

食安基発第0228001号
平成 20年 2月 28日

内 閣 府
食品安全委員会事務局評価課長 殿

厚生労働省
医薬食品局食品安全部基準審査課長



食品健康影響評価に係る追加試験の実施及び資料の提出について(回答)

「食品健康影響評価について」(平成18年5月9日付け府食第360号)により貴委員会から依頼のあった、食品健康影響評価に係る追加試験について、別添のとおりとりまとめたので提出します。

最終報告書

試験責任者の署名および日付

アガリチンのトランスジェニックラットを用いる遺伝子突然変異試験
【GLP 非適用試験】

試験番号：A260 (079-388)

2008年2月

表 題： アガリチンのトランスジェニックラットを用いる遺伝子突然変異試験

試験番号： A260 (079-388)

試験責任者：

中嶋 圓

2008年2月1日

中嶋 圓

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

要 約	6
1. 表題	7
2. 試験目的	7
3. 遵守した動物実験関連規則および参考としたガイドライン	7
4. 試験番号	7
5. 試験施設	7
6. 試験委託者	7
7. 試験責任者	8
8. 被験物質等管理責任者	8
9. 分担責任者	8
10. 試験従事者	8
11. 資料保存施設管理責任者	8
12. 試験日程	9
13. 被験物質	9
14. 被験物質配合飼料	10
15. 対照物質	11
16. 試験材料	12
17. 試験方法	18
18. 病理組織学検査およびDNA シークエンス解析	24
19. DNA 付加体測定用試料の送付	24
20. 試験結果	24
21. 考察および結論	28
22. 参考とした資料	29
23. 試験関係資料の保存	29
24. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと	30
Tables	
Table 1 Mutant frequency (MF) of <i>cH</i> gene in kidney of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	32
Table 2 Mutant frequency (MF) of <i>cH</i> gene in liver of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	33

Table 3 Mutant frequency (MF) of <i>cH</i> gene in bone marrow of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	34
Table 4 Mutant frequency (MF) of <i>cH</i> gene in thyroid gland of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	35
Table 5 Mutant frequency (MF) of <i>cH</i> gene in lung of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	36
Table 6 Mutant frequency (MF) of <i>cH</i> gene in forestomach of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	37
Appendices	
Appendix 1 Induction of mutation in kidney of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	38
Appendix 2 Induction of mutation in liver of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	39
Appendix 3 Induction of mutation in bone marrow of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	40
Appendix 4 Induction of mutation in thyroid gland of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	41
Appendix 5 Induction of mutation in lung of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	42
Appendix 6 Induction of mutation in forestomach of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	43
Appendix 7 Body weight in the gene mutation assay using transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	44
Appendix 8 Food consumption in the gene mutation assay using transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	47
Appendix 9 Test substance intake in the gene mutation assay using transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	50
Appendix 10 Clinical observations in the gene mutation assay with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	53
Appendix 11 Organ weight in the gene mutation assay with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	67
Appendix 12 Organ weight per body weight in the gene mutation assay with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]	68

Appendix 13 Individual gross findings in the gene mutation assay with agaritine

[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)].....69

添付資料

添付資料 1 肝臓、腎臓の切り出し方法.....70

添付資料 2 アガリチンの DNA 付加体解析 (試験計画書).....71

添付資料 3 アガリチンの DNA 付加体解析 (試験報告書).....72

要 約

アガリチンの変異原性について、トランスジェニックラット (Big Blue[®]) を用い、その標的器官 (臓器) における遺伝子突然変異誘発性を検討した。

最高用量は、先に実施されたキリン細胞壁破砕アガリクス顆粒を用いた中期多臓器発がん試験において腫瘍の増加が認められた臓器と同じ臓器 (前胃、腎臓) に Big Blue[®] マウスを用いたアガリチン経口投与試験において変異を誘発したとの報告があることから、この報告に基づき 120 mg/kg とした。最低用量の 3 mg/kg は、キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒を用いた中期多臓器発がん試験における高用量群 (5% 混餌) より算出された被験物質の摂取量相当量を用いた。中用量は公比約 6 となるよう 20 mg/kg とし、いずれも混餌投与とした。

投与 1 週の体重および摂餌量の測定結果から、アガリチン投与により予想を上回る体重増加抑制および摂餌量低下が認められた。この時点で試験開始時の設定用量では試験が成立しないと判断し、投与 2 週以降の用量を随時変更した (17.2.1. 投与用量一覧表参照)。

キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒の用量は、既に実施された中期多臓器発がん試験の最高用量である 5% 混餌とした。

