

OECD：化学物質テストガイドライン・アブストラクト集（III）

東京理科大学 小林 剛

PART II：発現毒性別リスト

1. 毒性動態

**417：毒性動態 (Toxicokinetics) (2010/07)**

本テストガイドラインは、物質収支(mass balance)・吸収・生物学的利用能(bioavailability)・組織分布・代謝・排泄・基礎的毒性動態パラメーター（例えば、AUC (area under the blood concentration-time curve, area) (訳者注：血中濃度時間曲線下面積)）についての情報のほか、毒性動態についての有用な情報を示すであろう。毒性動態研究からの情報は、認められた毒性に対する濃度あるいは用量と、その毒性メカニズムとの関連に役立つであろう。テスト物質（「非標識」または「放射性標識」）は、通常、経口的に投与されるが、その他の投与経路も適用される。テスト物質は、単一用量の投与（最少でも2種類の用量レベルが望ましい）は適切であろうが、ある種の状況では、反復投与が必要であろう。毒性動態研究には、その物質について行われた他の毒性研究と同種類の動物により実施すべきである（通常、各用量について、オス・メス各4匹のラットを用いる）。吸収についての当初の予測は、物質収支により可能であるが、静脈内（IV）投与および胆管排泄研究などのより高度の研究が必要であろう。生物学的利用能は、経口投与およびIVグループの血漿/血液動態により決定できる。組織中の総用量のパーセントは、実験終了時に測定可能な最少量にすべきであるが、追加的な測定時点も必要であろう。投与用量の5%以上の代謝産物を確認すべきである。投与用量の排泄のレートおよび範囲は、尿・糞便・呼気から回収したパーセントの測定により決定すべきである。

**452：慢性毒性テスト (2009/09)**

これら慢性毒性研究の目的は、長期あるいは反復暴露後の哺乳類（主として、げっ歯類）における化学物質のプロファイルの特性解明である。

このテストガイドラインは、げっ歯類の経口投与に重点をしぼり、オス・メス双方の動物を用いる。げっ歯類では、通常、各用量レベルのグループ当り、少なくとも、オス・メス各20匹の動物が用いるべきで、非げっ歯類では、各性別グループに4匹が推奨されている。対照グループに加えて、最少でも3種類の用量レベルを用いるべきである。通常、暴露は毎日行われるが、選択された経路（経口・経皮・吸入）により変わり、テスト物質の毒性動態プロフィールに基いて調整すべきである。暴露期間は、12ヶ月間とすべきである。研究報告には、体重測定と定期的観察（血液検査・尿分析・臨床化学検査）のほか、解剖検査と組織病理学的検索が含まれる。

### 453 慢性毒性/癌原性組合せテスト(2009/09)

慢性毒性/癌原性組合せ研究の目的は、癌原性と主要な慢性毒性を確認し、長期および反復暴露後の用量-反応関係を確定することである。

この研究では、通常、ラットが用いられる。ラットは、各用量グループと対照グループについて、癌原性フェーズでは、最少でオス・メス各 50 匹、慢性毒性フェーズでは、最少オス・メス各 10 匹を用いるべきである。本研究の慢性毒性フェーズと癌原性フェーズの双方の対照グループに加えて、用量は最少でも 3 レベルを用いるべきである。主要投与経路は、経口・経皮・吸入である。このテストガイドラインでは、主として、経口経路による投与を扱っている。

研究における投与期間は、通常、慢性フェーズでは 12 ヶ月、癌原性フェーズでは 24 ヶ月である。研究レポートには、測定（体重）および定期的な詳細な観察（血液学的検査・尿分析・臨床化学）のほか、解剖検査と組織病理学的検索が含まれる。これらのすべての所見により、新生物影響と癌原性の可能性の決定のほか一般毒性も検出できる。

### 432 : In vitro 3T3 NRU 光毒性テスト(2004/11)

本テストガイドラインは、光の存在の有無による、化学物質に暴露された細胞の生存力の相対的低下による光毒性の評価方法を述べている。

単層形成のため、Balb/c 3T3 細胞が 24 時間培養される。8 種類の濃度のテスト物質について、96 ウエル（サンプル皿）のプレートが 1 時間プレインキュベーションされる。次いで、二つのプレートの一つが、非細胞毒性の最高照射量に暴露される一方、他のプレートは暗所に置かれる。このテストにおける細胞毒性は、テスト化学物質と照射処理後 24 時間に測定された Vital 染色剤 Natural Red (NR) の濃度依存性の取り込み減少として表される。NR は拡散することなく細胞膜を進入し、リソソームに蓄積する。感受性の高いリソソーム膜の表面変化は、リソソームの脆弱化やその他の変化を誘発し、次第に不可逆性となる。このような変化は、NR の取り込みと結合を減少させる。これらの事象により、細胞の生存・損傷・死亡が識別できる。光毒性の可能性の予測には照射の有無において得られた濃度反応が比較され、通常は、細胞の生存が 50% 低下する濃度 IC50 と無処理対照との比較が用いられる。

