

微生物を用いる変異原性試験の具体的手法及び試験結果の評価方法

I 試験の手法

1 試験の準備

(1) 試験に使用する器具、試薬等の滅菌

微生物を用いる変異原性試験（以下「試験」という。）に使用する器具、試薬等で、あらかじめ滅菌されたもの以外のもので雑菌の混入するおそれのあるものについては、滅菌しなければならない。

(2) テスト菌株の特性検査

凍結保存するテスト菌株は、次の特性等について検査し、それぞれの菌株に特有の性質を持っていることを確認する。

- イ アミノ酸要求性
- ロ 紫外線感受性
- ハ 膜変異 *rfa* 特性
- ニ プラスミド由来の薬剤耐性
- ホ 陰性対照値
- ヘ 陽性対照値

(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。

微生物を用いる変異原性試験の具体的手法及び試験結果の評価方法

1 (6) その他

雑菌の混入するおそれのある器具、試薬等であって、予め滅菌処理されたもの以外のものについては、滅菌処理を実施する。【略】

1 (1) テスト菌株

試験に用いるテスト菌株は、下記アに掲げる種類の中から、下記イの特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質を持っていることが確認されたもの【略】

イ 特性等

- a) アミノ酸要求性
- b) 紫外線感受性
- c) 膜変異特性
- d) プラスミド由来の薬剤耐性
- e) 陰性対照値及び陽性対照値

1 (1) テスト菌株

試験に用いるテスト菌株は、【略】単一コロニーより増殖さ

(4) 培養条件の決定

テスト菌株の適切な培養条件は、経時的に生菌数を求める方法で得られた生育曲線より決定する。

(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。

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

ニ テスト菌株の前培養液は、試験ごとに新しく培養したものを用いなければならない。

(6) 被験物質溶液等の調製

試験を行う化学物質（以下「被験物質」という。）の溶液等は被験物質の性状により次の溶液等とする。

イ 水又は DMSO に安定な被験物質

(イ) 水に可溶である場合…水溶液

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。）を用いる。

1 (1) テスト菌株

【略】なお、全てのテスト菌株の培養は、経時的に生菌数を求める方法で得られた生育曲線に基づき決定する適切な培養条件（以下「適切な培養条件」という。）により行われたものでなければならない。

1 (1) テスト菌株

【略】菌凍結液を一度解凍したものは再使用してはならない。

2 (2) 前培養液の準備

菌凍結液を解凍したものをニュートリエントブロス培養液に一定量接種した後、適切な培養条件に基づき 37℃で静止期の初期で培養を止め、それ以上増殖しないようにしたものを「前培養液」とし、生菌数が概ね $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ 以上となっていることを確認する。【略】

1 (3) 被験物質

被験物質は、その性状に応じて下記のとおり調製したものをを用いる。【略】

ア 水又は DMSO に安定な被験物質

① 水に可溶である場合…水溶液

(ロ) 水に難溶で DMSO に可溶である場合…DMSO 溶液

(ハ) 水及び DMSO に難溶である場合…水又は DMSO 懸濁液

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。

ハ 水に不安定な被験物質は、適切な方法で脱水した有機溶媒に溶解又は懸濁する。

2 試験の実施

(1) 試験に用いるテスト菌株

試験に用いるテスト菌株は以下の菌株とする。

イ ネズミチフス菌 TA98

ロ ネズミチフス菌 TA100

ハ ネズミチフス菌 TA1535

ニ ネズミチフス菌 TA1537、TA97 又は TA97a

ホ 大腸菌 WP2uvrA、大腸菌 WP2uvrA/pKM101 又はネズミチフス菌 TA102

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

② 水に難溶で DMSO に可溶である場合…DMSO 溶液

③ 水及び DMSO に難溶である場合…水又は DMSO 懸濁液

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。当該有機溶媒に溶解させることが困難な場合には懸濁したものを用いる。

ウ 水に不安定な被験物質

適切な方法で脱水した有機溶媒に溶解したものを用いる。当該有機溶媒に溶解させることが困難な場合には懸濁したものを用いる。

1 (1) テスト菌株

試験に用いるテスト菌株は、下記アに掲げる種類の中から、下記イの特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質を持っていることが確認されたもの【略】

ア 種類

① ネズミチフス菌 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 WP2uvrA、大腸菌 WP2uvrA/pKM101 又はネズ

加しなければならない。

(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。

S9 mix 1ml 中の組成

S9 分画	10~30% (0.1~0.3ml)
MgCl ₂	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