被験物質を 91 日間混餌投与し、最終投与後 3 日の腎臓、肝臓、骨髄、甲状腺、肺および前胃における遺伝子突然変異頻度を計測した。

アガリチン投与群およびキリン製品投与群における遺伝子突然変異頻度は、腎臓、肝臓、骨髄、甲状腺、肺および前胃のいずれにおいても、陰性対照群と比較し、統計学的に有意な増加は認められなかった。

陽性対照の N-ニトロソ-N-エチル尿素 (ENU) 腹腔内投与投与群 (投与量 50 mg/kg, 1 日 1 回, 5 日間連続投与) においては、検討した 6 臓器 (臓器) とも遺伝子突然変異頻度が上昇しており、陰性対照と比較し、統計学的に有意 (いずれも $p < 0.05$) な増加を示した。

以上の結果から、当該試験条件下において、アガリチンは遺伝子突然変異を誘起しないもの (陰性) と判断された。

1. 表題

アグリチンのトランスジェニックラットを用いる遺伝子突然変異試験

2. 試験目的

被験物質の *in vivo* における標的器官 (臓器) での遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *cII*) を検討する。

3. 遵守した動物実験関連規則および参考としたガイドライン

動物実験関連規則

動物の飼育および動物の取り扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」を遵守し、動物を適正に使用した。

ガイドライン

Environmental Health Criteria 233 (United Nations WHO 2006; Transgenic Animal Mutagenicity Assays)

「財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 組換え DNA 実験実施安全管理規定」に則り届出を提出し、さらに「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年6月18日、法律第97号)に従って実施した。

4. 試験番号

A260 (079-388)

5. 試験施設

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1293

6. 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 毒性部

試験モニター 菅野 純

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀一丁目18番1号

Tel: 03-3700-9619 Fax: 03-3700-9647

7. 試験責任者

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

中嶋 圓 (環境毒性試験室)

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

Tel: 0538-58-3572 Fax: 0538-58-1368

mail: nakajima@anpyo.or.jp

8. 被験物質等管理責任者

水橋 福太郎

9. 分担責任者

検疫: 太田 泰史

病理学検査: 志賀 敦史

統計解析: 鈴木 雅也

10. 試験従事者

遺伝毒性実験: 渥美 務【主担当者】

夏目 匡克, 岩倉 佳奈子, 大野 久美,

鈴木 ゆみ子, 杉 麻衣, 國枝 正幹,

名波 加奈, 山本 裕里子, 太田 泰史,

大久保 陽子

検疫: 太田 泰史【分担責任者】

松本 覚, 渥美 務, 岩倉 佳奈子

器官 (臓器) 摘出: 萩原 孝【主担当者】

渥美 務, 岩倉 佳奈子, 芝田 真希,

牧田 真輝, 鈴木 ゆみ子, 大野 久美,

志賀 敦史, 中嶋 圓

病理学検査: 志賀 敦史【分担責任者】

宇野 冬美, 加藤 睦美, 萩原 孝

統計解析: 鈴木 雅也【分担責任者】

渥美 務

11. 資料保存施設管理責任者

柴田 典昭

12. 試験日程

試験開始日:	2006年12月19日
動物入荷日:	2007年1月18日
投与開始日:	2007年1月23日
投与日(陽性対照群):	2007年1月23日~1月27日
器官(臓器)摘出日(陽性対照群):	2007年1月30日
投与終了日:	2007年4月23日
器官(臓器)摘出日:	2007年4月26日
アッセイ終了日(腎臓):	2007年5月24日
アッセイ終了日(肝臓):	2007年6月8日
アッセイ終了日(骨髄):	2007年6月8日
アッセイ終了日(甲状腺):	2007年8月16日
アッセイ終了日(肺):	2007年9月14日
アッセイ終了日(前胃):	2007年9月21日
試験終了日:	2008年2月1日

13. 被験物質

- 13.1. 被験物質名
アガリチン
- 13.2. ロット番号
DPE0013
- 13.3. 純度/含量
97.0% (HPLC法)
- 13.4. 保存条件
室温・遮光
- 13.5. 保存場所
国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
- 13.6. 物質の状態
白色粉末
- 13.7. 安定性
飼料中:1ヵ月間安定であることが確認されている。

14. 被験物質配合飼料

14.1. 配合飼料1

14.1.1. 名称

3 mg/kg, 20 mg/kg, 120 mg/kg 群用アガリチン配合飼料 (投与1週)
3 mg/kg, 20 mg/kg, 80 mg/kg 群用アガリチン配合飼料 (投与2週)
3 mg/kg 群用アガリチン配合飼料, 250 ppm, 1000 ppm アガリチン配合飼料 (投与3週)
62.5 ppm, 250 ppm, 1000 ppm アガリチン配合飼料 (投与4~8週)
62.5 ppm, 250 ppm, 750 ppm アガリチン配合飼料 (投与9~13週)

