

『スクリーニング試験として行う中期発がん性試験の対象物質の  
選定方法等について』等基準一式

## スクリーニングとして行う中期発がん性試験の対象物質の選定方法等について

(2019年度第1回化学物質のリスク評価に係る企画検討会確認版)

### 1 中期発がん性試験の対象物質の選定について

平成24年度の有害性評価小検討会の検討結果に沿って、平成25年度から化学物質の発がん性評価を加速することとし、遺伝毒性試験、中期発がん性試験等による発がん性のスクリーニングの仕組みが導入された。この仕組みを踏まえ、企画検討会において、従来実施してきた長期発がん性試験の対象物質の選定に代えて、2の方針により、中期発がん性試験の対象物質の候補物質を選定し、その候補物質の中から発がん性評価ワーキンググループにおいて、対象物質を決定する。

なお、この中期発がん性試験で陽性の結果が出たものについては、フィージビリティテストを経て、長期発がん性試験を実施することとなる。

### 2 中期発がん性試験対象物質の選定方法について

(1) 下記 ~ のいずれかに該当する物質を中期発がん性試験の対象とする。

国が委託した微生物を用いる変異原性試験(エームス試験)結果において陽性で、比活性値が1,000 rev/mg以上となり、遺伝毒性評価ワーキンググループにおいて「強い遺伝毒性あり」と評価された物質

国が委託したBhas形質転換試験において遺伝毒性評価ワーキンググループで陽性と評価された物質

既存の遺伝毒性試験等の情報を踏まえ、遺伝毒性評価ワーキンググループにおいて、「強い遺伝毒性あり」と評価された物質(、を除く)

国が「強い変異原性物質」であるとして行政指導の対象としている物質

(2) (1)により選定した物質の中から、製造・輸入量、性状、社会的な必要性、予算等を考慮し、絞り込みを行う。

(3) 企画検討会で候補物質を絞り込み、その結果を踏まえ、発がん性ワーキンググループで対象物質を決定する。

### 3 検討の進め方

- (1) 企画検討会で選定方法を確認し、候補物質の選定を行う。
- (2) 化学物質のリスク評価検討会 有害性評価小検討会 発がん性評価ワーキンググループにおいて、(1)を踏まえ、中期発がん性試験の物質を決定する。

## 遺伝子改変動物を用いた発がん性試験について

(平成 29 年度第 2 回発がん性評価 WG 確認資料)

### 1 試験の導入 (H29.1.16 第 2 回発がん性評価WG 承認)

- 多臓器の発がん性評価に、遺伝子改変動物による発がん性試験を導入することは承認。ただし、粉じんの発がん性評価は、長期発がん性試験でも最終期に、発がんが認められることになるから、遺伝子改変動物による発がん性試験の対象とするかどうかは検討が必要。

- 遺伝子改変動物の選定については、次の検討。

遺伝毒性が強い化学物質の発がん性の評価は、rasH2 マウスのみで十分ではないか。

非遺伝毒性の化学物質のうち、発がん性がないことを含めた評価が必要なものは、rasH2 マウスに、p53 ヘテロ欠損マウスを加えてはどうか。

遺伝子改変動物の選定については、被験物質に応じて、rasH2 マウス、p53 ヘテロ欠損マウスの組み合わせを検討することが適当。

なお、当面は、本試験のキックオフであり、軌道に乗るまで、rasH2 マウス、p53 ヘテロ欠損マウスの両方の実施が適当との整理でもいいのではないか。

### 2 対象物質の選定 (H29.1.16 第 2 回発がん性評価WG 承認)

- 肝臓への標的性が弱く、他の臓器への標的性が高い化学物質
  - ・ 肝中期発がん性試験において、多臓器の標的性が疑われるが、その調査結果のみでは、発がん性の強度を評価できない化学物質
- 肝臓への標的性がなく、他の臓器への標的性が疑われる化学物質
  - ・ 肝中期発がん性試験において、多臓器の標的性を評価できない化学物質
- 経口ばく露による調査が不能なガス、蒸気又は粉状の化学物質
  - ・ 気体、液体の蒸気又は粉じんとして、労働環境にあり、吸入ばく露による発がん性を評価すべき化学物質

3 調査の基準（H29.3.1 第3回発がん性評価WG 改正案の承認）

- 遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準

## ラット肝中期発がん性試験による調査の基準

(平成 25 年度第 2 回発がん性評価 WG 後再修正)

