

V 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。

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 7 によりまとめる。

なお、様式 7 に代えて昭和 63 年 9 月 16 日付け労働省基発第 602 号「労働安全衛生規則の一部を改正する省令、ボイラー及び圧力容器安全規則の一部を改正する省令及び有機溶剤中毒予防規則等の一部を改正する省令の施行について」の別添様式「微生物を用いる変異原性試験結果報告書」によりとりまとめてもよい。

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×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、2μL/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、次に掲げる全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全てについて細胞

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。

2-11 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 $\sqrt{10}$ 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

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、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、 $P(x)=e^{-\lambda} \lambda^x / x!$ と表される(λ :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 $p(0)=e^{-\lambda}$ 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、 λ 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。