14.1.2. 製造元

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

ただし、投与2週用の80 mg/kg 群用アガリチン配合飼料、投与3週用の250 ppm アガリチン配合飼料および投与9週用の750 ppm アガリチン配合飼料は、国立医薬品食品衛生研究所提供のアガリチン配合飼料を、安評センターで、基礎飼料と混合し、調製した。

14.1.3. 保存条件

冷蔵

14.1.4. 保存場所

安評センター6号館1階冷蔵庫
保存期間:2007年1月18日~同年4月23日
実測値:3.8~8.5°C

14.1.5. 取り扱い上の注意

取り扱いに際しては、マスクおよびグローブを着用する。

14.1.6. 残余被験物質含有飼料の処理

焼却処分した。

14.2. 配合飼料2

14.2.1. 名称

5%キリン製品(キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒, 中期多臓器発がん性試験使用製品)
配合飼料

14.2.2. 製造元

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

- 14.2.3. 保存条件
冷蔵
- 14.2.4. 保存場所
安評センター6号館1階冷蔵庫
保存期間：2007年1月18日～同年4月23日
実測値：3.8～8.5°C
- 14.2.5. 取り扱い上の注意
取り扱いに際しては、マスクおよびグローブを着用する。
- 14.2.6. 残余被験物質含有飼料の処理
焼却処分した。

15. 対照物質

15.1. 陰性対照（媒体）

- 15.1.1. 物質名
CRF-1 粉末飼料（基礎飼料）
- 15.1.2. ロット番号
061108
- 15.1.3. 製造元
オリエンタル酵母工業
- 15.1.4. 保存条件
室温
- 15.1.5. 有効期限
2007年11月4日
- 15.1.6. 保存場所
安評センター6号館1階飼料保管庫

15.2. 陽性対照物質

トランスジェニック (TG) 試験において肝臓等で十分な陽性反応が認められており、「Transgenic Animal Mutagenicity Assays」に例示されていることから、下記の化合物を陽性対照物質に選択した。

- 15.2.1. 物質名
N-ニトロソ-N-エチル尿素 (ENU)

- 15.2.2. ロット番号
5-GNM-39-1
- 15.2.3. 純度
58.2%
- 15.2.4. 製造元
Toronto Research Chemicals Inc. (TRC)
- 15.2.5. 保存条件
冷凍
- 15.2.6. 有効期限
2011年9月14日
- 15.2.7. 保存場所
安評センター6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラー（冷凍庫）

16. 試験材料

- 16.1. 試験動物
- 16.1.1. 種
ラット (Big Blue®トランスジェニックラット)
- 16.1.2. 系統
Fischer 344 [SPF]
- 16.1.3. 生産場
Taconic (米国)
- 16.1.4. 購入先
ストラタジーン・ジャパン株式会社
- 16.1.5. 週齢および体重
購入時：6週齢
群分け時：7週齢 (体重134～156g)
- 16.1.6. 購入動物数
雄59匹
- 16.1.7. 使用動物数
雄34匹

16.1.8. 種・系統選択理由

遺伝子導入動物として広く利用されており、入手のし易さ等を考慮して本系統のトランスジェニックラットを使用した。

16.2. 飼育管理

16.2.1. 飼育環境

ラット飼育室 [802号室：組替えDNA実験指針；昭和54年8月27日内閣総理大臣決定、平成3年9月24日改訂による物理的封じ込めに係わる施設] (W3.5×D5.5×H2.5 m) で動物を飼育した。試験期間中の温度は23.4～24.8°C、相対湿度は41～64%であった。換気回数は1時間当たり8回以上、空気差圧は外気-1 mmH₂O以下、照明12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定した。

自動給水装置を取り付けたMicro-Isolator™ Systemラックを使用し、Zyfon™製飼育ケージ (W26.6×D48.2×H20.3 cm) に床敷き (ALPHA-dn™) を入れ、動物を1～2匹ずつ収容した。床敷きの分析値が日本実験動物飼料協会/コンタミナント分析基準案の許容基準値内であることを確認し、その分析報告書 (Sample No. L0619101-1, L0624960-1) を安評センターで保存した。

なお、動物の検疫・馴化期間を含めた飼育期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

16.2.2. 飼料

検疫・馴化期間中は、基礎飼料 (CRF-1, Lot No. 061108) を動物に自由摂取させた。投与期間中 (91日間) は、配合飼料1あるいは配合飼料2を自由に摂取させた。発現期間中 (3日間) は、基礎飼料を自由に摂取させた。陰性対照群および陽性対照群は、試験期間 (器官 (臓器) 摘出日まで) を通じて基礎飼料を自由に摂取させた。飼料中の汚染物質の分析を、ロット毎に財団法人 日本食品分析センターで行った。分析値が日本実験動物飼料協会案の許容基準内であることを確認し、その分析結果 (第106112214-001号) を安評センターで保存した。

