

### 3 マウスリンフォーマ TK 試験 (案)

#### 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<sup>+/+</sup>-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。代謝活性化系の存在下の短時間処理法の結果が陰性の場合には、必要に応じて確認試験を行う (注3) 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4)。最高用量は、80%以上の細胞毒性が認められない場合は2 mg/mL、2 μL/mL 又は10 mM のうちいずれか低い濃度を最高用量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5)。

### 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6)。

### 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、大きさで判断し、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

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。

### 3-10 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  $126 \times 10^6$  である。すべての被験物質群の突然変異頻度が 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群の突然変異頻度が 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。

### 3-11 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 7、8)
- ・被験物質処理前の細胞濃度、処理後の細胞濃度、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、それを記録する。

(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。

(注 3) 同じ種類及び濃度の代謝活性化系を用いた繰り返しの試験は、通常必要ない。しかしながら、特別な代謝が必要なある種の化合物については代謝活性化系の変更が必要である。この場合には、当該種類の物質を代謝活性化するのに適切だと認められている外来の代謝活性化系の使用が通常求められる。

(注 4) 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 は無処理 / 溶媒対照に対する処理培養の総 SG (SG1  $\times$  SG2) である。つまり、

$$RSG = [SG1(\text{処理群}) \times SG2(\text{処理群})] / [SG1(\text{対照群}) \times SG2(\text{対照群})]$$

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/溶媒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。

$$\text{相対総増殖率 (RTG)} : \text{RTG} = \text{RSG} \times \text{RCE}$$

(注 5) 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 6) 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 7) 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. 変異体選択用マイクロウェルプレート

$$CE_M = -\ln (E_{W_M} / T_{W_M}) / N_M$$

・  $E_{W_M}$ : 変異体選択用マイクロウェルのコロニーを含まないウェル数

・  $T_{W_M}$ : 変異体選択用マイクロウェルの総ウェル数

・  $N_M$ : 2000

ii. 平板効率マイクロウェルプレート

$$CE_V = -\ln (E_{W_V} / T_{W_V}) / N_V$$

・  $E_{W_V}$ : 平板効率マイクロウェルプレートのコロニーを含まないウェル数

・  $T_{W_V}$ : 平板効率マイクロウェルプレートの総ウェル数

・  $N_V$ : 1.6

iii. 突然変異頻度 (MF)

$$MF = CE_M / CE_V$$

(注 8) SC 変異体の割合 (%SC) の計算式

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