

# 変異原性試験等結果検討委員からの指摘について

## 1 委託事業の調達仕様書には反映済みの事項

### (1) ガスばく露法の導入

被験物質が気体又は揮発性である場合等にはガスばく露法による試験を実施すべきとのご指摘を頂いている。

#### 【大臣告示】

(試験の方法)

第二条 用量設定試験及び本試験は、プレインキュベーション法若しくはプレート法又はこれらと同等以上の知見を得ることができる方法により行わなければならない。

#### 【施行通達】

##### 2 細部事項

##### (1) 第2条関係

被験物質の物理化学的性質又は化学構造により適切な試験方法が選択されるべきものであること。

#### 【課長事務連絡】

##### 2 試験の実施

##### (2) 試験方法の選択

試験はプレインキュベーション法又はプレート法で実施する。なお、揮発性液体及びガス状物質については物性に応じた適切な方法で試験を実施する。

#### 【委託事業の調達仕様書】

##### 2 試験の実施

##### (2) 試験方法の選択

試験はプレインキュベーション法、プレート法又はガスばく露法で実施する。なお、被験物質が気体である場合や、試験管又はプレートからの散出のおそれのある揮発性の液体である場合は、ガスばく露法で実施する。

## (2) S9 mix 条件下の陽性対照物質

S9 mix 条件下で使用する陽性対照物質は、2-アミノアントラセン単剤とせず、他の適切な剤（ベンゾピレン又はジメチルベンズアントラセン）を併用すべきとのご指摘を頂いている。

### 【大臣告示】

(対照物質)

第五条 用量設定試験及び本試験における対照物質は、陰性対照においては被験物質を溶解するために用いる溶媒、陽性対照においては適切な既知の変異原物質としなければならない。

### 【施行通達】

2 細部事項

(4)第5条関係

背景データのない溶媒を用いる場合には、溶媒が菌株及び代謝活性化系に対して影響がないことを説明する資料を添付する必要があること。

### 【課長事務連絡】

(8)対照

上記のすべての試験において、必ず陰性対照と陽性対照を含める。

イ 陰性対照

各テスト菌株について被験物質の調製に用いた溶媒を用いる。

ロ 陽性対照

S9 mix を必要とする陽性対照物質と S9 mix を必要としない陽性対照物質を、適切な用量で用いる。

### 【委託事業の調達仕様書】

(8)対照

上記のすべての試験において、必ず陰性対照と陽性対照を含める。

ア 陰性対照

各テスト菌株について被験物質の調製に用いた溶媒(ガスばく露法の場合には、被験物質の調製に用いた気体)を用いる。

イ 陽性対照

(ア)陽性対照の選択及び用量

S9 mix を必要とする陽性対照物質と S9 mix を必要としない陽性対照物質を、テスト菌株に応じて選択し、適切な用量で用いる。

(イ)代謝活性化系を用いる場合

S9 mix を必要とする陽性対照は、以下を考慮して選択する。

①2-アミノアントラセンは、S9mix の有効性の唯一の指標としてはならない。

②2-アミノアントラセンに加える陽性対照は、ベンゾピレン又はジメチルベンズアントラセンとすることが望ましい。

### (3) 試験で使用するプレート数

試験で使用するプレート数は、用量設定試験、本試験及び確認試験のいずれにおいても2枚以上とすることを求めているが、2枚以上のプレートを用いた2回の本試験を行う場合には、用量設定試験は1枚のプレートとして差し支えないとのご指摘を頂いている。

#### 【大臣告示】

(使用プレートの数)

第六条 用量設定試験及び本試験に用いるプレートの数は、被験物質を各用量ごとに、並びに陰性対照及び陽性対照において、それぞれ二枚以上としなければならない。

#### 【課長事務連絡】

2 試験の実施

(3)プレート数

すべての試験(用量設定試験、本試験及び確認試験)は2枚以上のプレートを用いて行う。

#### 【委託事業の調達仕様書】

2 試験の実施

(3)プレート数

すべての試験(用量設定試験、本試験及び確認試験)は2枚以上のプレートを用いて行う。ただし、2枚以上のプレートを用いた2回の本試験を行う場合は、用量設定試験は1枚のプレートとして差し支えない。

