

< 哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験、哺乳類を用いる 90 日間の反復投与毒性試験及び哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスリンフォーマTK試験による変異原性試験 >

ここでは、哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による変異原性試験の標準となるべき方法について規定する。

哺乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験

目的

本試験は、動物に被験物質を一定期間反復投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより、被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物^(注1)

1 - 1 動物種及び性

ラット以外のげっ歯類を用いる妥当な理由がある場合を除き、原則として、順調に発育したラットの雄及び雌を用いる。

1 - 2 週齢

ラットでは投与開始時に 5 あるいは 6 週齢^(注2)とし、その際の体重の変動範囲は、雌雄それぞれ平均体重の ±20% 以内とする。

1 - 3 動物数

各群雄及び雌それぞれ 5 匹以上とする。なお、途中解剖を行う場合は、それに要する数をあらかじめ加えるものとする。また、投与終了後少なくとも 14 日間飼育し、変化の可逆性及び持続性、遅発性毒性等について観察するために、雄及び雌それぞれ 5 匹以上で構成される回復群を、少なくとも対照群及び最高用量群にそれぞれ設けることが望ましい。

2 被験物質

2 - 1 投与方法

原則として、経口投与とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2 - 2 用量^(注3)

被験物質投与群は 3 段階以上を設定し、投与群とは別に対照群をおく。最高用量は被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に 1 段階以上の中間用量を設ける。

最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000mg/kg/dayの用量とする。また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は摂餌量又は摂水量から算出される被験物質の用量が1000mg/kg/dayに相当する用量とする。この量で何ら毒性が認められないときは必ずしも試験で3用量を用いなくてもよい。

2 - 3 投与期間

原則として、28日間連続投与とする。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死^(注4)及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する^(注5)。さらに、馴化期間中に1回、その後は少なくとも週に1回、全ての動物について詳細に観察し、記録する^(注6、7)。

さらに、次の事項について検査する。

3 - 1 死亡率

3 - 2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水に添加した場合）^(注8)

3 - 3 機能検査^(注9)

3 - 4 血液検査^(注10)

3 - 4 - 1 血液学的検査^(注11)

3 - 4 - 2 血液生化学的検査^(注12)

3 - 5 尿検査^(注13)

3 - 6 病理学的検査

3 - 6 - 1 肉眼的検査及び器官重量^(注14、15)

3 - 6 - 2 病理組織学的検査^(注16)

3 - 7 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

また、一般状態が極めて不良となり、死期の迫った動物は速やかに安楽死させた後、剖検を行う。

4 結果報告

試験の結果は様式4によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計学的手法を用いて評価する。

(注1) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。

(注2) 5あるいは6週齢の動物が得られない場合でも、9週齢を超えないものとする。

(注3) 用量設定に際しては、全身的な毒性（例えば、体重減少や、肝臓、心臓、肺又は腎臓に対する影響など）や毒性と断定できない変化が観察された場合は、免疫系や、神経系、内分泌関連の影響についても考慮する。

(注4) 少なくとも1日に2回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。

(注5) 少なくとも1日に1回（毒性の徴候が観察された場合は、より頻繁に）、投与の予測される影響のピーク時を考慮し、可能な限り同じ時刻に観察する。

(注6) 観察は飼育室内又はそれと同等の環境下のケージ外の標準的な観察の場におい

で行う。試験施設で明確に定義されたスコアリングシステムを用いて記録することが望ましい。試験条件のばらつきを最小にするよう配慮する。観察は投与について知らされていない観察者が実施することが望ましい。

(注7) 観察は、少なくとも、皮膚、被毛、眼、粘膜の状態、分泌物及び排泄物の状態、自律神経系への影響を示す反応(流涎、流涙、立毛、縮瞳・散瞳、異常呼吸等)を観察する。また、間代性・強直性痙攣、常同行動(過度の身づくろい、反復巡回運動等)及び異常行動(自傷行動、後ずさり等)の有無とともに、歩行、姿勢及びハンドリングへの反応に異常がないかを確認する。

(注8) 週1回以上測定する。

(注9) 投与4週目の観察において、異なる種類の刺激に対する感覚応答(聴覚、視覚、深部知覚等)、握力の測定及び自発運動量の測定を、必要に応じ、測定機器等を使って全ての動物について行う。影響が認められた場合には、回復2週目にも同様に検査する。

(注10) 剖検時や剖検の直前など、適切な時期に採血する。採血前に一晩絶食することが望ましい。途中死亡等により検査を実施できない場合を除き、全ての動物を検査する。

(注11) 血液学的検査として次の項目を検査する。

赤血球数、網状赤血球率、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分率、血小板数、その他の血液凝固能の指標など。

なお、血液凝固能の指標としては、血液凝固時間、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間等がある。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えばメトヘモグロビン濃度、ハイツ小体等についても検査する。

(注12) 血液生化学的検査として次の項目を検査する。

総たん白、アルブミン、血糖、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、Na、K、Cl、肝細胞への影響を示す2種以上の酵素(アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、-グルタミルトランスペプチターゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタマートデヒドロゲナーゼ等)、胆汁酸など。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、コリンエステラーゼ、トリグリセリド、ホルモン、Ca、P、総ビリルビン等についても検査する。

下垂体 甲状腺系への影響が示唆される場合は、甲状腺ホルモン(T₃及びT₄)及びTSHを測定するため、血漿又は血清サンプルをマイナス20℃以下で保存しておくことが望ましい。

(注13) 原則として、剖検を実施する週に新鮮尿又は一定時間の蓄尿を用いて、性状、量、浸透圧又は比重、pH、蛋白、糖、潜血、沈査等の尿検査を実施する。

(注14) 解剖に当たり、膣垢を採取し、全ての雌の性周期を決定することは、エストロゲン感受性組織の病理組織的評価の手助けになり得る。

(注15) 原則として、最終投与の翌日(回復群については回復期間終了後)に剖検する。試験に使用した全ての動物について、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔及びその内容の観察を含む肉眼的検査を十分に行う。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な固定液中に保存する(例えば、精巣などに関しては、ブアン液や改良ダビドソン液などが推奨されている。)