16.2.3. 被験物質配合飼料の調製

各用量群の投与1～2週の調製濃度を下式により算出した。予想を上回る体重増加抑制および摂餌量低下により、投与2, 3, 4および9週に投与用量を変更した。投与3週については、アガリチン低用量群の調製濃度を下式により算出し、中用量群、高用量群では式の使用を中止し、17.2.1.項に記載する《投与用量一覧表》に従い、アガリチン配合飼料を調製した。投与4週以降は、各用量群ともに、17.2.1.項に記載する《投与用量一覧表》に従い、アガリチン配合飼料を調製した。

《投与1～3週の調製濃度算出に用いた式》

$$\text{調製濃度 (ppm)} = \frac{\text{体重 (g)} \times \text{設定用量 (mg/kg)} \times 7}{\text{摂餌量 (g)}} \times \text{係数*}$$

*：投与1, 2週に与える飼料：係数は使用しない。

投与3週に与える飼料：(投与8日の体重÷群分け時体重)¹⁵

配合飼料は、毎週、国立医薬品食品衛生研究所にて調製された。ただし、投与2週用の80 mg/kg群用アガリチン配合飼料、投与3週用の250 ppmアガリチン配合飼料および投与9週用の750 ppmアガリチン配合飼料は、国立医薬品食品衛生研究所より提供された配合飼料を、安評センターで基礎飼料と混合し、調製した。安評センターにて調製した配合飼料の調製方法を以下に記載する。

《安評センターで調製したアガリチン配合飼料の調製方法》

投与2週用の80 mg/kg群アガリチン配合飼料：

高用量群に給餌されていた120 mg/kg群用アガリチン配合飼料(1545 ppm)を回収し、回収した配合飼料800.2 gと基礎飼料400.2 gをそれぞれ秤量した。両飼料をビニール袋に入れ、そのまま30分間混合し、80 mg/kg群用アガリチン配合飼料 (1030 ppm) を調製した。

投与3週用の250 ppmアガリチン配合飼料：

中用量群に給餌されていた20 mg/kg群用アガリチン配合飼料 (342 ppm) を回収し、回収した配合飼料を877.2 gと基礎飼料322.8 gをそれぞれ秤量した。両飼料をビニール袋に入れ、そのまま30分間混合し、250 ppmアガリチン配合飼料を調製した。

投与9週用の750 ppmアガリチン配合飼料：

国立医薬品食品衛生研究所より提供された1000 ppmアガリチン配合飼料900 gと基礎飼料300 gをそれぞれ秤量した。両飼料をビニール袋に入れ、そのまま30分間混合し、750 ppmアガリチン配合飼料を調製した。

16.2.4. 給水

動物には自動給水ノズルより水道水を自由に摂取させた。水道法に基づく水質検査を2007年4月に、株式会社 エコプロ・リサーチで行い、2006年12月、2007年1, 2, 3および5月に細菌検査 (一般細菌および大腸菌検査) を安評センターで実施した。検査結果については、SOPに記載されている上水道水質基準 (平成15年5月30日厚生労働省令第101号) の基準値内であることおよび細菌が検出されていないことを確認し、その検査結果 (水質検査：第071770-5号、細菌検査：GT06-12号, GT07-01号, GT07-02号, GT07-03号, GT07-05号) を安評センターで保存した。

16.3. 検疫および馴化

各動物について、異常の有無を、1日1回、6日観察するとともに、動物を飼育環境に馴化させた。動物搬入時および検疫・馴化期間終了時（群分け時）に、電子天秤を用いて、体重を測定した。体重増加量に異常を示した動物は認められなかった。検疫・馴化期間中の観察において、仮動物番号241の動物に上顎歯欠損が認められたが、その他の動物では体重の増加量あるいは健康状態に異常を示した動物は認められなかった。したがって、上顎歯欠損が認められた1匹は、群分け用動物から除外された。

16.4. 個体識別および群分け

検疫・馴化期間中は、ケージに付した仮動物番号を記入したラベルと、動物の毛刈により個体の識別をした。

投与開始当日に動物を体重により層別化し、無作為抽出法を用いて各試験群を構成するように分けた。各動物は、油性インクで尾部に識別マークを記入し、識別した。群分け時にケージおよび床敷きを新しいものに交換し、群分け後のケージには、試験番号、動物番号等を記入したラベルを装着した。

