. *TK* 遺伝子突然変異試験では、2 種類の異なる形質の *TK* 変異体が生ずる；すなわち、TK ヘテロ接合体細胞と同じ速度で増殖する変異体（normal growing mutants; NG 変異体）と、倍加時間を延長して増殖する変異体（slow growing mutants; SG 変異体）である。それぞれの変異体は、MLA においては大きなコロニーおよび小さなコロニーとされ、TK6 試験では早く出現するコロニーおよび遅く出現するコロニーとして認識される。大コロニーおよび小コロニーのMLA 変異体の分子細胞遺伝学的性質は、詳細に調べられている (8) (10) (11) (12) (13)。早期出 現コロニーおよび遅延出現コロニーのTK6 変異体の分子細胞遺伝学的性質についても広範囲に調べられている (14) (15) (16) (17)。両方の細胞種において、SG 変異体は倍加時間を延長し、遅延出現または小コロニーの原因となる *TK* 遺伝子座近傍の推定増殖調節遺伝子に遺伝的損傷を負っている(18)。SG 変異体の誘発には、染色体レベルの大きな構造変化を誘発する物質が関与している。*TK* 遺伝子座近傍の推定増殖調節遺伝子に遺伝的損傷を受けていない細胞は、親株細胞と同様の速度で増殖してNG 変異体となる。NG 変異体の誘発には、主に点突然変異原として作用する物質が関与している。したがって、すべての変異体を網羅して被験物質に よって誘発された損傷の種類（突然変異あるいは染色体構造異常）をある程度明らかにする ためには、SG 変異体および NG 変異体の両方を測定することが必要である (10) (12) (18) (19)。

5. 試験ガイドラインは、MLA と TK6 試験の両方に適用する一般的な情報ならびにそれぞれの試験に特化したガイダンスを提供するように構成されている。

6. 用語の定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項および制限

7. *In vitro* で実施する試験は、一般的に外因性の代謝活性物質を利用する必要がある。外因性代

謝活性化系は *in vivo* での状況を完全に再現するものではない。

8. 見せかけの陽性結果、すなわち被験物質の細胞の遺伝物質への直接的相互作用ではなく、試験系との相互作用に起因する陽性結果が起こるような条件を避けるよう注意を払う必要がある。そのような条件には、pH や浸透圧の変化、培地成分との相互作用(20) (21)、または、過度の細胞毒性(22) (23) (24)がある。28 項で示した推奨最高レベルを超える細胞毒性は、MLA および TK6 試験において過度に当たると考えられる。さらに、チミジン類縁体、またはそれに類似の作用を有する被験物質は、細胞処理の間に背景の自然発生突然変異体の選択的増殖により変異体頻度を増加させるため、適切な評価のための追加の試験法が必要となることに留意する(25)。

9. 工業用ナノ物質に関しては、本試験ガイドラインの特別な適用が必要と思われるが、本試験ガイドラインでは言及していない。

10. 混合物について、規制対応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

11. *TK*$^{+/-}$-から *TK*$^{-/-}$-への突然変異によりチミジンキナーゼ酵素活性が欠損した変異細胞は、ピリミジン類縁体であるトリフルオロチミジン（TFT）の細胞増殖抑制作用に抵抗性がある。*TK* 保持細胞はTFT に対して感受性があり、細胞の代謝が抑制され、細胞分裂を停止する。このように、変異体細胞は TFT 存在下で増殖でき目視できるコロニーを形成するが、TK 酵素を保持する細胞は増殖できない。

12. 細胞懸濁液を、外因性の代謝活性化系（19 項参照）の存在下および非存在下で、適切な時間（33 項参照）被験物質に曝露した後、継代培養して細胞毒性を決定し、形質発現させた後、突然変異体を選択する。細胞毒性は、MLA では相対総増殖率（RTG：25 項参照）、TK6 試験では相対生存率（RS：26 項参照）より決定できる。処理した細胞を増殖用の培地で維持する。その際、選択された細胞種ごとに十分な培養期間を設定して（37 項参照）、誘発された変異がほぼ至適な形質を発現できるようにする。発現期間経過後、突然変異体コロニーを検出するための選択薬剤を含んでいる培地、およびコロニー形成率（生存数）を測定するために選択薬剤を含まない培地に、それぞれ既知の細胞数を播種することにより、突然変異体頻度を決定する。適切な培養時間後に、コロニーを計測する。突然変異体頻度は、変異体選択時のコロニー形成率で補正された変異体コロニー数に基づき算出される。

試験方法

準備

細胞

13. MLA の場合：MLA は、L5178Y 細胞の *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C 株を用いて開発され、かつ特性が明らかにされたため、MLA にはこの特定の細胞株を使用しなければならない。L5178Y 細胞株は、DBA-2 マウスのメチルコラントレン誘発胸腺リンパ腫由来である(26)。Clive とその共同研究者たちは、L5178Y 細胞（Clive によって *TK*$^{+/+}$ -3 と命名）をエチルメタンスルホン酸で処理し、選択薬剤のブロモデオキシウリジンで *TK*$^{-/-}$（*TK*$^{-/-}$ -3.7 と命名）クローンを分離した。*TK*$^{-/-}$ クローンから自然発生した *TK*$^{+/-}$クローン（*TK*$^{+/-}$ -3.7.2. と命名）とサブクローン（*TK*$^{+/-}$ -3.7.2C と命名）が分離され、MLA 用に特性が明らかにされた(27)。細胞株の核型は公表されている (28) (29) (30) (31)。染色体モード数は 40 である。1 つある中部動原体染色体（t12；13）は 1 本の染色体として数える。マウス *TK* 遺伝子座は、11 番染色体の遠位端に位置する。L5178Y *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C 細胞株は、p53 の両方の対立遺伝子に変異を有し、変異 p53 タンパク質を生成する(32) (33)。L5178Y *TK*$^{+/-}$ -3.7.2C 細胞株の p53 の状態は、この試験が広範囲の損傷を検出できる要因と考えられる (16)。