代謝活性化系を用いない場合は S9 mix の代わりに 0.1M のナトリウム-リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いる。

(3) プレート数

ミチフス菌 TA102

ただし、試験の対象とする化学物質（以下「被験物質」という。）の性質からみて、これらの菌株以外の菌株を用いて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。

2 試験の流れ

試験は、プレート法又はプレインキュベーション法により、【略】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行う。【略】

なお、被験物質が気体又は試験管若しく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って、プレート法又はプレインキュベーション法による試験が困難である場合には、物性に応じた適切な方法で試験を実施する。

1 (2) S9 mix

代謝活性化系を用いる場合の S9 mix は、以下の組成とする。製造から 6 ヶ月以内のものであることが望ましい。

S9 mix 1ml 中の組成

S9 分画	10~30% (0.1~0.3ml)
MgCl ₂	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

1 (5) プレート

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。

(4) 用量設定試験

この試験は、被験物質の沈殿の有無と各テスト菌株に対する生育阻害を調べ、本試験を行う場合の被験物質の用量範囲を決定するための試験である。

本試験と同じ手法を用い、代謝活性化系を用いる場合と用いない場合の両条件下で最高用量 **5mg/プレート** から適切な公比で **5 段階以上**の用量について実施する。

(5) 本試験の用量設定

本試験の用量は、用量設定試験の結果より求める。

イ 用量設定試験において、変異原性が認められた場合
用量依存性が得られるように適切な間隔で用量を設定する。

ロ 用量設定試験において、変異原性が認められなかった場合

(イ) 用量設定試験において、被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示さず、かつ、被験物質の沈殿が認められない場合は、最高用量 **5mg/プレート** とし、適切な間隔で用量を設定する。

(ロ) 用量設定試験において、被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示した場合は、沈殿の有無にかかわらず最

小グルコース寒天平板培地をプレートとして用いる。

なお、全ての試験において、用いるプレートは **2 枚以上**とするのが原則であるが、本試験で 2 枚以上のプレートを用いた試験を 2 回以上実施する場合には、用量設定試験において用いるプレートは 1 枚のみとして差し支えない。

2 (3) 用量設定試験

標準最高用量から、適切な公比で **5 段階以上**の用量について試験を実施し、被験物質の沈殿の有無及び各テスト菌株に対する生育阻害を調べる。

なお、標準最高用量は、**5mg/プレート**とする（以下同様）。

2 (4) 本試験の用量設定

上記 (3) の用量設定試験の結果に基づき、下記により本試験における用量を設定する。なお、いずれの場合にも、適切な公比で **5 段階以上**の用量を設定する。

ア 用量設定試験において変異原性が認められた場合
用量依存性が得られるように適切な間隔で用量を設定する。

イ 用量設定試験において変異原性が認められなかった場合
(ア) 被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示さず、かつ、被験物質の沈殿が認められない場合は、最高用量 **5mg/プレート** とし、適切な間隔で用量を設定する。

(イ) 被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示した場合は、沈殿の有無にかかわらず最高用量は被験物質がテス

高用量は被験物質がテスト菌株に対して生育阻害を示す用量とし、適切な間隔で用量を設定する。

(ハ) 用量設定試験において、被験物質がすべてのテスト菌株に対して生育阻害を示さず、かつ、被験物質の沈殿が認められた場合は、沈殿の認められる用量段階を1段階以上含めた適切な間隔で用量を設定する。

(6) 本試験

試験は、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(5)で設定した用量で5段階以上の試験を実施する。

(7) 確認試験

用量設定試験と本試験の結果が一致しない場合には再現性を確認するために確認試験を実施する。

(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

ト菌株に対して生育阻害を示す用量とし、適切な間隔で用量を設定する。

(ウ) 被験物質がすべてのテスト菌株に対して生育阻害を示さず、かつ、被験物質の沈殿が認められた場合は、沈殿の認められる用量段階を1段階以上含めた適切な間隔で用量を設定する。

2 試験の流れ

試験は、【略】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行う。【略】

2 (4) 本試験の用量設定

【略】いずれの場合にも、適切な公比で5段階以上の用量を設定する。

2 (6) 確認試験

用量設定試験と本試験の結果、又、本試験を2回実施した場合の本試験の結果が一致しない場合には、再現性を確認するために確認試験を実施する。

1 (4) 対照物質

ア 陰性対照物質

上記(3)の被験物質の調整に用いた溶媒を用いる。

イ 陽性対照物質

代謝活性化系を用いる場合(S9 mixを必要とするもの)と代謝活性化系を用いない場合(S9 mixを必要としないもの)のそれぞれについて、適切な陽性対照物質を用いる。