なお、余剰動物については炭酸ガスを用いて安楽死させた（2007年2月21日）。

16.5. 培地および培養液等の調製

16.5.1. LB 培養液

[調製例]

1000 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

Bacto tryptone (BD Diagnostic)	10 g
Bacto yeast extract (BD Diagnostic)	5 g
NaCl	5 g

オートクレーブで20分間滅菌した後、4°Cで保存した。

16.5.2. LB 寒天培地

[調製例]

1000 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Bacto agar (BD Diagnostic)	15 g

オートクレーブで20分間滅菌した後、シャーレ (φ150 mm) に20 mL ずつ分注した。

16.5.3. トップアガー

[調製例]

1000 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Bacto agar	7 g

オートクレーブで20分間滅菌した。使用時までウォーターバスを用いて50°Cの条件で保温した。

16.5.4. SM 緩衝液

[調製例]

1000 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

NaCl	5.84 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.03 g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] (ニッポンジーン)	50.0 mL
ゼラチン末 (関東化学)	100 mg

オートクレーブで20分間滅菌した後、室温で保存した。

16.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

16.6.1. ダウンス緩衝液

[調製例]

1000 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

Na ₂ HPO ₄	1.75 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0] (ニッポンジーン)	20 mL

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを8.0に調整後、オートクレーブで20分間滅菌した、室温で保存した。

16.6.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

ダウンス緩衝液50容に対し、RNase 溶液 (10 mg/mL, ニッポンジーン) 1容を添加し、用時調製した。

16.6.3. 組織破砕用緩衝液

102 mL を調製する場合の組成を以下に示す。

ダウンス緩衝液	45 mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	45 mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	10 mL
RNase 溶液 [10 mg/mL]	2 mL

用時調製した。

16.6.4. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液
[調製例]

100 mL の遺伝子工学用滅菌水 (ニッポンジーン) に SDS (和光純薬工業) 10 g を溶解した。フィルター (孔径 0.2 μm) を過除菌後、室温で保存した。

16.6.5. プロテナーゼ K 溶液

下記の通り調製した。

プロテナーゼ K (和光純薬工業)	200 mg
遺伝子工学用滅菌水	60 mL
10 w/v% SDS 溶液	20 mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] ^注	20 mL

注) pH 8.0 の EDTA 溶液を 1 mol/L の塩酸で、pH 7.5 に調整したものをを用いた。
用時調製した。

16.6.6. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

200 mL を調製する場合の組成を以下に示す。

クロロホルム	100 mL
TE 飽和フェノール (ニッポンジーン)	100 mL

用時調製した。

16.7. 陽性対照物質液の調製

ENU 100 mg を精密に量り、目盛り付試験管に移した後、生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, 大塚製薬工場) を加えて溶解後 20 mL に定容し、調製原液 (5.0 mg/mL 溶液) とした。陽性対照物質液は、調製後速やかに使用した。

17. 試験方法

17.1. 対照群

17.1.1. 陰性 (媒体) 対照

基礎飼料を与えた。

17.1.2. 陽性対照

ENU を、1 日 1 回、5 日間連続して腹腔内 (i.p.) に投与した。用量は、50 mg/kg とした。

17.2. トランスジェニック (TG) 試験

試験日の起算は、投与開始日を投与 1 日とし、投与 1 から投与 7 日を投与 1 週とした。

17.2.1. 用量

投与 1 週の用量は 3, 20 および 120 mg/kg の計 3 用量を被験物質処理群として設定した。

最高用量は、先に実施されたキリン細胞壁破砕アグリクス顆粒を用いた中期多臓器発がん試験において腫瘍の増加が認められた臓器と同じ臓器 (前胃, 腎臓) に Big Blue[®]-マウスを用いたアグリチン経口投与試験において変異を誘発したとの報告があることから、この報告に基づき 120 mg/kg とした。

最低用量の 3 mg/kg は、キリン細胞壁破砕アグリクス顆粒を用いた中期多臓器発がん性試験における高用量群 (5% 混餌) より算出された被験物質摂取量相当量を用いた。中用量は公比約 6 となるよう 20 mg/kg とした。

投与 1 週の体重および摂餌量の測定結果から、アグリチン投与により予想を上回る体重増加抑制および摂餌量低下が認められた。この時点で試験開始時の設定用量では試験が成立しないと判断し、投与 2 週以降の用量を随時変更した。(投与用量一覧表参照)