### 1 試験の方法

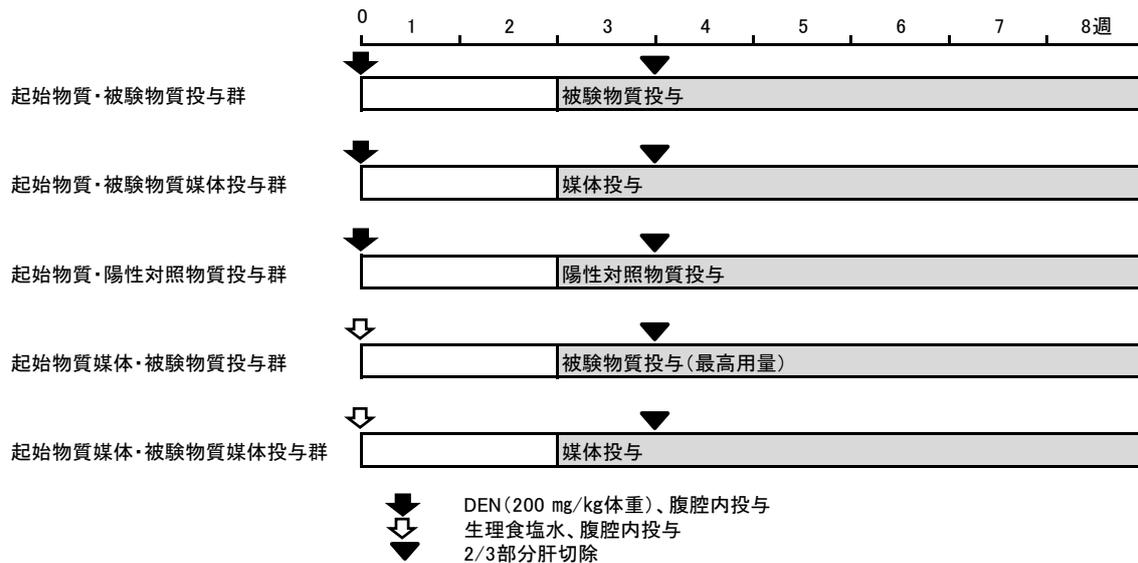
ラット肝中期発がん性試験は、2 段階発がんモデルによる試験方法（伊東法）とする。投与方法は、被験物質の物理化学的性質及び人がばく露される経路を考慮して選択する。

### 2 試験に用いる動物

- (1) 試験に用いる動物は、原則として、6 週齢の雄ラットとする。
- (2) 1 群当たりの動物数は、有効匹数 15 匹以上とする。

### 3 投与群及び対照群

- (1) 試験における起始物質・被験物質投与群の用量は、3 段階以上とする。
- (2) 起始物質・被験物質投与群の他に起始物質・被験物質媒体投与群を設定する。また、必要に応じて起始物質・陽性対照物質投与群、起始物質媒体・被験物質投与群及び起始物質媒体・被験物質媒体投与群を設定する。
- (3) 起始物質・被験物質媒体投与群には、被験物質の代わりに、その媒体を投与する。
- (4) 起始物質・陽性対照物質投与群には、被験物質の代わりに、既知の陽性物質（フェノバルビタール等）を投与する。
- (5) 起始物質媒体・被験物質投与群には、起始物質の代わりに、その媒体を投与する。
- (6) 起始物質媒体・被験物質媒体投与群には、起始物質及び被験物質の代わりに、それらの媒体を投与する。



#### 4 被験物質の用量

被験物質の用量は、次に定めるところによる。

- (1) 用量は、あらかじめ実施した用量設定試験の結果又は同等の知見に基づき決定する。
- (2) 最高用量は、最小限の毒性兆候を表すのに十分な用量、若しくは技術的に投与可能な上限の用量とする。

#### 5 試験手順

試験は、起始物質ジエチルニトロソアミン (DEN) の 200 mg/kg 体重を腹腔内に単回投与後、第 3 週目より 6 週間、被験物質を毎日、投与し、第 8 週終了後に解剖する。なお、第 3 週目の終わりに肝の 2/3 を切除する。

#### 6 観察及び測定事項

- (1) 各群の全例について、一般状態及び体重を適切な頻度で観察する。
- (2) 必要に応じて摂餌量を適切な頻度で測定する。
- (3) 試験に使用したすべての動物を解剖し、臓器の肉眼的観察をする。免疫組織学的に肝臓の前がん病変 (GST-P 陽性細胞巣) の数及び総面積の測定を行う。また、肝臓の病理組織学的検査を行う。

なお、被験物質の毒性を考慮して、適切な器官・組織についても病理組織学的検査を行う。

## 中期発がん性試験（ラット肝中期発がん性試験）の結果の評価基準

（平成 26 年度第 1 回発がん性評価 WG 確認版）

厚生労働省では、平成 25 年度から化学物質の発がん性スクリーニングとして、ラット肝中期発がん性試験を実施している。この試験の結果の評価は、発がん性評価ワーキンググループで行うこととなっており、その際の評価基準は次のとおりとする。

### 1 陽性の判断基準

投与群における肝臓の胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数又は面積が、媒体対照群と比較して有意に増加し、かつ、用量反応性が認められる場合、又は単一の用量群において明らかな増加が認められる場合、陽性と判断する。