TG 425 および TG 432 に用いられるソフトウェアは、MDA(化学品安全データの相互受理協定)には含まれない。

## 2. 世代毒性

### 414: 出生前発生毒性 (2001/01)

この発生毒性についてのテストガイドラインは、妊娠テスト動物および発育生体への出生前暴露の影響についての一般情報を示すためにデザインされている。テスト物質は、妊娠動物に対して、通常、少なくとも、着床前1日から、正常の出生日になるべく近い屠殺予定日の間に投与すべきである。このテストでは、げっ歯類（ラットが推奨される）および非げっ歯類（ウサギが推奨される）の使用が予定されている。各テストおよび対照グループには、解剖検査時に、約20匹の着床メス動物を得るため、十分な数のメスに対して、通常、挿管により経口的に投与される。限界テストは、1000 mg/kg 体重の用量において影響が見込めない場合に実施される。本研究の結果には、測定（体重）、毎日の臨床観察（同時刻での実施が望ましい）が含まれる。帝王切開の直前に、メスは屠殺され、子宮内容物が検査され、胎子の軟組織と骨格の変化が評価される。すべての実験において毒性影響が認められなかった場合には、テスト物質の吸収と生物学的利用能を確認するため、さらに検討すべきである。

### 415: 一世代生殖毒性 (1983/05)

この生殖についてのテストガイドラインは、テスト物質（固体・液体・ガス・ベーパー）のオスおよびメスの生殖機能への影響についての一般情報をもたらすようにデザインされている。テスト物質は、段階的な用量により、オス・メスの数グループに対して経口的に投与される。

オスへの投与は、生育中に、少なくとも、1回の全精子形成サイクル中に、また、親世代のメスへの投与は、少なくとも2回の全発情期サイクル中に行うべきである。次いで、動物を交配させる。テスト物質は、交配期間中にオス・メス双方に投与し、その後、メスのみに対し妊娠中と授乳期間中投与される。このテストガイドラインは、主として、ラットあるいはマウスの使用を予定している。各テストおよび対照グループには、約20匹の妊娠メスを、その際の出産あるいは近い出産において得られるように、十分な数の動物を含めるべきである。テストには、少なくとも3グループを用いるべきである。テスト物質は、食餌あるいは飲料水中での投与が推奨されている。限界テストは、1000 mg/kg 体重の用量において影響が見込めない場合に実施される。本研究の結果には、測定（体重・食餌摂取量）、毎日の詳細な観察（同時刻での実施が望ましい）のほか、肉眼的解剖検査と組織病理学的検索が含まれる。生殖毒性の知見は、観察された影響、剖検、顕微鏡所見から評価すべきである。適切に実施された生殖テストは、信頼できる無影響レベル、生殖・分娩・授乳・出生後の生育に対する有害影響の解明をもたらす。

### 416: 二世代生殖毒性テスト (2001/01)

この二世代生殖テストは、テスト物質の、オス・メスの生殖システムの正常状態と機能、産仔の生育と成長に関する影響についての一般情報をもたらすようにデザインされている。テスト物質は、毎日、段階的な用量で、オス・メスの数グループに投与される。

親世代のオス・メス（5-9 週齢）には、成長・交配・妊娠期間中と、初産仔の離乳期間を通して投与すべきである。テスト物質の投与は、第一世代産仔の成獣への成長過程、交配と第二世代の生産（離乳まで）に至る期間中継続される。テストにはラットが推奨される。各テストおよび対照グループには、できれば 20 匹以上の妊娠メスを、その際の出産あるいは近い出産において得られるように、十分な数の動物を含めるべきである。少なくとも 3 レベル以上の用量と対照が用いられる。テスト物質は経口的（食餌・飲料水あるいは強制的）投与が推奨される。限界テストは、1000 mg/体重 kg/日の用量において影響のない場合に実施されるであろう。この研究結果には、測定（体重および精子・発情期・産仔のパラメーター）、毎日の臨床観察のほか肉眼的解剖検査および組織病理学的検索が含まれる。二世世代生殖毒性の知見は、剖検、顕微鏡所見を含む観察された影響により評価すべきである。適切に実施された生殖毒性テストは、信頼できる無影響レベル、生殖・分娩・授乳・出生後の生育と性的発達に対する有害影響の解明をもたらす。

### 3. 生殖/発生毒性

#### 421：生殖/発生毒性スクリーニングテスト（1995/07）

テスト物質の段階的な用量のテスト物質が、オス・メスの数グループに投与される。オスに対しては、最短でも 4 週間投与すべきである。メスには、研究期間を通して、54 日間程度投与すべきである。このテストガイドラインでは、ラットを用いるようデザインされ、各グループは、オス・メス夫々最少 10 匹の動物での開始が推奨されている。一般的には、少なくとも、3 テストグループと 1 対照グループを用いるべきである。用量レベルは、急性毒性テストおよび反復用量研究からの情報に基づくであろう。テスト物質は、毎日、経口投与される。限度テストは、最少でも 1000 mg/kg 体重における用量レベルに対応する。本研究の結果には、測定（体重、食餌/水の摂取量）、毎日の詳細な観察（同時刻での実施が望ましい）のほか、肉眼的解剖検査および病理組織学的検索が含まれる。本毒性研究の評価は、観察された影響、剖検、顕微鏡所見により行うべきである。オスの生殖影響の評価に際しては、処置期間が短いため、精巣および精巣上体の組織病理学的検索は、授精能力と共に検討すべきである。

#### 422: 反復投与毒性テストと生殖毒性スクリーニングテストの組合せテスト (1996/03)

テスト物質は、段階的な用量で、オス・メスの数グループに投与される。オスは、最短 4 週間、メスは研究期間中（約 54 日間）投与すべきである。通常、本研究では、「1 匹のメスに対して一匹のオス」による交配を行うべきである。

このテストガイドラインでは、ラットの使用を予定している。テスト物質は、強制経口投与が推奨されている。この方式は、胃管あるいは適当なカニューレ挿管を用いて、毎日 1 回実施すべきである。各グループは、最少オス・メス 10 匹の動物で開始すべきである。一般には、最少でも 3 テストグループと 1