14. TK6 試験の場合：TK6 はヒトリンパ芽球様細胞株である。親細胞株は Epstein-Barr ウイルス形質転換細胞株の WI-L2 で、もともとは遺伝性球状赤血球症の 5 歳の男児患者に由来するものであった。最初に分離されたクローンの HH4 は ICR191 処理により突然変異を生じ、*TK* ヘテロ接合体細胞株である TK6 が生成した(34)。TK6 細胞は、ほぼ 2 倍体で代表的な核型は 47、XY、13+、t（14；20）、t（3；21）である(35)。ヒト *TK* 遺伝子座は、17 番染色体の長腕部分に位置する。TK6 は両対立遺伝子に野生型 p53 配列を有し、野生型 p53 タンパク質のみを発現することから p53 正常細胞株である(36)。

15. MLA およびTK6 試験の場合：マスターストックを最初に作製する、または補充する際、試験施設は、マイコプラズマ汚染がないこと、細胞の核型、または染色のペイントにより *TK* 遺伝子座を保有する染色体を確認し、細胞集団倍加時間を調べることが推奨される。試験施設で使用する細胞は、正常な細胞周期時間を求め、それが公表されている細胞特性と一致するものでなければならない(16) (19) (37)。これをマスターストックとして-150ºC 以下で保存し、すべてのワーキング細胞ストックの作製に使用する。

16. ワーキングストックを大量に凍結保存する前、または実験使用の直前において、すでに存在する変異細胞を除去する必要があるだろう［ただし溶媒対照の変異体頻度（MF）が

すでに許容範囲にある場合を除く（MLA は表 2 を参照）]。この除去は、TK-欠損細胞に対して選択性のあるメトトレキサート（アミノプテリン）を使用し、TK-正常細胞の最適な増殖を確保するために、培養液にL5178Y 細胞(19) (38) (39) (40)ではチミジン、ヒポキサンチンおよびグリシンを、またTK6 細胞(39)ではグリシンに代え 2'-デオキシシチジンを添加することで可能となる。細胞培養を維持するための一般的な助言は、L5178Y および TK6 細胞に特化した助言に加えて、 (19) (31) (37) (39) (41)で確認できる。MLA または TK6 試験のいずれかを開始する試験施設、あるいは新たなマスター細胞ストックを必要とする試験施設にとっては、特性が明らかにされた細胞の保管施設が利用可能である(37)。

培地と培養条件

17. 両試験において、培養の維持には、適切な培地と培養条件（例：培養容器、5%CO_2 の加湿状態、および 37ºC の培養温度）を使用すべきである。細胞培養は、必ず対数期を持って増殖する条件下で常に維持されなければならない。発現期間における至適増殖ならびに変異細胞と 非変異細胞のクローニングを促すために、培地と培養条件を選択することは特に重要である。MLA およびTK6 試験にとっては、*TK* 変異体として早期に出現する大コロニーおよび遅延して出現する小コロニーの両方に最適な増殖を促す培養条件であることも重要である。変異体選択時に RPMI 培地を使用する場合の熱によるウマ血清の非働化の必要性を含めた培養についての詳細は、(19) (31) (38) (39) (40) (42)で確認できる。

培養の準備

18. 細胞は、ストックから増殖させて、懸濁培養により処理時間および発現期間を通じて対数増殖を維持できる密度で培養液に播種する。

代謝活性化

19. L5178Y 細胞および TK6 細胞を使用する場合は、内因性の代謝能が適切ではないため、外因性の代謝系を用いる必要がある。他に妥当な理由がある場合を除き、通常よく用いられ、既知のものとして推奨される代謝系は、アロクロール 1254 (43) (44) (45)またはフェノバルビタールとβ-ナフトフラボンの併用(46) (47) (48) (49) (50) (51)などの酵素誘導剤で処理したげっ歯類（通常はラット）の肝臓から調製したミクロソーム画分（S9）に、補酵素を添加した溶液である。フェノバルビタールとナフトフラボンの併用は「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」(52)に抵触せず、複合機能オキシダーゼの誘導能はアロクロール 1254 と同程度に効果的であることが確認されている(45) (46) (47) (48) (49)。最終的な試験培養液中での S9 画分の濃度は通常 1～2%を使用するが、10%（v/v）に高める場合もある。使用する外因性代謝活性化系または代謝誘導剤の種類および濃度の選択は、被験物質の種類によって考慮すべき場合がある。

被験物質の調製

20. 被験物質が固体の場合は、適切な溶媒で溶解し、適宜希釈して細胞を処理する（21 項参照）。被

験物質が液体の場合は、試験系に直接添加するか、希釈して添加する。被験物質が気体または揮発性の場合は、密封容器内で処理するなど、標準的なプロトコールに適切な修正を加えて試験を実施する(53) (54) (55)。保存可能であることが安定性データによって証明されている場合を除き、被験物質は用時調製すべきである。

試験条件

溶媒

21. 試験の実施に有害な影響を及ぼす（例えば、細胞増殖を変化させる、被験物質の特性に影響する、培養容器と反応する、代謝活性化系を障害する）ことがなく、被験物質の溶解性を最適化できる溶媒を選択する。可能な限り、水性の溶媒（または培地）の使用を第一に考慮する。問題なく使用できるとされている溶媒は、水やジメチルスルホキシドである。一般に処理培地中の最終濃度は、有機溶媒では1%（v/v）、水性溶媒（生理食塩水または水）では10%（v/v）を超えないようにする。それ以外の溶媒（例：エタノール、アセトン）を使用する場合は、それらが被験物質および試験系に影響しないこと、また使用する濃度で遺伝毒性がないことを示すデータによって、その溶媒の使用の正当性を裏付ける必要がある。正当性を裏付けるデータがない場合は、選択した溶媒によって有害な影響も変異原性への影響も誘発されないことを証明するため、無処理対照（補遺1、定義参照）を含めることが重要である。