※検査方法等は、〈参考 1〉を参照。

### 2 がん原性指針の策定の要否の判断基準

発がん性評価ワーキンググループにおいて、ラット肝中期発がん性試験の結果が「陽性」と判断された物質は、原則として、労働安全衛生法第 28 条第 3 項の規定に基づく厚生労働大臣の指針（がん原性指針）の対象とする。

ただし、被験物質が遺伝毒性を有さず、かつ、ラット肝中期発がん性試験から得られた NOAEL 等が日本産業衛生学会の許容濃度等と比較して非常に大きく、労働者に健康影響を与える可能性が低い場合は別途検討する。

### 3 リスク評価の要否の判断基準

発がん性評価ワーキンググループにおいて、ラット肝中期発がん性試験の結果が「陽性」と判断された物質は、原則として、リスク評価の候補物質とし、「化学物質のリスク評価に係る企画検討会」等での意見聴取を行った上で「有害物ばく露作業報告」の対象とする。

### <参考 1> GST-P 陽性細胞巢の検査方法等について

定期解剖動物について、固定・保存した肝臓（右上葉、右下葉及び尾状葉）を切り出し、パラフィン包埋、薄切、胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P)の免疫組織学的染色を行う。GST-P 陽性細胞巢の個数及び面積を、病理標本画像解析装置を用いて、肝臓切片 1 cm<sup>2</sup> 当たりの GST-P 陽性細胞巢（直径 0.2 mm 以上）の個数及び総面積を算出する。

また、GST-P 陽性細胞巢の個数及び面積は、1 匹当たりの GST-P 陽性細胞巢の個数（個/cm<sup>2</sup>）及び面積（mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>）を算出する。

### <参考 2> ラット肝中期発がん性試験以降のさらなる試験の実施について

#### (1) 陽性と判断された物質の場合

発がん性評価ワーキンググループにおいて、ラット肝中期発がん性試験の結果が「陽性」と判断された物質は、原則として、吸入による長期発がん性試験の可否を確認するためのフィージビリティ試験（試験用ガス、蒸気等の発生試験）を行う。

その結果、試験可能と判断された場合には、吸入による長期発がん性試験の候補物質とし、「有害性評価小検討会」において、候補物質の中から試験対象物質を選定する。

試験対象物質が選定された場合には、発がん性評価ワーキンググループにおいて、長期発がん性試験の使用動物種等を決定する。

#### (2) 陰性と判断された物質の場合

発がん性評価ワーキンググループにおいて、ラット肝中期発がん性試験の結果が「陰性」と判断された物質は、原則として、肝臓以外の臓器を標的臓器とした中期発がん性試験（以下「非肝臓中期発がん性試験」という。）の候補物質とする。

ただし、当分の間は、ラット肝中期発がん性試験を優先して行うこととし、将来、非肝臓中期発がん性試験を行う段階となった場合には、その時

点までに実施したラット肝中期発がん性試験で陰性だった物質の中から、発がん性評価ワーキンググループにおいて、追加の試験が必要な物質を選定するとともに、標的臓器及び試験方法を決定する。

## 遺伝子改変動物を用いたがん原性試験による調査の基準

(平成 28 年度第 3 回発がん性評価 WG 確認版)

### 1 試験の方法

がん原性試験の投与方法は、被験物質の物理化学的性質及び人体がばく露される経路を考慮して選択されなければならない。

### 2 試験に用いる動物

(1) がん原性試験に用いる動物は、体重のそろった 8 週齢前後の遺伝子改変マウスとしなければならない。

(2) がん原性試験に用いる動物数は、1 群につき、雄及び雌それぞれ 25 匹以上としなければならない。

### 3 投与群及び対照群.

(1) がん原性試験における投与群の数は、雄及び雌それぞれについて、3 段階以上としなければならない。

(2) がん原性試験において投与群の他に対照群を設定しなければならない。

### 4 被験物質の用量

がん原性試験における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。

(1) 用量は、あらかじめ 4 週間程度の用量設定試験を行い、その結果により決定すること。なお、用量設定試験に用いる動物は、がん原性試験に用いる遺伝子改変動物の野生型を用いることができる。

(2) 最高用量は、腫瘍以外の原因で死亡率を増加させることなく、かつ、最小限の毒性兆候を表すのに十分な用量とすること。

### 5 投与期間

がん原性試験における投与期間は、26 週間以上としなければならない。

## 6 観察及び測定事項

- (1) 各群の全例について、一般状態及び体重を適切な頻度で観察しなければならない。
- (2) 摂餌量を適切な頻度で測定しなければならない。
- (3) 被験物質を飲料水に添加し投与する場合は、摂水量を適切な頻度で測定しなければならない。
- (4) 試験に使用したすべての動物（途中死亡及び途中屠殺した動物を含む。）を解剖し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検査を行わなければならない。
- (5) なお、屠殺時、必要に応じて血液を採取し、被験物質の毒性を考慮して適切な項目について検査を行わなければならない。
- (6) 病理組織学的検査には、次の器官・組織について行わなければならない。
- (7) 皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、椎骨又は大腿骨（骨髄を含む。）、胸腺、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、精巣、卵巣、子宮、膣、眼球、脳、下垂体、脊髄、その他 肉眼で変化が認められた器官・組織

