

不十分あるいはないために分類されなかったのか、また、データは十分にあるものの当該毒性が分類する基準には合致しなかったために分類されなかったのかが不明であり、このことは特に安全データシートでは重要であるため、記載の明確化を図りたいとの提案である。すなわち状況に応じ、たとえばデータがなく評価できない場合には、「分類できない」、「データなし」あるいは「データ不十分」とし、データがあり評価できたものについては、「入手データに基づき区分外」、「当該毒性を示さない」、あるいは「分類基準に適合しない」などと記載することが提案された。コメントをもとに、本仮提案を修正とした。

GHS 小委員会参加報告書 (2)

期 間：2009 年 12 月 9 日～11 日

場 所：ジュネーブ（スイス）

会議名：第 18 回 GHS 小委員会

報告者：国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部 森田 健

報告日：2009 年 12 月 18 日

2009 年 12 月 9 日～11 日に化学物質の分類と表示に関する世界的調和システム（GHS）の第 18 回小委員会がジュネーブの国連欧州本部で開催された。本報告書では、H21 年度厚生労働省科学研究費補助金「化学物質管理における世界戦略へ対応するための法規制等基盤整備に関する調査研究（H20-労働-一般-011）」に関する研究を含む当部第 4 室の業務と密接に関連する健康有害性に関する諸問題に焦点を絞り、概略を報告する。

第 18 回 GHS 小委員会では、化学物質の有害性分類における GHS の動向ならびに各国の取り組みや科学的・技術的問題点等について情報収集した。日本からは UN GHS 委員の城内先生（日本大学）ならびに私の他、GHS 小委員会に先立ち開催された TDG（国連危険物輸送）小委員会委員の濱田氏（海事検定協会）が参加した。会議参加者は、90 名程度であった。

GHS 小委員会では、「GHS の更新」として物理化学的危険性、健康有害性および付属書の各項目が、「ハザードコミュニケーションに関する問題」として高圧ガスのピクトグラム適用に関する一部削除の提案、ナノ材料について追加の物理化学的特性情報を SDS に記載するための付属書の改訂提案、非引火性のエアゾールのために、可燃性/引火性エアゾールに区分 3 を設ける提案などが、「GHS 導入における問題点」として国際的分類リストの開発提案などがなされた。今回の会議では、最終的に 11 の正式提案書（Working Document, WD）、23 の非公式文書（Informal Document, INF）が提示された。

健康有害性に関する議論は、GHS 本文の第 3.2 章（皮膚刺激性）および第 3.3 章（眼刺激性）の修正についてのみであり、作業は種々の問題について進展しているものの、一部の項目についてはさらに検討を加えることが求められた。その概略は以下のとおりである：

第 3.2 章（皮膚腐食性）および第 3.3 章（重篤な眼の損傷）の改訂問題

- UN/SCEGHS/18/INF.3 (Germany)
- UN/SCEGHS/18/INF.8 (Netherlands)
- UN/SCEGHS/18/INF.17 (CEFIC)
- UN/SCEGHS/18/INF.22 (Secretariat)

ドイツより、検討グループでは、皮膚腐食性や眼刺激性の判定基準の適用に際し、明確性や利用者の利便性を向上するため、GHS 第 3.2 章（皮膚腐食性/刺激性）および第 3.3 章（眼に対する重篤な損傷性/眼刺激性）の編集上の改正、ならびに 3.2 章と 3.3 章の整合性を図るために判定基準の調整の必要性の検討を進めていることが報告された。すなわち、例えば、両章における専門用語の調和や試験方法に対する記述の削除など、問題となっているいくつかの項目について検討グループで合意に至ったが、他の事項、例えば、Fig. 3.2.1 および Fig. 3.3.1 の修正やそれらの判定理論へどのように関連付けるかなどについては、引き続き協議されることとなった。また、INF.17 で取り上げたいくつかの問題について、UN モデル規則のクラス 8 における腐食性基準と GHS の腐食性基準の整合に関し TDG 小委員会の検討グループで議論され、TDG 小委員会副議長がその結果を INF.22 をもとに説明した。

また、腐食性判定のための極端な pH の利用に関し、CEFIC は、現行の GHS 基準に従い、追加データがない場合に、極端な pH の物質や混合物が腐食性とみなされてしまうことを説明した。その結果、いくつかの物質や混合物が過剰分類される。例えば、極端な pH の物質と刺激性の添加剤のみから成る混合物については、極端な pH にもとづいて誤って腐食性と分類されるのを防ぐためには試験が必要であるとした。TDG の副議長は極端な pH の解釈に基づく分類は、輸送などの分野においてはかなりの経済的影響があると指摘した。すなわち、より高次のカテゴリへの分類（輸送規則では包装等級が該当）は、結果としてより厳しい輸送条件が適用されたり、輸送が禁止されたりする（例えば、包装等級 I に分類されるいくつかの物質は、タンクによる輸送は認められていない）。反対に、少数意見ではあるが、分類は入手可能なすべての知見に基づき実施されなければならないことは明白なので、現行の GHS 文書が解釈の問題を生じさせているわけではないことが述べられた。議論の結果、GHS 小委員会は、極端な pH そのことのみは腐食性を示唆するものとみなすという解釈に同意した。産業界から提供された例を踏まえると、pH と腐食性の相関性をより検討する必要があるのではとの指摘もあった。小委員会は、最終的に、分類基準の実施に関するすべての問題点のリストを提出するよう検討グループに求めた。従って、本件については、来期以降の進展が待たれる。

Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme

別添資料8

David A. Eastmond, Andrea Hartwig¹, Diana Anderson²,
Wagida A. Anwar³, Michael C. Cimino⁴, Ivan Dobrev⁵,
George R. Douglas⁶, Takehiko Nohmi⁷, David H. Phillips⁸
and Carolyn Vickers^{9,*}

Environmental Toxicology Graduate Program, University of California, Riverside, CA, USA, ¹Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin, Berlin, Germany, ²Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, Bradford, West Yorkshire, UK, ³Department of Community, Environmental and Occupational Medicine, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Abassya, Cairo, Egypt, ⁴Risk Assessment Division, Science Support Branch, Office of Pollution Prevention and Toxics, Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, ⁵Department of Chemical Risk Assessment, Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine, Hanover, Germany, ⁶Mechanistic Studies Division, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada, ⁷Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, ⁸Section of Molecular Carcinogenesis, Institute of Cancer Research, Sutton, UK and ⁹International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland

Since the publication of the International Programme on Chemical Safety (IPCS) Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing, there have been a number of publications addressing test strategies for mutagenicity. Safety assessments of substances with regard to genotoxicity are generally based on a combination of tests to assess effects on three major end points of genetic damage associated with human disease: gene mutation, clastogenicity and aneuploidy. It is now clear from the results of international collaborative studies and the large databases that are currently available for the assays evaluated that no single assay can detect all genotoxic substances. The World Health Organization therefore decided to update the IPCS Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing as part of the IPCS project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals. The approach presented in this paper focuses on the identification of mutagens and genotoxic carcinogens. Selection of appropriate *in vitro* and *in vivo* tests as well as a strategy for germ cell testing are described.

Introduction

Since the publication of the International Programme on Chemical Safety (IPCS) Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing (1), there have been a number of publications addressing test strategies for mutagenicity (2–6) and reviews thereof (7). In addition, analyses of test batteries and their correlation with carcinogenicity (8–11) have indicated that an optimal solution to this issue has not yet been found. The 2005 International Workshop on Genotoxicity Testing

(IWGT) meeting in San Francisco, USA, discussed many of these problems, and reports of this meeting (10,12) and companion papers (13–16) have recently been published.

Safety assessments of substances with regard to genotoxicity are generally based on a combination of tests to assess effects on three major end points of genetic damage associated with human disease: gene mutation (i.e. point mutations or deletions/insertions that affect single or blocks of genes), clastogenicity (i.e. structural chromosome changes) and aneuploidy (i.e. numerical chromosome aberrations). It is now clear from the results of international collaborative studies and the large databases that are currently available for the assays evaluated that no single assay can detect all genotoxic substances. This is not surprising, as a wide variety of possible genetic events can occur. For example, some mutagens preferentially induce gene mutations by either base pair substitutions or frameshift mechanisms, whereas others induce chromosome mutations but show little or no evidence of inducing gene mutations.