細胞毒性の測定と処理濃度の選択

22. 被験物質の最高濃度を決定する際には、見せかけの陽性反応、例えば、過剰な細胞毒性（28項参照）、培養液中の沈殿物（29 項参照）、pH や浸透圧の著しい変化（8 項参照）などを引き起こす可能性のある濃度は避ける。被験物質を添加した際に培養液の pH が著しく変化する場合は、最終処理培養液を緩衝液で処理して pH を調整することで、見せかけの陽性結果の回避や適切な培養条件の維持ができることがある。

23. 濃度は、細胞毒性と他の考慮すべき事項（27～30 項参照）に基づいて選択する。予備試験で細胞毒性を評価することは、本試験で使用する濃度をより明確に決定する上で有用であるが、予備試験の実施は義務付けられてはいない。予備試験において細胞毒性評価を実施した場合でも、本試験における各培養の細胞毒性の測定は必須である。用量設定試験を実施する場合は、広範囲な濃度を設定し、処理後 1 日目で終了するか、または 2 日間の発現を含めて実施して変異体を選択するか（使用濃度が適切である場合）、いずれかで実施できる。

24. 細胞毒性は、個々の試験培養および対照培養で決定すべきである。MLA(2)およびTK6 試験(15) の方法は、国際的合意を得て定義されている。

25. MLA のソフトアガー法およびマイクロウェル法の場合：細胞毒性は、1975 年にClive と Spector によって最初に定義された相対総増殖率（RTG）で測定する(2)。この測定は、細胞処理中の相対浮遊細胞増殖率（RSG：溶媒対照に対する試験培養）、発現期間、および変異体選択時の相対コロニー形成率（RCE：溶媒対照に対する試験培養）を含む(2)。RSG には処理中の試験培養に生ずる、いかなる細胞消失も含むことに注意する（計算式については、補遺 2 参照）。

26. TK6 試験の場合：細胞毒性は、相対生存率（RS）で評価する。すなわち、細胞数に基づいて処理期間中のあらゆる細胞消失を補正した処理直後のコロニー形成率を、同様に補正した陰性対照のそれ（生存率を 100%とする）と比較する（計算式については補遺 2 を参照）。

27. 試験許容基準（適切な細胞毒性、細胞数など）を満たす少なくとも 4 段階（溶媒および陽性対照を除く）の試験濃度を評価すべきである。2 系列の培養を使用するのが望ましいが、試験する各濃度で複数系列または 1 系列の培養を使用することも可能である。設定した濃度において、それぞれ 2 系列以上で培養した細胞から得られた結果は、別々に報告すべきであるが、プールしてデータ解析することができる(55)。細胞毒性をほとんど、またはまったく示さない被験物質については、通常、公比約 2～3 で設定した濃度段階の使用が適している。細胞毒性がある場合は、選択した試験濃度が中等度の細胞毒性を示す濃度および細胞毒性をほとんど、またはまったく示さない濃度を含む必要がある。被験物質には急勾配の濃度反応曲線を示すものが多く、全範囲の細胞毒性を含めるため、または濃度反応関係を詳しく調べるためには、とりわけ確認試験が要求される状況では（70 項参照）、濃度間隔のより密な設定や 4 段階を超える濃度の設定が必要な場合もある。4 段階を超える濃度設定は、1 系列の培養では特に重要となる可能性がある。

28. 最高濃度が細胞毒性に基づく場合、最高濃度は、MLA の場合は RTG が 20～10%、TK6 試験の場合はRS が 20～10%になるように設定する（67 項）。

29. 被験物質が難溶性で、最低不溶濃度以下の濃度で細胞毒性がない場合は、観察した最高濃度において被験物質処理の終了時に、肉眼または倒立顕微鏡で混濁や沈殿が確認される必要がある。たとえ最低不溶濃度より高い濃度で細胞毒性が生じたとしても、見せかけの影響が沈殿によって生じる可能性があるため、混濁または目に見える沈殿を生じる濃度を 1 濃度だけ含めるようにすることが望ましい。MLA と TK6 試験は浮遊培養を使用するため、沈殿が試

験の実施を妨げないよう特に注意する。実験前に培地での溶解性を測定しておくことも、有用である。

30. 沈殿も、処理濃度を規定する細胞毒性も認められない場合、最高試験濃度は 10 mM、2 mg/mL または 2 µL/mL のうち、最も低い濃度とする(57)(58)。組成が不明な被験物質、例えば、組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料（すなわち、UVCB 物質[Substances of Unknown or Variable Composition, Complex reaction products or Biological materials]）、環境抽出物などの場合、十分な細胞毒性を示さない場合は、最高濃度を高くして（5 mg/mL にするなど）、各成分の濃度を高める必要がある。ただし、上記の要件は、人に用いる医薬品では異なる場合があるので注意する(59)。

対照

31. 処理培地に溶媒のみを添加したもので、被験物質処理培養と同じ方法で処理した同時陰性対照（21 項参照）を、細胞の試験条件ごとに設ける。

32. 同時陽性対照は、試験施設が用いた試験プロトコールの条件下で変異原物質を検出する能力を備えていること、および、外因性代謝活性化系を使用した場合は、その有効性を証明するために必要である。また、遅延して出現する小さな *TK* 変異体および早期に出現する大きな *TK* 変異体の適切な検出を証明するためにも必要である。陽性対照の例を表 1 に示す。妥当性が示されれば代わりの陽性対照物質を使用してもよい。哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験は、代謝活性化系の存在下と非存在下において同じ処理時間で同時に実施する短時間処理法（3～4 時間）が十分に標準化されているため、代謝活性化を必要とする変異原物質を陽性対照として使用すればよい。この場合、1 つの陽性対照の結果で、代謝活性化系の活性と試験系の反応性の両方が証明されると考えられる。ただし、長時間処理（すなわち、S9 非存在下で 24 時間）については、代謝活性化系を用いる試験とは処理時間が異なるため、それ自体の陽性対照が必要である。試験系の感度を証明するため、それぞれの陽性対照は、再現性があり検出できる背景出現率を超える増加が期待される 1 つ以上の濃度を設定し、その反応が、試験ガイドラインに規定された限度を超える細胞毒性によるものではないようにする（28 項参照）。