全ての肉眼的病変部、脳*(大脳、小脳及び橋を含む代表的な部位)、下垂体、脊髄、眼球、顎下腺、甲状腺*(上皮小体を含む。)、心臓*、気管及び肺(固定液を注入後浸漬)、肝臓*、腎臓*、胸腺*、脾臓*、膵臓、副腎*、胃、小腸及び大腸(パイエル板を含む。)、生殖腺(精巣*又は卵巣*)、副生殖器(前立腺*、精囊*(凝固腺を含む。)、精巣上体*、子宮*)、膣、膀胱、リンパ節(投与経路に関連するリンパ節及び試験施設の経験に従ってその他のリンパ節を採取する。)、筋肉に近い末梢神経(坐骨神経又は脛骨神経)、骨格筋、骨、骨髄(大腿骨)及び肉眼的所見・他の情報・検査等から標的器官と疑われた器官及び組織。

なお、*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。

(注16) 最高用量群と対照群の全ての動物で(回復群を除く。)、保存した全ての器官・組織について病理組織学的検査を行う。特に、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が認められた器官及び組織については、他の全ての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査する。

回復群では、少なくとも投与群で投与期間終了時に影響の認められた器官・組織及び、特に回復期間に変化が認められた場合には関連する器官及び組織についても検査する。

哺乳類を用いる90日間試験の反復投与毒性試験

OECDテストガイドライン408で定められた方法に準じて実施する。

哺乳類を用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

目的

本試験は、動物に被験物質を一定期間反復投与したときに現れる被験物質の一般毒性及び生殖発生毒性を明らかにすることを目的とする。

1 試験動物(注1)

1-1 動物種及び性

ラット以外のげっ歯類を用いる妥当な理由がある場合を除き、原則として、順調に発育したラットの雄及び雌を用いる。

1-2 週齢

ラットでは、交配開始時に性成熟期(注2)に達している週齢とする。投与開始に際しては、体重の変動範囲は、雌雄それぞれ平均体重の±20%以内とする。また、雌動物

については、未経産で正常な性周期^(注3)を示している動物を使用する。

1 - 3 動物数

交配群については、各群雄及び雌それぞれ 10 匹以上とし、著しい毒性影響が認められる場合を除き、妊娠末期において 1 群 8 匹以上の妊娠動物を確保する。また、雌については少なくとも対照群及び最高用量群について、それぞれ 5 匹以上で構成される非交配群を設けることが望ましい。なお、途中解剖を行う場合は、それに要する数の動物をあらかじめ加えておくものとする。また、投与終了後少なくとも 14 日間飼育し、変化の可逆性及び持続性、遅発性毒性等について観察するために、雄及び雌それぞれ 5 匹以上で構成される回復群を、少なくとも対照群及び最高用量群にそれぞれ設けることが望ましい^(注4)。

1 - 4 交配方法

雌動物は、交尾が確認されるまで同じ試験群の同一の雄動物と 1 対 1 で同居させる。

交配期間は 14 日間を限度とする^(注5)。

2 被験物質

2 - 1 投与方法

原則として、経口投与とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2 - 2 用量^(注6)

被験物質投与群は原則として 3 段階以上を設定し、投与群とは別に対照群をおく。最高用量は被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に 1 段階以上の中間用量を設ける。

最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000 mg/kg/day とする。また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は摂餌量又は摂水量から算出される被験物質の摂取量が 1000 mg/kg/day に相当する用量とする。この量で何ら毒性が認められないときは必ずしも試験で 3 用量を用いなくてもよい。

2 - 3 投与期間

雌雄に少なくとも交配前 14 日間投与する。雄^(注7)及び雌の非交配群については合計で少なくとも 28 日間以上、雌の交配群については交配期間、妊娠期間及び剖検前日(分娩完了確認日を分娩後 0 日とした場合、分娩後 13 日)まで、原則として連続投与する^(注8、9)。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死^(注10)及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する^(注11、12)。さらに、詳細な観察を、投与期間前に1回以上、その後は少なくとも週に1回、全ての親/成熟動物について行い、記録する^(注13、14)。

さらに、次の事項について検査する。

3 - 1 親/成熟動物

3 - 1 - 1 死亡率

3 - 1 - 2 体重、摂餌量及び摂水量（被験物質を飲料水に添加した場合）^(注15)

3 - 1 - 3 機能検査^(注16)

3 - 1 - 4 性周期^(注3)及び妊娠期間^(注17)

3 - 1 - 5 血液検査^(注18)

3 - 1 - 5 - 1 血液学的検査^(注19)

3 - 1 - 5 - 2 血液生化学的検査^(注20、21)

3 - 1 - 6 尿検査^(注22)

3 - 1 - 7 病理学的検査

3 - 1 - 7 - 1 肉眼的検査及び器官重量^(注23、24)

3 - 1 - 7 - 2 病理組織学的検査^(注25)

3 - 2 児動物^(注26、27)

3 - 2 - 1 生存児検査^(注28、29、30)

3 - 2 - 2 剖検時検査^(注31)

3 - 2 - 3 血液検査^(注32、33)

3 - 2 - 3 - 1 血液生化学的検査^(注21)

3 - 3 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

また、一般状態が極めて不良となった瀕死の動物は速やかに安楽死させた後、剖検を行う。交尾が成立しなかった雌雄、出産予定日を過ぎても分娩が認められない雌についてはその原因を調べる。

4 結果報告

試験の結果は様式 5 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。
また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて評価する。