ない陽性対照物質を、適切な用量で用いる。

(9) 無菌テスト

上記のすべての試験において、最高用量の被験物質溶液、**S9 mix** について試験に用いた容量で無菌テストを実施する。

3 試験の方法

(1) プレインキュベーション法

イ 代謝活性化系を用いない場合

(イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。

(ロ) (イ)に **0.1M** ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH7.4) を **0.5ml** 添加し、続いてテスト菌株前培養液を **0.1ml** 加えてよく混合する。

(ハ) (ロ) を **37°C** で振盪しながら一定時間プレインキュベートする。

(ニ) (ハ) にトップアガーを **2ml** 加えてよく混合する。

(ホ) (ニ) を最少グルコース寒天平板培地 (プレート) の上に注ぎ一様に広げる。

(ヘ) **37°C** で **48** 時間以上インキュベートする。

(ト) すべてのプレートについて、テスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べる。また、被験物質の沈殿の有無を肉眼で調べる。

(チ) 復帰突然変異により生じたコロニー数を数える。

ロ 代謝活性化系を用いる場合

【略】

2 試験の流れ

【略】 全ての試験において、最高用量の被験物質及び試験に用いた用量の **S9 mix** について無菌テストを実施する。

3 具体的な試験の方法

試験は、以下の流れにより実施する。

① 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。

② 【代謝活性化系を用いない場合】

①に **0.1M** ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH7.4) を **0.5ml** 添加し、続いて前培養液を **0.1ml** 加えてよく混合する。

【代謝活性化系を用いる場合】

①に **S9 mix** を **0.5ml** 添加し、続いて前培養液を **0.1ml** 加えてよく混合する。

③ 【プレインキュベーション法の場合】

②を **37°C** で振盪しながら一定時間プレインキュベートする。

【プレート法の場合】

追加の操作をせず③以降に進む。

④ ③にトップアガーを **2ml** 加えてよく混合する。

⑤ ④をプレートの上に注ぎ一様に広げる。

- (イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。
- (ロ) (イ) に **S9 mix** を **0.5ml** 添加し、続いてテスト菌株前培養液を **0.1ml** 加えてよく混合する。
- (ハ) イの (ハ) ~ (チ) と同じ操作を実施する。

(2) プレート法

イ 代謝活性化系を用いない場合

- (イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。
- (ロ) (イ) に **0.1M** ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH7.4) を **0.5ml** 添加し、続いてテスト菌株前培養液を **0.1ml** 加える。
- (ハ) (ロ) にトッパアガーを **2ml** 加えてよく混合する。
- (ニ) (ハ) をプレートの上に注ぎ一様に広げる。
- (ホ) **37°C** で **48** 時間以上インキュベートする。
- (ヘ) すべてのプレートについて、テスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べる。また、被験物質の沈殿の有無を肉眼で調べる。
- (ト) 復帰突然変異により生じたコロニー数を数える。

ロ 代謝活性化系を用いる場合

- (イ) 滅菌された試験管に被験物質溶液を入れる。
- (ロ) (イ) に **S9 mix** を **0.5ml** 添加し、続いてテスト菌株前培養液を **0.1ml** 加える。
- (ハ) イの (ハ) ~ (ト) と同じ操作を実施する。

- ⑥ ⑤を **37°C** で **48** 時間以上インキュベートする。
- ⑦ 全てのプレートについて、テスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べる。また、被験物質の沈殿の有無を肉眼で調べる。
- ⑧ 復帰突然変異により生じたコロニー数を数える。

復帰変異コロニー数は、各々のプレートの実測値とその平均値を表示し、用量－反応曲線の図を添付する。

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 被験物質

保管方法、CAS 番号（既知の場合）

ロ 被験物質溶液の調製方法及び溶媒の名称とその選択理由

ハ 陽性対照物質

陽性対照物質溶液の調製方法、溶液の保管及び方法

ニ S9 及び S9 mix

S9 の入手方法等、S9 の調製方法、S9 mix の組成

ホ 試験系

試験に用いたテスト菌株の名称、選択理由、入手方法及び保存方法

ヘ 前培養の条件及び培地

前培養条件、ニュートリエントブロス、前培養終了時の生菌数、最少グルコース寒天平板培地、トッパアガー

ト 試験方法等

採用した試験方法、使用プレート数、試験の操作手順、用量の設定理由、コロニーカウント方法、生育阻害の有無の確認方法、無菌テスト、沈殿の有無の確認方法、結果の

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。なお、復帰変異コロニー数については、各々のプレートの実測値とその平均値を表示し、用量－反応曲線の図を添付する。