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

カテゴリー	物質	CAS 番号
1. 代謝活性化なしで活性を示す変異原物質	メタンスルホン酸メチル	66-27-3
	マイトマイシン C	50-07-7
	4-ニトロキノリン-N-オキシド	56-57-5
2. 代謝活性化を必要とする変異原物質	ベンゾ（a）ピレン	50-32-8
	シクロフォスファミド（一水和物）	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-ジメチルベンズアントラセン	57-97-6
	3-メチルコラントレン	56-49-5

手順

被験物質による処理

33. 代謝活性化系の存在下および非存在下で増殖中の細胞を被験物質で処理する。適切な期間（通 常、3～4 時間）曝露する。ただし、上記の要件は、人に用いる医薬品では異なる場合があるので注意する(59)。MLA では、短時間処理で陰性結果が得られた場合、またより長い時間での処理が必要と示唆される情報［例えば、ヌクレオシド類縁体や難溶性の被験物質など(5) (59)］ がある場合には、長時間処理（すなわち、S9 非存在下で 24 時間）で試験を実施することを考慮すべきである。

34. 試験の各ステージで各試験（対照および処理）培養に用いる最小細胞数は、自然突然変異体頻度に基づく必要がある。一般的な目安は、試験の全ステージ（処理、突然変異形質発現および変異体選択）において、少なくとも 10 個の、理想的には 100 個の自然突然変異体を維持できるように各試験培養中で十分な細胞を処理し、継代することである(56)。

35. MLA の推奨される自然突然変異体頻度の許容範囲は、35～140×10^{-6}（ソフトアガー法の場合）および 50～170×10^{-6}（マイクロウェル法の場合）である（表 2 参照）。各試験培養を通じて、10 個以上、理想的には 100 個の生き残った自然突然変異体を得るためには、少なくとも 6×10^{6} 個の細胞を処理する必要がある。この数の細胞を処理し、発現中に十分な細胞を維持し、変異体選択のためにクローニングすることで、90%の細胞毒性（RTG 測定では 10%）となる濃度で処理した培養であっても、実験の全ステージをとおして十分な数（10 個以上）の自然突然変異体を維持できる(19) (38) (39)。

36. TK6 試験における自然突然変異体頻度は、通常 2～10×10^{-6} である。各培養を通じて、生き残った自然突然変異体を 10 個以上得るためには、少なくとも 20×10^{6} 個の細胞を処理する必要がある。この数の細胞を処理することにより、処理中 90%の細胞毒性（10%RS）となる濃度で処理した培養であっても、十分な数の自然突然変異体（10 個以上）を生ずる。さらに、十分な数の細胞を発現期間中に培養し、変異体選択のためにプレート播種しなければならない(60)。

形質発現期間および細胞毒性と突然変異体頻度の測定

37. 処理終了時に、新たに誘発された変異体の形質発現が至適になるように、細胞を所定の時間培養する。その時間は各細胞株に特異的であり、MLA の形質発現期間は 2 日、TK6 試験の場合は 3〜4 日である。24 時間処理が行われる場合の発現期間は、処理終了後に始まる。

38. 形質発現期間中、細胞を毎日計測する。MLA では、毎日の細胞数は、毎日の浮遊細胞増殖率（SG）の算出に使用される。2 日間の発現期間の後、細胞を、突然変異体数を計測するための選択薬剤を含む培地（選択プレート）とコロニー形成率を測定するための選択薬剤を含まない培地（生存プレート）に懸濁する。MLA の場合、変異体選択のクローニングは 2 つの方法で行うことができる。1 つはソフトアガーを使用し、もう 1 つは 96 ウェルプレートで液体培地を使用する(19) (38) (39)。TK6 試験におけるクローニングは、96 ウェルプレートで液体培地を用いて行う(16)。

39. トリフルオロチミジン（TFT）のみが、*TK* 変異体の選択薬剤として推奨される(61)。

40. MLA では、10〜12 日間の培養後、アガープレートあるいはマイクロウェルプレートを計測する。TK6 試験では、NG 変異体として 10〜14 日後にマイクロウェルプレートのコロニー数を計測する。SG 変異体を回収するには、NG 変異体の計測後、増殖培地に TFT を再添加し、さらに 7〜10 日間プレートを培養する必要がある(62)。SG および NG 変異体の計数に関する考察は 42 項および 44 項を参照のこと。

41. MLA におけるソフトアガー法とマイクロウェル法による試験の適切な計算方法については、補遺 2 に記載がある。MLA のソフトアガー法では、MF を算出するためにコロニーを計数し、変異体コロニー数をコロニー形成率で補正する。MLA と TK6 試験のマイクロウェル法では、選択プレートとコロニー形成率のプレートから、ポアソン分布に従ってコロニー形成率を測定する(63)。この 2 つのコロニー形成率から MF を算出する。

<u>変異コロニーの特徴付け</u>

42. MLA で被験物質が陽性の場合（62 項、63 項参照）、試験培養のうちの少なくとも 1 つ（通常、許容可能な陽性を示す最高濃度）と陰性および陽性対照について、コロニーサイズあるいは増殖性によりコロニーの特徴を評価する。被験物質が陰性の場合（64 項参照）、陰性および

陽性対照について変異コロニーの特徴を評価する。マイクロウェル法の MLA では、小コロニー変異体は、ウェルの直径の 25%未満を占めるものとして定義され、大コロニー変異体は、ウェルの直径の 25%以上を占めるものとして定義されている。ソフトアガー法では、変異コロニー数およびコロニーサイズの測定には自動コロニーカウンターが使用される。コロニーサイズに関しては、文献に詳細が示されている(19) (38) (40)。陰性および陽性対照におけるコロニーの特徴付けは、適切に試験が実施されている証拠として必要となる。

43. 陽性対照において、大コロニーと小コロニー両方の変異体が適切に検出されない場合は、被験物質を陰性と決定することはできない。コロニーの特徴付けは、点突然変異や染色体レベルの変異を誘発する被験物質の能力に関する一般的な情報提供として利用できる（4 項参照）。