- (注 1) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。
- (注 2) 性成熟期は系統により異なるので注意する。
- (注 3) 交配群の全ての雌動物について、性周期を投与前期間の 2 週間を含め交尾まで毎日観察し、記録する。膣垢を採取する際は子宮頸部の刺激による偽妊娠を引き起こさないように注意する。
- (注 4) 雄については、投与終了時に各群それぞれ少なくとも 5 匹以上を選択し、回復群としてもよい。雌については、別途回復群として、交配させない群を設定する。
- (注 5) 雌動物については、毎朝膣垢中の精子又は膣栓の検査を行い、精子又は膣栓が認められた日を妊娠 0 日とする。
- (注 6) 用量設定に際しては、全身的な毒性（例えば、体重減少や、肝臓、心臓、肺又は腎臓に対する影響など）や毒性と断定できない変化が観察された場合には、内分泌関連の影響についても考慮する。
- (注 7) 交尾が確認できなかった、又は雌を妊娠させ得なかった雄について、無処置の成熟雌と再交配する場合などは、それを考慮して適切な時期まで雄を飼育しその間投与を継続する。
- (注 8) 被験物質を吸入又は経皮暴露する場合、雌については少なくとも妊娠 19 日まで暴露し、分娩後 4 日までに暴露を再開する。
- (注 9) 交尾が確認できなかった雌についても投与を継続し、交配期間の最終日の 24 日から 26 日後に安楽死させた後、剖検する。
- (注 10) 少なくとも 1 日に 2 回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。
- (注 11) 少なくとも 1 日に 1 回（毒性の徴候が観察された場合はより頻繁に）、投与により予測される影響のピーク時を考慮し、可能な限り同じ時刻に観察する。
- (注 12) 母動物については、妊娠期における分娩の障害又は遅延の徴候、授乳期における哺育行動等、児動物については、形態、哺乳状態及び行動の異常がないかを確認する。
- (注 13) 観察は飼育室内又はそれと同等の環境下のケージ外の標準的な観察の場において行う。試験施設で明確に定義されたスコアリングシステムを用いて記録することが望ましい。試験条件のばらつきを最小にするよう配慮する。観察は投与内容について知らされていない観察者が実施することが望ましい。
- (注 14) 少なくとも、皮膚、被毛、眼、粘膜の状態、分泌物及び排せつ物、自律神経系への影響を示す反応（流涎、流涙、立毛、縮瞳・散瞳、異常呼吸等）を観察する。また、間代性・強直性痙攣、常同行動（過度の身づくろい、反復旋回運動等）、異常行動（自傷行動、後ずさり等）の有無と共に、歩行、姿勢及びハンドリングへの反応に異常がないかを確認する。
- (注 15) 投与開始日、その後週に 1 回以上及び解剖時に体重を測定する。交尾が成立した雌については、妊娠 0 日、7 日、14 日及び 20 日、分娩後 0 日、4 日及び 13 日

に体重を測定する。また、摂餌量及び摂水量については、原則として週1回以上測定する。

(注16) 試験期間中の適切な時期(母動物については授乳期に児動物への影響に十分配慮した上で適切に、その他の動物については剖検を実施する週に行うのが望ましい。)に1回、全ての群の雄及び雌のそれぞれ少なくとも5匹以上について、異なる種類の刺激に対する感覚応答(聴覚、視覚、深部知覚等)、握力の測定及び自発運動量の測定を、必要に応じ、測定機器等を使って行う。影響が認められた場合には、回復2週目にも同様に検査する。

(注17) 妊娠期間について、妊娠0日から起算する。

(注18) 剖検時や剖検の直前など、適切な時期に全ての雄及び雌動物について採血する。採血前に一晩絶食することが望ましい。

(注19) 全ての群の雄及び雌についてそれぞれ少なくとも5匹以上(母動物については投与期間を十分に考慮して選択することが望ましい。)について、次の項目を検査する。

赤血球数、網状赤血球率、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、白血球数、白血球百分率、血小板数、その他の血液凝固能の指標など。

なお、血液凝固能の指標としては、血液凝固時間、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間等がある。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えばメトヘモグロビン濃度、ハイツ小体等についても検査する。

(注20) 全ての群の雄及び雌についてそれぞれ少なくとも5匹以上(母動物については投与期間を十分に考慮して選択することが望ましい。)について、次の項目を検査する。

総たん白、アルブミン、血糖、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、Na、K、Cl、肝細胞への影響を示す2種以上の酵素(アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ、グルタメートデヒドロゲナーゼ等)、胆汁酸など。

このほか、被験物質の化学構造等からみて毒性影響が示唆される項目、例えば、コリンエステラーゼ、トリグリセリド、ホルモン、Ca、P、総ビリルビン等についても検査する。

(注21) 生後13日(出生日を生後0日とする。)児動物及び成熟雄動物について血清T4濃度を測定する。関連性がある場合、母動物及び生後4日児動物についてもT4測定する。必要に応じて、他のホルモン濃度の測定を検討する。T4及びTSHなど甲状腺ホルモン測定のために、児動物の血液は同腹ごとにまとめて、総量として測定することが望ましい。甲状腺ホルモン(T3及びT4)及びTSHを測定するため、血漿又は血清サンプルをマイナス20以下で保存する。

(注22) 原則として、雄及び雌(非交配群)について、各群それぞれ少なくとも5匹以

上、剖検を実施する週に新鮮尿又は一定時間の蓄尿を用いて、性状、量、浸透圧又は比重、pH、蛋白、糖、潜血、沈査等の尿検査を実施する。

(注23) 解剖に当たり、膣垢を採取し、全ての雌の性周期を特定し、エストロゲン感受性組織の病理組織学検査の結果との関連性を検討する。

(注24) 原則として、最終投与の翌日(回復群については回復期間終了後)に剖検する。試験に使用した全ての動物について、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔及びその内容の観察を含む肉眼的検査を、特に生殖器官に十分に注意を払いながら行う。雌の交配群については着床痕数を記録する。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な固定液中に保存する(例えば、精巣などに関しては、ブアン液や改良ダビドソン液などが推奨されている。)。全ての肉眼的病変部、脳*(大脳、小脳及び橋を含む代表的な部位)、下垂体、脊髄、眼球、顎下腺、甲状腺*(上皮小体を含む。)、心臓*、気管及び肺(固定液を注入後浸漬)、肝臓*、腎臓*、胸腺*、脾臓*、膵臓、副腎*、胃、小腸及び大腸(パイエル板を含む。)、生殖腺(精巣*又は卵巣*)、副生殖器(前立腺*、精囊*(凝固腺を含む。))、精巣上体*、子宮*(子宮頸部を含む。))、膣、膀胱、リンパ節(投与経路に関連するリンパ節及び試験施設の経験に従ってその他のリンパ節を採取する。)、筋肉に近い末梢神経(坐骨神経又は脛骨神経)、骨格筋、骨、骨髄(大腿骨)及び肉眼的所見・他の情報・検査等から標的器官と疑われた器官・組織。