対照グループを用いるべきである。用量レベルは、入手し得る現存の毒性および（毒性）動態データを検討し選定すべきである。限度テストは、最少でも 1000 mg/kg 体重における用量レベルに対応する。本研究の結果には、測定（体重、食餌/水の摂取量）、毎日の詳細な観察（刺激に対する感覚反応を含み、同時刻での実施が望ましい）のほか、肉眼的解剖検査および病理組織学的検索が含まれる。この毒性研究の知見の評価は、観察された影響、剖検、顕微鏡所見により行うべきである。その評価には、テスト物質の用量と観察影響の有無との関連性が含まれるであろう。オスの生殖影響の評価に際しては、処置期間が短いため、精巣および精巣上体の組織病理学的検索は、授精能力と共に検討すべきである。

## 4. 神経毒性

### 418: 急性暴露後の有機リン化合物の遅延性神経毒性テスト(1995/07)

テスト物質は、国内産のニワトリに単回投与される。動物は、21 日間観察され、生残ニワトリは屠殺され、組織病理学的検索を受ける。動物には、8-12 月齢の、若い成鳥の国内産産卵メンドリ (*Gallus gallus domesticus*) が推奨される。テスト物質の単回投与は、通常、強制経口、ゲラチン・カプセルあるいは類似方法により実施すべきである。処置グループには少なくとも 12 羽、陽性対照には最少 6 羽のメンドリを含めるべきである。予備的研究の目的は、主要な研究用量の最大化である。限度テストは、最少でも 2000 mg/kg 体重における用量レベルに対応する。主要研究の用量レベルは、予備研究の結果と、最高用量レベル (2000 mg/kg 体重) をふまえて、可能な限り多くすべきである。本研究の結果には、測定（体重）・生化学（神経疾患標的エステラーゼ）と毎日の詳細な観察のほか、肉眼的解剖検査と組織病理学的検索が含まれる。本研究の知見は、発生率・重症度・挙動との関連・生化学的/組織病理学的影響・処置および対照グループにおいて観察された影響により評価すべきである。

### 419: 有機リン化合物の遅延性神経毒性テスト：28 日反復投与テスト（1995/07）

本テストガイドラインは、有機リン化合物の毒性影響のアセスメントと評価に用いられる。テスト物質は、国内産の産卵メンドリ（8-12 月齢）に毎日 28 日間投与される。動物の観察は、最後の投与後少なくとも 14 日まで行われる。生化学的測定は、最後の投与後、各グループからランダムに選定されたメンドリについて実施される。最後の投与後 2 週間において、生存メンドリは屠殺され、組織病理学的検索が行われる。処置グループには、少なくとも 12 羽のメンドリが含まれるべきである。一般的には、3 種類の処置グループを用いるべきである。最高用量レベルは、毒性影響の誘発を目的に選定すべきであり、その後、用量レベルの低下の影響を選択すべきである。限度テストは、最少でも 1000 mg/kg 体重において無影響の場合に実施される。本研究の結果には、少なくとも週 1 回の体重測定、生化学的検査（神経疾患標的エステラーゼのアセチルコリンエステラーゼ）、最低でも、詳細な観察のほか肉眼的解剖検査および組織病理学的検索が含まれる。本研究の知見は、発生率・重症度・挙動との関連・生化学的/組織病理学的影響・処置および対照グループにおいて観察された影響などの見地から評価すべきである。

## 424: げっ歯類の神経毒性テスト (1997/06)

本テストガイドラインは、成獣動物における化学物質の神経毒性の可能性を確認し、その後の特性解明に必要な情報を入手するためにデザインされている。

本テストガイドラインは、ラットを使用するようデザインされ、テストと物質の強制的経口（食餌/飲料水またはカプセルによる）による毎日の投与を特定している。本研究は分離して行われた場合には、各用量には、少なくとも、20匹の動物（メス・オス各10匹）を用いるべきである。一般的には、3用量グループと対照グループを用いるべきである。用量レベルは、テスト化合物あるいは関連物質類について以前に観察された毒性や、入手できる動態データを検討のうえ選定すべきである。投与方式は28日間、亜慢性（90日）あるいは慢性（1年以上）になろう。このテストガイドラインで設定された方式は、急性神経毒性テストとしても用い得るであろう。限界テストは、最少でも1000 mg/kg体重における用量レベルに対応する。本研究の結果には、測定（体重・食餌/水摂取量）、機能テスト、少なくとも週1回の詳細な観察（眼科・血液・臨床生化学・組織病理学）が含まれる。研究末期には、テストグループから、少なくとも、オス・メス各5匹を選定し、生体内部位での還流により、詳細な神経組織病理学的検索を行うべきである。本研究の知見は、神経学的挙動や神経病理学的影響（神経化学あるいは電気生理学的影響のほか補完的検査が含まれる）の発生・重症度・関連性、その他の観察された有害影響などの見地から評価すべきである。