44. TK6 試験：NG 変異体および SG 変異体は、出現時期の違いで区別する（40 項参照）。TK6 試験では、一般的に NG 変異体と SG 変異体の両方を、陰性対照および陽性対照を含むすべての培養について測定する。陰性および陽性対照のコロニーの特徴付けは、適切に試験が実施されている証拠として必要となる。陽性対照において、NG 変異体および SG 変異体の両方が適切に検出されない場合は、被験物質を陰性と決定することはできない。コロニーの特徴付けは、点突然変異や染色体レベルの変異を誘発する被験物質の能力に関する一般的な情報提供として利用できる（4 項参照）。

<u>試験施設の習熟度</u>

45. 試験施設は、試験を日常的に実施するに先立ち、この試験について十分な経験を積むため、 異なる機序で作用する複数の標準的な陽性対照物質（表 1 に示す物質から、代謝活性化の存在下で作用するものと非存在下で作用するものをそれぞれ少なくとも 1 つ選択）および各種陰性対照（種々の溶媒／媒体を使用）を用いて一連の実験を行っておく必要がある。これら の陽性対照および陰性対照の反応は文献と一致していなければならない。この必須要件は経 験のある、すなわち 47～50 項で定義した背景データが利用可能な試験施設には適用されない。MLA における陽性対照および陰性対照用に得られたデータは、IWGT で推奨されているものと一致していなければならない（表 2 参照）。

46. 陽性対照物質（表 1 参照）は、代謝活性化系の非存在下における短時間および長時間（実施する場合）処理、さらに代謝活性化の存在下における短時間処理で正しく陽性と判定されなければならない。これによって、変異原物質の検出、代謝活性化系の有効性の判定、および処理中の細胞増殖の条件、形質発現と突然変異体の選択ならびにその計数手順の習熟度が妥当であるとみなされる。試験系の感度と検出範囲を示すため、選択した物質の濃度範囲は、再現性と濃度相関性があり、背景値を超える増加が認められるように設定する。

背景対照データ

47. 試験実施施設は、下記について確立しておく必要がある：

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

48. 最初に陰性対照の背景分布データを得る場合は、公表されている陰性対照データと同時陰性対照のデータが一致していなければならない(21)。対照の分布に追加する実験データの増加に伴い、同時陰性対照は、その分布の 95%管理限界の範囲内に収まるのが理想的である(64) (65)。

49. 試験施設の陰性対照の背景データベースは、最初は最低 10 回の実験によって構築すべきだが、できれば同等な条件下で実施された少なくとも 20 回の実験によって構築することが望ましい。試験施設は、管理図（例：C 管理図、X-バー管理図(65)）などの品質管理の方法を用いて、試験施設における陽性、陰性の両対照データの変動の様子を明らかにし、その試験方法が当該施設で「管理下にある」ことを示す必要がある(66)。背景データの構築および使用の方法に関するさらなる推奨事項（すなわち、背景データにおけるデータの選択および除外基準ならびに所定の実験の許容基準）が、文献に示されている(64)。

50. 陰性対照のデータは、27 項で述べたように、1 系列培養あるいは望ましくは 2 系列以上の培養からの突然変異体頻度で構成される。同時陰性対照は、試験施設の陰性対照の背景データベース分布の 95%管理限界内に収まるのが望ましい。同時陰性対照のデータが 95%管理限界から外れた場合は、そのデータが極端な外れ値ではなく、試験系が「管理下にある」こと（49 項参照）および手技的または人為的なミスがなかったという証拠があれば、対照の背景データの分布に含めることができる。

51. 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。

データおよび報告

結果の提示

52. MLA およびTK6 試験のデータの提示は、以下に定義するように、処理培養および対照培養における細胞毒性（それぞれ RTG または RS）と突然変異体頻度の算出に必要なデータを含める。

53. MLA では、個々の培養データとして、RSG、RTG、突然変異体選択時のコロニー形成率、変異体コロニー数（ソフトアガー法の場合)、または空のウェル数（マイクロウェル法の場合） を示す。MF は、生存細胞 100 万個あたりの変異体細胞の数として表す。陽性反応の場合、被験物質の少なくとも 1 つの濃度（通常、陽性を示す最高濃度）における大小コロニーの MF（あるいは総 MF に対する割合(%)）と陰性および陽性対照のデータを記載する。陰性反応の場合、大小コロニーの MF は、陰性および陽性対照のデータを記載する。

54. TK6 試験では、RS、突然変異体選択時のコロニー形成率、NG および SG 変異体を計数する際の空のウェル数について、変異体培養ごとのデータを報告する。MF は、生存細胞数あたりの変異体細胞の数として表し、NG および SG 変異体の MF（あるいは総 MF に対する割合(%)）と同様に総 MF を含める。

許容基準

55. MLA と TK6 試験において、以下の基準は、特定の被験物質について結果の最終判断を下す前に満たしておく必要がある。

－2つの実験条件のうち（代謝活性化の存在下および非存在下での短時間処理―33項参照）、いずれかで陽性結果が得られていない限り、2つの条件すべてで試験を実施していること。
－適切な細胞数および濃度数が解析可能であること（27項、34～36項参照）。
－最高濃度の選択基準が、28～30項に述べた条件に適合していること。

陰性対照および陽性対照における許容基準

56. IWGT の専門家による MLA 作業グループの広範囲な MLA データの分析で、MLA 特定の許容基準に関して国際的な合意が得られた(1) (2) (3) (4) (5)。そのため、本試験ガイドラインは、陰性対照および陽性対照の許容判断、ならびに MLA で得られた個々の物質の評価に特化した推奨事項を示している。TK6 試験に関するデータベースはかなり小規模であり、作業グループでの評価は受けていない。

57. MLA では、すべての実験において、無処理／溶媒対照が IWGT の MLA 作業グループによる次の許容基準（(4)、表 2）を満たしているかどうかの評価を行う。[1] MF（IWGT における MF の許容範囲は、MLA ではソフトアガー法とマイクロウェル法で異なることに注意する)、

