

写

基 発 第 6 5 2 号
平成 9 年 9 月 2 9 日

都道府県労働基準局長 殿

労働省労働基準局長

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による調査の基準及び
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書様式の改正
について

労働安全衛生法第 5 7 条の 2 第 1 項の規定に基づき労働大臣の定める基準を定める告示（昭和 6 3 年労働省告示第 7 7 号）第 1 条第 2 項の規定により、微生物を用いる変異原性試験以外の調査の基準は、労働省労働基準局長が定めることとされているところである。

今般、これに基づき、微生物を用いる変異原性試験以外の試験による調査の基準として、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による調査の基準を別添 1 のとおり定めるとともに、さらにその取扱いについては、今後、下記のとおりとすることとし、平成 1 0 年 4 月 1 日以降に実施されるほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（以下「染色体異常試験」という。）について適用することしたので、了知されたい。

また、当該試験の結果報告については、別添 2 に示す「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書」（以下「報告書」という。）によることとするので、併せて了知されたい。

なお、関係事業者団体等に対しては、本職より別添 3 のとおり要請を行ったので申し添える。

おって、昭和 6 2 年 3 月 1 8 日付け基発 1 4 3 号は平成 1 0 年 3 月 3 1 日をもって廃止する。

記

- 1 労働安全衛生法（昭和47年法律第57号）第57条の2第1項の規定に基づき、労働安全衛生規則（昭和47年労働省令第32号）第34条の3第1項第1号の規定による微生物を用いる変異原性試験の結果等の届出があった場合において、労働者の健康障害を防止する観点から、必要があると認められるときは、労働大臣は、当該届出をした事業者に対して染色体異常試験による調査を行い、その結果等を報告するように要請するものであること。また、この染色体異常試験による調査の基準は、別添1のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による調査の基準によるべきものであること。
- 2 上記1の染色体異常試験による調査を行う場合には、労働安全衛生規則第34条の3第2項の規定に基づき試験施設等が具備すべき基準を定める告示（昭和63年労働省告示第76号）（以下「76号告示」という。）に適合した試験施設等においてこれを実施し、かつ、染色体異常試験の結果等の報告には、労働大臣が定める基準を具備している試験施設等において行われたことを証する書面を添付するよう、併せて要請するものであること。
- 3 上記1の要請を受けた事業者が、染色体異常試験による調査の基準と同等以上の知見を得ることができるとみなされる基準に従い、既に染色体異常試験を実施した場合には、当該事業者は、その試験等の結果を報告することで足りるものであること。
- 4 細胞増殖抑制試験の結果を図により判然と示すため、本様式の試験結果に対応した被験物質の容量と細胞増殖率との用量－反応曲線を作成し、報告書に添付すること。
また、染色体異常試験の結果が陽性の場合には、染色体異常の結果を示す写真を併せて添付すること。
- 5 76号告示を満たす試験施設等で試験が実施されたことを示す運営管理者による陳述書並びに76号告示を満たす試験施設等で試験が実施されたこと及び本通達に示す調査の基準に従い試験が実施されたことを示す信頼性保証責任者による信頼性保証書を報告書に添付すること。

(別添1) ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による調査の基準

1 染色体異常試験の種類

- (1) ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験は、短時間処理法による試験及び連続処理法による試験とする。
- (2) 短時間処理法による試験及び連続処理法による試験は、染色体異常物質を検索するために行う試験とする。
- (3) 細胞増殖抑制試験は、短時間処理法による試験及び連続処理法による試験における被験物質の最高用量を決定する試験とする。

2 染色体異常試験の方法

- (1) 細胞増殖抑制試験及び短時間処理法による試験は、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、及び用いないで行われなければならない。
- (2) 短時間処理法による試験において、陰性と判断された場合は、連続処理法による試験を行わなければならない。
- (3) 連続処理法による試験は、代謝活性化系を用いないで行わなければならない。

3 染色体異常試験に用いる細胞

短時間処理法による試験及び連続処理法による試験に用いる細胞は、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株、ヒト末梢リンパ球又はその他のほ乳類培養細胞の初代、継代若しくは株細胞とする。

4 被験物質の用量

被験物質の最高用量は、次に定めるところによらなければならない。

- (1) 細胞増殖抑制試験の最高用量を5 mg/ml又は10 mMのいずれか低い用量とすること。
- (2) 短時間処理法による試験及び連続処理法による試験の最高用量を次のとおりとすること。
 - イ 細胞増殖抑制試験において50%以上の細胞増殖抑制が認められる場合
明らかに50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量
 - ロ 細胞増殖抑制試験において50%以上の細胞増殖抑制が認められない場合（ハに掲げる場合を除く。） 5 mg/ml又は10 mMのいずれか低い用量

ハ 細胞増殖抑制試験において明らかな細胞増殖抑制が認められず、かつ、
処理終了時に被験物質の沈殿が認められる場合 沈殿が認められる用量
(3) 適切な間隔で3段階以上の染色体分析ができる用量を設定すること。

5 対照物質

短時間処理法による試験及び連続処理法による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た溶媒、陽性対照においては、適切な既知の染色体異常誘発物質としなければならない。

6 使用プレートの数

短時間処理法による試験及び連続処理法による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、原則としてそれぞれ2枚以上としなければならない。