なお*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。ただし、妊娠した雌の子宮の測定は任意とする。また、必要に応じて、肛門挙筋-球海綿体筋複合体、カウパー腺及び陰茎亀頭の重量を測定する。

(注25) 交配群及び非交配群の最高用量群及び対照群について各群(回復群を除く。)雄及び雌それぞれ少なくとも5匹以上の保存した全ての器官及び組織について病理組織学的検査を行う。特に、卵巣、精巣及び精巣上体(精子形成過程と精巣の間質細胞に注意を払う。)について詳細に検査する。また、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が認められた器官・組織については、他の全ての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査する。

回復群では、少なくとも投与群で投与期間終了時に影響の認められた器官・組織及び、特に回復期間に変化が認められた場合には関連する器官・組織についても検査する。

(注26) 各母動物について出産後の可能な限り早い時期に出産児及び死産児の数及び性別並びに肉眼による外表異常(口蓋、外部生殖器を含む。)の有無を調べる。

(注27) 生後4日に同腹児動物の匹数が雌雄各4~5匹になるように余分な児動物を無

作為に取り除いてもよい。各腹あたり雌雄各 4 ~ 5 匹に調整できない場合には、総数を 8 ~ 10 匹に調整する。体重や肛門生殖突起間距離などに基づいて児動物を選択して除去するのは適切でない。

(注 28) 出産直後又は出産後の早い時期、生後 4 日及び生後 13 日に児動物の数と性別を調べ、児体重を個別に測定する。

(注 29) 肛門生殖突起間距離を、生後 0 日から 4 日の間の同一日に測定する。測定日の体重の立方根で補正する。

(注 30) 生後 12 日又は 13 日に雄の児動物の乳頭数 / 乳輪数を算出する。

(注 31) 死亡児及び生後 13 日などに安楽死させた児動物について肉眼による外表異常(口蓋、外部生殖器を含む。)の検査をする。生後 13 日児動物について同腹の雌雄それぞれ 1 匹以上の甲状腺を保存し、必要に応じて病理組織学的検査を行う。

(注 32) 生後 4 日児動物について、同腹児動物の匹数が 8 ~ 10 匹より多い場合には、同腹ごとに可能な限り 2 匹以上を安楽死させ、採血する。同腹児動物の匹数が 8 ~ 10 匹に欠ける場合には安楽死及び採血は行わない。

(注 33) 生後 13 日に安楽死させた児動物について同腹の少なくとも 2 匹以上から採血する。

【参考】哺乳類を用いる簡易生殖発生毒性試験

目的

本試験は、生殖発生毒性に関する情報を得ることを目的とした簡易試験である(注 1)。

1 試験動物(注 2)

1 - 1 動物種及び性

ラット以外のげっ歯類を用いる妥当な理由がある場合を除き、原則として、順調に发育したラットの雄及び雌を用いる。

1 - 2 週齢

ラットでは、交配開始時に性成熟期(注 3)に達している週齢とする。投与開始に際しては、体重の変動範囲は、雌雄それぞれ平均体重の $\pm 20\%$ 以内とする。また、雌動物については、未経産で正常な性周期(注 4)を示している動物を使用する。

1 - 3 動物数

各群雄及び雌それぞれ 10 匹以上とし、著しい毒性影響が認められる場合を除き、妊娠末期において 1 群 8 匹以上の妊娠動物を確保する。

1 - 4 交配方法

雌動物は、交尾が確認されるまで同じ試験群の同一の雄動物と 1 対 1 で同居させる。

交配期間は 14 日間を限度とする (注5)。

2 被験物質

2 - 1 投与方法

原則として、経口投与とする。ただし、被験物質の性状により経口投与ができない場合は、非経口投与とする。強制投与の場合は、被験物質を適切な溶媒に溶解又は懸濁し、毎日一定の時刻に投与する。

2 - 2 用量 (注6)

被験物質投与群は原則として3段階以上を設定し、投与群とは別に対照群をおく。最高用量は被験物質による毒性影響が明らかに認められる量とし、最低用量は試験期間を通じて被験物質による毒性影響が発現しない量とする。また、最高用量と最低用量の間に1段階以上の中間用量を設ける。

最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000 mg/kg/day とする。また、飼料又は飲料水に添加して投与する場合は摂餌量又は摂水量から算出される被験物質の摂取量が 1000 mg/kg/day に相当する用量とする。この量で何ら毒性が認められないときは必ずしも試験で3用量を用いなくてもよい。

2 - 3 投与期間

雌雄に少なくとも交配前 14 日間投与する。雄については交配期間も含めて少なくとも 28 日間以上 (注7) とする。雌については交配期間、妊娠期間及び分娩後 13 日 (分娩完了確認日を分娩後 0 日とする。) まで、原則として連続投与する (注8、9、10)。

3 観察・検査

全ての動物について、その生死 (注11) 及び一般状態等を観察し、全ての毒性徴候を記録する (注12、13)。

さらに、次の事項について検査する。

3 - 1 親 / 成熟動物

3 - 1 - 1 死亡率

3 - 1 - 2 体重、摂餌量及び摂水量 (被験物質を飲料水に添加した場合) (注14)

3 - 1 - 3 性周期 (注4) 及び妊娠期間 (注15)

3 - 1 - 4 血液検査 (注16)

3 - 1 - 4 - 1 血液生化学的検査 (注17)

3 - 1 - 5 病理学的検査

3 - 1 - 5 - 1 肉眼的検査及び器官重量 (注18、19)

3 - 1 - 5 - 2 病理組織学的検査 (注20)