## 426: 発達神経毒性テスト (2007/10)

発達神経毒性テストは、子宮内および出生後初期の成育における、ある物質への反復暴露の影響についての情報をもたらすであろう。

テスト物質は、毎日、一般には、経口的に、交配したメス（ラットが望ましい）に対して、着床時（妊娠6日）から授乳（出生後21日）までの間に投与される。少なくとも3用量レベルと対照を用いるべきで、各用量レベルにおいて、総数20匹の産仔が推奨される。母獣は、妊娠および授乳時におけるメスに対する影響のテストに供され、比較情報をもたらすであろう。仔獣は、神経毒性評価のため、産仔群からランダムに選定される。すべての母獣と産仔に対しては、少なくとも毎日1回、病気や死亡を含む健康状態について注意深く観察すべきである。その評価は、出生後と成獣期間における、肉眼による神経学および挙動上の異常を検出する観察、脳重量と脳病理学的所見により構成される。レポートには、体重・食餌/水摂取量・詳細な臨床観察・解剖検査所見・すべての挙動の詳細な記述・研究着手時と終了時の動物数・性別および用量レベルによる毒性反応を含むべきである。

## 5. 内分泌毒性

### 440: げっ歯類における子宮肥大テスト：エストロゲン様作用の短期スクリーニングテスト (2007/10)

子宮肥大バイオアッセイは、in vivo の短期スクリーニングテストで、子宮重量の増加あるいは子宮肥大反応に基いている。子宮肥大バイオアッセイは、その感受性を、視床下部脳下垂体卵巣軸が機能性を示さない動物テストシステムに準拠している。次の 2 種類のエストロゲン高感受性状態にあるげっ歯類のメスは、この要件に適合している。1) 離乳後で未成熟のメス 2) 卵巣摘出後で、子宮組織退行に適切な時期に該当する若いメスの成獣。各テスト物質は、強制経口法あるいは皮下注射により投与される。各処置および対照グループには、少なくとも 6 匹の動物を用いるべきである。テスト物質の段階的な用量が、実験動物中の最少でも 2 処置グループに、グループ当り 1 用量レベルを用いて投与される。投与期間は、未成熟動物法では 3 日連続、卵巣摘出-成獣動物法では、3 日連続を最短投与期間とする。動物は、最後の投与後約 24 時間で解剖検査される。処置動物グループのエストロゲンアゴニストおよび子宮平均重量は、担体グループと比較され、増加についての統計学的有意性が評価される。レポートには、毎日の体重と動物の状態、湿状態および周囲の付着水分を吸着した状態 (blotted) の子宮重量、毎日の食餌摂取量を含めるべきである。

### 441: ラットにおけるハーシュバーガー・バイオアッセイ： (抗) アンドロゲン様作用の短期スクリーニングアッセイ (2009/09)

ハーシュバーガー・バイオアッセイは、in vivo の短期スクリーニングテストである。これは化学物質について、アンドロゲン・アゴニスト・アンタゴニスト・5- $\alpha$ -還元酵素インヒビターに一致する生物学的活性を誘発する能力を評価する。現在のバイオアッセイは、去勢された生殖能力発現期前後のオスラットにおける五つのアンドロゲン依存性の組織すなわち腹側前立腺、精嚢 (体液と凝固腺を含む)、抗球海綿体挙筋肉、クーパー腺ペア、陰茎亀頭の重量変化に準拠している。テスト物質が、アンドロゲン様あるいは抗アンドロゲン様作用を有するか否かを確認するため、通常は、夫々の作用に対して 3 種類の用量のテスト物質と陽性および担体 (陰性) 対照により、十分なアッセイが行われる。テスト物質の投与は、強制経口法あるいは皮下注射により、10 日間連続的に行われる。抗アンドロゲンのテストでは、テスト物質は参照アンドロゲンアゴニストと共に投与される。動物は、テスト物質の最後の投与後約 24 時間に解剖検査を受ける。組織は摘出され、新鮮な状態での重量が測定される。5 種類の組織のうち 2 種類の重量についての、統計学的に有意の増加 (アンドロゲン様) あるいは減少 (抗アンドロゲン様) は、このアッセイにおける陽性反応を示す。



## 455：化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とし、安定的に形質移入されたヒトエストロゲン受容体- $\alpha$ の転写活性テスト（2009/09）

本テストガイドラインは、スクリーニングおよび優先度決定に用い得るメカニズムの情報をもたらす *in vitro* アッセイを述べている。このテストシステムには、ヒトの頸部腫瘍由来の hER アルファ-HeLa-9903 細胞系を用い、安定的に形質移入された。この細胞系は、ルシフェラーゼ遺伝子発現の hER アルファ介在の相互活性化作用を誘発するテスト物質の能力測定が可能である。細胞は、レポーター遺伝子産物を誘発するため、テスト化学物質の7種類の非細胞毒性濃度に、20-24時間暴露される。各実験には、強力なエストロゲン(17-β-エストラジオール)、弱いエストロゲン(17-α-エストラジオール)、極めて弱いエストロゲン(17-α-メチルテストステロン)および陰性対照(コルチコステロン)など4種類の参照化学物質を含めるべきである。ルシフェラーゼ酵素の活性は、発光測定計で測定される。テスト化学物質は、少なくとも2回の測定で2回、あるいは3回の測定で2回において、最高反応が陽性対照(1 nMの17-α-エストロゲンとラジオール)と同等あるいは10%を超える場合には陽性で見なされる。

## 6. 発ガン性/変異原性/遺伝毒性

### 451：発ガン性テスト（2009/09）

長期発ガン性テストの目的は、実験動物に対して、テスト物質を適切な投与経路により、種々の用量に暴露し、その期間中あるいはその後における腫瘍性損傷について、それらのライフスパンの主要部分を観察することである。

