

遺伝毒性試験の取扱いについて

1. 提案

食事中濃度区分の「区分Ⅱ」及び「区分Ⅲ」における線引きの値（0.05 mg/kg）は、非発がんのエンドポイントに基づき設定されていることから、遺伝毒性による発がん影響の可能性の有無を検出するために、「区分Ⅱ」から「区分Ⅳ」に対して「3. 対応（案）」に示す遺伝毒性試験を要求してはどうか。

（なお、「区分Ⅰ」については、第47回器具・容器包装専門調査会での議論の結果、遺伝毒性に関する利用可能な情報に基づく考察の提出を求めていることとしているため、実試験データを必須としない。）

食事中濃度区分		試験項目
区分Ⅰ	毒性試験の結果を必須としない水準	—*
区分Ⅱ	一般毒性試験の結果を必須としない水準	遺伝毒性試験
区分Ⅲ	一般毒性試験の結果（スクリーニングレベル）が必須となる水準	遺伝毒性試験 亜慢性毒性試験
区分Ⅳ	フルセットの毒性試験等の結果が必須となる水準	遺伝毒性試験 亜慢性毒性試験 生殖毒性試験 発生毒性試験 慢性毒性試験 発がん性試験 体内動態試験

* 毒性試験の実施を必須とはしないが、遺伝毒性に関して、利用可能な情報に基づく考察の提出を求める。

2. 検討材料

（1）科学的知見

Kirkland (2005) は、既知の発がん物質（553 物質）及び非発がん物質（177 物質）を4種の *in vitro* 遺伝毒性試験（Ames 試験、マウスリンフォーマ TK 試験（MLA）、小核試験（MN）、染色体異常試験（CA））を単独、又は組合せ（2種又は3種）で、各場合の感度¹、特異性²、及び相対予測性³を検討した。

感度は単独の場合よりも、組合せの場合の方が高くなった。一方、特異性は単独の場合よりも、組合せの場合の方が低くなった。また、発がん物質及び非発がん物質の相対予測性（「2」を下回るものは有意ではないと判断）は、多くの単独及び組合せの

¹ 発がん物質を陽性と判定する能力

² 非発がん物質を陰性と判定する能力

³ 正しく判定できた物質の割合を誤った判定をした物質の割合で割った比率

1 場合で「2」を下回った。

2 このことから、1つの試験でのみ陽性結果が得られているような場合においては、
3 試験結果だけでなく、作用機序や WOE (weight of evidence) を加味して発がんの可能性
4 を評価すべきとしている。【別紙参照】

6 (2) 遺伝毒性試験に係る各種規定

7 ① IPCS EHC240⁴の規定

8 リスク評価に係る原則と手法を定めた IPCS EHC240 は、遺伝毒性試験の種類及び
9 テストストラテジー、関連する試験方法として OECD テストガイドラインを記載して
10 いる。

11 テストストラテジーについては、異なる遺伝子エンドポイントをカバーするため
12 に、一般的に用いられるテストバッテリーとして、*in vitro* 試験である、細菌を用
13 いた復帰突然変異試験に加え、ほ乳類細胞を用いた点突然変異又は染色体異常を検
14 出する遺伝毒性試験を1つ、又は2つ選択することとしている。

15 また、上記 *in vitro* 試験結果が全て陰性の場合、特に懸念すべき理由（例えば、
16 ヒトへの高ばく露、又は持続的ばく露、構造的考察など）がない限り、遺伝毒性の
17 懸念はないと結論するのに通常は十分であるとしている。一方で、1つ以上の *in*
18 *vitro* 試験結果が陽性の場合、通常、追加で *in vivo* 試験が必要となるとしてい
19 る。*in vivo* 試験の選択は、*in vitro* 試験の結果や物質のトキシコキネティクスや
20 トキシコダイナミクスに係る情報を踏まえ、ケースバイケースで選択するとしてい
21 る。

23 ② FDA ガイダンス⁵及び EFSA ガイダンス⁶の規定

24 FDA ガイダンス及び EFSA ガイダンスにおいて、食品接触物質の安全性評価で要求
25 される遺伝毒性試験の種類を表1及び表2に示す。両者はいずれも「細菌を用いた
26 復帰突然変異試験」を必須とした2～3種類の組合せ試験を要求しているが、概して、
27 EFSA ガイダンスの方が FDA ガイダンスよりも遺伝毒性試験の数が少ない。

⁴ IPCS EHC240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Foods (「食品中の化学物質のリスク評価の原則と手法」) (2009年)