3 - 2 児動物 (注 21、22)

3 - 2 - 1 生存児検査 (注 23、24、25)

3 - 2 - 3 剖検時検査 (注 26)

3 - 2 - 1 血液検査 (注 27、28)

3 - 2 - 1 - 1 血液生化学的検査 (注、17)

3 - 3 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、可能な限りその死因を調べる。

また、一般状態が極めて不良となった瀕死の動物は速やかに安楽死させた後、剖検を行う。交尾が成立しなかった雌雄、出産予定日を過ぎても分娩が認められない雌についてはその原因を調べる。

4 結果報告

試験の結果は様式 6 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。

また、可能な項目については、適切な統計的手法を用いて評価する。

- (注 1) 本試験は、原則として反復投与毒性試験が既に行われている場合に行う。反復投与毒性試験が実施済みである化学物質について、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験における生殖発生毒性試験相当部分の試験成績を得るために本試験を実施することができる。
- (注 2) 動物愛護の観点から、全ての動物を適切に取り扱うこととする。
- (注 3) 性成熟期は系統により異なるので注意する。
- (注 4) 全ての雌動物について、性周期を投与前期間の 2 週間を含め交尾まで毎日観察し、記録する。膣垢を採取する際は子宮頸部の刺激による偽妊娠を引き起こさないように注意する。
- (注 5) 雌動物については、毎朝膣垢中の精子又は膣栓の検査を行い、精子又は膣栓が認められた日を妊娠 0 日とする。
- (注 6) 用量設定に際しては、全身的な毒性 (例えば、体重減少や、肝臓、心臓、肺又は腎臓に対する影響など) や毒性と断定できない変化が観察された場合には、内分泌関連の影響についても考慮する。
- (注 7) 交尾が確認できなかった、又は雌を妊娠させ得なかった雄について、無処置の成熟雌と再交配する場合などは、それを考慮して適切な時期まで雄を飼育しその間投与を継続する。
- (注 8) 剖検前に血液検査等のため一晩絶食させる場合は、投与期間は分娩後 13 日までとし、剖検は分娩後 14 日とする。
- (注 9) 被験物質を吸入又は経皮暴露する場合は、雌については少なくとも妊娠 19 日まで暴露し、分娩後 4 日までに暴露を再開する。
- (注 10) 交尾が確認できなかった雌についても投与を継続し、交配期間の最終日の 24 日から 26 日後に安楽死させた後、剖検する。
- (注 11) 少なくとも 1 日に 2 回、動物の生死及び死亡の徴候を観察する。

- (注12) 少なくとも1日1回(毒性の徴候が観察された場合はより頻繁に)、投与により予測される影響のピーク時を考慮し、可能な限り同じ時刻に観察する。
- (注13) 母動物については、妊娠期における分娩の障害又は遅延の徴候、授乳期における哺育行動等、児動物については、形態、哺乳状態及び行動の異常がないかを確認する。
- (注14) 投与開始日、その後週に1回以上及び解剖時に体重を測定する。交尾が成立した雌については、妊娠0日、7日、14日及び20日、分娩後0日、4日及び13日に体重を測定する。また、摂餌量及び摂水量については、原則として週1回以上測定する。
- (注15) 妊娠期間について、妊娠0日から起算する。
- (注16) 剖検時や剖検の直前など、適切な時期に全ての雄及び雌動物について採血する。
- (注17) 生後13日(出生日を生後0日とする。)児動物及び成熟雄動物について血清T4濃度を測定する。関連性がある場合、母動物及び生後4日児動物についてもT4測定する。必要に応じて、他のホルモン濃度の測定を検討する。T4及びTSHなど甲状腺ホルモン測定のために、児動物の血液は同腹ごとにまとめて、総量として測定することが望ましい。甲状腺ホルモン(T3及びT4)及びTSHを測定するため、血漿又は血清サンプルをマイナス20以下で保存する。
- (注18) 解剖に当たり、臍垢を採取し、全ての雌の性周期を特定し、エストロゲン感受性組織の病理組織学検査の結果との関連性を検討する。
- (注19) 原則として、最終投与の翌日に剖検する。試験に使用した全ての動物について、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔及びその内容の観察を含む肉眼的検査を、特に生殖器官に十分に注意を払いながら行う。雌については着床痕数を記録する。病理組織学的検査のため次の器官・組織を適切な固定液中に保存する(例えば、精巣などに関しては、ブアン液や改良ダビドソン液などが推奨されている。)

全ての肉眼的病変部、甲状腺*、生殖腺(精巣*又は卵巣*)、副生殖器(前立腺*、精囊*(凝固腺を含む。))、精巣上体*、子宮(子宮頸部を含む。))、膣。

なお、*印を付した諸器官については、全例その重量を測定する。

また、必要に応じて、肛門挙筋-球海綿体筋複合体、カウパー腺及び陰茎亀頭の重量を測定する。

- (注20) 最高用量群及び対照群について各群雄及び雌それぞれ少なくとも5匹以上の保存した全ての器官・組織について病理組織学的検査を行う。特に、卵巣、精巣及び精巣上体(精子形成過程と精巣の間質細胞に注意を払う。)について詳細に検査する。保存した他の器官・組織については、肉眼的変化が認められた場合や毒性が予想される場合などは検査をすることが望ましい。また、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が認められた器官・組織については、他の全ての用量群の動物についてもその該当所見に注目して検査する。
- (注21) 各母動物について出産後の可能な限り早い時期に出産児及び死産児の数及び

性別並びに肉眼による外表異常（口蓋、外部生殖器を含む。）の有無を調べる。

（注 2 2）生後 4 日に同腹児動物の匹数が雌雄各 4 ～ 5 匹になるように余分な児動物を無作為に取り除いてもよい。各腹あたり雌雄各 4 ～ 5 匹に調整できない場合には、総数を 8 ～ 10 匹に調整する。体重や肛門生殖突起間距離などに基づいて児動物を選択して除去するのは適切でない。