The World Health Organization (WHO) therefore decided to update the IPCS Harmonized Scheme for Mutagenicity Testing (1) as part of the IPCS project on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure to Chemicals. A public review draft paper was prepared by an International Drafting Group Meeting of experts, held at the Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine in Hanover, Germany, on April 11–12, 2007, and revised, following peer and public review, by an expert review meeting hosted by the University of Bradford, Bradford, UK, on June 30 to July 1, 2008. The present paper is the product of the expert review meeting.

Strategy for mutagenicity testing

The approach presented in this paper (see Figure 1) focuses on the identification of mutagens and genotoxic carcinogens. The term 'mutation' as understood in this paper (a glossary of terms used in this paper is available on the IPCS website at <http://www.who.int/ipcs/publications/methods/harmonization/en/index.html>) refers to permanent changes in the structure and/or amount of the genetic material of an organism that can lead to heritable changes in its function, and it includes gene mutations as well as structural and numerical chromosome alterations. The group is aware of other mechanisms leading to carcinogenicity and other heritable diseases, but their identification requires additional types of mechanistic studies. 'Genotoxicity' refers to the capability of substances to damage DNA and/or cellular components regulating the fidelity of the genome—such as the spindle apparatus, topoisomerases, DNA repair systems and DNA polymerases (4)—and includes all adverse effects on genetic information. These potentially harmful effects on genetic material may be mediated directly or

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +41 22 791 1286; Fax: +41 22 791 4848; Email: ipcsmail@who.int

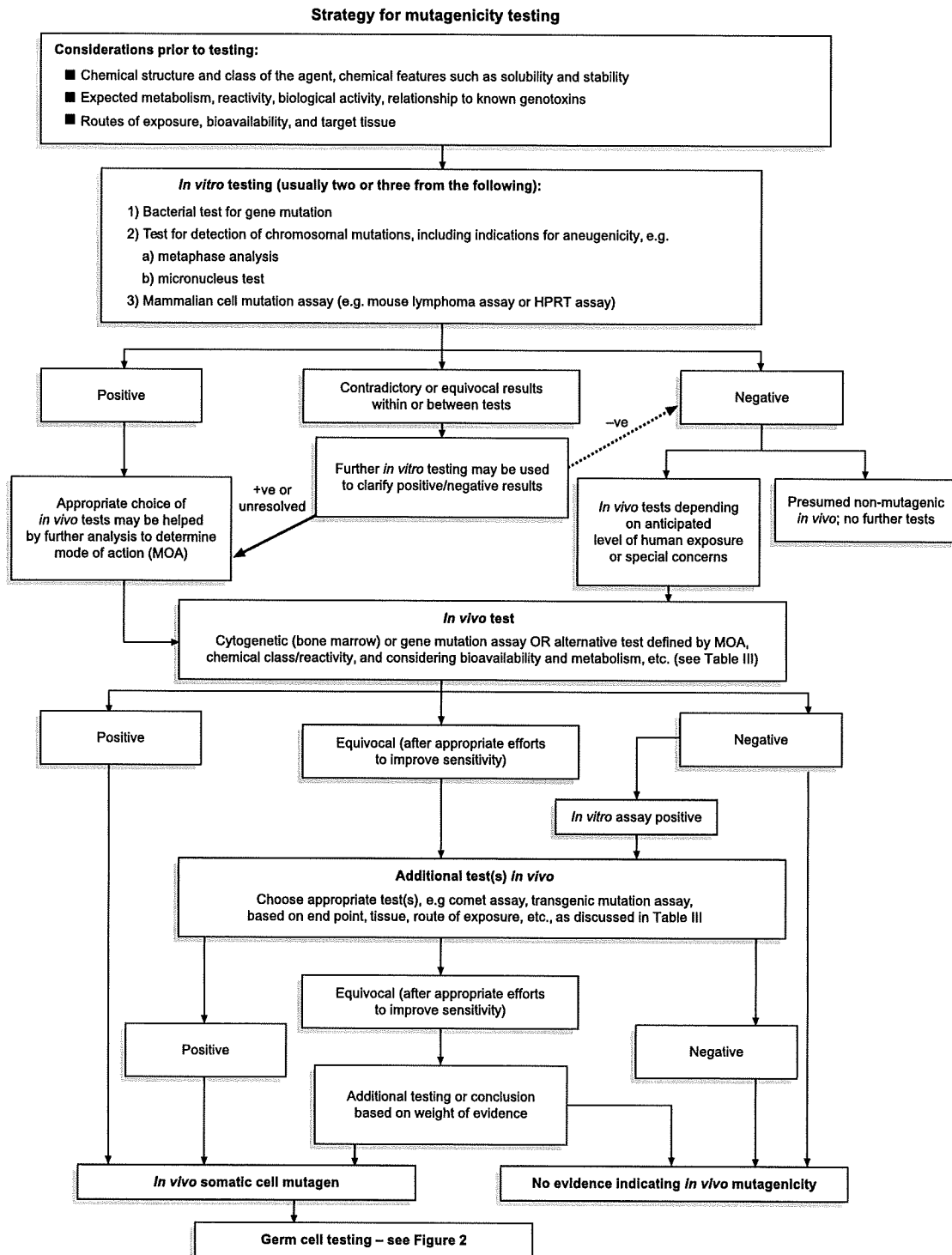


Fig. 1. Strategy for mutagenicity testing.

indirectly and are not necessarily associated with mutagenicity. Genotoxicity is therefore a broader term than ‘mutagenicity’, which refers to the capacity to give rise to mutations.

Because of the wide range of genetic damage that can occur, test batteries are designed to include complementary tests evaluating different mechanisms of mutagenicity. At all stages of the outlined testing strategy, a weight of evidence approach and scientific judgement should be used. Multiple negative results may not be sufficient to remove concern for mutagenicity raised by a clear positive result in a single mutagenicity assay.

Most short-term tests in bacteria and mammalian cell cultures have been designed primarily for hazard identification and thus can represent only the starting point in the process of risk assessment. Whether or not the observed effects are relevant for humans under anticipated exposure conditions depends on pharmacokinetic, pharmacodynamic and other factors that require investigation *in vivo*.

Especially when choosing *in vivo* assays and when proceeding into germ cell mutagenicity studies (see Strategy for germ cell testing), expert judgement is required to select the

appropriate test systems and to avoid uninformative and thus unnecessary animal experiments.

Development of a testing strategy

Before initiating mutagenicity testing on a particular substance (or mixture of substances), the following aspects should be considered, when available:

- (i) Chemical structure and class of the substance (possible structure–activity relationships) and physicochemical properties, such as solubility and stability;
- (ii) Expected pathways of metabolism, chemical and biological reactivity/activity and relationship to known genotoxic substances and
- (iii) Routes of exposure, bioavailability and target tissues for genotoxicity.

Critical evaluation of available data prior to testing usually provides important information for choosing the appropriate *in vitro* assays, but even more so for the selection of appropriate *in vivo* studies.

Distinction needs to be made between ‘mutagenicity tests’ in the strict sense and ‘indicator tests’ that provide evidence of interaction with DNA that may or may not lead to mutations (e.g. DNA adducts, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges). Preference should be given to mutagenicity tests whenever possible.

In vitro testing

Usually two or three different tests in bacteria and mammalian cells are selected to cover the end points of gene mutations, clastogenicity (structural chromosome aberrations) and aneuploidy (numerical chromosome aberrations), taking into account physicochemical properties of substances under consideration.

In vitro tests. Screening should be based on a limited number of tests that are well validated and informative. Genotoxicity test batteries generally include the following:

- (i) A test for gene mutation in bacteria (bacterial reverse mutation assay): Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Test Guideline 471 recommends the use of at least five strains of bacteria: (a) *Salmonella typhimurium* TA1535, (b) *S.typhimurium* TA1537 or TA97 or TA97a, (c) *S.typhimurium* TA98, (d) *S.typhimurium* TA100 and (e) *Escherichia coli* WP2 or *E.coli* WP2uvrA or *S.typhimurium* TA102. The choice of additional tests depends on the chemical structure and class of the substance (see Development of a testing strategy). Table I describes the most commonly used bacterial mutagenicity tests.
- (ii) *In vitro* mammalian assays: These assays should evaluate the potential of a substance to induce point mutations, clastogenicity and/or aneugenicity, by using either mammalian cell lines or primary human cell cultures such as fibroblasts or lymphocytes (e.g. mouse lymphoma thymidine kinase assay, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase assay or cytogenetic evaluation of chromosomal damage in mammalian cells via either the *in vitro* chromosome aberration or the *in vitro* micronucleus test) (see Table II).