### (4) 菌凍結液の調製

菌凍結液の調製の際は少量ずつ凍結させるべきとのご指摘を頂いている。

#### 【課長事務連絡】

1 試験の準備

(3)テスト菌株の保存

テスト菌株の保存には特性を確認した後、単一コロニーより増殖させた菌懸濁液を凍結保存する。

#### 【委託事業の調達仕様書】

1 試験の準備

(3)テスト菌株の保存

テスト菌株は、特性を確認した後、単一コロニーより増殖させた菌懸濁液を少量ずつ凍結させたもの(以下「菌凍結液」という。)を保存する。

## (5) テスト菌株の前培養

テスト菌株の前培養に当たって、静止期の初期で培養を止めるのみならず、それ以上増殖しないようにすべきとのご指摘を頂いている。

### 【課長事務連絡】

#### 1 試験の準備

##### (5) テスト菌株の前培養

- イ (3)で凍結保存したテスト菌株(以下「菌凍結液」という。)を解凍し、ニュートリエントブロス培養液に一定量を接種する。なお、菌凍結液を解凍したものの残りは再使用してはならない。
- ロ 37℃で培養し、(4)で求めた培養条件に基づき静止期の初期で培養を止める。

### 【委託事業の調達仕様書】

#### 1 試験の準備

##### (5) テスト菌株の前培養

- ア (3)の菌凍結液を解凍し、ニュートリエントブロス培養液に一定量を接種する。なお、菌凍結液を解凍したものの残りは再使用してはならない。
- イ 37℃で培養し、(4)で求めた培養条件に基づき静止期の初期で培養を止め、それ以上増殖しないようにする。

## (6) 被験物質の調製

被験物質の調製では懸濁より溶解を優先すべきとのご指摘を頂いている。

### 【課長事務連絡】

#### 1 試験の準備

##### (6) 被験物質溶液等の調製

- ロ 水及びDMSOに懸濁できない場合又は水及びDMSOに不安定な被験物質  
被験物質の溶解性及び安定性並びにテスト菌株及びS9 mixに対する毒性を  
考慮して選んだ適切な有機溶媒に溶解又は懸濁したものを用いる。

### 【委託事業の調達仕様書】

#### 1 試験の準備

##### (6) 被験物質溶液等の調製

- ア プレインキュベーション法及びプレート法の場合
  - (イ) 水及びDMSOに懸濁できない場合又は水及びDMSOに不安定な被験物質  
被験物質の溶解性及び安定性並びにテスト菌株及びS9 mixに対する毒性  
を考慮して選んだ適切な有機溶媒に溶解したものを用いる。
  - (ウ) (イ)で選んだ有機溶剤に溶解しない場合は、当該有機溶剤に懸濁したもの  
を用いる。

## 2 その他近年しばしば見られる指摘事項

### (1) プレインキュベーション法又はプレート法の選択

プレート法のみで陰性と判定しているケース等において、プレインキュベーション法で行うことが望ましいとのご指摘を頂いている。

#### 【大臣告示】

(試験の方法)

第二条 用量設定試験及び本試験は、プレインキュベーション法若しくはプレート法又はこれらと同等以上の知見を得ることができる方法により行わなければならない。

#### 【施行通達】

##### 2 細部事項

##### (1) 第2条関係

被験物質の物理化学的性質又は化学構造により適切な試験方法が選択されるべきものであること。

#### 【委託事業の課長事務連絡】

##### 2 試験の実施

##### (2) 試験方法の選択

試験はプレインキュベーション法又はプレート法で実施する。なお、揮発性液体及びガス状物質については物性に応じた適切な方法で試験を実施する。

プレインキュベーション法又はプレート法は、代謝活性化系を用いる場合及び用いない場合の両条件下で試験を実施する。

代謝活性化系を用いる場合の S9 mix は以下の組成とする。

#### 【Q&A(Web サイト)】

容易に加水分解する被験物質の場合には、分解物(分解後の物質)を試験すればよいでしょうか？

→ 分解物ではなく、分解前の物質を脱水した溶媒を用いて、プレインキュベーション法ですばやく試験を行ってください。

## (2) 生菌数が低い場合の対処

前培養液の生菌数が  $1 \times 10^9$ /ml 以上となっていないケースについて、再試験を要請する必要がある可能性についてご指摘を頂いている。

### 【大臣告示】

(被験物質の用量)

第四条 被験物質の用量は、次に定めるところによらなければならない。

ニ 本試験の最高用量は、次に掲げる場合に応じて、プレート当たり次に定める用量とすること。

イ 用量設定試験において被験物質の菌株に対する生育阻害が認められる場合 被験物質の菌株に対する生育阻害を示す用量

ロ 用量設定試験において被験物質の菌株に対する生育阻害が認められず、かつ、被験物質の沈殿が認められる場合 被験物質の沈殿が認められる用量

ハ 用量設定試験において被験物質の菌株に対する生育阻害が認められず、かつ、被験物質の沈殿が認められない場合 五ミリグラム

三 適切な間隔で五段階以上の用量を設定すること。

(観察)

第七条 用量設定試験及び本試験においては、被験物質の菌株に対する生育阻害の状態及び被験物質の沈殿の状態を確認しなければならない。

2 前項の確認は、復帰突然変異により生じたコロニー数を計測する時に行わなければならない。

### 【施行通達】

1 改正の要点

(3)被験物質の菌株に対する生育阻害及び被験物質の沈殿の状態に応じ、具体的に被験物質の最高量を定めたこと。(第4条関係)