（注 2 3）出産直後又は出産後の早い時期、生後 4 日及び生後 13 日に児動物の数と性別を調べ、児体重を個別に測定する。

（注 2 4）肛門生殖突起間距離を、生後 0 日から 4 日の間の同一日に測定する。測定日の体重の立方根で補正する。

（注 2 5）生後 12 日又は 13 日に雄の児動物の乳頭数 / 乳輪数を算出する。

（注 2 6）死亡児及び生後 13 日などに安楽死させた児動物について肉眼による外表異常（口蓋、外部生殖器を含む。）の検査をする。生後 13 日児動物について同腹の雌雄それぞれ 1 匹以上の甲状腺を保存し、必要に応じて病理組織学的検査を行う。

（注 2 7）生後 4 日児動物について、同腹児動物の匹数が 8 ～ 10 匹より多い場合には、同腹ごとに可能な限り 2 匹以上を安楽死させ、採血する。同腹児動物の匹数が 8 ～ 10 匹に欠ける場合には安楽死及び採血は行わない。

（注 2 8）生後 13 日に安楽死させた児動物について同腹の少なくとも 2 匹以上から採血する。

変異原性試験

目的

本試験は、比較的簡便な短期間の試験により、被験物質の遺伝毒性、がん原性を予測することを目的とする。

試験法について

本試験においては、遺伝子突然変異誘発性を指標とする試験として細菌を用いる復帰突然変異試験及び染色体異常誘発性を指標とする試験として哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行うこととする。

なお、上記の試験を実施し得ない科学的根拠のある場合には、類似の遺伝学的指標を持つ試験系で代行することができる。

1 細菌を用いる復帰突然変異試験

1 - 1 目的

細菌を用いて、被験物質の遺伝子突然変異誘発性の有無を検索する。

1 - 2 使用菌株

以下の 5 菌株を用いて試験を行う。

(1) ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA98

(2) ネズミチフス菌 TA100

(3) ネズミチフス菌 TA1535

(4) ネズミチフス菌 TA1537、TA97 又は TA97a

(5) 大腸菌(*Escherichia coli*)WP2 *uvrA*、大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 又はネズミチフス菌 TA102

DNA にクロスリンクする化合物を検出する時には、ネズミチフス菌では TA102 を含めるか、大腸菌では除去修復能が野生型の WP2 株又は WP2/pKM101 株を追加する。必要に応じて他の菌株を追加する。

1 - 3 試験法

プレインキュベーション法又はプレート法のいずれかで実施する。科学的に正当な理由があれば、他の方法を用いてもよい。いずれの方法においても、代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を行う。代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネート 9,000 × g 上清分画(S9)に補酵素などを加えた S9mix を用いる。S9 の最終濃度は 5 ~ 30% の範囲内（通常 10%）とする。

1 - 4 用量段階

適切な間隔で 5 段階以上の解析できる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ用量設定試験を行い、生育阻害及び溶解性を考慮に入れて設定する。原則として、生育阻害の現れる用量を最高用量とし、生育阻害の現れない場合は 5mg/plate を最高用量とする。難溶性物質で全く生育阻害がみられない場合には、析出する用量を最高用量とすることができる。

1 - 5 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の変異原物質による処理群を設ける。

1 - 6 プレート数

被験物質の各用量、並びに陰性及び陽性対照について、原則としてそれぞれ 2 枚以上のプレートを用いる。

1 - 7 復帰変異コロニーの観察

全てのプレートを原則として 37 °C で 48 ~ 72 時間培養した後に、プレート毎に復帰変異コロニー数を計測し、記録する。同時に生育阻害を観察し、それが認められた場合には、その用量を記録する。又、被験物質の析出が認められた場合にも記録する。

1 - 8 再現性

原則として試験結果には再現性がなければならない。ただし、全菌株を用いて、陰性対照及び陽性対照も含めた用量設定試験が各用量 2 枚以上のプレートを用いて行われている場合には、再現性の確認に用いることができる。

1 - 9 結果の判定

復帰変異コロニー数が陰性対照に比較して明らかに増加し、かつ、その作用に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定する。用量設定試験及び本試験の結果に再現性が認められない場合には、再現性を確認する試験を実施する。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

1 - 10 結果の表示

各プレート毎の復帰変異コロニー数を示すとともに、各用量毎にその平均値を表示する。

1 - 1 1 結果のまとめ

試験の結果は様式 7 によりまとめる。

2 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2 - 1 目的

哺乳類培養細胞を用いて、被験物質の染色体構造異常の誘発性の有無を検索する。倍数体等が出現した場合には、それを記録する。

2 - 2 使用細胞

チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（例えば CHL/IU、CHO）、ヒト末梢血リンパ球、若しくは、その他の初代、継代又は株細胞を用いる。試験に用いる細胞については、染色体数（modal number）、マイコプラズマの汚染の有無、細胞周期などを調べる。

2 - 3 試験法

増殖期にある細胞を用い、最初に短時間処理法として代謝活性化による場合及びよらない場合について、3~6 時間被験物質で処理し、処理開始より約 1.5 細胞周期後に染色体標本を作製する。短時間処理法の結果が陰性の場合には、次に代謝活性化によらない場合について 1.5 細胞周期の連続処理法による試験を実施する。被験物質によっては顕著な細胞周期の遅延が生じる場合がある。代謝活性化によらない場合には 1.5 細胞周期よりも長い連続処理が必要な場合があり、そのため必要に応じて確認試験を行う。

代謝活性化による場合には、適切な薬物代謝酵素誘導剤（例えばフェノバルビタールと β -ナフトフラボンの併用等）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9,000 \times g 上清画分（S9）に補酵素などを加えた S9mix を用いる。S9 の最終濃度は 1 ~ 10 % の範囲内（通常 1~2 %）とする。

2 - 4 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解又は適切な媒体に懸濁させる。被験物質が液体の場合には直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩水などを用いて溶解させ、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド（DMSO）などを用いて溶解させる。必要に応じてカルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウムなどを用いて均一な懸濁液を調製する。