Evaluation of in vitro testing results. In the evaluation, results are classified into (i) positive, (ii) negative and (iii) contradictory or equivocal:

- (i) Positive: Substance is positive at one or more end points of mutagenicity.
- (ii) Negative: Substance is negative in all test systems under appropriate *in vitro* test conditions; the substance is not mutagenic (or genotoxic) *in vitro* and is anticipated not to be mutagenic *in vivo* [for exceptions, see refs (37,38)].
- (iii) Contradictory or equivocal (e.g. borderline biological or statistical significance): All other substances.

Follow-up to *in vitro* testing.

- (i) Positive *in vitro* results
In vivo test; selection of an appropriate end point; if necessary, further *in vitro* studies to optimize *in vivo* testing (e.g. kinetochore staining as an addition in the micronucleus assay of *in vitro* aneugens). Follow-up tests *in vitro* may also provide additional mechanistic information to enable interpretation of a positive finding.
- (ii) Negative *in vitro* results
In vivo testing is recommended in the case of ‘high’ or ‘moderate and sustained’ human exposure or for substances otherwise of high concern. In limited cases, metabolic considerations may trigger *in vivo* testing (38).
- (iii) Contradictory or equivocal *in vitro* results
Further *in vitro* testing to clarify positive or negative results; depending on whether the situation is resolved by further *in vitro* testing, proceed according to ‘positive’ or ‘negative’.

In vivo testing

In vivo tests. *In vivo* tests (see Tables III and IV) should be chosen carefully to avoid an uninformative outcome and with concern for animal welfare. Therefore, toxicokinetics, metabolism and chemical reactivity have to be considered carefully. *In vivo* tests may also be used for evaluation of a dose–response, species differences or mode of action determination. The use of such tests needs to be considered on a case-by-case basis for risk assessment purposes.

The choice of an *in vivo* follow-up test should be guided by the spectrum of genotoxic events observed in the *in vitro* studies as well as knowledge of the bioavailability, distribution, metabolism and target organ specificity of the substance. Typically, a bone marrow micronucleus or clastogenicity test is conducted. However, if there are indications that point to a more appropriate assay, then this assay should be conducted instead (e.g. mutagenicity study with transgenic animals and/or comet assay in potential target tissues).

Follow-up to *in vivo* testing.

- (i) Positive *in vivo* results
Substance is considered an ‘*in vivo* somatic cell mutagen’. Testing for germ cell mutagenicity (see Strategy for germ cell testing) may be required.

Table I. Common *in vitro* bacterial assays

Assay	Strain	End point	Comments	Published guidelines	References
<i>Salmonella typhimurium</i> reverse mutation assay	TA1535, TA1537 (or TA97 or TA97a), TA98, TA100	Primarily detects G/C base pair and frameshift mutations	Contain specific mutations in one of several genes involved in histidine biosynthesis that must be reverted to function normally. Testing with and without appropriate exogenous metabolic activation system. May not detect some oxidizing mutagens and cross-linking agents.	OECD Test Guideline 471 (replaces old OECD Test Guidelines 471 and 472)	(17–19)
<i>S.typhimurium</i>	TA102	Primarily detects A/T base pair damage and small deletions	Detects oxidizing mutagens and cross-linking agents	OECD Test Guideline 471	(19,20)
Other <i>S.typhimurium</i> mutants	YG1021, YG1026 (NR overexpression); YG1024, YG1029 (NAT overexpression)		For detection of mutagenicity of nitroaromatic and aminoaromatic substances that are bioactivated by NR and NAT. More sensitive than conventional strains. Used for detecting mutagenicity of toxic pollutants in air, water and food.		(21,22)
<i>Escherichia coli</i> reverse mutation assay	WP2, WP2uvrA	Primarily detects A/T base pair damage	Detects oxidizing mutagens and cross-linking agents	OECD Test Guideline 471	(19)

A, adenine; C, cytosine; G, guanine; NAT, *N*-acetyltransferase; NR, nitroreductase; T, thymine.

Table II. Common *in vitro* mammalian assays

Assay	Method/end point	Main attributes	Comments	Published guidelines	References
Mouse lymphoma TK gene mutation assay	L5178Y mouse lymphoma cell line; using a selective medium, mutant frequencies are determined	Detects not only point mutations but also various sizes of chromosome deletions and other effects that can lead to loss of heterozygosity (e.g. mitotic recombination, gene conversion and translocations)	Use of positive controls and colony sizing essential for quality control. Evaluation and interpretation changed over the years. Recent protocol updates recommendations. Can be used as alternative to metaphase analysis.	OECD Test Guideline 476; IWGT guidelines	(3,23–26)
HPRT gene mutation assay	Chinese hamster ovary, AS52 or other suitable cell line; using a selective medium, mutant frequencies are determined	Detects not only point mutations but also small deletions; larger deletions may be detected in AS52 cells	Use of positive controls essential for quality control	OECD Test Guideline 476	(23,27)
Metaphase analysis (<i>in vitro</i> mammalian chromosome aberration test)	A metaphase-arresting substance (e.g. colchicine) is applied; metaphase cells are analysed for the presence of structural chromosome aberrations	Detects clastogenicity; some information on aneugenicity can be obtained with extended culture times	A variety of cell lines, strains or primary cell cultures, including human cells, may be used (e.g. Chinese hamster fibroblasts, human or other mammalian peripheral blood lymphocytes) (28)	OECD Test Guideline 473	(29–31)
Micronucleus test	Detects micronuclei in the cytoplasm of cultured mammalian cells during interphase	Detects both aneugenic and clastogenic substances; established mammalian lines, cultured human peripheral blood lymphocytes or Syrian hamster embryo cells may be used	Several developments in updating the protocol. Immunochemical labelling of kinetochores or hybridization with general or chromosome-specific centromeric/telomeric probes gives information on the nature and mechanism of formation of micronuclei induced (whole chromosomes or fragments).	Draft OECD Test Guideline 487	(13,32–36)

HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; TK, thymidine kinase.

Table III. Common *in vivo* genotoxicity assays

Assay	End point	Main attributes	Comments	Published guidelines	References
Micronucleus test in erythropoietic cells	Structural and numerical chromosome alterations	Long history, regulatory acceptance, high relevance of end point	Has potential for application to other tissues	OECD Test Guideline 474	(15,28), and references cited therein
Metaphase analysis <i>in vivo</i>	Structural and numerical chromosome aberrations	Long history, regulatory acceptance, high relevance of end point	Has potential for application to other tissues	OECD Test Guideline 475	(39)
Transgenic animal models	Gene mutation	Can be applied to many tissues. Gene specific. No selective pressure on mutations. Relevant end point.	Need to optimize protocols overall and for each tissue. <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> , <i>gpt</i> systems not sensitive to the detection of large deletions. <i>Spi</i> ⁻ system detects large deletions.	IWGT, IPCS guidance	(40–44)
Chemically modified DNA	Covalent DNA adducts, oxidative lesions (e.g. 8-OH-dG)	Can be applied to many tissues. Can be highly sensitive (³² P-postlabelling or AMS) or chemically specific (MS). Other methods include immunochemical techniques, fluorescence, ECD (for 8-OH-dG).	Indicator test detecting premutagenic lesions. Interpretation of results can be complicated.	IWGT guidance	(45)
DNA strand breakage assays (e.g. comet assay)	DNA strand breaks, alkali-labile lesions	Can be applied to many tissues. Incorporation of enzymes can improve specificity. Cell division not required.	Indicator tests. Need to optimize protocols for different tissues. May be unable to detect mutagens that do not induce strand breaks or alkali-labile lesions, but may detect repair-induced breaks. Apoptosis/necrosis need to be controlled.	IWGT guidance	(14,46–49)
Liver UDS	Thymidine incorporation outside S phase	Long history of use; useful for some classes of substances.	Indicator test detecting repair activity. Uncertain acceptability and questionable sensitivity. Limited use in other tissues.	OECD Test Guideline 486	(50,51)

8-OH-dG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; AMS, accelerator mass spectrometry; ECD, electrochemical detection; MS, mass spectrometry; UDS, unscheduled DNA synthesis.

(ii) Negative *in vivo* results

Further *in vivo* testing is recommended in the case of positive *in vitro* studies. Again, the second *in vivo* test is chosen on a case-by-case basis, as stated above. If the test is negative, it is concluded that there is no evidence for *in vivo* mutagenicity.