このテストガイドラインでは、主として、マウスおよびラットを用いる経口投与を予定している。オス・メス双方を使用し、各用量グループと対照グループには、オス・メス各50匹の動物を含めるべきである。また、少なくとも、3種類の用量レベルと対照を用いるべきである。動物には、テスト物質を毎日投与し(経口・経皮・吸入)、暴露モードはテスト物質の毒性動態プロファイルにより調整すべきである。研究期間は、げっ歯類の場合は、通常、24ヶ月であらう。特異な系統のマウスを用いた18ヶ月のテストは、より適切であらう。研究の終了は、低用量あるいは対照グループの動物の生存数が25%以下に低下した場合に検討すべきである。これらの研究の結果には、測定(体重・食餌摂取量)と少なくとも毎日の詳細な観察のほか肉眼的解剖検査および組織病理学的検索が含まれる。

### 471：細菌復帰突然変異テスト（1997/07）

細菌復帰突然変異テストは、塩基置換あるいはフレームシフトによる点突然変異を検出するため、少なくとも5系統のサルモネラ菌(*Salmonella typhimurium*)および大腸菌(*Escherichia coli*)の要求するア



ミノ酸を利用している。この細菌復帰突然変異テストの原理は、テスト系統中に存在する突然変異を復帰させる変異の検出と、必須アミノ酸を合成する細菌の機能能力の回復である。

細菌細胞の懸濁液は、代謝活性化システムの有無の状況下で、テスト物質（液体または固体）暴露される。少なくとも、5種類の分析可能な濃度のテスト物質を用いるべきである。溶解性の非細胞毒性物質に推奨される最高濃度は5 mg/プレートあるいは5 ml/プレートである。このテストには、プレート・インキューション法とプレインキューション法という二つの方法がある。双方のテクニックとも、37°Cにおいて2-3日インキューションの後、復帰コロニーが算定され、溶媒対照プレート上の自然発生復帰コロニーの数と比較される。

#### 473: 哺乳類の in vitro 染色体異常テスト (1997/07)

この in vitro 染色体異常テストの目的は、培養哺乳類体細胞における染色体構造異常を生じさせるテスト物質の確認である。この構造異常には、染色体と染色体の二つのタイプがある。

In vitro 染色体異常では、確立されている細胞系、細胞種、一次細胞培養が採用されよう。細胞培養は、テスト物質（液体または固体）に、約 1.5 の正常細胞周期間に代謝活性化の有無双方において暴露される。テスト物質には、少なくとも 3 種類の分析可能濃度を用いるべきである。通常の場合、各濃度では重複培養を採用すべきである。テスト物質への培養細胞の暴露から既定の間隔で、細胞は分裂中期阻害物質により処置され、採取の上、染色される。分裂中期の細胞は、染色体異常の存在について、顕微鏡分析される。

#### 474: 哺乳類赤血球小核テスト (1997/07)

哺乳類の in vivo 小核テストは、テスト物質により染色体あるいは赤芽球の細胞分裂装置に誘発されたダメージを、動物（通常は、げっ歯類のマウスまたはラット）の骨髄あるいは末梢血液細胞から採取された赤血球の分析による検出に用いられる。

小核テストの目的は、遅滞染色体断片または全染色体を含む小核を形成させる細胞ダメージを生じさせる物質（液体または固体）の確認である。処置動物における小核化多染性赤血球の出現頻度の増加は、染色体損傷誘発の指標である。動物は、テスト物質に適切な経路（通常は、胃チューブあるいは適当な挿管カニューレを用いる強制経口法や、腹腔内注射による）により暴露される。骨髄または血液細胞が採集され、調製の上、染色される。試料は小核の存在について分析される。処置および対照グループには、分析用に、少なくともメス・オス各5匹の動物を含めるべきである。処置は、テスト物質の単回投与または毎日2回（あるいは、より多い回数）により行われる。リミット用量は 2000 mg/kg 体重/日で、処置は 14 日まで、1000 mg/kg 体重/日では 14 日以上である。

#### 474: 哺乳類骨髄染色体異常テスト(1997/07)

哺乳類 in vivo 染色体異常テストは、動物の骨髄中において、テスト化合物により誘発された染色体の構造異常の検出に用いられ、通常は、げっ歯類（ラット・マウス・チャイニーズハムスター）が用いられる。染色体の構造異常には、染色体と染色分体の 2 タイプがある。

動物は、適切な暴露経路（通常は、胃チューブ挿管カニューレによる強制経口あるいは腹腔内注射による）によりテスト物質（液体または固体）に暴露され、処置後、適当な時期に屠殺される。屠殺前に、動物は中期細胞分裂阻害剤により処置される。次いで骨髄細胞から染色体試料が調製の上染色され、中期分裂細胞は、染色体異常について分析される。処置および対照の各グループには、少なくとも、イス・メス各 5 匹の分析用動物を含めるべきである。限度用量は、14 日までの処置の場合は 2000mg/kg 体重、14 日以上の際には 1000 mg/kg 体重である。

#### 476: 哺乳類細胞の in vitro 遺伝子突然変異テスト（1997/07）

哺乳類細胞の in vitro 遺伝子突然変異テストは、化学物質類により誘発された遺伝子突然変異の検出に用いることができる。細胞系の中で最も一般的に利用される遺伝子発現影響は、チミジンキナーゼ(TK)、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ (HPRT)、キサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ (XPRT) の遺伝子導入における突然変異の測定である、これらの TK・HPRT・XPRT の突然変異テストは、遺伝子イベントの異なるスペクトルを検出する。

懸濁中あるいは単層培養の細胞が、代謝活性化の有無双方の状態、少なくとも 4 種類の濃度のテスト物質に、適当時間暴露される。それらは、細胞毒性の決定と、突然変異選択前の表現型発現を可能にするため継代培養される。最少でも、106 個の細胞の使用が推奨される。