2 - 5 用量段階

適切な間隔（原則として公比 2）で 3 段階以上の染色体分析ができる用量を用いる。最高用量は、あらかじめ 2mg/mL、2 μ L/mL 又は 10mM のうちいずれか低い濃度を最高用量とし、細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。

細胞毒性の指標として、細胞株については相対的細胞集団倍加（RPD）、又は相対的細胞数増加（RICC）を、初代培養リンパ球については分裂指数（MI）の相対値を用い、原則として、最高用量はこれらの指標において 50% 以上 60% 以下の細胞毒性を示す（RICC、RPD、MI が陰性対照の 50% 以下 40% 以上となる）用量に設定する。

ただし、60%を超えた細胞毒性が認められる場合であっても、染色体の観察が十分に可能であれば、その用量を最高用量とすることができる。50%以上の細胞毒性が認められない場合は2mg/mL、2 μ L/mL又は10mMのうちいずれか低い方を最高用量とする。50%以上の細胞毒性が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出する用量を最高用量とすることができる。

2 - 6 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の染色体異常誘発物質による処理群を設ける。

2 - 7 プレート数

被験物質の各用量群、並びに陰性及び陽性対照群について、原則としてそれぞれ2枚のプレートを用いる。

2 - 8 染色体異常の観察

スライド標本はコード化し、処理条件がわからない状況で観察する。染色体構造異常については、各用量当たり少なくとも300個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数がモード \pm 2）を計数する。なお、染色体異常を有する細胞が多数観察され、被験物質が明らかに陽性と判定される場合、分析する分裂中期細胞数を減らすことができる。

また、染色体構造異常を有する細胞を計数する。染色分体型及び染色体型の異常はそれぞれ別に記録し、さらに細分類（切断、交換）する。ギャップは他の異常と区別して記録するが、構造異常には含めない。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義する。染色体数的異常については、倍数体等の出現数を記録する。

2 - 9 結果の判定

原則として、次に掲げるすべての要件を満たすものと認められた場合に陽性と判定する。

a) 少なくとも1つの試験濃度において、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。

b) 適切な傾向検定において、用量依存性があること。

c) 試験結果は、いずれも陰性対照の背景データの分布から外れていること。

明確に陽性又は陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施する。

2 - 10 結果の表示

短時間処理法又は連続処理法による試験における全てのプレートについて、染色体構造異常をもつ細胞数及びその出現頻度（%）並びに構造異常の種類別に細胞数を表示する。また、群ごとにプレートの平均値を表示する。ギャップは他の異常とは区別して記録するが、総異常頻度には含めない。倍数性や核内倍加の細胞が観察された場合はその割合（%）を表示する。

細胞増殖抑制試験並びに短時間処理法による試験及び連続処理法による試験における全てのプレートについて、処理群、陰性対照群及び陽性対照群のすべてについて細胞毒性を同時に測定、記録する。被験物質の析出が見られた場合には、その用量を明記する。

2 - 1 1 結果のまとめ

試験の結果は様式 8 によりまとめる。

(注)

細胞毒性評価のための計算式

分裂指数 (MI: Mitotic Index) :

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{分裂細胞の数}}{\text{計数した細胞の総数}} \times 100$$

相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count) 又は相対的細胞集団倍加

(RPD: Relative Population Doubling) は、いずれも分裂した細胞集団の割合を考慮に入れたものとして用いられる。

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

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

細胞集団倍加 (PD: Population Doubling) = $[\log(\text{処理後の細胞数} \div \text{処理開始時の細胞数})] \div \log 2$

3 マウスリンフォーマ TK 試験

3 - 1 目的

マウスリンパ腫細胞 L5178Y 細胞を用いて、被験物質のチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) 遺伝子における突然変異誘発性の有無を検索する^(注1)。

3 - 2 使用細胞

マウスリンパ腫細胞 L5178Y tk^{+/+}-3.7.2c 株を用いる。試験に用いる細胞については、マイコプラズマ汚染の有無、細胞周期、TK 遺伝子自然突然変異頻度、核型などを調べておく^(注2)。

3 - 3 試験法

対数増殖期にある細胞を用い、最初に 3~4 時間の短時間処理法として代謝活性化による場合及びよらない場合について試験を実施する。短時間処理法の結果が陰性の場合には、代謝活性化によらない場合について 24 時間処理法による試験を実施する。代謝活性化には、適切な薬物代謝酵素誘導剤 (例えばフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとの併用等) で処理したげっ歯類 (通常ラット) 肝ホモジネートの 9,000 × g 上清画分 (S9) に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。S9 の最終濃度は 1~10% の範囲内 (通常 1~2%)

とする。

3 - 4 被験物質の調製

被験物質を適切な溶媒に溶解又は適切な媒体に懸濁させる。被験物質が液体の場合は直接試験系に加えてもよい。被験物質が水溶性の場合は生理食塩水などを用いて溶解させ、水に不溶の場合はジメチルスルホキシド (DMSO) などを用いて溶解させる。

3 - 5 用量段階

適切な間隔 (原則として公比 2) で 4 段階以上の突然変異コロニーが解析できる用量を用いる。最高用量が細胞毒性に基づく場合、最高用量は、相対総増殖率 (Relative Total Growth; RTG) が 10 ~ 20% になるよう設定する (注³)。80% 以上の細胞毒性が認められない場合の最高用量は、2 mg/mL、2 µL/mL 又は 10 mM のうちいずれか低い濃度とすることができる。80% 以上の細胞毒性が認められず、処理終了時に被験物質の析出が認められた場合には、析出が認められる最低濃度を試験の最高用量とすることができる。

3 - 6 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として適切な既知の突然変異誘発物質による処理群を設ける (注⁴)。

3 - 7 処理系列数

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 (注⁵)。

3 - 8 コロニーの観察及び特徴づけ

コロニーの観察は肉眼、顕微鏡又は適当な器具を用いて行う。LC 変異体コロニーを含むウェル、SC 変異体コロニーを含むウェル、両タイプのコロニーを含むウェルを分けてカウントする。コロニーの区別に関する基準は以下の通りである。