[2] 突然変異選択時のコロニー形成率（CE)、[3] 溶媒対照の浮遊細胞増殖比（SG)（計算式については、補遺 2 参照)。

表 2：MLA における許容基準

パラメータ	ソフトアガー法	マイクロウェル法
突然変異頻度	35～140 × 10^{-6}	50～170 × 10^{-6}
コロニー形成率	65～120%	65～120%
浮遊細胞増殖比	8～32 倍（3～4 時間処理） 32～180 倍（24 時間処理、実施した場合）	8～32 倍（3～4 時間処理） 32～180 倍（24 時間処理、実施した場合）

58. MLA では、すべての試験において、陽性対照が IWGT 作業グループによる次の 2 つの許容基準のうち、少なくとも 1 つを満たしているかどうかを評価する。

(1) 陽性対照の総 MF が絶対的に増加していること。つまり、少なくとも、自然突然変異体頻度の背景値を 300×10^{-6} 分［誘発 MF（IMF）］超えること。少なくとも IMF の 40%が小コロニーの MF に反映されていること。
(2) 陽性対照の小コロニーの MF が、同時の無処理／溶媒対照よりも少なくとも 150×10^{-6} 増加していること（小コロニーIMF が 150×10^{-6}）。

59. TK6 試験では、同時陰性対照が、48、49 項で述べたように、試験施設の陰性対照の背景データベースに追加できる場合に、試験は許容される。さらに、同時陽性対照（32 項参照）は、陽性対照の背景データベースで得られる反応に一致し、同時陰性対照と比較して統計学的に有意に増加していること。

60. 両試験において、陽性対照培養で観察された細胞毒性の上限は被験物質培養の上限と同じでなければならない。すなわち、RTG/RS は 10%を下回ってはならない。陽性対照の許容基準が満たされていることを示すためには、単一濃度（または複数の陽性対照濃度を使用の場合は、その濃度の 1 つ）の使用で十分である。さらに、陽性対照 MF は、試験施設が設定した許容範囲内でなければならない。

結果の評価および解釈

61. MLA では、IWGT のマウスリンフォーマ専門家による作業グループが、生物学的妥当性および陽性反応の基準に関する重要な作業を行った(4)。そのため、本試験ガイドラインでは、MLA から得た被験物質の結果の解釈に特化した推奨事項を示している（62～64 項参照）。TK6 試験に関するデータベースはかなり小規模であり、作業グループによる評価は受けていない。そのため、TK6 試験にて推奨されるデータ解釈については、より一般的なものとなっている（65、66 項参照）。その他の推奨事項は、両試験に適用する（67～71 項参照）。

MLA の場合

62. 陽性および陰性反応の定義としては、増加した MF に生物学的妥当性があることを保証する方法が推奨される。他の試験に一般的に使用される統計解析の代わりに、事前に定義されている誘発突然変異体頻度（すなわち、同時対照を上回る MF の増加）を使用する。これは、総合的評価ファクター（Global Evaluation Factor; GEF）と呼ばれ、試験実施施設における陰性対照 MF データ分布の解析に基づくものである（4)。MLA における GEF は、ソフトアガー法の場合は 90×10^{-6} で、マイクロウェル法の場合は 126×10^{-6} となる。

63. すべての許容基準が満たされた、検討したいずれかの実験条件（33 項参照）で、同時背景値に対する MF の増加がGEF を超えており、かつ、その増加が濃度依存性である（例：傾向検定を使用）場合、被験物質は陽性であると判定される。この場合、被験物質は、本試験系において突然変異を誘発すると判定される。

64. すべての許容基準が満たされた、検討したすべての実験条件（33 項参照）で、濃度依存性の反応がない、あるいは MF の増加がみられるがその増加が GEF を超えていない場合、被験物質は明確に陰性であると判定される。この場合、被験物質は、本試験系において突然変異を誘発しないと判定される。

TK6 試験の場合

65. すべての許容基準が満たされた、検討したいずれか実験条件（33 項参照）で、以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陽性であると判定される。

a) 少なくとも 1 つの試験濃度で、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められる場合。
b) 適切な傾向検定で評価し、濃度依存性の増加が認められる場合（33 項参照)。
c) 当該結果が、いずれも陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った 95%管理限界；48 項参照）から外れている場合。

上記基準をすべて満たす場合、被験物質は本試験系で突然変異を誘発すると判定される。なお、推奨される最適な統計学的手法が文献に発表されている(66) (67)。

66. すべての許容基準が満たされた、検討したすべての実験条件（33 項参照）で、以下の結果が得られた場合、被験物質は明確に陰性であると判定される。

a) 試験した濃度のいずれにおいても、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認

められない場合。

b) 適切な傾向検定の評価で、濃度依存性の増加が認められない場合。

c) すべての結果が陰性対照の背景データの分布（例：ポアソン分布に従った 95%管理限界；48 項参照）内に収まる場合。

この場合、被験物質は、本試験系に突然変異を誘発しないと判定される。

MLA および TK6 試験両方について：

67. 最高濃度が細胞毒性に基づく場合、最高濃度は、RTG/RS が 20～10%に収まるように設定する。陽性の結果が RTG/RS が 20～10%の間においてのみ見られる場合には、結果の解釈に注意を払う必要があり、MF の増加が RTG/RS が 10%以下においてのみ見られる場合は（評価した場合）、陽性とはみなされない (2) (59)。

68. RTG/RS が 10～20%を示していない場合、被験物質が突然変異誘発性でないと判定する際に追加情報が役立つ以下の状況がある。[1] 100%～20%の RTG/RS 範囲内の一連のデータポイントに変異原性の証拠がない（例：用量反応性がない、変異体頻度が同時陰性対照または背景値の範囲を超えていないなど）、ならびに 20～25%の RTG/RS 間に 1 つ以上のデータポイントがある。[2] 100%～25%の RTG/RS 間で一連のデータポイントに変異原性の証拠がない（例： 用量反応性がない、突然変異頻度が同時陰性対照または背景値の範囲を超えていないなど）、ならびに 10%の RTG/RS よりわずかに低い、変異原性の証拠がないデータポイントをもつ。この 2 つの状況において、被験物質は陰性と結論づけることができる。