(iii) Equivocal *in vivo* results

Equivocal results may be due to low statistical power, which can be improved by increasing the number of treated animals and/or scored cells.

If the situation is unresolved, a second *in vivo* test is recommended, chosen on a case-by-case basis (ordinarily on a different end point or in a different tissue, depending on toxicokinetics, metabolism and mode of action); proceed according to 'positive' or 'negative'.

For substances that give positive results for mutagenic effects in somatic cells *in vivo*, their potential to affect germ cells should be considered. If there is toxicokinetic or toxicodynamic evidence that germ cells are actually exposed to the somatic mutagen or its bioactive metabolites, it is reasonable to assume that the substance may also pose a mutagenic hazard to germ cells and thus a risk to future generations.

Where germ cell testing is indicated, judgement should be used to select the most appropriate test strategy. There are a number of tests available (summarized in Table IV), which fall into two classes:

- (i) Tests in germ cells *per se* (class 1)
- (ii) Tests to detect effects in the offspring (or potential offspring) of exposed animals (class 2)

Three tests that are available for such studies have established OECD test guidelines:

- (i) Clastogenicity in rodent spermatogonial cells (class 1): OECD Test Guideline 483 (65)

Strategy for germ cell testing

When information on the risk to the offspring of exposed individuals is important, the following germ cell testing strategy is recommended.

Table IV. Germ cell assays

Assay	End point	Main attributes ^a	Comments	Published guidelines	References
Class 1: tests in germ cells <i>per se</i>					
Transgenic animal models	Gene mutation	Gene specific. No selective pressure on mutations. Relevant end point.	See Table III	See Table III	See Table III
ESTR assay	Non-coding tandem repeat DNA mutation	Potentially relevant end point. Detects heritable mutations at ambient exposure levels. Uses relatively few animals. Can be conducted in humans.	Some tandem repeat mutations also occur in, or near, coding genes. Although there are parallels with mutations in coding genes, the human health outcomes require further study.		(52–55)
Mammalian spermatogonial chromosome aberration test	Structural chromosome aberrations	Relevant end point		OECD Test Guideline 483	(56)
FISH assays	Structural chromosome aberrations; sperm aneuploidy	Relevant end points. Can be conducted in humans.	See Table III	See Table III	(57,58)
Comet assay	DNA strand breaks or alkali-labile sites	See Table III. Can be conducted in humans.	See Table III	See Table III	(59)
Chemically modified DNA	DNA adducts	See Table III. Can be conducted in humans.	See Table III	See Table III	(60)
Class 2: tests to detect effects in the offspring (or potential offspring)					
ESTR assay	As above for class 1 tests	As above for class 1 tests	As above for class 1 tests		As above for class 1 tests
Dominant lethal test	Reduction in viable embryos attributed to chromosome or gene mutations	Relevant end point. Provides data for quantification of pregnancy loss.		OECD Test Guideline 478	(61)
Mouse visible specific locus test	Gene mutation	Provides data for quantification of inherited mutation frequency. Relevant end point.	Uses large number of animals	EPA OPPTS 870.5200	(62)
Mouse biochemical specific locus test	Gene mutation	Provides data for quantification of inherited mutation frequency. Relevant end point.	Uses large number of animals	EPA OPPTS 870.5195	(63)
Mouse heritable translocation assay	Structural chromosome aberrations	Provides data for quantification of inherited mutation frequency. Relevant end point.	Uses large number of animals	OECD Test Guideline 485	(64)

EPA OPPTS, United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances; ESTR, Expanded Simple Tandem Repeat; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

^a'Relevant end point' means relevant to the estimation of human heritable health risk.

- (ii) The dominant lethal test (class 2): OECD Test Guideline 478 (66)
- (iii) The mouse heritable translocation assay (class 2): OECD Test Guideline 485 (67)

The above-mentioned class 2 tests usually require large numbers of animals. Thus, in order to minimize the use of animals in germ cell testing, it is advisable to start with tests that detect effects in germ cells *per se* (class 1). Other methods include (but are not limited to) gene mutation tests in transgenic animals [see ref. (41) for IWGT guidance], gene mutations in the more recent Expanded Simple Tandem Repeat (ESTR) assay, chromosomal assays (including those using fluorescence *in situ* hybridization), comet assay and DNA adduct analysis.

Following the use of such tests, if quantification of heritable effects is required (class 2), an assay for ESTR mutations can

be performed with the offspring of a low number of exposed animals. Tests used historically to investigate transmitted effects (e.g. the heritable translocation test and the specific locus test) can also be performed; however, they use large numbers of animals.

Class 1 and class 2 germ cell assays are summarized in Table IV. The strategy used in germ cell mutagenicity testing is outlined in Figure 2.

Funding

This work was funded by donations to the World Health Organization by a number of member states of the World Health Assembly.

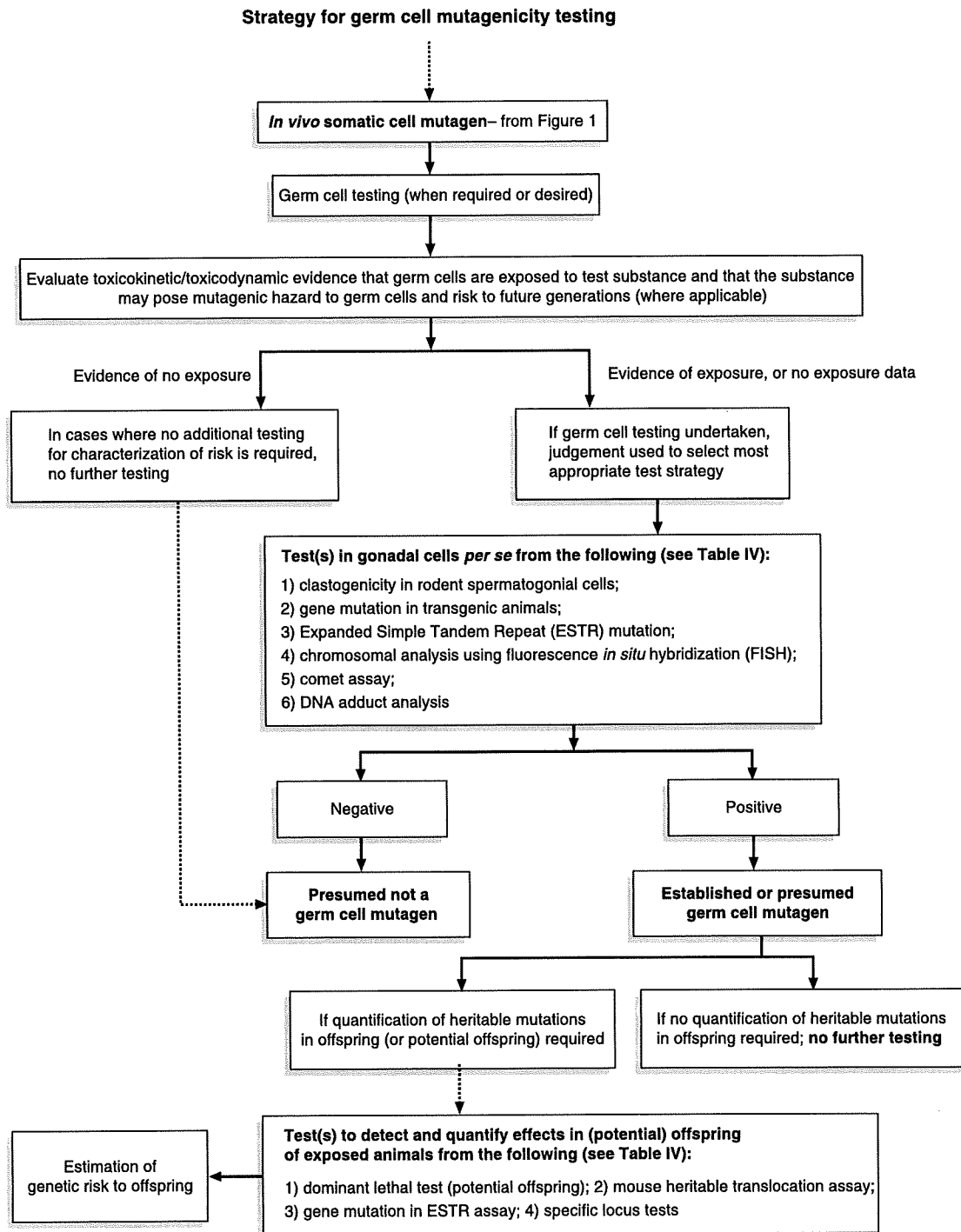


Fig. 2. Strategy in germ cell mutagenicity testing.