キリン細胞壁破砕アグリクス顆粒の用量は、先に実施したキリン細胞壁破砕アグリクス顆粒を用いた中期多臓器発がん試験の最高用量と同量とした。

試験群	用量 (ppm)	投与 期間 (日)	動物数		動物番号
			投与数	評価数	
陰性対照*	0	90	6	5	1001~1006
	62.5 [#]	90	6	5	1101~1106
アガリチン	250 [#]	90	6	5	1201~1206
	750 [#]	90	6	5	1301~1306
キリン製品**	5**	90	6	5	1401~1406
陽性対照***	50***	5	4	3	1501~1504

*: 基礎飼料 ** : キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒 (%) *** : ENU (mg/kg)

[#]: 投与用量一覧表参照

《投与用量一覧表》

投与週	アガリチン 低用量群	アガリチン 中用量群	アガリチン 高用量群
1	3 mg/kg (35 ppm)	20 mg/kg (231 ppm)	120 mg/kg (1389 ppm)
2	3 mg/kg (39 ppm)	20 mg/kg (257 ppm)	80 mg/kg (1030 ppm)
3	3 mg/kg (52 ppm)	250 ppm	1000 ppm
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13	62.5 ppm		750 ppm

17.2.2. 投与動物数

評価数5匹を確保するため、6匹に投与した。死亡が認められなかったことから、動物番号の小さい順に5匹を評価に使用した。陽性対照群については4匹に投与し、3匹を評価に使用した。評価に使用しなかった動物は、17.2.7.に記載する各器官（臓器）を

抽出し、凍結保存した。ただし、ゲノムDNAの抽出は行わなかった。

17.2.3. 投与方法および投与期間（回数）

被験物質およびキリン製品の投与経路は、混餌による経口投与とした。通常の飼育用基礎飼料（CRF-1）に被験物質あるいはキリン製品を一定濃度添加した配合飼料を自由に摂取させた。投与期間は91日間（13週間）とした。

陽性対照物質の投与経路は、トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異性試験に通常用いられている腹腔内投与とし、ディスポーザブルシリンジと23G注射針を用いて、1日1回、5日間連続投与した。投与容量は、体重100g当たり1.0mLとし、群分け時の体重を基に投与液量を決定した。

17.2.4. 発現期間

最終投与後3日間の発現期間の後（投与開始94日目）、17.2.7.に記載する器官（臓器）を抽出した。陽性対照群については、最終投与後3日に器官（臓器）を抽出した。

17.2.5. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検査・馴化期間終了時（群分け時、投与1日）、投与8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、91日および器官（臓器）抽出直前に電子天秤（PG2002あるいはPG802-S、メトラー・トレド）を用いて体重を測定した。陽性対照群については、動物搬入時、検査・馴化期間終了時（群分け時、投与1日）および器官（臓器）抽出直前に電子天秤（PG2002あるいはPG802-S）を用いて体重を測定した。

器官（臓器）抽出の日まで、1日1回、一般状態を観察した。

17.2.6. 摂餌量

全動物について、投与1日（投与開始日）以降91日（配合飼料除去時）まで、体重測定日に残餌および／あるいは給餌重量を電子天秤（PG802-S）を用いて測定し、測定日間の平均1日摂餌量（g/day）を算出した。なお、陽性対照群の摂餌量は測定しなかった。

被験物質摂取量（mg/kg/day）は、体重および摂餌量から算出した。

17.2.7. 摘出器官（臓器）および保存

動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈からの放血により安楽死させた動物より、肝臓、腎臓、肺、心臓、甲状腺、胃、精巣、大腸、大腿骨を抽出した。抽出後、速やかに肝臓、腎臓、肺、心臓、精巣の重量を測定した。各器官（臓器）の抽出および保存方法は以下の方法に従った（添付資料1参照）。

- 肝臓 左葉の外周近くを生検トレパン (BP-50F, 貝印) を用いて4ヵ所くり抜いた (添付資料1の病理組織標本に配慮してくりぬいた)。くり抜いた肝臓は、それぞれマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN₂) 中で凍結させた (遺伝子突然変異解析用)。
迅速に左葉の肝門部を含む組織片 (厚さ約 3 mm) を切り出し、十分な量の 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した (病理組織学検査用)。
残った辺縁部は、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
他の葉は、保存袋に入れそのままLN₂中で凍結させ、後日、国立がんセンター研究所に送付した (DNA付加体測定用)。陽性対照群の場合は、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 腎臓 左側の腎臓の皮膜を取り、メスで厚さ約 1~2 mmにスライス (水平断で4枚程度) した。各スライスをそれぞれ別のマイクロチューブに入れ、LN₂中で凍結させた (遺伝子突然変異解析用スライスを全量使用した)。その他の部位は保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
右側の腎臓は、腎門部を含む組織片 (厚さ約 5 mm) を切り出し、十分な量の 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した (病理組織学検査)。
残りの右側の腎臓は、保存袋に入れそのままLN₂中で凍結させ、後日、国立がんセンター研究所に送付した (DNA付加体測定用)。陽性対照群の場合は、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 肺 左肺、右肺を摘出した後、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 心臓 保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 甲状腺 気管から両側にある甲状腺を剥離し、マイクロチューブに入れ、LN₂中で凍結させた。
- 胃 胃を摘出し、切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。保存袋に入れ、LN₂中で凍結させた。
- 精巣 左右の精巣を摘出した後、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 大腸 (結腸) 結腸を摘出し、切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。マイクロチューブに入れ、LN₂中で凍結させた。
- 大腿骨 左右の大腿骨を摘出した後、チューブに入れ、LN₂で凍結させた。