ア 被験物質

保管方法、CAS 番号（既知の場合）

イ 被験物質の調製方法及び溶媒の名称とその選択理由

ウ 陽性対照物質

陽性対照物質溶液の調製方法、溶液の保管及び方法

エ S9 及び S9 mix

S9 の入手方法等、S9 の調製方法、S9 mix の組成

オ 試験系

試験に用いたテスト菌株の名称、選択理由、入手方法及び保存方法

カ 前培養の条件及び培地

前培養条件、ニュートリエントブロス、前培養終了時の生菌数、最少グルコース寒天平板培地、トッパアガー

キ 試験方法等

採用した試験方法、使用プレート数、試験の操作手順、用量の設定理由、コロニーカウント方法、生育阻害の有無の確認方法、無菌テスト、沈殿の有無の確認方法、結果の

<p>判定基準</p> <p>チ 試験結果及び考察 無菌テストの結果、生育阻害の有無、被験物質の沈殿の有無、陰性対照値と陽性対照値の背景データ</p> <p>リ その他必要とされる事項 参考文献</p> <p>(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。</p> <p>6 その他</p> <p>(1) 試験に使用した化学物質等の取扱い及び廃棄に当たっては、法令の定めのあるものは、当該法令の定めによることはもとより、法令の定めのないものであってもその取扱い及び廃棄には十分注意しなければならない。</p> <p>(2) 被験物質の安全性を確認する上で、試験責任者がここに示した手法等から変更を必要とする場合は、試験責任者の判断によることとし、最終報告書及び届出に用いる試験結果報告書にその旨を記載すること。</p> <p>II 結果の評価</p>	<p>判定基準</p> <p>ク 試験結果及び考察 無菌テストの結果、生育阻害の有無、被験物質の沈殿の有無、陰性対照値と陽性対照値の背景データ</p> <p>ケ その他必要とされる事項 参考文献</p> <p>(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。【略】</p> <p>5 その他</p> <p>(1) 試験に使用した化学物質等の取扱い及び廃棄に当たっては、法令の定めのあるものは、当該法令の定めによることはもとより、法令の定めのないものであってもその取扱い及び廃棄には十分注意しなければならない。</p> <p>(2) 被験物質の安全性を確認する上で、試験責任者がここに示した手法等から変更を必要とする場合は、試験責任者の判断によることとし、最終報告書及び届出に用いる試験結果報告書にその旨を記載すること。</p> <p>II 結果の評価</p>
---	--

1 評価の前提条件

ある物質について行われた変異原性試験は、それが適正な菌、代謝活性化系及び試薬等を用い、上記 I の手法に従って適切に実施された場合に初めて、当該試験結果が評価の対象となる。

2 結果の判定基準

化学物質の用量の増加とともに復帰変異コロニー数が明らかに増加し、かつ、再現性が得られる場合に陽性と判定する。

3 化学物質の変異原性比活性

化学物質の変異原性の強さについては、化学物質の変異原性比活性を用いて相対的比較を行う。比活性は陽性と判定した用量で次式で計算し、被験物質の用量（単位 mg/プレート）当たりの最高値を求める。

比活性＝

$$\frac{\{\text{当該用量におけるプレート当たりの復帰変異コロニー数}\} - \{\text{陰性対照の復帰変異コロニー数}\}}{\text{当該用量 [mg/プレート]}}$$

1 評価の前提条件

ある物質について行われた変異原性試験は、それが適正な菌、代謝活性化系及び試薬等を用い、上記 I の手法に従って適切に実施された場合に初めて、当該試験結果が評価の対象となる。

2 結果の判定基準

被験物質の用量の増加とともに復帰変異コロニー数が明らかに増加し、(原則として、陰性対照の2倍以上)、かつ、再現性が得られる場合に陽性と判定する。

3 評価指標

被験物質の変異原性の強さについては、被験物質の変異原性比活性を用いて相対的比較を行う。比活性は陽性と判定した用量で次式で計算し、被験物質の用量（単位 mg/プレート）当たりの最高値を求める。

比活性＝

$$\frac{\{\text{当該用量におけるプレート当たりの復帰変異コロニー数}\} - \{\text{陰性対照の復帰変異コロニー数}\}}{\text{当該用量 [mg/プレート]}}$$