Acknowledgements

This publication contains the collective views of the listed authors and does not necessarily represent the decisions or stated policies of the World Health Organization or of the authors' affiliated agencies or institutions.

WHO thanks the Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine, Hanover, Germany, for its assistance in preparing for and hosting the international drafting group expert meeting that developed the first draft of this paper. Participants in the drafting group meeting were M.C.C., Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA; G.R.D., Health Canada, Ottawa, Ontario; D.A.E., University of California, Riverside, CA, USA; A.H., Technische Universität Berlin, Berlin; Janet Kielhorn, Fraunhofer Institute

for Toxicology and Experimental Medicine, Hanover; Andreas Luch, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin; D.H.P., Institute of Cancer Research, Sutton; Atsuya Takagi, National Institute of Health Sciences, Tokyo; Raymond Tennant, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC, USA; and C.V., International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva. WHO also thanks the University of Bradford, Bradford, UK, for hosting the expert meeting that finalized this paper. Participants at that meeting are listed as the authors of the paper. Laurence Musset of the OECD was an observer at that meeting and provided information relevant to the OECD Test Guidelines. Professor David Kirkland was invited to the drafting group meeting and the expert review meeting in his capacity as Steering Committee Chair for the International

Workshops on Genotoxicity Testing. He did not participate in the decision-making parts of the meetings. Finally, WHO expresses its appreciation to D.A.E. for chairing and to A.H. for acting as rapporteur for both meetings.

Conflict of interest statement: None declared.

References

- Ashby, J., Waters, M. D., Preston, J. *et al.* (1996) IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens. *Mutat. Res.*, **352**, 153–157.
- ICH Steering Committee (1997) *Guidance for Industry. S2B Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. pp. 1–8.
- Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T. and Tweats, D. (1999) ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.*, **436**, 195–225.
- United Kingdom Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment (2000) *Guidance on a Strategy for Testing of Chemicals for Mutagenicity*. pp. 1–36. (<http://www.dh.gov.uk/assetRoot/04/07/71/96/04077196.pdf>) (last accessed 14 August 2008).
- United States Food and Drug Administration (2000) *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Redbook 2000. IV.C.1. Short-Term Tests for Genetic Toxicity*. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Additive Safety, College Park, MD, pp. 1–5.
- Dearfield, K. L. and Moore, M. M. (2005) Use of genetic toxicology information for risk assessment. *Environ. Mol. Mutagen.*, **46**, 236–245.
- Cimino, M. C. (2006) Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environ. Mol. Mutagen.*, **47**, 362–390.
- Brambilla, G. and Martelli, A. (2003) Failure of the standard battery of short-term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens. *Toxicology*, **196**, 1–19.
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L. and Müller, L. (2005) Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat. Res.*, **584**, 1–256.
- Kirkland, D., Aardema, M., Müller, L. and Makoto, H. (2006) Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. *Mutat. Res.*, **608**, 29–42.
- Matthews, E. J., Kruhlak, N. L., Cimino, M. C., Benz, R. D. and Contrera, J. F. (2006) An analysis of genetic toxicity, reproductive and developmental toxicity, and carcinogenicity data: I. Identification of carcinogens using surrogate endpoints. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **44**, 83–96.
- Kirkland, D. J., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kasper, P., MacGregor, J. T., Müller, L. and Uno, Y. (2006) Summary of major conclusions from the 4th IWGT, San Francisco, 9–10 September, 2005. *Mutat. Res.*, **627**, 5–9.
- Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M. J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G. and Marzin, D. (2006) SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat. Res.*, **607**, 13–36.
- Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G. *et al.* (2007) Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. *Mutat. Res.*, **627**, 31–35.
- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G. *et al.* (2007) *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutat. Res.*, **627**, 10–30.
- Thybaud, V., Aardema, M., Clements, J. *et al.* (2007) Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. *Mutat. Res.*, **627**, 41–58.
- Ames, B., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347–364.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173–215.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *Bacterial Reverse Mutation Test*. OECD, Paris (Test Guideline 471).
- Levin, D., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A. and Ames, B. N. (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A**T* base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**, 7445–7449.
- Joseph, P. D., Gruz, P. and Nohmi, T. (1997) Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutat. Res.*, **386**, 1–23.
- Nohmi, T. (2007) Novel DNA polymerases and novel genotoxicity assays. *Genes Environ.*, **29**, 75–88. (http://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsgc/29/3/29_75/_article) (last accessed 14 August 2008).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test*. OECD, Paris (Test Guideline 476).
- Moore, M., Honma, M., Clements, J. *et al.* (2002) Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, April 2000. *Environ. Mol. Mutagen.*, **40**, 292–299.
- Moore, M., Honma, M., Clements, J. *et al.* (2003) Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup report—Plymouth, UK 2002. *Mutat. Res.*, **540**, 127–140.
- Moore, M. M., Honma, M., Clements, J. *et al.* (2007) Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing—San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, **627**, 36–40.
- Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, L., Theiss, J. and Thompson, E. (1994) Mammalian cell gene mutation assays working group report. *Mutat. Res.*, **312**, 235–239.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. OECD, Paris (Test Guideline 474).
- Parry, J. M. (ed.) (1996) Molecular cytogenetics. *Mutat. Res.*, **372**, 151–294.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*. OECD, Paris (Test Guideline 473).
- Aardema, M. J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L. M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J. M., Sarraf, A. M., Stringer, D. A. and Taalman, R. D. (1998) Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat. Res.*, **410**, 3–79.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P. (1997) The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosomal breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.*, **392**, 19–30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M. *et al.* (2003) Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat. Res.*, **540**, 153–163.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.*, **455**, 81–95.
- Lorge, E., Lambert, C., Gervais, V., Becourt-Lhote, N., Delongas, J. L. and Claude, N. (2007) Genetic toxicity assessment employing the best science for human safety evaluation. Part II: performances of the *in vitro* micronucleus test compared to the mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicol. Sci.*, **96**, 214–217.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (2008) *OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Guideline 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit)*. OECD, Paris, pp. 1–28.
- Tweats, D. J., Blakey, D., Heflich, R. H. *et al.* (2007) Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat. Res.*, **627**, 78–91.
- Tweats, D. J., Blakey, D., Heflich, R. H. *et al.* (2007) Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory *in vivo* tests. II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.*, **627**, 92–105.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test*. OECD, Paris (Test Guideline 475).
- Heddle, J. A., Dean, S., Nohmi, T. *et al.* (2000) *In vivo* transgenic mutation assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 253–259.
- Thybaud, V., Dean, S., Nohmi, T. *et al.* (2003) *In vivo* transgenic mutation assays. *Mutat. Res.*, **540**, 141–151.
- Lambert, I. B., Singer, T. M., Boucher, S. E. and Douglas, G. R. (2005) Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat. Res.*, **590**, 1–280.
- Nohmi, T. and Masumura, K. (2005) Molecular nature of intrachromosomal deletions and base substitutions induced by environmental mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.*, **45**, 150–161.