凍結後は超低温フリーザー (MDF-493AT, 設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

突然変異頻度の算出は、腎臓、肝臓、骨髄、甲状腺、肺、前胃の順に実施した。

17.2.8. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに、組織破砕用緩衝液 (RNase を含む) 3 mL を分注し、氷中で冷却した。次いで、凍結組織片を入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした。

あらかじめ、0.5 mol/L ショ糖溶液 3 mL を入れて氷冷しておいた 15 mL 容の遠心管に、上記の組織破砕液を静かに重層し、遠心機 (LC-122) を用いて 3000 r/min (1710 G) で 10 分間遠心した。上清をスポイト等で除去し、冷却した RNase 含有ダウンス緩衝液を 3 mL を加え、よく懸濁させた (核/細胞懸濁液)。骨髄の場合は、適量の RNase 含有ダウンス緩衝液を用いて大腿骨から骨髄を洗い出し、ペッスルを用いてホモジナイズした (核/細胞懸濁液)。甲状腺の場合は、ダウンス型ホモジナイザーに RNase 含有ダウンス緩衝液 1.5 mL を分注し、氷中で冷却した。次いで、凍結組織片を入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした (核/細胞懸濁液)。

この核/細胞懸濁液にプロテナーゼ K 溶液 3 mL (甲状腺の場合は 1.5 mL) を加えて静かに混和転倒し、1~5 時間程度 (懸濁液が透明になるまで) 50°C に保温し、消化させた。等量 (約 6 mL) の Ph/Cl 混液を加え数回混和転倒し、さらに、10 分間ローターを用いて回転混和後、遠心機 (LC-122) を用いて 2500 r/min (1190 G) で 10 分間遠心した。上層 (水相) をトランスファーピペットで静かに回収し、新たな 15 mL 容の遠心管に移した。本操作を 2 回繰り返した。甲状腺の場合は、本操作を 1 回のみとした。また、加える Ph/Cl 混液の量は、回収した水相と等量とした。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (和光純薬工業) 混液 (容量比 24:1) を加え、数回混和転倒し、さらに、10 分間ローターを用いて回転混和後、2500 r/min (1190 G) で 10 分間遠心した。水相を回収し、新たな 50 mL 容の遠心管に移した。この遠心管にエタノールを徐々に加え、ゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA を 70% エタノールを入れたマイクロチューブに移し、約 10 分間放置した。次いで、遠心機 (MX-160) を用いて 13000 r/min (13240 G) で 10 分間遠心した。上清をマイクロピペットで可能な限り除いた後、チューブを室温に放置することにより残ったエタノールを蒸散させた。適量 (20~50 µL 程度) の TE 緩衝液を加え、一晚室温に放置し、DNA 残渣を溶解させた。DNA 溶液は、調製後冷蔵にて保存された。

全ての DNA 溶液は、最終報告書提出後 3 ヶ月以内に処分する。

17.2.9. 試験菌株の準備

容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに、LB 培養液 30 mL、マルトース水溶液 (200 mg/mL) 300 µL および 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液 300 µL を添加した。これに、凍結保存 (設定値: -80°C) 後溶解した大腸菌 hfl⁻ 株 (G1250) 懸濁液 50 µL を接種した。30°C、120 回/分の振盪条件で一晩培養し、前培養液とした。

容量 500 mL のバツフル付三角フラスコに、新鮮な LB 培養液 100 mL、マルトース水

溶液 (200 mg/mL) 1 mL および 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液 1 mL を添加し、次いで先の前培養液 1 mL を細菌した後、同様に 4~6 時間培養を続けた。培養終了後、菌懸濁液を遠心機 (LC-122) を用いて 1000 r/min (190 G) で 10 分間遠心した。上清を捨て、10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を加えて再懸濁した。

