

平成 16 年 4 月 30 日
薬食発第 0430001 号
平成 16・04・21 製局第 1 号
環保企発第 040430001 号

厚生労働省医薬食品局長

経済産業省製造産業局長

環境省総合環境政策局長

「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について

第二種監視化学物質の指定を行う際の試験成績として「新規化学物質に係る試験並びに第一種監視化学物質及び第二種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第二条の二の規定により厚生労働大臣、経済産業大臣及び環境大臣が別に定める試験の試験成績」(平成 16 年厚生労働省、経済産業省、環境省告示第 3 号)が告示されたことに伴い、「新規化学物質等に係る試験の方法について(平成 15 年 1 月 21 日薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号)」の一部を下記のとおり改正し、平成 16 年 4 月 30 日から施行する。

記

- 1 本文中「同省令第 2 条第 1 項各号、同条第 2 項及び同条第 3 項に掲げる試験」の右に「並びに第 2 条の 2 に基づき厚生労働大臣、経済産業大臣及び環境大臣が定めたほ乳類を用いる 90 日間の反復投与毒性試験及びマウスリンフォーマ T K 試験による変異原性

試験」を加える。

- 2 別添中「<ほ乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による変異原性試験>」を「<ほ乳類を用いる 28 日間の反復投与毒性試験及びほ乳類を用いる 90 日間の反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスリンフォーマTK試験による変異原性試験>」に改める。

を とし、2 の後に以下を加える。

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 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 × 10⁶)は適切な方法により、使用する

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サルホン酸メチル、(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。

- 「ほ乳類を用いる 28 日間試験の反復投与毒性試験」の項の後に以下を加える。
ほ乳類を用いる 90 日間試験の反復投与毒性試験
OECD テストガイドライン 408 で定められた方法に準じて実施する。