44. International Programme on Chemical Safety (2006) *Transgenic Animal Mutagenicity Assays*. World Health Organization, Geneva (Environmental Health Criteria 233).
45. Phillips, D., Farmer, P. B., Beland, F. A., Nath, R. G., Poirier, M. C., Reddy, M. V. and Turteltaub, K. W. (2000) Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 222–233.
46. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D. *et al.* (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 206–221.
47. Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C. *et al.* (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, **18**, 45–51.
48. Speit, G. and Hartmann, A. (2005) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol.*, **291**, 85–95.
49. Smith, C. C., Adkins, D. J., Martin, E. A. and O'Donovan, M. R. (2008) Recommendations for design of the rat comet assay. *Mutagenesis*, **23**, 233–240.
50. Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U. *et al.* (1994) Recommendations for the performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.*, **312**, 263–285.
51. Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo*. OECD, Paris (Test Guideline 486).
52. Dubrova, Y. E., Plumb, M., Brown, J., Fennelly, J., Bois, P., Goodhead, D. and Jeffreys, A. J. (1998) Stage specificity, dose response, and doubling dose for mouse minisatellite germ-line mutation induced by acute radiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 6251–6255.
53. Yauk, C. L. (2004) Advances in the application of germline tandem repeat instability for *in situ* monitoring. *Mutat. Res.*, **566**, 169–182.
54. Singer, T. M., Lambert, I. B., Williams, A., Douglas, G. R. and Yauk, C. L. (2006) Detection of induced male germline mutation: correlations and comparisons between traditional germline mutation assays, transgenic rodent assays and expanded simple tandem repeat instability assays. *Mutat. Res.*, **598**, 164–193.
55. Gomes-Pereira, M. and Monckton, D. G. (2006) Chemical modifiers of unstable expanded simple tandem repeats: what goes up, must come down. *Mutat. Res.*, **598**, 15–34.
56. Adler, I. D. (1986) Clastogenic potential in mouse spermatogonia of chemical mutagens related to their cell-cycle specifications. In Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds), *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*. Liss, New York, pp. 477–484.
57. Wyrobek, A. J. and Adler, I. D. (1996) Detection of aneuploidy in human and rodent sperm using FISH and applications of sperm assays of genetic damage in heritable risk evaluation. *Mutat. Res.*, **352**, 173–179.
58. Hill, F. S., Marchetti, F., Liechty, M., Bishop, J., Hozier, J. and Wyrobek, A. J. (2003) A new FISH assay to simultaneously detect structural and numerical chromosomal abnormalities in mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, **66**, 172–180.
59. Haines, G. A., Hendry, J. H., Daniel, C. P. and Morris, I. D. (2002) Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol. Reprod.*, **67**, 854–861.
60. Horak, S., Polanska, J. and Widlak, P. (2003) Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutat. Res.*, **537**, 53–65.
61. Ehling, U. H., Macheiner, L., Buselmaier, W. *et al.* (1978) Standard protocol for the dominant lethal test on male mice set up by the work group "Dominant Lethal Mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics". *Arch. Toxicol.*, **39**, 173–185.
62. Russell, L. B., Selby, P. B., von Halle, E., Sheridan, W. and Valcovic, L. (1981) The mouse specific locus test with agents other than radiations: interpretation of data and recommendations for future work. *Mutat. Res.*, **86**, 329–354.
63. Lewis, S. E., Barnett, L. B., Felton, C., Johnson, F. M., Skow, L. C., Cacheiro, N. and Shelby, M. D. (1986) Dominant visible and electrophoretically expressed mutations induced in male mice exposed to ethylene oxide by inhalation. *Environ. Mutagen.*, **8**, 867–872.
64. Léonard, A. and Adler, I. D. (1984) Test for heritable translocations in male mammals. In Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds), *Handbook on Mutagenicity Test Procedures*. 2nd edn. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 485–494.
65. Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) *Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test*. OECD, Paris (Test Guideline 483).
66. Organisation for Economic Co-operation and Development (1984) *Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test*. OECD, Paris (Test Guideline 478).
67. Organisation for Economic Co-operation and Development (1986) *Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay*. OECD, Paris (Test Guideline 485).

Received on February 2, 2009; revised on April 14, 2009;
accepted on April 15, 2009

8-(1) グルタルアルデヒドの変異原性確認試験方法の国際的整合化

○ 問題提起者: 駐日米国大使館

○ 所管省庁: 労働省

○ 問題提起内容

病院における消毒薬等として使用されるグルタルアルデヒド(以下「GA」という。)が、平成10年10月に、労働安全衛生法上、「強度の変異原性が認められた既存化学物質」とされたが、その試験方法は、in vitro試験結果のみによる判定と推測される。

一方、欧米諸国におけるGAの変異原性を確認する試験については、in vitro試験のみにより変異原性ありとは結論づけておらず、in vivo試験とin vitro試験の双方による総合判断を行い、その結果、変異原性については問題なしとされている。

したがって、我が国も、GAの変異原性については、試験方法の国際的整合化の観点から、諸外国の試験結果を受け入れ、問題なしとすべき。

(注)

in vitro試験: 培養細胞に検体である化学物質を加えて培養し、染色体異常を調べる方法。

in vivo試験: ラットなどの生体内に検体である化学物質を投与し、細胞で染色体異常を調べる方法。

○ 所管省庁における対処方針

労働省が行う有害性の調査制度は、がん原性に着目したものであり、労働安全衛生法第57条の4に基づいて行われている微生物を用いる変異原性試験(生体外(in vitro))と培養細胞を用いる染色体異常試験(in vitro)の2種類の試験は、がん原性の疑いのある物質を洗い出す(スクリーニング)ために行っているものである。この2つの有害性の調査の結果評価は、「変異原性」の有無として評価している。

この結果、変異原性があると評価された物質については、労働者の健康障害を予防するという見地から労働省労働基準局長通達で当該物質を周知するとともに、製造・取扱いの方法について指導を行うこととされているものであり、既に100以上の物質についてこれに沿って公表及び指導を行っている。労働省が行う変異原性試験結果の評価対象としては、in vitro試験のみで十分であると思料している。

しかしながら、これらの試験はがん原性の疑いのある物質を洗い出し(スクリーニング)する趣旨で行われていることから、当該物質についてがん原性が認められないことが明確になった場合については、別途検討することとする。

(その後の状況)

問題提起者は、労働省の対処方針を受け、グルタルアルデヒドのがん原性が認められないことを示しているとされる資料を、平成11年11月に所管省へ提出した。

これを受け所管省では、提出されたデータは、当該試験がOECD-GLP基準に適合した試験施設で行

われていること及びOECDテストガイドラインにより実施された旨の明確な記載がなく、がん原性の有無を評価することが適当でないとし、更にこれを証明する書面等が必要であるとする回答を行った。

これを受け問題提起者において、所管省の求める資料を準備中。

(参考)

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development: 経済協力開発機構) が、OECD-テストガイドライン及びOECD-GLPを作成し、加盟各国がこれらを採用するよう勧告したことを受け、労働省では、昭和63年5月、法令改正を行い、新規化学物質の有害性の調査は、有害性の調査の基準(テストガイドライン)に従って行われることおよび当該有害性の調査は有害性の調査を行う試験施設等が具備すべき基準(GLP)に合致した試験施設等において行うべきこととした。

フォローアップ(平成12年12月7日)

報告書

8-(1) グルタルアルデヒドの変異原性確認試験方法の国際的整合化

平成12年4月に問題提起者より労働省に提出されたNTP(米国国家毒性プログラム)が実施し、評価したがん原性試験結果等をもとに、専門家からその結果及び変異原性とがん原性の関連性等について意見を聞いた上で、平成12年8月に以下のとおり労働省としての見解を回答した。

(1) NTPが実施し、評価したがん原性試験結果は、有害性情報として利用できるものであるが、GAについては、労働省が委託して行った試験の結果について学識経験者の意見を聞いた上で変異原性が認められた化学物質としたものであり、今回提出された資料によってその評価が変更されるものではない。

(2) GAについては、必ずしもヒトに対するがん原性がないとは言えず、人体に健康影響を及ぼすと考えられる情報が得られていることを考慮して、労働衛生対策は、予防的な観点から考える必要がある。

(3) したがって、労働省は、GAを引き続き変異原性が認められた化学物質のリストに残すこととする。

(4) GAを譲渡・提供する事業者等がMSDSを作成する際の参考とするため、NTPが実施したがん原性試験の結果については、がん原性の証拠が認められないと評価されている旨、関係者に対して周知を行う。(中央労働災害防止協会安全衛生情報センターのホームページにより周知済み。)

これに対し、平成12年9月に問題提起者から面会して説明を求める旨の要望があり、平成12年10月に、改めて平成12年8月に回答した内容を説明した。

その際に、問題提起者からGAについてin vitro試験の結果とin vivo試験の結果の総合評価を行うこと及びGAのin vivo試験結果のNTPにおける評価について周知を行うことについて要望があり、平成12年11月に以下のとおり回答を行った。

1 「変異原性が認められた化学物質による健康障害を防止するための指針」は、微生物を用いる変異原性試験とほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験等の結果及びその結果を踏まえた当該物質の取扱いについて学識経験者に意見を聴取し、これらの試験の結果、変異原性が認められるとされた化学物質を「変異原性が認められた化学物質」として周知し、予防的な観点から必要な措置を講じることを要請しているものであり、in vivoの変異原性試験の結果をもってその取扱いを変更することはできないものである。

