

< ほ乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験及びほ乳類を用いる 90 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、ほ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、ほ乳類を用いる 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ほ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。

ほ乳類を用いる 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毎日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

1 - 1 動物種及び性

原則として、ラットの雄及び雌を用いる。

1 - 2 週齢

ラットでは 5 あるいは 6 週齢^(注1)とし、体重のそろった動物を用いる。体重の変動範囲は、それぞれ雌雄の平均体重の ± 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、中間で屠殺して検査を行う場合は、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、持続性、並びに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サテライト群を、対照群及び高用量群にそれぞれ設ける。

2 被験物質

2 - 1 投与方法

被験物質の投与は、原則として、経口投与で行う。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、非経口投与で行う。強制投与の場合は、毎日一定の時刻に投与する。

2 - 2 用量

投与量は 3 段階以上を設定する。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、別に対照群をおく。

混餌投与又は飲水投与の場合の被験物質摂取量は、動物の摂餌量又は摂水量と被験物質の濃度から算出する。

なお、最高投与限度用量は、強制経口投与の場合は、1000 mg/kg の用量で、また、

飼料又は飲料水に添加して投与する場合は飼料又は飲料水から摂取される被験物質の量が 1000 mg/kg に相当する用量^(注2)とし、この量で何ら毒性が認められないときは 3 用量を用いる試験は必要としない。

2 - 3 投与期間

28 日間投与とする。

3 観察・検査

毎日少なくとも 1 回、可能な限り同じ時刻で、投与後の予測される影響のピーク時を考慮し、すべての動物の一般状態を観察・記録する。共食いや自己融解による被験動物数の減少を防ぐため、少なくとも 1 日に 2 回は動物の発病及び死亡の徴候について観察を行う。更に、最初に被験物質を投与する前に 1 回、その後少なくとも週に 1 回、すべての動物についての詳細な観察を行い、記録する^(注3,4)。投与 4 週目に、すべての動物について機能検査を行い、異常が認められた場合には、サテライト群についてもすべての動物について機能検査を行う^(注5)。

更に、次の事項について検査を行う。

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6)

3 - 3 血液検査

3 - 3 - 1 血液学的検査^(注7)

3 - 3 - 2 血液生化学的検査^(注8)

3 - 4 尿検査^(注9)

3 - 5 病理学的検査

3 - 5 - 1 肉眼的検査及び器官重量^(注10)

3 - 5 - 2 病理組織学的検査^(注11)

3 - 6 その他の必要な事項

試験中死亡した動物については、できるだけその死因を調べる。

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による屠殺剖検を行う。

4 結果のまとめ

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) 5 あるいは 6 週齢の動物が得られない場合には、9 週齢を超えないものでもよい。

(注 2) ラットの場合、1000mg/kg の用量に相当する飼料又は飲料水中の濃度は、投与期間等により変わることもあるが、一応、2 % を目安とする。

(注 3) 観察は飼育室内あるい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。試験機関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。試験結果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4) 観察は、少なくとも、皮膚、被毛、眼、粘膜、分泌物及び排泄物の状態、自律神経系の活動の出現(流涎、流涙、立毛、瞳孔の大きさ、異常呼吸等)、歩行・姿勢・ハンドリングへの反応、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)等の有無を確認する。

(注5) 投与4週目の観察において、異なる種類の感覚への刺激に対する運動反応(聴覚、視覚、固有感覚等)、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。

(注6) 週1回以上測定する。

(注7) すべての動物(瀕死又は途中死亡を除く。)について行う。血液学的検査として次の項目を検査する。赤血球数、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、トロンボプラスチン時間等がある。

この他、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、例えば網状赤血球数、メトヘモグロビン等についても検査する。