69. 明確な陽性反応または陰性反応については、確認の必要はない。

70. 得られた結果が上述したような明らかな陰性でも明らかな陽性でもない場合、また、結果の生物学的妥当性を確認する必要がある場合には、専門家判断や追加調査によりデータを詳細に評価する必要がある。実験条件の変更［例：10～20%の RTG/RS 範囲内でデータポイントに到達する可能性を高くするための濃度間隔、他の代謝活性化条件（すなわち、S9 の濃度またはその由来）、および処理期間］を考慮した再試験の実施が、有用な場合がある。

71. まれに、追加試験を行っても得られたデータセットからは陽性または陰性の結果に関して結論を出せず、そのため被験物質の反応が「不明確」（陽性または陰性が同程度の解釈）と結論される場合もある。

試験報告書

72. 試験報告書には以下の情報を含める。

被験物質：

－入手可能な場合、供給元、ロット番号、使用期限

－被験物質の安定性（既知の場合）

－溶媒中における被験物質の溶解性と安定性（既知の場合）

－必要に応じ、被験物質を添加した培地のpH、浸透圧および沈殿の測定結果

単一成分の物質：

－外観、水への溶解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物質および混合物：

－構成物質の化学的識別（上記参照）、定量的組成および関連のある物理化学的性質

溶媒：

- 溶媒選択の妥当性
- 最終的な培地中の溶媒の割合（%）

細胞：

試験施設のマスター培養の場合：

- 細胞の種類、供給元、および試験施設における継代履歴
- 核型の特性や染色体のモード数
- 細胞培養方法
- マイコプラズマ汚染のないこと
- 細胞倍加時間

試験条件：

- 濃度および細胞培養系列数の選択の根拠（細胞毒性データと溶解限界値等を含む）
- 培地の組成、CO_2 濃度、湿度
- 培地中での被験物質の最終濃度（例：培地中の μg/mL、mg/mL または mM）
- 培地に添加される溶媒と被験物質の濃度（および容量）
- 培養温度
- 培養時間
- 処理時間
- 処理中の細胞密度

- 代謝活性化系の種類および組成（S9 の供給元、S9 mix の調製方法、最終培地における S9 mix と S9 の濃度または容量、S9 の品質管理）
- 陽性および陰性対照物質と各処理条件での最終濃度
- 発現期の長さ（必要に応じ、播種細胞数、継代および培地交換のスケジュールも含む）
- 選択薬剤およびその濃度
- MLA の場合は、使用した培養法（ソフトアガー法またはマイクロウェル法）を明記
- 試験の許容基準
- 生存細胞数および変異細胞数の計数方法
- 細胞毒性の測定方法
- 細胞毒性と使用した方法に関する補足情報
- プレート播種後の培養時間
- 大きさとタイプを考慮したコロニーの定義（該当する場合、「小」コロニーと「大」コロニーの基準を含む）
- 試験結果を陽性、陰性または不明確と判定する基準
- pH、浸透圧および沈殿の測定に用いた方法（実施した場合）

結果

- 各培養について処理した細胞数および継代培養した細胞数
- 毒性パラメータ（MLA では RTG、TK6 試験では RS）
- 沈殿の有無およびその観察時期
- 選択培地と非選択培地でプレートに播種した細胞数
- 非選択培地のコロニー数と選択培地の抵抗性コロニー数、および関連する突然変異体頻度
- 陰性対照および陽性対照のコロニーサイズ、および被験物質が陽性の場合は少なくとも 1 つの濃度と関連する突然変異体頻度
- 可能な場合、濃度反応関係
- 同時陰性（溶媒）対照と陽性対照のデータ（濃度および溶媒）
- 陰性（溶媒）対照および陽性対照の背景データ（濃度および溶媒）、範囲、平均、標準偏差；背景対照の基礎となる試験の数
- 統計解析（該当する場合、個々の培養およびプールした複数系列培養）、また、もしあれば、p 値、および MLA の場合は GEF 評価

結果の考察

結論

参考文献

1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003), Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540:127-140.

4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1):1-5.

5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

6) 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.

7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001), Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

© OECD, (2016)

9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.*.,* 109 (1): 96-105.

10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985), Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res*.,* 151 (1): 161-174.

14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press. p. 27-50.

20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007), Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res*.,* 634 (1-2): 177-183.

21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen*.,* 8 (6): 879-886.

23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979), Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/-- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014), The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation.. Res., 373 (2): 157-165.

33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland,(2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA., 33 (3): 261-287.

42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System In Vitro, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

47) Ong T.M., et al. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol. Toxicol.,* 4 (1): 55-65

48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In:) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., et al. (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

50) Galloway S.M., et al. (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

52) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

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

54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008), An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

56) Arlett C.F., et al. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012), Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

59) USFDA. (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981), Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

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

66) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

補遺1

用語の定義

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

異数性：正常な二倍体（または半数体[一倍体ともいう]）の染色体数から 1 本もしくは複数の染色体の増減があること。ただし、染色体数の全体での倍加（倍数性）は含めない。

塩基対置換型変異原物質：DNA の塩基対の置換を引き起こす物質。

コロニー形成率：低い密度で播種された細胞に対し、計数可能なコロニーにまで増殖可能な細胞の割合。

染色体構造異常誘発物質：細胞または生物の集団中に、染色体の構造異常を引き起こす物質または作用。

細胞毒性：本試験ガイドラインで述べる試験の場合、MLA、TK6 試験それぞれにおいて、相対総増殖率（RTG）または相対生存率（RS）が減少する事象として示される。

前進突然変異：親型から突然変異型への遺伝子の突然変異で、その結果、酵素活性または該当タンパク質の機能に変化または消失を生じる。

フレームシフト型変異原物質：DNA 分子中に、一対または複数の塩基対の挿入または欠失を引き起こす物質。

遺伝毒性：DNA や染色体のあらゆる種類の損傷の総称。DNA 切断、付加体、再配列、遺伝子突然変異、染色体構造異常ならびに異数性が含まれる。すべてのタイプの遺伝毒性作用が突然変異や安定した染色体損傷を起こすわけではない。