細胞毒性は、通常、相対クローニング効率（生存）または処置期間後における培養の相対的なトータルの生育状態の測定により決定される。処置培養細胞は、適当な時間、生育培養基中に維持される。夫々選定された各遺伝子座と細胞タイプの形質、導入された突然変異に最高に近い表現型発現を可能にするために、適当な時間、生育培養基中に維持される。突然変異株の出現頻度は、変異細胞を検出するため選定された物質を含む培養基における既知の細胞数の播種と、クローニング効率（生存）を決定する選択物質のない培養基により決定される。適当なインキュベーション時間の経過後、コロニーが計数される。

#### 477: 遺伝毒性：ショウジョウバエを用いる伴性劣勢致死テスト(1984/04)

ショウジョウバエの X-染色体における突然変異は、突然変異遺伝子を持つオスにおける形質発現である。突然変異が半接合状態において致死性である場合には、その存在により、半接合のメスにより正常

に生まれた 2 クラスのうちの 1 クラスのオスの産仔の欠損が推察される。野生種のオスが処置され、適切なメスと交尾を行わせる。投与方法は経口（固体あるいは液体）、注射、ガスまたはベーパーへの暴露により行われる。暴露回数は、テストの内容により異なり、変異原性の当初のアセスメントのテストの場合には 1 回、信頼性確認の際には、少なくとも 3 種類の暴露レベルが用いられる。第一世代のメスは、それらの兄弟と個々に交配し、夫々のかけあわせからの産仔は、表現型野生種のオスとしてスコアされる。これらのオスの欠損は、親世代の生殖細胞中のオスの伴性劣勢致死性突然変異の発生を示している。

#### 478: 遺伝毒性：げっ歯類を用いる優性致死テスト（1984/04）

優性致死（Dominant Lethal: DL）影響は、受精卵および胎仔の死亡を発生させる。テスト物質（液体・固体・ベーパー・ガス）への暴露後における優性致死の誘発は、その物質がテスト生物の生殖組織への影響を示している。優性致死は、一般的には、染色体異常（構造的および異数性）の結果として容認されているが、遺伝子突然変異および毒性影響も排除できない。

このテストガイドラインでは、テスト生物としてラットおよびマウスを推奨している。一般的には、オス動物はテスト物質に暴露され、未処置のバージンのメスと交配する。最も広く用いられている投与方法は、テスト物質の経口法あるいは腹腔内注射による単回投与である。通常は、3 種類の濃度レベルを用いるべきである。種々の段階の生殖細胞が、連続的な交配間隔により、分離してテストされる。メスは、適当な時期に屠殺され、着床数・生死の胎仔数を決定するため子宮内容物が検索される。優性致死の影響の算出は、処置グループと対照グループにおけるメス 1 匹当りの生存着床数の比較に基いている。

#### 479: 遺伝毒性：哺乳類動物細胞を用いる in vitro 姉妹染色体交換テスト (1986/10)

姉妹染色体交換（SCE）テストは、染色体重複の二つの姉妹染色体の間の DNA の相互交換を検出する短期テストである

SCEs の検出を達成するには、異なる標識の姉妹染色体について、いくつかの方法、すなわち、二つの細胞サイクルについて、ブロモデオキシウリジン（BrdU）の染色体 DNA への取り込みを必要とする。SCE の測定は、哺乳類のほか非哺乳類システムにおいても可能である。テスト物質は、固体・液体・ベーパー・ガスであろう。哺乳類細胞は、テスト物質に哺乳類代謝活性化システムの有無の状態、in vitro において暴露され、BrdU 含有培地中で、2 ラウンドの複製培養を受ける。また、少なくとも、3 種類の適切な間隔の濃度のテスト物質を用いるべきである。有糸核分裂の中期に似た段階（c-中期）の細胞蓄積に対し、紡錘阻害体（spindle inhibitor）の処理後に、細胞は採取され染色体試料が調製される。

#### 480: 遺伝毒性: 酵母を用いる遺伝子突然変異テスト (1986/10)

このアッセイは、真核性微生物の酵母における突然変異の測定に用いられる。正突然変異あるいは逆突然変異を検出するため、サッカロミセス属が開発されている。多様な一倍体および二倍体系の酵母が、化学物質（固体・液体・ベーパー・ガス）により誘発される遺伝子突然変異発生の測定に用いられる。静置あるいは生育中の細胞が、テスト化学物質に、投与された哺乳類代謝活性化システムの有無の状態、28 - 37°Cにおける振動培養を 18 時間まで行う。28 - 30°Cにおける 4 - 7 日間の温置後、生存および遺伝子突然変異誘発のプレートがスコアされる。最初の実験が陰性の場合には、第二の実験は静置フェーズの細胞を用いて実施すべきである。また、最初の実験が陽性の際には、適切な独立的な実験において確認される。少なくとも、適切な間隔を置いた 5 種類の濃度のテスト物質を用いるべきである。遺伝子突然変異と生存力により製造された原栄養菌のアッセイについては、各濃度当り、少なくとも 3 枚の反復プレートをを用いるべきである。