2 GAに係るNTPのin vitroとin vivoの変異原性試験の結果の評価等については、その内容を周知することとする。

3 労働省においてin vivoの変異原性試験の結果の評価を行う考えはないが、OECDにおける化学物質の分類に関する国際調和等の動向を踏まえ、変異原性の評価の方法等について検討することは、今後の課題と考えている。

4 指針に表記している「原性が認められた化学物質」については、「微生物を用いる変異原性試験とほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験等の結果により評価された化学物質」という意味であるこ

とについて理解されるよう努めることとする。

(注)MADSとはMaterial Safety Data Sheets(化学物質等安全データシート)の略で、有害な化学物質について、物質名、供給者、有害性、取扱い上の注意、緊急時の措置などについて詳細かつ不可欠な情報を含んだ資料のことをいう。

市場開放問題苦情処理推進会議第7回報告書(平成14年3月18日)

8-(1) グルタルアルデヒドの変異原性試験方法の国際的整合化

- 問題提起者: 在日米国大使館
- 所管省庁: 厚生労働省
- 問題提起内容

諸外国(米国、欧州等)及びOECDのガイドラインによると「変異原性試験」とは、in vitro 試験(試験管内で行う比較的単純な試験)、及び in vivo 試験(生体で行うより包括的試験)を併せて行い、両試験の結果を用いて総合的に判断し、さらにその度合いによってクラス分けをするような制度になっている。

一方、厚生労働省(旧労働省)の労働安全衛生法における変異原性試験のガイドラインでは、in vitro 試験のみで変異原性の有無を判定し、また、その度合いによるクラス分けもされていない。また、この試験により、変異原性があるとされた化学物質は、取り扱い注意物質として公表されている。その結果、本件の対象化学物質であるグルタルアルデヒドのように、諸外国(米国、欧州等)の変異原性試験では、陰性(変異原性なし)とされている化学物質でも、労働安全衛生法における変異原性試験のガイドラインにそった試験では、陽性(変異原性あり)として公表され、不当な差別を市場で受けている。

したがって、労働安全衛生法における変異原性試験のありかたについて、スクリーニングテストとの位置付け、及び上記の諸外国の制度との整合性を考え、現在の労働安全衛生法における変異原性試験結果に基づき「変異原性が認められる」とされた化学物質であっても、その後、国内外を問わず、in vivo 試験により「変異原性が認められない」という信頼できる試験結果が得られた場合は、「変異原性が認められる」とされる化学物質のリストから削除できる制度をつくるべきである。

(再意見)

1. 下記の2点から、変異原性のあるとしてリストされた物質を、より信頼性の高いデータが有用になった場合は、リストより削除するプロセスが必要と考える。

(1)厚生労働省の対処方針について、「OECD化学品テストガイドライン/p3503、遺伝毒性試験に関するOECDテストガイドラインの序論及び試験の選択と適用の手引き」に「上記のように、in vitro の試験に関するプロトコルは、試験の構成上妥協している点があるが、実際には、これらのプロトコルを使ってほとんどの化学物質について信頼できる結果を得ることができる」との内容があり、対処方針と同様の内容を示していると考えられるが、その後「しかし、結果の解釈に関して、化学物質の構造が及ぼす影響に注意を払うことがその化学物質に関する試験のプロトコルが適正であることを決定するうえで重要な要因となる」との記載もあり、一律にすべての化学物質の変異原性を調べるプロトコルとして in vitro 試験のみでガイドライン化することはこの記述から考えると無理があると思われる。

(2)同書中、「6.実際に試験をどのように用いるか?」については「一般に用いられている変異原性試験の数がたくさんあるので、化学物質を試験する方法の用い方についていろいろな体系が発展してきた。これらは便宜上2群にわけられる。すなわち、連続的または段階的方法およびあらかじめ決めた組み合わせ法である。段階的方法は、論理的な試験の配列から成り立っており、通常2ないし3つ

の in vitro 試験で始まり、第2段階で in vitro そして/または in vivo の試験を行うが、いずれを選ぶかは、多くの場合、最初の試験の結果によって決定される。第2の方法は、事前に決められた、平行して行われる in vitro および in vivo の試験の組み合わせから成り立っている。これらの試験から得られた基礎資料はすべて総括的に考察される。いずれの場合でも変異原性試験の結果は、他の毒性試験や薬物動態学的研究から得られたデータを合わせ考察されなければならない」との記載があり、段階的に試験を実施し、総括的に考察されることとなっており、我々が今回提起した「変異原性が認められる」とされた化学物質であっても、その後、国内外を問わず、in vivo 試験により、変異原性がないという、信頼できる試験結果が得られた場合は、「変異原性が認められる」とされる化学物質のリストから削除する制度をつくるべきである」といった段階を経て考察をする内容に合うものであり、我々の提起内容の方がOECDのガイドラインに沿ったものであると思われる。そのため、再度、制度の見直しをご検討いただきたい。

2. 厚生労働省からの回答中、「ヒトに対する発がん性がないことの実証が得られない限りできないと考えている。」に関して、厚生労働省では多くの化学物質について、多くの動物で行われた、発がん性試験の結果についてどのような位置付けをされているのか。

3. すべての変異原性のある物質としてリストされた化学物質のテスト結果の信頼性を高めるために、厚生労働省ではどのような努力をされているのか。例えば、in vivo での試験の実施や発表されてきている信頼性の高い、有用な情報の入手とそのレビューはされているのか。さらに、既にさまざまな形(リストになっている等)で発表されている物質の評価について、そのリストから削除する等の措置は一切とられていないのか。

○ 所管省庁における対処方針

現行の有害性の調査制度では、がん原性の疑いのある物質を洗い出す(スクリーニング)ため、労働安全衛生法第57条の5に基づいて『微生物を用いる変異原性試験(生体外(in vitro))』と『ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(in vitro)』の2種類の試験を行い、変異原性の評価を行っている。厚生労働省では、多くのがん原性物質はこの2種類の試験で強度の変異原性が認められることに鑑み、2種類の試験で強度の変異原性が認められた物質については、その結果に基づき労働者の健康障害を予防するという見地から、当該物質の周知及び製造又は取り扱う場合の措置について指導を行うものである。

上記の2種類の試験方法の組み合わせについては、「毒性試験に関するOECDテストガイドラインの序論及び試験の選択と適用の手引」においても、ほとんどの潜在的な変異原物質や遺伝毒性を示す発がん物質を検出できる組み合わせとして支持されている旨の記載がある。

上記2つの試験によって変異原性が認められた化学物質について、これら以外の生体内(in vivo)の変異原性試験の結果をもってその取扱を変更することは、ヒトに対する発がん性がないことの実証が得られない限りできないと考えている。

特に、このグルタルアルデヒドは、WHOのIARC(国際がん研究機構)やACGIH(米国産業衛生専門家会議)においても、ヒトに対する発がん性の評価が定まっていないところである。

(再対処方針)

1 労働安全衛生法第57条の5に基づいて実施している『微生物を用いる変異原性試験(生体外(in vitro))』と『ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(in vitro)』は、がん原性の疑いのある物質を洗い出す(スクリーニング)ために実施しているところであり、この2種類の試験で強度の変異原性が認められた物質については、労働者の健康障害を予防するという見地から、当該物質の周知及び製造又は取り扱う場合の措置について指導を行うものである。

上記のように、本制度は当該物質を取り扱うこととなる労働者の健康障害を防止するため、行政的な措置が必要か否かを判断するためにできるだけ多くのがん原性の疑いのある化学物質を調査することを目的とし、簡便な試験手法によりがん原性のスクリーニングを行っているものである。

また、上記の2種類の試験方法の組み合わせについては、「毒性試験に関するOECDテストガイドラインの序論及び試験の選択と適用の手引き」においても、ほとんどの潜在的な変異原物質や遺伝毒性を示す発がん物質を検出できる組み合わせとして支持されている旨の記載がある。

なお、変異原性試験の用い方については、問題提起者が引用した「遺伝毒性試験に関するOECDガイドライン序論および試験の選択と適用の手引き」の「6. 実際に試験をどのように用いるか？」に記述があるが、がん原性の疑いのある物質を調査し、労働者への健康障害を予防するという観点からは、上記の2種類の *in vitro* の試験によって変異原性が認められた化学物質について、これら以外の生体内 (*in vivo*) の変異原性試験の結果をもってその取扱を変更することは、ヒトに対する発がん性がないことの確かな立証が得られておらず、またWHOのIARC(国際がん研究機構)やACGIH(米国産業衛生専門家会議)において、ヒトに対する発がん性の評価が定まっていない状況においてはできないと考えている。