(注8) すべての動物(瀕死又は途中死亡を除く。)について行う。採血前に一晩絶食することが望ましい。

血液生化学的検査として次の項目を検査する。

総蛋白、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ぺプチターゼ、ソルピトールデヒドロゲナーゼ等)など。この他、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9) 毒性影響が予想されるか、尿の外観の観察結果によってそれが示唆されるときには、試験の最終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10) 試験に使用したすべての動物は、体表、開孔部、頭蓋腔、胸腔、腹腔と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・組織を適切な保存液中に保存する。

すべての肉眼的病変部、脳*(大脳、小脳及び橋を含む代表的な部位)、下垂体、脊髄、眼球、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*、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(子宮又は前立腺、精巣上体*)、膀胱、リンパ節(投与経路に関連するもの、投与経路から離れたもの)、筋肉に近い末梢神経(坐骨神経又は脛骨神経)、骨髓(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、*印を付した諸器官は、その重量を測定する。

(注11) 最高用量群と対照群のすべての動物で、保存したすべての器官・組織について行う。特に、最高用量群で被験物質によると考えられる変化が見られた器官・組織については、他のすべ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を行う。

サテライト群でも、28日間の投与後に影響の見られた器官・組織について病理組織学的検査を行う。なお、基本的に肉眼的病変部については、すべて検査する。

ほ乳類を用いる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。

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は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 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 - 11 結果のまとめ

試験の結果は様式 5 によりまとめる。

2 ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2 - 1 目的

ほ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、代謝活性化による場合には 1.5 細胞周期よりも遅い標本作製時期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 5,6-ベンゾフラボンとの併用など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9,000 × 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 5 %）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 5mg/ml 又は 10mM（いずれか低い方）を最高用量とした細胞増殖抑制試験を行って設定することが望ましい。原則として、被験物質の培養液中での溶解性にかかわらず、細胞増殖が明らかに 50 % 以上抑制される用量を最高用量とする。細胞増殖は短時間処理法による試験あるいは連続処理法による試験においても染色体標本作製時に計測する。50 % 以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5mg/ml 又は 10mM（いずれか低い方）を最高用量とする。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 200 個のよく広がった分裂中期細胞（染色体数が $2n \pm 2$ ）を観察し、染色体構造異常をもつ細胞数及び構造異常の種類別に細胞数を記録する。2 枚のプレートを用いた場合には、原則としてプレート当たり少なくとも 100 個の分裂中期細胞を観察する。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。染色体の数的異常については、各用量当たり 200 個以上の分裂中期細胞について観察し、倍数体等の出現数を記録する。

2 - 9 結果の判定

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照に比較して明らかに上昇し、かつ、その作用に用量依存性又は再現性が認められた場合に陽性と判定する。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。

2 - 1 0 結果の表示

短時間処理法による試験あるい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。又、群毎にプレートの平均値を表示する。倍数体等についてもその数と出現頻度（%）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あるいは連続処理法による試験における各用量群と陰性対照群の細胞増殖に関するデータを表示する。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 6 によりまとめる。

3 マウスリンフォーマ T K 試験

3 - 1 目的

マウスリンパ腫細胞のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、被験物質の遺伝毒性誘発性の有無を検索する。

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、自然突然変異頻度などを調べておく^(注1)。

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系の非存在下及び、存在下について試験を実施する。代謝活性化系の非存在下の結果が陰性の場合には、代謝活性化系の非存在下の 24 時間連続処理による試験を実施する^(注2)。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など）で処理したげっ歯類（通常ラット）肝ホモジネートの 9000 × 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 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または懸濁させる。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液などを用いて溶解させ、水に不溶の場合に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 10 以下）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。最高用量は、用量設定試験の結果から 80% 以上の細胞毒性（20% 以下の相対生存率または相対増殖率）が得られる用量とする^{(注}

4)。ただし、90%以上の細胞毒性が認められる用量で陽性結果が得られた場合には、結果の解釈には注意を要する。80%以上の細胞毒性が認められない場合には5 mg/mlまたは10 mM（いずれか低い方）を最高用量とする。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。析出物が試験の測定を妨げる場合には、要求されている細胞毒性が得られなくても良い^(注5)。