⁵ Guidance for Industry: Preparation of Food Contact Notifications for Food Contact Substances (Toxicology Recommendation). (2002年改訂)

⁶ NOTE FOR GUIDANCE FOR THE PREPARATION OF AN APPLICATION FOR THE SAFETY ASSESSMENT OF A SUBSTANCE TO BE USED IN PLASTIC FOOD CONTACT MATERIALS. (2017年改訂)

1

表1 米国のガイダンスにおける遺伝毒性試験

遺伝毒性試験の種類*1		累積推定ばく露量（※食事中濃度換算値）			
		0.5 µg/kg 以下*2	0.5 µg/kg 超 50 µg/kg 以下	50 µg/kg 超 1 mg/kg 未満	1 mg/kg 以上
<i>in vitro</i> 試験	細菌を用いた復帰突然変異試験	—	○	○	○
	ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験	—	△*3	△*3	△*3
	マウスリンフォーマ TK 試験	—	△*3	△*3	△*3
<i>in vivo</i> 試験	げっ歯類を用いた小核試験	—	—	○	○

2

*1 試験方法は Redbook に準拠するよう規定

3

*2 FDA は、当該区分においては毒性試験の実施を要求していないが、利用可能な情報に基づき、食品接触物質の潜在的発がん性に関する考察がなされるべきと要求している。

4

5

*3 ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験又はマウスリンフォーマ TK 試験のいずれかを選択。

6

7

表2 欧州連合のガイダンスにおける遺伝毒性試験

遺伝毒性試験の種類*1		累積推定ばく露量（※食事中濃度換算値）		
		50 µg/kg 未満	50 µg/kg~ 5 mg/kg	5 mg/kg~
<i>in vitro</i> 試験*2	細菌を用いた復帰突然変異試験	○	○	○
	ほ乳類細胞を用いた小核試験	○	○	○

8

*1 試験方法は OECD テストガイドラインに準拠するよう規定。

9

*2 記載の *in vitro* 遺伝毒性試験結果のうち、少なくとも一つが陽性の場合、げっ歯類を用いた小核試験、トランスジェニックげっ歯類突然変異試験、コメットアッセイのような *in vivo* 遺伝毒性試験が必要な場合がある。

10

11

12

13

14

15

16

1 (3) 国内の他の化学物質（農薬及び添加物）の評価に関する規定

2 「農薬の登録申請に係る試験成績について（平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第
3 8147 号農林水産省農産園芸局長通知 一部改正 平成 30 年 3 月 29 日付け 29 消安第
4 6335 号）」及び「添加物に関する食品健康影響評価指針（2010 年 5 月 食品安全委員会
5 （2017 年 7 月改正）」は、遺伝毒性の評価に必要な標準的組合せ試験の種類を記載し
6 ている（表 3）。

7
8 表 3 国内の他の化学物質（農薬及び添加物）の評価に関する規定

遺伝毒性試験の種類		農薬	添加物* ²
<i>in vitro</i> 試験	細菌を用いた復帰突然変異試験	○	○
	ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験	○	△* ¹
	マウスリンフォーマ TK 試験	—	△* ¹
	ほ乳類細胞を用いた小核試験	—	△* ¹
<i>in vivo</i> 試験	げっ歯類を用いた小核試験	○	○

9 *1 ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験、マウスリンフォーマ TK 試験、又はげっ歯類を用いた小
10 核試験のいずれか 1 つを選択

11 *2 記載の *in vitro* / *in vivo* 試験結果を補足するための追加試験の例として、トランスジェ
12 ニックげっ歯類を用いた突然変異試験、コメットアッセイが挙げられる。

13
14
15 3. 対応（案）

16 (1) 基本的な考え方

17 IPCS EHC 240 との整合を確保しつつ、国外（米国、欧州連合）における食品接触物
18 質の評価の状況、及び国内の他の化学物質（農薬、添加物）の評価の状況を考慮し、
19 食品用器具・容器包装の評価の際に要求する遺伝毒性試験を定める。

20
21 (2) 各論

22 ① ステップ 1: *in vitro* 試験

23 原則として、次の a 及び b の組合せによる、2 種類の *in vitro* 試験結果を要求す
24 る。

25 a 細菌を用いた復帰突然変異試験

26 b ほ乳類細胞を用いた遺伝毒性試験（次の 3 つから 1 つ以上を選択）

27 ・ ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験

28 ・ ほ乳類細胞を用いた小核試験

29 ・ ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験

30 （マウスリンフォーマ TK 試験、又はヒトリンパ芽球様細胞（TK6）試験）
31

② ステップ2: *in vivo* 試験

in vitro 試験結果等から対象物質の遺伝毒性が否定されない場合、生体における遺伝毒性を評価するため、以下に例示する *in vivo* 試験の結果を要求することがある。