2 動物試験によりがん原性が認められた物質については、ヒトに対する発がん性のおそれが否定できないことから、専門家による意見を踏まえ、労働安全衛生法第28条の規定により、当該物質をがんその他の重度の健康障害を労働者に生ずるおそれがあるものとして定め、当該化学物質による労働者の健康障害を防止するための指針を公表しているところである。

3 厚生労働省では、微生物を用いる変異原性試験及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行った物質を含め、専門家による意見を踏まえ、内外の文献等から有害性の高いと思われる物質について、動物を用いたがん原性試験、生殖発生毒性試験を実施しており、化学物質に関する有害性のデータの集積に努めるとともに、その結果に基づき化学物質による労働者の健康障害を防止するための指針を定める等の措置を講じているところである。

(現在の検討状況)

問題提起者において検討中。

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合事業）
研究分担報告書

化学物質管理における世界戦略へ対応するための
法規制等基盤整備に関する調査研究

—GHS を導入した欧州の CLP 規制と労働安全衛生法の比較—
—国連勧告等重要書籍・文書の邦訳—

研究分担者 城内 博 日本大学大学院理工学研究科教授
研究分担者 宮川 宗之 独立行政法人労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究
グループ 上席研究員

研究要旨：

本年度は、欧州連合 CLP（分類、ラベル、包装）規則と日本の労働安全衛生関連法規／条項の比較を行ない、日本の法制度の今後の課題を明らかにする。また、国際連合や欧米諸国の化学物質管理に関する重要な書籍や文書を邦訳では、国連危険物輸送勧告 試験方法及び判定基準のマニュアル、米国の HCS（危険有害性周知基準）の翻訳を行い、昨年度設置した GHS ホームページ等に公開する。

A. 研究目的

2008 年 12 月に欧州連合から GHS を導入した CLP（分類、ラベル、包装）規則が発表され、2010 年 1 月から施行された。これは我が国にとってもまた世界的に見ても、化学物質管理あるいは化学品の貿易の観点から非常に影響力のある規則である。本年度はこの CLP 規則と我が国の労働安全衛生関連法規との比較検討を行う。

また、国際連合や欧米諸国の化学物質管理に関する重要な書籍や文書を邦訳では、国連危険物輸送勧告など重要な文書の翻訳を行う。

B. 研究方法

- ① 化学物質管理に関する重要な書籍、文書の邦訳は、とりあえず外部の翻訳業者等に邦訳を依頼し、本研究の分担研究者らが翻訳をチェックした後、公表する。国連危険物輸送勧告 試験方法及び判定基準のマニュアル、米国の HCS（危険有害性周知基準）改訂版の翻訳を計画している。
- ② GHS を導入した欧州連合 CLP 規則と日本の労働安全衛生法関連法規で規定する内容と

の比較検討を行う。

C. 研究結果

- ① 化学物質管理に関する重要な書籍、文書の邦訳および公開

国連危険物輸送勧告 試験方法及び判定基準のマニュアルの翻訳を行い、昨年度開設した GHS ホームページ

(<http://jonai.medwel.cst.nihon-u.ac.jp/>) に英語版とともに掲載し（資料 1 参照）、さらに化学工業日報社から出版した。

米国 HCS（危険有害性周知基準）は 2009 年 10 月に改訂案が出されパブリックコメントが募集され 2010 年 3 月には公聴会が予定されている。本研究ではこの改訂案を、GHS と同様の技術的部分は除き、翻訳し GHS ホームページに英語版とともに掲載した（資料 1 参照）。また、翻訳文書は資料 2 に添付した。

- ② CLP 規則と日本の労働安全衛生法関連法規で規定する内容との比較検討

2008年12月末に「物質及び混合物の分類、表示、包装に関する、指令 67/548/EEC 及び 1999/45/EC を改正し廃止し、規則 (EC)No1907/2006 を改正する、2008年12月16日付欧州議会および理事会規則 (EC)No1272/2008」(以下 CLP 規則と呼ぶ)が欧州官報に掲載され、2009年早々に施行された。これは「持続可能な開発に関する世界サミット」(2002年、ヨハネスブルグ)の決議である「GHS の世界的な完全実施目標を 2008年とする」を意識したものであった。

CLP 規則は欧州 REACH 規則と共に、化学物質管理のみならず貿易においても、欧州諸国のみならず他の国々に対しても大きな影響をあたえるものである。ここではこの CLP 規則の基本理念を概観し、わが国の化学物質に関する法規制(特に労働安全衛生法)との比較を行った。分類等にかかわる技術的な詳細はほぼ GHS を踏襲しているため、この説明は割愛した。

【CLP 規則の内容】

この CLP 規則は序文、第 I 編 一般的事項、第 II 編 有害性分類、第 III 編 ラベル表示の形式による危険有害性情報の伝達、第 IV 編 包装、第 V 編 物質の分類及び表示の調和、ならびに分類及び表示インベントリー、第 VI 編 所管官庁及び執行、第 VII 編 共通最終条項、及び、附属書 I 危険有害性物質及び混合物の分類ならびに表示要求事項、附属書 II 特定の物質及び混合物のラベルと包装に関する特別の規則、附属書 III 危険有害性情報、補足的危険有害性情報及び補足的ラベル項目のリスト、附属書 IV 注意書きのリスト、附属書 V 危険有害性を表す絵表示、附属書 VI 特定の危険有害物質の調和された分類及び表示のリスト、附属書 VII 指令 67/548/EEC での分類から本規則における分類への変換表、からなっている。附属書 VI には約 8,000 の物質について、約 1,000 頁にわたり、その分類結果と該当する危険有害性情報のコードが記載されている。(本研究では予算の都合もあり、また附属書 III 以降は表であるため、附属書 II までの 145 頁分を邦訳した。)

【CLP 規則の意義・目的】

「本規則は、競争力及び革新を強化しつつ、ヒトの健康や環境の高レベルでの保護、ならびに化学物質、混合物及び特定の物品の自由な移動を確保しなければならない。」(序文(1))(第 1 条 1.) と記述されており、世界的な化学物質管理の潮流、すなわち持続可能な開発の達成を目標として、分

類や表示に関する調和を行うことが謳われている。これは国連 GHS 勧告にも謳われていることであるが、このような概念は我が国の化学物質管理に関する法律には見られない。

化学物質の危険有害性を分類しそれを表示するというシステムは欧州ですでに 40 年の歴史があるが、CLP 規則により欧州共同体内のシステムの調和をさらに進める必要があるとしている(序文(11))。

【CLP 規則の範囲】

「本規則は、一般原則として、共同体内で供給されるあらゆる物質及び混合物に適用される。」(序文(11))とあり、この点が、特定の化学物質のみに適応される我が国の労働安全衛生法における分類及び表示との最も大きな違いである。

【危険有害性の分類】

「物質及び混合物の危険有害性を把握し、その分類を決定する責任は、・・・主としてそれら物質及び混合物の製造者、輸入者及び川下使用者に存在する(序文(11))(第 9 条)。一方、「分類の調和のために・・・本規則の付属書 6、第 3 部に項目が記載された場合には、製造者、輸入者及び川下使用者はその調和分類を適用しなければならないとともに、自己分類するのは上記以外の調和されていない危険有害性分類、・・・のみとする。」(序文(17))(第 4 条 3.)としており、約 8,000 物質についての分類がリスト化されており、これの使用が義務付けられている。すなわちこれは日本等から欧州に輸出する化学物質がこのリストに掲載されている場合には、これにしたがって分類しなければならないことを意味する。関連省庁が共同で行った我が国の分類は事業者が参照できる参考分類であるという位置づけに比べて大きな違いである。

さらにこれとは別に「欧州化学品庁は、データベースの形で分類及び表示インベントリーを作成し、維持しなければならない。」(第 42 条 1.)となっており、今後、分類及び表示に関するデータベースがさらに充実することが予想される。分類及び表示インベントリーの適用範囲については、「規則(EC)No 1907/2006 に基づく登録が必要な物質。」(第 39 条 (a))とあり、さらに「第 39 条で言及された物質を販売する製造者及び輸入者、又は・・・は、以下の情報を欧州化学品庁に通知し、第 42 条で言及されたインベントリーに組み入れてもらわなければならない。」(第 40 条 1.)としており、「以下の情報」として「物質が危険有害性クラス又は区別の全部でなく一部について分類されている場合、その原因がデータ欠如