1) LC 変異体コロニー

大きさ：ウェルの直径の 1/4 を越えるもの

形態：一層になって広がっているもの

2) SC 変異体コロニー

大きさ：ウェルの直径の 1/4 以下のもの

形態：塊状にコンパクトとなっているもの

基本的には、大きさに判断し、それで判断が難しい場合は形態的違いを考慮する。

3 - 9 細胞毒性及び突然変異の検出

十分な数の細胞を被験物質で処理し、細胞を洗浄、新鮮培地に移し、約 48 時間培養を行う (突然変異発現期間)。突然変異発現期間の相対浮遊細胞増殖率 (Relative Suspension Growth; RSG) を記録する。その後、細胞を 96 ウェルプレートにトリフルオロチミジン (TFT) 存在下で、2,000 細胞/well の濃度で播種する (変異体選択プレート)。同時に

TFT を含まない平板効率測定用の 96 ウェルプレート (1.6 細胞/well) を作製する (平板効率プレート)。細胞を播種した 96 ウェルプレートで 10~14 日間細胞を培養後、変異体選択プレートと平板効率プレートのコロニーを含むウェルの数を数え、記録する。これらの値から、ポアソン分布の計算式に従い、遺伝子突然変異頻度、平板効率を求める。

3 - 1 0 結果の判定

陽性又は陰性の判定には、増加した突然変異頻度に生物学的妥当性があることを保証する方法として、他の試験に一般的に使用される統計解析の代わりに、事前に定義された誘発突然変異頻度 (総合的評価ファクター (Global Evaluation Factor; GEF)) を利用する。マイクロウェル法の GEF は 126×10^{-6} である。すべての被験物質処理群において、誘発突然変異頻度 (陰性対照群に対する増加分) が GEF を超えていない場合、被験物質は原則として陰性であると判定される。いくつかの被験物質処理群の誘発突然変異頻度が 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。明確に陽性又は陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施することが望ましい。

3 - 1 1 結果の表示

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群の全てについて、以下の事項を記録する。毒性を同時に測定、記録する。

- ・変異体選択プレートの LC 変異体コロニーを含むウェル数、SC 変異体コロニーを含むウェル数、両タイプのコロニーを含むウェル数。平板効率プレートのコロニーを含むウェル数
- ・これらの値から算出された総突然変異頻度 (MF) ($\times 10^{-6}$) と SC 変異体の割合 (%) (注 6、7)
- ・被験物質処理前の細胞数及び細胞濃度、処理後の細胞数及び細胞濃度、発現期間における細胞の増殖率
- ・これらの値から算出された相対浮遊細胞増殖率 (RSG) と相対総増殖率 (RTG)

被験物質の析出が見られた場合には、その用量を明記する。また、バクテリア、カビ等のコンタミが認められたウェルは観察対象からはずし、その数の分は総ウェル数から引いて計算する。

(注 1) 本試験では細胞増殖速度の異なる 2 種類の変異体 (large colony (LC) 変異体、small colony (SC) 変異体) が出現する。SC 変異体は染色体レベルの大きなゲノム変化に起因すると考えられているので、突然変異誘発性が見られた場合は、SC 変異体の割合を記録する。

(注 2) 細胞周期は、増殖曲線から求めた世代倍加時間でよい。自然突然変異頻度が著しく高い場合 ($>200 \times 10^{-6}$) は適切な方法により、使用する細胞中より TK 変異体を除去する必要がある。核型の代わりに染色体モード数を調べることでよい。

(注3) 細胞毒性計算式

細胞毒性は、2日間の突然変異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平板効率(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(SG1)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(SG2)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は陰性対照に対する処理培養の総SG(SG1 × SG2)である。つまり、

$$RSG = [SG1(\text{処理群}) \times SG2(\text{処理群})] / [SG1(\text{陰性対照群}) \times SG2(\text{陰性対照群})]$$
となる。SG1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。ただし、細胞の遠心、洗浄の過程で細胞を消失することがあるので、その前後で細胞数を計測し、操作による細胞の消失を補正することが望ましい。

相対平板効率(RCE)は、突然変異体選択時の平板効率で得られる処理培養/陰性対照の相対平板効率である(注7参照)。相対総増殖率(RTG)はRSGとRCEの積から求めることができる。

相対総増殖率(RTG)： $RTG = RSG \times RCE$

(注4) 一般的に陽性対照物質としてメタンスルホン酸メチル、(代謝活性化系の非存在下)、シクロフォスファミド、ベンツ[a]ピレン、3-メチルコラントレン(代謝活性化系の存在下)が用いられる。

(注5) 原則として、陰性対照群に関しては1系列あたり、平板効率プレート2枚、変異体選択プレート4枚、被験物質の各用量群、及び陽性対照群については、平板効率プレート1枚、突然変異プレート2枚を用いる。

(注6) 突然変異頻度の計算式

96ウェルプレートのコロニー形成率はポアソン分布のゼロ項から、Pは次式で求められる。

$$P = -\ln(E_w / T_w)$$

E_w : Empty Well (コロニーを含まないウェル数)

T_w : Total Well (総ウェル数)

i. 変異体選択プレート

$$CE_M = -\ln(EW_M / TW_M) / N_M$$

・ EW_M : 変異体選択プレートのコロニーを含まないウェル数

・ TW_M : 変異体選択プレートの総ウェル数

・ N_M : 変異体選択プレートの1ウェルあたりの平均播種細胞数(2000個)

ii. 平板効率マイクロウェルプレート

$$CE_v = -\ln(EW_v / TW_v) / N_v$$

- EW_v : 平板効率プレートのコロニーを含まないウェル数
- TW_v : 平板効率プレートの総ウェル数
- N_v : 平板効率プレートの1ウェルあたりの平均播種細胞数 (1.6個)

iii. 突然変異頻度 (MF)

$$MF = CE_M / CE_v$$

(注7) SC変異体の割合 (%SC) の計算式

$$\%SC = (\text{SC変異体コロニーを含むウェル数} + \text{両タイプのコロニーを含むウェル数}) / (\text{全てのコロニーを含むウェル数})$$