(4)変異原性試験において、新たに被験物質の沈殿の状態を確認しなければならないこととしたこと。(第7条第1項関係)

2 細部事項

(3)第4条関係

用量設定試験において変異原性が認められた場合には、本試験においては、用量反応関係が求められるように適切な用量設定を行う必要があること。

(5)第7条関係

被験物質の沈殿は、目視により確認されるべきものであること。

### 【課長事務連絡／委託事業の調達仕様書】

1 試験の準備

(5)テスト菌株の前培養

ハ 前培養液について、生菌数が  $1 \times 10^9$ /ml 以上であることを確認する。

### (3) 製造後 6 ヶ月以内の S9 の使用

S9 については製造後 6 ヶ月以内に使用すべきとのご指摘を頂いている。

#### 【大臣告示】

(試験の方法)

第二条 用量設定試験及び本試験は、プレインキュベーション法若しくはプレート法又はこれらと同等以上の知見を得ることができる方法により行わなければならない。

2 用量設定試験及び本試験は、代謝活性化系(薬物代謝酵素系を誘導する処理を行った動物の肝臓のホモジネートの上清画分に補酵素等を添加したものをいう。)を用いて、及びこれを用いないで行わなければならない。

#### 【施行通達】

2 細部事項

(1) 第2条関係

被験物質の物理化学的性質又は化学構造により適切な試験方法が選択されるべきものであること。

#### 【課長事務連絡／委託事業の調達仕様書】

2 試験の実施

(2) 試験方法の選択

(略)

代謝活性化系を用いる場合の S9 mix は以下の組成とする。

S9 mix 1ml 中の組成

S9 分画	10～30% (0.1～0.3ml)
MgCl <sub>2</sub>	8 μ mol
KCl	33 μ mol
グルコース 6-リン酸	5 μ mol
NADPH	4 μ mol
NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)	100 μ mol

#### (4) 被験物質の純度換算

被験物質の純度が十分に高くないもの(ex. 95%未満のもの)については、純度換算を実施すべきとのご指摘を頂いている。

##### 【大臣告示】

(被験物質の用量)

第四条 被験物質の用量は、次に定めるところによらなければならない。

- 一 用量設定試験の最高用量をプレート当たり五ミリグラムとすること。
- 二 本試験の最高用量は、次に掲げる場合に応じて、プレート当たり次に定める用量とすること。  
イ～ハ (略)
- 三 適切な間隔で五段階以上の用量を設定すること。

##### 【施行通達】

###### 1 改正の要点

(3)被験物質の菌株に対する生育阻害及び被験物質の沈殿の状態に応じ、具体的に被験物質の最高量を定めたこと。(第4条関係)

###### 2 細部事項

###### (3)第4条関係

用量設定試験において変異原性が認められた場合には、本試験においては、用量反応関係が求められるように適切な用量設定を行う必要があること。

##### 【課長事務連絡／委託事業の調達仕様書】

※用量設定に関する各種記述はあるが、純度換算への言及は見られない。

##### 【Q&A(Web サイト)】

新規化学物質届出に添付する有害性調査における不純物の取扱いはどのようになりますか？

→ 被験物質はできるだけ不純物を分離したものをを用いることが原則ですが、不純物が分離できない場合には、次のように取り扱います。

なお、不純物が新規化学物質であって、分離が可能な場合は、独立した有害性調査が必要です。

###### (1) 不純物が分離できない場合(反応副生成物、原料等)

ア 純度 95%以上 主成分の単一物質として扱います。純度換算は不要。

イ 純度 90%超～95%未満 主成分の単一物質として扱います。純度換算は必要。

ウ 純度 90%以下 主成分と不純物の混合物として扱います。純度換算は主成分と不純物の純度の和によります。

###### (2) 被験物質が溶液状の場合

溶液中の溶媒の割合が10%未満の場合は純度換算を行うだけでよいですが、10%以上の場合には、以下のように取り扱います。

ア 溶媒が水、DMSO、アセトン等の場合

溶質成分を単一物質又は混合物として純度換算を行います。



イ 溶媒が特殊なものの場合

(ア) 溶液中の溶媒を除去します。

(イ) (ア)が不可能であれば、水、DMSO、アセトン等、試験系に与える影響がないことが判明している溶媒に置換します。溶質成分を単一物質又は混合物として純度換算を行います。

(ウ) (イ)が不可能であれば、溶媒が試験系に与える影響を調査します。

例えば、微生物を用いる変異原性試験による有害性調査を実施する場合は次の事項を調査します。

・菌に対する影響(生育阻害)