- ・ げっ歯類を用いた小核試験
- ・ トランスジェニックげっ歯類を用いた突然変異試験

上記 *in vitro*、及び *in vivo* 遺伝毒性試験における試験方法の例としては以下の表のとおりとする。

対応（案）の試験名	OECD ガイドラインの試験名	試験方法の例
ステップ1: <i>in vitro</i> 試験		
細菌を用いた復帰突然変異試験	細菌復帰突然変異試験	OECD TG471
ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験	<i>in vitro</i> ほ乳類細胞染色体異常試験	OECD TG473
ほ乳類細胞を用いた小核試験	<i>in vitro</i> ほ乳類細胞小核試験	OECD TG487
ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (マウスリンフォーマ TK 試験、又は ヒトリンパ芽球様細胞 (TK6) 試験)	チミジンキナーゼ遺伝子を用いた ほ乳類細胞の <i>in vitro</i> 遺伝子突然変異試験	OECD TG490 ⁷
ステップ2: <i>in vivo</i> 試験		
げっ歯類を用いた小核試験	ほ乳類赤血球小核試験	OECD TG474
トランスジェニックげっ歯類を用いた 突然変異試験	トランスジェニックげっ歯類の 体細胞および生殖細胞を用いた 遺伝子突然変異試験	OECD TG488

⁷ マウスリンパ腫 L5178Y 細胞を用いたマウスリンフォーマ TK 試験、及びヒトリンパ芽球様細胞を用いる TK6 試験はいずれもチミジンキナーゼ (TK) レポーター遺伝子座に遺伝子変異を生じる物質を特定するための試験であり、両試験はもともと TG476 (「ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (チミジンキナーゼ (TK)、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hprt) 遺伝子座及びキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (xpirt) の導入遺伝子における突然変異を測定)」) に含まれていたが、新たに策定された OECD TG490 (「チミジンキナーゼ遺伝子を用いたほ乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験」2016 年採択) に組込まれた。それに伴い、TG476 は改訂され、「Hprt 遺伝子および xpirt 遺伝子を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験」のみがその対象となっている。

国内及び海外で要求される遺伝毒性試験の比較（ステップ1）

遺伝毒性試験の種類		対応（案）	IPCS EHC240	FDA ガイドライン		EFSA ガイドライン	国内		
		食事中濃度区分		食事中濃度			農薬	添加物	
		区分Ⅱ～Ⅳ		0.5 µg/kg 超 50 µg/kg 以下	50 µg/kg 超				
<i>in vitro</i> 試験	細菌を用いた復帰突然変異試験	○	○	○	○	○	○		
	ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験	△*1	△*2	△*3	△*3	—	○	△*4	
	ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験	マウスリンフォーマ TK 試験		△*1	△*3	△*3	—	—	△*4
		ヒトリンパ芽球様細胞（TK6）試験		△*1	—	—	—	—	—
	ほ乳類細胞を用いた小核試験	△*1		—	—	—	○	—	△*4
<i>in vivo</i> 試験	げっ歯類を用いた小核試験	—	—	—	○	—	○	○	
要求する遺伝毒性試験数		2 種類	2～3 種類	2 種類	3 種類	2 種類	3 種類	3 種類	

2 *1：「ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験」、「マウスリンフォーマ TK 試験」、「ヒトリンパ芽球様細胞（TK6）試験」又は「ほ乳類細胞を用いた小核試験」から、1つ以上を選択

4 *2：ほ乳類細胞を用いた点突然変異又は染色体異常を検出する遺伝毒性試験を1つ又は2つを選択とされているが、具体的な試験方法の記載はない。

5 *3：「ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験」、又は「マウスリンフォーマ TK 試験」から、いずれか1つを選択

6 *4：「ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験」、「マウスリンフォーマ TK 試験」、又は「ほ乳類細胞を用いた小核試験」から、いずれか1つを選択

1
2

ステップ1の試験結果に基づき、追加で試験が必要とされる遺伝毒性試験の例（ステップ2）

遺伝毒性試験の種類		対応（案）	IPCS EHC240	FDA ガイドライン		EFSA ガイドライン	国内	
		食事中濃度区分		食事中濃度			農薬	添加物
		区分Ⅱ～Ⅳ		0.5 µg/kg 超 50 µg/kg 以下	50 µg/kg 超			
<i>in vivo</i> 試験	げっ歯類を用いた小核試験	△*1	△*2	規定なし		△*3	規定なし	—*4
	トランスジェニックげっ歯類を用いた突然変異試験	△*1				△*3		△*5
	コメットアッセイ					△*3		△*5