3 - 6 対照

陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として小さなコロニーを主として誘発する既知の遺伝毒性物質で処理した群を設ける^(注6)。

3 - 7 処理系列数

被験物質の各用量群並びに陽性対照群について、それぞれ1～2系列の処理を行う。ただし陰性対照群については、2系列の処理を行う。

3 - 8 細胞毒性及び突然変異の検出

被験物質処理直後の細胞を一部分取し、マイクロウェルプレートに播種して適切な期間培養し、生育コロニーを含むウェルを計数し、生存率を算出する^(注7)。残りの細胞は2日間の突然変異発現期間に、毎日細胞濃度を測定して適宜継代した後、マイクロウェルプレートにトリフルオロチミジン（TFT）存在下及び非存在下で播種して適切な期間（通常12日間）培養し、それぞれTFT耐性変異体コロニー、及び生育コロニーを含むウェルを計数して、突然変異頻度を算出する。なおコロニーサイズの解析のためにTFT耐性変異体コロニーを含むウェルはコロニーの大小別に計数する。

3 - 9 結果の判定

結果の判定は、適切な統計処理法を用いると共に、突然変異頻度の有意な上昇、及び用量依存性の有無を考慮して行う。最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行うことが望ましい。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。

3 - 10 結果の表示

被験物質処理群、陰性及び陽性対照群について、薬物処理直後のコロニー形成率（PE0）と陰性対照に対する相対生存率（RS）、2日間の突然変異発現期間中の細胞増殖率を考慮した細胞毒性指標（RSG、RTG）、突然変異発現期間終了後のコロニー形成率（PE2）、突然変異頻度（MF）、統計処理結果を表示する。陰性及び陽性対照でのコロニーサイズの解析、ならびに被験物質処理群で突然変異頻度の上昇が認められた場合には、最大突然変異頻度が得られた用量を含めた少なくとも一用量以上でのコロニーサイズの解析結果を表示する^(注8)。

3 - 11 その他

上記によらず、OECDテストガイドライン476に準じて実施する場合には、以下の条件を満たすものとする。

- ・ マウスリンパ腫L5178Y細胞株を用いた試験系による試験であること
- ・ 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

いて試験を実施し、短時間処理法の結果がともに陰性の場合には、代謝活性化によらない場合について、連続処理法による試験を実施すること

- (注1) 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2) マウスリンフォーマ TK 試験のマイクロウェル法では代謝活性化系非存在下の 24 時間処理法を用いると、核酸及び塩基アナログや一部の異数性誘発物質の検出力が高くなる。それにも関わらず、特異性、すなわち非遺伝毒性物質に対する検出力には影響を与えないという結果が得られている。
- (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) 細胞毒性の指標としては、処理直後の陰性対照に対する相対生存率 (RS)、あるいは相対増殖率 (RTG) を用いる。RTG は突然変異発現期間中の相対浮遊細胞増殖率 (RSG) と突然変異を選抜する際のコロニー形成率から算出される。
- (注5) 被験物質の析出は処理の開始と終了時に、肉眼で観察する。
- (注6) 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、ペンツ[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7) 1つのウェル中に発生するコロニーの数はポアソン分布に従い、 x 個のコロニーからなるウェルの割合を $P(x)$ とすると、 $P(x) = e^{-y/n} \frac{(y/n)^x}{x!}$ と表される (y/n : 期待されるコロニーの発生数)。コロニーを含まないウェルの割合は $p(0) = e^{-y/n}$ となり、 $P(0) = y/n$ (y : コロニーを含まないウェルの数、 n : 全体のウェルの数) であることから、 y/n が計算できる。この式はコロニー形成率や、突然変異頻度を求める際に用いる。
- (注8) 突然変異体コロニーを大(正常の増殖)と小(増殖が遅い: SC)の2種類に分類してウェルを計数して、全体に対する小コロニーの変異体の割合を %SC として算出する。