## 遺伝子改変動物を用いた発がん性試験の結果の評価基準（素案）

厚生労働省では、平成 29 年度から化学物質の発がん性スクリーニングとして、遺伝子改変動物を用いた発がん性試験を実施している。この試験の結果の評価は、発がん性評価ワーキンググループで行うこととなっており、その際の評価基準は次のとおりとする。

### 1 発がん性の判断基準

試験に用いた動物の種類（rasH2 マウス、p53KO マウス）及び雌雄毎の評価基準は、原則以下のとおりとする。

- ①発がん性を示す明らかな証拠あり（clear evidence of carcinogenic activity）：1) 悪性腫瘍の増加、2) 悪性腫瘍と良性腫瘍を合わせた発生の増加、あるいは、3) 悪性腫瘍への進行することが既に知られている良性腫瘍の明らかな増加と解釈される場合。
- ②発がん性を示す証拠あり（some evidence of carcinogenic activity）：悪性腫瘍、良性腫瘍、または悪性腫瘍と良性腫瘍を合わせた発生前に投与による発生増加がみられるが、「明らかな証拠」とするには弱い、あるいは、極めて稀な腫瘍（良性または悪性）の少数例の発生があり、投与による発生と考えられる場合。
- ③発がん性を示す不確実な証拠（equivocal evidence of carcinogenic activity）：腫瘍（良性または悪性）の発生前に投与による増加が疑われるが、その増加は極めて僅か（境界）と解釈される場合。
- ④発がん性を示す証拠なし（no evidence of carcinogenic activity）：投与に関連する腫瘍の増加はないと解釈される場合。

上記判断には、統計解析（臓器毎及び多臓器にわたる腫瘍に対する Peto、Cochran-Armitage、Fisher 検定）、腫瘍の種類や発生時期、他臓器にわたる

腫瘍発生、前腫瘍性病変の発生状況等の生物学的意義、当該動物種における背景データ（ヒルトリカルコントロールデータ等）、用量反応関係の有無、試験の実施状況（濃度設定や動物の生存率等）、及び被験物質の特性等を考慮し結論するものとする。

また、これら試験に用いた動物の種類（rasH2 マウス、p53KO マウス）及び雌雄毎の評価結果をもとに、試験に用いた動物の種類毎の特性等も勘案して、被験物質に発がん性があるか否か（陽性・陰性）について総合的に評価を行う。

## 2 がん原性指針の策定の要否の判断基準

発がん性評価ワーキンググループにおいて、遺伝子改変動物を用いた発がん性試験の結果が「陽性」と判断された物質は、原則として、労働安全衛生法第 28 条第 3 項の規定に基づく厚生労働大臣の指針（がん原性指針）の対象とする。

ただし、被験物質が遺伝毒性を有さず、かつ、遺伝子改変動物を用いた発がん性試験から得られた NOAEL 等が日本産業衛生学会の許容濃度等と比較して非常に大きく、労働者に健康影響を与える可能性が低い場合は別途検討する。

また、遺伝子改変動物を用いた発がん性試験とともに、長期がん原性試験を併せて実施している場合は、長期がん原性試験の結果を踏まえ判断するものとする。

## 3 リスク評価の要否の判断基準

発がん性評価ワーキンググループにおいて、遺伝子改変動物の結果が「陽性」と判断された物質は、原則として、リスク評価の候補物質とし、「化学物質のリスク評価に係る企画検討会」等での意見聴取を行った上で「有害物ばく露作業報告」の対象とする。

#### 4 遺伝子改変動物を用いた発がん性試験以降のさらなる試験の実施

##### (1) 陽性と判断された物質の場合

発がん性評価ワーキンググループにおいて、遺伝子改変動物（マウス）を用いた発がん性試験の結果が「陽性」と判断された物質について、技術等の面から吸入試験の実施が可能であり、ラットを用いる長期がん原性試験が実施されていない場合は、試験実施の可否を検討する。

その結果、試験実施が可能と判断された場合には、ラットを用いる吸入による長期がん原性試験の候補物質とし、「有害性評価小検討会」において検討する。

試験対象物質が選定された場合には、発がん性評価ワーキンググループにおいて、長期発がん性試験の使用動物種等を決定する。

##### (2) 陰性と判断された物質の場合

新たな試験は実施しない。