#### 481: 遺伝毒性: 酵母を用いる体細胞組み換えテスト (1986/10)

このアッセイは、酵母における体細胞の組み換え（遺伝子変換あるいは交叉）、真核微生物の測定に用いられるであろう。遺伝子変換は、同一遺伝子に二つの異なる欠陥対立遺伝子を保有し、栄養素要求性で異質対立遺伝性の傾向における原栄養菌の産生する復帰突然変異体によりテストされるのに対して、遺伝子交叉は、一般的には、異種接合系において生成された劣性同型接合コロニーあるいはセクターの生成によりテストされる。静置あるいは生育中の細胞は、テスト物質（固体・液体・ベーパー・ガス）に暴露され、投与された哺乳類代謝活性化システムの有無の状態、28 - 37°Cで 18 時間まで振動培養される。暗所における 28 - 30°Cで 4 - 7 日間温置された後、生存および有糸分裂組み換えのプレートがスコアされる。少なくとも、適切な間隔を置いた 5 種類の濃度のテスト物質を用いるべきである。有糸分裂遺伝子変換と生存能力により生成される原栄養体のアッセイについては、少なくとも 3 枚のレプリカプレートをを用いるべきである。最初の実験が陰性の場合には、第二の実験は静置フェーズの細胞を用いて実施すべきである。また、最初の実験が陽性の場合には、適切な独立的な実験において確認される。

#### 482: 遺伝毒性: DNA 損傷および修復: 哺乳類動物を用いる in vitro 不定期 DNA 合成テスト (1986/10)

哺乳類動物細胞における in vitro 不定期 DNA 合成のテストガイドラインは、化学・物理的エージェントにより誘発されるダメージ部位を含む DNA の伸張の切除および除去後の、DNA 修復合成を検出するため、ヒトリンパ球または株化細胞系の一次培養の利用方法を記述している。

このテストは、一般的には、細胞サイクルが合成フェーズでない哺乳類細胞の DNA 中への、トリチウム標識のチミジン (3H-TdR) の取り込みに基いている。3H-TdR の取り込みは、処置された細胞からの DNA のオートラジオグラフあるいは液体シンチレーション計数 (LSC) により測定される。培養中の哺乳類

細胞には、ラットの一次肝細胞は用いられず、哺乳類代謝活性化の有無の状況において、テスト物質（固体・液体・ベーパー・ガス）に暴露される。各実験ポイントでは、少なくとも、オートラジオグラフでは2種類、LSCには6種類の細胞培養が必要である。反応を決定するため、適当な範囲のテスト物質の複数の濃度が用いられる。テスト物質が、放射性標識の取り込みにおいて、統計学的に有意の増加 [核当りの細粒子あるいは dpm/ig DNA(訳者注：DNA 免疫グロブリンにおける放射性物質の一分間の崩壊)として表される]を示さない、あるいは、何れのテストポイントにおいても、統計学的に有意でない再現性のある陽性反応も、このシステムにおける活性はない (not active) と見なされる。

### 483: 哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常テスト(1987/07)

本テストは、精原生殖細胞における事象を測定することにより、生殖細胞における遺伝性の突然変異誘発の予測が期待できる。

一般的には、オスのチャイニーズハムスターとマウスが用いられる。動物はテスト物質（液体あるいは固体）に、通常は、強制経口あるいは腹腔内注射など適当な経路により投与される。次いで、動物は処置後の適当な時期に屠殺される。各処置および対照グループには、分析用に、少なくとも5匹のオスを含むべきである。テスト物質の投与は、1回もしくは2回が多いが、大量の物質の投与を容易にするため分割投与も行われるであろう。屠殺前に、動物は細胞分裂中期阻害剤により処置される。次いで、染色体試料は生殖細胞から作製して染色され、分裂中期細胞は染色体異常について分析される。限界テストは、2000 mg/kg 体重/日の用量において影響が認められない場合に実施される。In vivo における精原細胞染色体異常テストからの陽性の結果は、テスト動物における生殖細胞における染色体異常の誘発を示している。

### 484: 遺伝毒性: マウススポットテスト

マウススポットテストは、テスト物質の経胎盤吸収後の胎仔細胞における体細胞突然変異の可能性を検出する。

このテストは、化学物質（固体・液体・ベーパー・ガス）に暴露されたマウスにおける、発育中の胎仔における in vivo テストである。発育中の胎仔における標的細胞は黒色素芽細胞 (melanoblast) で、その標的遺伝子は、毛皮の毛髪の色素沈着をコントロールする。黒色素芽細胞のそのような遺伝子の突然変異により、毛皮に色が変わったスポットを持つ仔が生まれる。出生後3-4週間に、仔マウスはコード化されて、スコアがつけられる。処置グループにおける遺伝的関連のスポットの出現頻度は、対照グループと比較される。採用された各用量レベルにおいて、適当数の生存マウスを得るため、十分な数の妊娠メスマウスに処置（経口挿管あるいは腹腔内注射）が行われる。用量には、毒性特徴の発生あるいは産仔数の減少を含む、適当な間隔を有し、少なくとも2種類が用いられる。陽性の結果の決定には、いく

つかのクライテリアがある。あるテスト物質が、遺伝関連のスポットの出現頻度に、統計学的に有意の用量関連性の増加もなく、テストポイントのすべてにおいて統計学的に有意の陽性反応もない場合には、このシステムでは突然変異誘発性はないと見なされる。