体細胞組換え：細胞分裂中の相同な染色分体間の組換えで、DNA の二本鎖切断の誘発またはヘテロ接合体の消失をもたらす可能性がある。

変異原性：遺伝子の DNA 塩基対配列または染色体の構造に継世代的変化を引き起こす性質（染色体の場合、染色体異常）。

突然変異体頻度（MF）：観察された突然変異細胞数を生存細胞数で除した値。

形質発現期間：遺伝的変化がゲノム内で固定され、既存の遺伝子産物が枯渇し、遺伝的形質が変化するまでの処理後の時間。

相対生存率（RS）：TK6 試験において処理に関連する細胞毒性の測定に使用される。処理中の細胞消失を補正した、処理直後の播種細胞のコロニー形成率を、陰性対照のコロニー形成率と比較した相対コロニー形成率（CE）。

相対浮遊細胞増殖率（RSG）：MLA において、陰性／溶媒対照の 2 日間の総浮遊細胞増殖率に対する試験培養 2 日間の相対浮遊細胞の総増殖率（Clive および Spector、1975）。RSG は、処理期間中の陰性／溶媒対照に対する試験培養の相対増殖率を含める。

相対総増殖率（RTG）：MLA において処理に関連する細胞毒性の測定に使用される。各試験培養の RTG は、RSG に変異体の選択時における試験培養の相対コロニー形成率を乗じて表される（Clive および Spector、1975）。

S9 肝画分：肝臓のホモジネートを 9000×g で遠心分離した後の上清、すなわち生の肝臓抽出物。

S9 mix： S9 肝画分と代謝酵素の活性化に必要な補因子の混合物。

浮遊細胞増殖比（SG）：MLA の処理中および発現期の細胞数の増加比。SG は、短時間処理（3 または 4 時間）において、1 日目の増加比に 2 日目の増加比を乗じて算出される。24 時間処理の場合は、24 時間処理中の増加比に 1 日目と 2 日目に発現した増加比を乗じた SG を使用する。

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

無処理対照：いかなる処理も受けない（すなわち、被験物質でも溶媒でも処理しない）が、それ以外は、被験物質で処理する培養細胞と同じ方法で処理する対照培養。

補遺 2

計算式

細胞毒性

MLA におけるソフトアガー法およびマイクロウェル法

細胞毒性は、2 日間の発現期間中の相対浮遊細胞増殖率（RSG）と、突然変異体選択時に得られる相対コロニー形成率（RCE）を含む相対総増殖率（RTG）と定義される。RTG、RSG、および RCE はすべて割合（%）で表す。

RSG の算出：浮遊細胞増殖比 1（SG_1）は、0 日目から 1 日目の増殖比（1 日目の細胞濃度／0 日目の細胞濃度）で、浮遊細胞増殖比 2（SG_2）は 1 日目から 2 日目の増殖比（2 日目の細胞濃度／1 日目の細胞濃度）である。RSG は無処理／溶媒対照に対する処理培養の総 SG（$SG_1 \times SG_2$）である。つまり、

$$RSG = \frac{[SG_{1\,(処理)} \times SG_{2\,(処理)}]}{[SG_{1\,(対照)} \times SG_{2\,(対照)}]}$$

となる。SG_1 は、試験開始時に使用される開始時の細胞濃度から算出する。細胞処理中の試験培養で発生する細胞毒性はすべて含める。

RCE は、突然変異体選択時に得られる無処理／溶媒対照の相対コロニー形成率に対する試験培養の相対コロニー形成率である。

相対総増殖率（RTG）：RTG＝RSG×RCE

TK6 試験

相対生存率（RS）：

細胞毒性は、相対生存率で評価する。すなわち陰性対照のコロニー形成率に対する処理中の細胞消失に合わせて補正された処理期間直後の播種細胞の相対コロニー形成率（CE）である（生存率 100%とする）。処理中の細胞消失の補正は以下の計算式で算出できる。

$$補正CE = CE \times \frac{処理終了時の細胞数}{処理開始時の細胞数}$$

被験物質で処理された培養のRSの計算式：

$$RS = 100 \times \frac{\text{処理培養の補正CE}}{\text{溶媒対照の補正CE}}$$

MLA および TK6 試験の突然変異体頻度

突然変異体頻度（MF）は、突然変異選択時の非選択培地でのコロニー形成率（CE_V）で補正された選択培地における突然変異コロニーのコロニー形成率（CE_M）、つまり、$MF= CE_M／CE_V$ である。これら 2 つのコロニー形成率の算出方法をソフトアガー法とマイクロウェル法について以下に示す。

MLA ソフトアガー法：MLA のソフトアガー法では、直接クローンを計数することで突然変異体選択プレートのコロニー数（C_M）と非選択用またはコロニー形成率（生存数）用プレートのコロニー数（C_V）が得られる。600 個の細胞が変異体選択プレート（CE_M）および非選択用またはコロニー形成率（生存数）用のプレート（CE_V）でコロニー形成率（CE）として播種され、3×10^6 細胞が突然変異選択に使用される場合、

$$CE_M = C_M／（3 \times 10^6） = （C_M／3）\times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V／600$$

MLA および TK6 試験のマイクロウェル法：MLA のマイクロウェル法では、C_M と C_V がマイクロウェルプレートのウェル（P）あたりの推定コロニー数にマイクロウェルの総数（TW）をかけることで算出できる。

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

ポアソン分布（Furth ほか、1981）のゼロ項から、P は次式で求められる。

$$P = -1n （EW／TW）$$

この場合、EW が空のウェル、TW が総ウェルとなるため、以下の計算式となる。

$$CE_M = C_M／T_M = （P_M \times TW_M）／T_M$$

$$CE_V = C_V／T_V = （P_V \times TW_V）／T_V$$

MLA のマイクロウェル法では、小コロニーおよび大コロニーの変異体頻度は、それぞれのコロニーに関連する空のウェル数を使用して同じ方法で算出できる。

TK6 試験における小コロニーおよび大コロニーの変異体頻度は、早期出現するか遅延出現するかに基づく。