- 3 *1: *in vitro* 試験結果（ステップ1）等から対象物質の遺伝毒性が否定されない場合、生体における遺伝毒性を評価するため、*in vivo* 試験として、
 4 例えば、げっ歯類を用いた小核試験、又はトランスジェニックげっ歯類を用いた突然変異試験結果を要求することがある。
 5 *2: *in vitro* 遺伝毒性試験結果（ステップ1）のうち、1つ以上の陽性の場合、通常、追加で *in vivo* 試験が必要となるとしている。また、*in vivo*
 6 試験の選択は、*in vitro* 試験の結果や物質のトキシコキネティクスやトキシコダイナミクスに係る情報を踏まえ、ケースバイケースで選択する
 7 としている
 8 *3: *in vitro* 遺伝毒性試験結果（ステップ1）のうち、少なくとも一つが陽性の場合、げっ歯類を用いた小核試験、トランスジェニックげっ歯類を
 9 用いた突然変異試験、コメットアッセイのような *in vivo* 遺伝毒性試験が必要な場合がある
 10 *4: げっ歯類を用いた小核試験については、ステップ1で要求しているため、ステップ2では要求しない。
 11 *5: ステップ1の試験結果を補足するための追加試験の例として、トランスジェニックげっ歯類を用いた突然変異試験、コメットアッセイが挙げら
 12 れる。
 13

遺伝毒性を評価するための検討材料となる科学的知見

1. Kirkland (2005)

(1) 知見

既知のげっ歯類における発がん物質 (553 物質) 及び非発がん物質 (177 物質) を対象に、4 種の *in vitro* 遺伝毒性試験 (Ames 試験、マウスリンフォーマ試験 (MLA)、小核試験 (MN)、染色体異常試験 (CA)) を単独、又は組合せ (2 種又は 3 種) て、各場合の感度、特異性、並びに発がん物質及び非発がん物質における相対予測性を検討した。

感度は、1 種類の試験の場合よりも、2 種又は 3 種組合せた場合の方が高くなった (1 種 : 58.8~78.7%、2 種 : 75.3~87.0%、3 種 : 84.7 及び 90.7%)。

一方、特異性は、1 種類の試験の場合よりも、2 種又は 3 種組合せた場合の方が低くなった (1 種 : 30.8~73.9%、2 種 : 10.0~34.6%、3 種 : 5.0 及び 22.9%)。

相対予測性 (「2」を下回るものは有意ではないと判断) について、2 種の組合せでは「Ames+MLA」、3 種の組合せでは「Ames+MLA+CA」のみにおいて、発がん物質及び非発がん物質の相対予測性が「2」以上であったが、それ以外は「2」を下回った。(試験結果の詳細は別添を参照)

(2) 考察

著者は、相対予測性の考察において、単独又は組合せ試験結果が最適な情報を提示しているか否かを判断するにあたっては、感度と特異性との間の適切なバランスを見出す必要がある、多くの単独及び組合せでの実施において相対予測性は「2」を下回ることから、1 つの試験でのみ陽性結果が得られているような場合においては、試験結果だけでなく、作用機序や WOE (weight of evidence) を加味して発がんの可能性を評価すべきと考察している。

1
2
3

(別添)

各試験結果における感度、特異性及び相対予測性

		遺伝毒性試験の種類										
		1種				2種					3種	
		Ames	MLA	MN	CA	Ames			MLA		Ames	
						MLA	MN	CA	MN	CA	MLA + MN	MLA + CA
感度* ¹ (%)		58.8	73.1	78.7	65.6	81.0	85.9	75.3	87.0	81.3	90.7	84.7
特異性* ² (%)		73.9	39.0	30.8	44.9	32.4	12.0	34.6	10.0	27.1	5.0	22.9
相 対 予 測 性 * ³	発がん 物質	2.59	1.40	1.70	1.46	2.93	2.72	2.99	1.76	1.72	2.96	3.47
	非発がん 物質	1.86	2.03	1.61	1.48	2.31	0.93	1.54	1.08	2.12	0.68	2.10

4 *1 発がん物質を陽性と判定する能力
 5 *2 非発がん物質を陰性と判定する能力
 6 *3 正しく判定できた物質の割合を誤った判定した物質の割合で割った比率

7
8
9
10