#### 485: 遺伝毒性:マウス転座テスト (1986/10)

マウス遺伝性転座テストは、第一世代の子孫における哺乳類生殖細胞染色体の構造的および異数性の変化を検出する。

このテストシステムで検出される染色体の変化のタイプは、相互転座である。転座のキャリアおよびXO-メスは、細胞遺伝分析についての第一世代子孫の選択に用いられ、受精能の低下を示す。転座は、オス個体の移動期分裂中期Ⅰの減数細胞において、細胞遺伝として認められる。本テストは、通常、オスの第一世代子孫の分析により実施される。各用量レベルには、約500匹のオスが必要とされる。テストされる一つの用量レベルは、通常、最少の毒性影響の生成に関連する最高用量で、経口挿管または腹腔内注射により投与される。テスト物質の単回あるいは週に7日の35日間の投与が可能である。テスト物質は、固体・液体・ペーパー・ガスなどの状態である。異型接合の転座には、第一世代子孫の受精能テストと、第一世代子孫のすべてのオスの細胞遺伝学的分析という二つの方法が可能である。あるテスト物質が、少なくとも一つのテストポイントにおいて、統計学的に有意の転座の数の増加がなく、観察された転座数の増加に用量関連の統計学的に有意性が認められない場合には、このシステムにおける突然変異誘発性はないと見なされる。

#### 486: 哺乳類肝細胞を用いる in vivo 不定期 DNA 合成 (UDS)テスト(1997/07)

哺乳類肝細胞を用いる in vivo 不定期 DNA 合成 (UDS)テストの目的は、肝臓内の化学物質 (固体あるいは液体)あるいは物理的因子により誘発される損傷部分を含むDNAの伸張の切除あるいは除外後のDNA修復を誘発する物質の確認である。

本テストは、一般的には、トリチウム標識のチミジン 3H-TdR の、細胞サイクルのSフェーズ (停止段階)においては出現頻度の低い肝臓内DNAへの取り込み(3-8時間の間における)に基いている。3H-TdRの取り込みは、通常、オートラジオグラフにより測定される。一般的には、ラットが用いられ、動物数は、少なくとも、分析用グループ当り3匹とすべきである。通常、少なくとも2種類の容量レベルが用いられる。限界テストは、2000 mg/kg 体重/日の用量において影響が期待できない場合に実施される。テスト物質の投与は、一般的には、胃チューブを用いる強制処置あるいは適切な挿管カニューレによる単回処置である。肝細胞は、投与後12-16時間の動物から調製される。オートラジオグラフ測定後に、通常の場合、各動物から100個の細胞が、少なくとも2枚のスライドによりスコアされる。In vivoにおける哺乳類肝細胞を用いるUDSテストの陽性の結果は、その物質がin vitroの不定期DNA合成により修復できる、in vivoの哺乳類肝細胞のDNAダメージを誘発することを示している。陰性の結果はこのテスト条件下で、テスト物質はこのテストにより検出可能なDNAダメージを誘発しないことを示してい

る。

#### 487: 哺乳類細胞を用いた in vitro 小核テスト(2010/07)

この in vitro 小核テストは、細胞分裂間期の細胞形質における小核の検出による遺伝毒性のテストである。小核は、染色体の無動原体断片（すなわち、動原体を欠く）から創生され、細胞分裂の後期段階において、全染色体は分裂極に移動できない。このアッセイは、テスト物質の暴露による、細胞分裂中あるいはその後における染色体異常および異数性に対する活性を検出する。このテストガイダンスでは、アクチン重合阻害剤 cytochalasin B の有無双方のプロトコールの利用を許可している。Cytochalasin B は、有糸核分裂を完了した細胞は二核であるため、その小核の頻度と確認と選択的分析を行う。また、このテストガイダンスは、分析された細胞個体数は有糸核分裂の証拠があるという条件で、細胞分裂遮断のないプロトコールの利用も許可している。



## あとがき

先ず、ここまでお読み頂いた皆様のご熱意に対して、心より敬意を表し、御礼申し上げます。

本シリーズの冒頭において申し上げた通り、筆者が、これを執筆した動機は、わが国の科学技術領域での、理工学系の指導的な立場の方々、医学生物学領域の常識に余りにも不案内であることに由来しております。

海外における化学物質の先進的な健康影響研究（近年は、ナノリスク関連が中心）の紹介に努力してきた筆者は、先日、ある科学技術研究助成団体から「拝外主義」とまでの厳しい指弾をうけました。

この OECD のテストガイドラインは、現代社会に不可欠な化学物質の有効利用の前段階として、その有害性を、如何に科学的に検出するかについて、国際的に合意された協定であります。

ところが、企業に関連する理工学専門家（研究者および公務員などを含む）の一部には、商品の有害性データの検出そのものを、産業発展の「敵」と誤解し、安全性テストの回避に努力しております。しかし、これでは「自縄自縛」です。むしろ、企業は自社製品の安全性の確立に最大限の努力を尽くし、行政機関と適切な規制の導入に協力する「産業哲学」を創出すべきであります。

この体制が実現すれば、行政は「不作為」の批判を逃れ、企業は繁栄し、消費者も大歓迎で、いわば「三方一両得」です。現在のような、三者対立状態では、一般国民は利害関係者の場から排除され、孤立無援で不幸であります。

一方、すぐれて学際的な化学物質の健康影響研究について、わが国では、医学生物学者からのタイアップの呼びかけに対して、ナノリスクに見られるように、理工学専門家は無関心な態度に終始しており、「鼯鼠の引き倒し」になりかねない「状態」にあると申せましょう

「科学を真の科学ならしめるため」、東日本災害において、想定外の天災も加わり脆くも崩壊した「原子力の安全神話」が、今後、ナノ物質などを含むあらゆる革新的な化学物質の健康影響領域にどのように反映されるのか注視されます。安全確保に「想定を超えたベスト」を求める警鐘ではないでしょうか？