・S9に対する影響

(エ) (ウ)の結果、

溶媒が試験系に与える影響がない場合には、主成分(溶質)の単一物質として扱い、純度換算を行います。

溶媒が試験系に与える影響がある場合には、主成分(溶質)と溶媒の混合物として扱います。

## (5) 機器計測時の補正

機器計測を行う際に適切に補正を実施すべきとのご指摘を頂いている。

【大臣告示】

(再現性)

第八条 変異原性試験の結果は、再現性のあるものでなければならない。

【施行通達】

特段記載なし。

【課長事務連絡】

特段記載なし。

## (6) 報告書中における年の表記の統一

最終報告書等において和暦・西暦の表記が混在しているものについては、いずれかに統一すべきとのご指摘を頂いている。

【大臣告示】

特段記載なし。

【施行通達】

特段記載なし。

【課長事務連絡】

5 報告書

(1) 最終報告書

最終報告書に記載すべき内容は、GLP 基準(昭和 63 年労働省告示第 76 号)に記載された内容に以下の内容を加えて作成する。

イ〜リ (略)

(2) 労働安全衛生法第 57 条の 2 第 1 項の規定に基づく新規化学物質の届出に用いる試験結果報告書

新規化学物質の製造又は輸入に係る届出に用いる試験結果報告書は、平成 9 年 9 月 29 日付け基発第 653 号「微生物を用いる変異原性試験結果報告書様式の改正について」の別添様式によること。

## (7) 使用する菌株の種類

TA97A など一部の菌株について、使用実績が乏しいのではないかとのご指摘を頂いている。

### 【大臣告示】

(試験に用いる菌株)

第三条 用量設定試験及び本試験に用いる菌株は、次の各号に掲げるものとしなければならない。ただし、被験物質の性質からみてこれらの菌株以外の菌株を用いて変異原性試験を行う必要があると認められる場合には、当該菌株を追加しなければならない。

- 一 ネズミチフス菌TA九八
- 二 ネズミチフス菌TA一〇〇
- 三 ネズミチフス菌TA一五三五
- 四 ネズミチフス菌TA一五三七、TA九七又はTA九七a
- 五 大腸菌WPニuvrA、大腸菌WPニuvrA(pKM一〇一)又はネズミチフス菌TA一〇二

### 【施行通達】

#### 1 改正の要点

(2)変異原性試験に用いる菌株の種類を追加したこと。(第3条関係)

#### 2 細部事項

(2)第3条関係

「被験物質の性質からみて、これらの菌株以外の菌株を用いて用量設定試験及び本試験を行う必要があると認められる場合」には、例えば、被験物質の化学構造からみて反応性結合基を2以上有し、DNAの鎖間に架橋する可能性がある場合があること。この場合において、DNA損傷修復機能を有する菌株を追加し、試験を実施する必要があること。

### 【課長事務連絡】

大臣告示の記述が再掲されているのみ。

## (8) 沈殿がない用量での実施

全ての用量で沈殿が生じているケースについて、沈殿がない用量でも試験を実施すべきとのご指摘を頂いている。

### 【大臣告示】

(被験物質の用量)

第四条 被験物質の用量は、次に定めるところによらなければならない。

- 一 用量設定試験の最高用量をプレート当たり五ミリグラムとすること。
- 二 本試験の最高用量は、次に掲げる場合に応じて、プレート当たり次に定める用量とすること。
  - イ (略)
  - ロ 用量設定試験において被験物質の菌株に対する生育阻害が認められず、かつ、被験物質の沈殿が認められる場合 被験物質の沈殿が認められる用量
  - ハ 用量設定試験において被験物質の菌株に対する生育阻害が認められず、かつ、被験物質の沈殿が認められない場合 五ミリグラム
- 三 適切な間隔で五段階以上の用量を設定すること。

(観察)

第七条 用量設定試験及び本試験においては、被験物質の菌株に対する生育阻害の状態及び被験物質の沈殿の状態を確認しなければならない。

### 【施行通達】

#### 1 改正の要点

- (3) 被験物質の菌株に対する生育阻害及び被験物質の沈殿の状態に応じ、具体的に被験物質の最高量を定めたこと。(第4条関係)
- (4) 変異原性試験において、新たに被験物質の沈殿の状態を確認しなければならないこととしたこと。(第7条第1項関係)

#### 2 細部事項

##### (3) 第4条関係

用量設定試験において変異原性が認められた場合には、本試験においては、用量反応関係が求められるように適切な用量設定を行う必要があること。

##### (5) 第7条関係

被験物質の沈殿は、目視により確認されるべきものであること。

### 【課長事務連絡(／委託事業の調達仕様書)】

※ 用量設定試験において「被験物質の沈殿の有無」を確認すること、又、試験の中で「被験物質の沈殿の有無を肉眼で調べる」等の規定は散在しているが、その他関連の規定はない。