7 観察及び記録

- (1) 短時間処理法による試験及び連続処理法による試験においては、スライド標本をコード化し、処理条件が判らない状況で、観察しなければならない。
- (2) 染色体構造異常については、染色体数がモード ± 2 の分裂中期細胞を各用量ごとに、200個以上について観察し、染色体構造異常を持つ細胞の数及び異常の種類別に細胞数を記録しなければならない。
- (3) 染色体の数的異常については、分裂中期細胞200個以上について観察し、倍数体の出現数を記録しなければならない。

8 結果の判定

- (1) 染色体構造異常又は数的異常を持つ細胞の出現頻度が陰性対照と比較して明らかに上昇し、かつ、その作用に用量依存性又は再現性が認められる場合には、陽性と判断しなければならない。
- (2) 明確に陽性又は陰性が判断できない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施しなければならない。

9 適用

本基準は、平成10年4月1日より適用する。

(別添2)

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)						
別 名						
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)						
試験に供した新規 化学物質の純度	wt%		試験に供した新規 化学物質の Lot No.			
不純物の名称及び濃度	wt%					
C A S 番 号			蒸 気 圧			
分 子 量			分 配 係 数			
融 点	℃		常 温 に お け る 性 状			
沸 点	℃					
安 定 性						
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水			DMSO		
	エタノール			その他 ()		

[備考]物理化学的性状は参考資料であるので、可能な限り記入すること。

- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「分配係数」の欄には、分配係数、測定温度及び分配係数の測定に用いた溶媒名を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名		入手先		
種		入手年月日	年 月 日	
培養液		製造元		
血清の種類と添加量	%	製造元 (Lot No.)		
細胞周期	h	凍結条件		
継代数		培養条件	容器	
染色体数 (モード)	本		温度	
			CO ₂ 濃度	
備考				

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入 (製造元)
製造年月日	年 月 日 製造
購入の場合の Lot No.	
保存温度	℃

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統		名称	
性		投与方法	
週令	週	投与期間及び投与量 (g / kg 体重)	
体重	g		

(3) S9 mixの組成

成分	S9 mix 1ml中の量	成分	S9 mix 1ml中の量
S9	ml	NADP	μmol
MgCl ₂	μmol	Na-リン酸緩衝液	μmol
KCl	μmol	その他 ()	μmol
グルコース-6-リン酸	μmol		

(4) S9 mixの処理条件 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

1. プレート法 2. 浮遊細胞法 3. その他 ()	
S9量 (最終濃度)	%
S9蛋白量 (最終濃度)	mg/ml
処 理 時 間	h
回 復 時 間	h
備 考	

4. 被験物質溶液の調製（被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。）

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
溶媒選択の理由					
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	時間	分	℃		
純度換算の有無	有		無		

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	ml/培養器	ml/培養器
	S 9 m i x 添加量		ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		
	S 9 蛋白の最終濃度		
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
細胞増殖抑制 測定法			
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (- h)		代謝活性化法による場合 (- h)	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録すること。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培養器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	ml/培養器	ml/培養器
	S 9 m i x 添加量		ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		
	S 9 蛋白の最終濃度		
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表1による。)

6. 連続処理法による試験（短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること。）

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		年 月 日から 年 月 日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	ml/培養器	ml/培養器
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
細胞増殖抑制 測定法			
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(- h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (m g / m l)	細胞増殖率 (%)	用量 (m g / m l)	細胞増殖率 (%)

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録すること。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		年 月 日から	年 月 日から
		年 月 日	年 月 日
培 養 器	形 状		
	大 き さ		
	培 養 液 量	ml/培養器	ml/培養器
	用量当たりの培養器数		
細 胞	播 種 細 胞 数	個/ml	個/ml
	前 培 養 日 数	日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	ml/培養器	ml/培養器
	処 理 時 間	h	h
	回 復 時 間	h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表2による。)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)		陽 性		陰 性			
判定の理由							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
		連続処理法	/		—	h 処理	mg/ml
					—	h 処理	mg/ml
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
		連続処理法	/		—	h 処理	mg/ml
					—	h 処理	mg/ml

[備考] D₂₀値は分裂中期像 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判断した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

[備考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

8. その他

試験実施施設	名 称	
	所 在 地	電話 () FAX ()
試験責任者	職 氏 名	印
	経 験 年 数	
試験期間	年 月 日より 年 月 日	
試験番号		

[備考]

1. 本様式への記載は最終報告書より転記して記載すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記載すること。

別表1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体構造異常細胞の数 (出現頻度%)						ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)										
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他			総異常数 (%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)						
-	-	陰性対照 ()																			
-	-																				()
-	-																				()
-	-																				()
-	-																				()
-	-	陽性対照 ()																			()
-	+	陰性対照 ()																			()
-	+																				()
-	+																				()
-	+																				()
-	+																				()
-	+	陽性対照 ()																			()

【備考】

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にT O Xを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。

別表2 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称

処理時間 (h)	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)						ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)				
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他			総異常数 (%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
-	陰性対照 ()													
								()						()
-														
								()						()
-														
								()						()
-														
								()						()
-														
								()						()
-	陽性対照 ()													
								()						()
-	陰性対照 ()													
								()						()
-														
								()						()
-														
								()						()
-														
								()						()
-														
								()						()
-	陽性対照 ()													
								()						()

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に↑印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にT O Xを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。