17.2.10. ゲノム DNA のパッケージング

Transpack (Stratagene) のチューブ (RED) を解凍した。300~600 µg/mL 程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液 10 µL をチューブ (RED) に加え、ピペッティングにより混合した後、30°C の条件で 90 分間インキュベートした。次いで、チューブ (BLUE) を解凍し、その 10 µL をチューブ (RED) に加えて、同様に混合した。さらに、30°C で 90 分間インキュベートを続けた。各チューブに SM 緩衝液 700 µL を加え、十分に攪拌した。

17.2.11. パッケージング DNA のプレーティング

大腸菌懸濁液を、総ブランク算出用 (タイター用) に 1 mL、変異ブランク算出用 (セレクション用) に 2 mL、それぞれのチューブに分注した。パッケージング溶液の全量 (およそ 700 µL) をセレクション用チューブに加えた後 (およそ 2700 µL) 攪拌し、室温で 20~30 分放置してファージを大腸菌に感染させた。本溶液 30 µL を 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 270 µL に加えて 10 倍希釈した。本希釈液 30 µL をタイター用チューブに加え、攪拌した。タイター用チューブに、トップアガー 17 mL を加えて混和し、LB 寒天培地に全量を重層した。セレクション用チューブには、トップアガー 16 mL を加え、タイター用と同様に LB 寒天培地に重層した。タイター用プレートは、37°C で 16~24 時間、セレクション用プレートは、24~25°C で 44~48 時間培養した。

総ブランク数が 30 万に達するまで上記のパッケージング操作を繰り返した。ただし、甲状腺のアッセイでは、総ブランク数が 30 万に達しなかったが、DNA 溶液を全て使い切ったため、パッケージング操作を終了した。

17.3. ブランクの計数

17.3.1. 総ブランク算出用 (タイター用)

タイター用プレートに出現したブランク数 (N) を計数し、下記の式を用いて総ブランク数を求めた。

$$\begin{aligned} \text{総ブランク数} &= \frac{N \times 300 (\mu\text{L}) \times 2700 (\mu\text{L})}{30 (\mu\text{L}) \times 30 (\mu\text{L})} \\ &= 900 \times N \end{aligned}$$

17.3.2. 変異ブランク算出用 (セレクション用)

セレクション用プレートに出現したブランク数を計数し、変異ブランク数とした。

17.3.3. 突然変異頻度算出

cII 遺伝子をレポーターとして用いた。

出現した変異ブランク数を総ブランク数で除して、当該組織における突然変異頻度とした。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{変異ブランク数}}{\text{総ブランク数}}$$

17.4. 結果の解析

各試験群の突然変異頻度は、条件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法: 有意水準上側 0.05) を用いて有意差を判定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群の突然変異頻度において統計学的な有意差が認められた場合は、陽性と判定した。ただし、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った。

18. 病理組織学検査および DNA シークエンス解析

病理組織学検査 (肝臓および腎臓) および DNA シークエンス解析は実施しなかった。

19. DNA 付加体測定用試料の送付

採取した肝臓および腎臓は、ドライアイス存在下で宅配業者の冷凍車 (-20°C 以下) により下記に送付した。DNA 付加体測定は、国立がんセンター研究所において実施された (添付資料 2 および 3 参照)。

試料送付先: 国立がんセンター研究所
がん予防基礎研究プロジェクト 戸塚 ゆかり
〒104-0045 東京都中央区築地 5 丁目 1 番 1 号
Tel: 03-3542-2511 Fax: 03-3543-9305

20. 試験結果

20.1. トランスジェニック試験

20.1.1. 腎臓

試験結果を Table 1 および Appendix 1 に示す。

陰性対照群では、総ブランク数 2,253,600 の内、ブランクが 43 出現し、その突然変異頻度は 19.1×10^{-6} 、各個体の平均値は 19.3×10^{-6} であった。

アガリチン投与群における突然変異頻度は、低用量群で 21.3×10^{-6} (変異体数/総ブ
ラーク数:472,207,700), 中用量群で 20.9×10^{-6} (同:612,922,300), 高用量群で 19.9×10^{-6}
(同:371,860,300), キリン製品投与群で 18.8×10^{-6} (同:442,340,000) であり、陰性対
照群と同等の頻度であった。各個体の平均値は、低用量群, 中用量群, 高用量群および
キリン製品投与群でそれぞれ 21.4×10^{-6} , 21.4×10^{-6} , 20.3×10^{-6} および 18.7×10^{-6} であ
った。

陽性対照群の突然変異頻度は、 172.1×10^{-6} (同:198/1,150,200) と顕著な増加を示し、
陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は
 177.2×10^{-6} であった。

20.1.2. 肝臓

試験結果を Table 2 および Appendix 2 に示す。

陰性対照群では、総ブラーク数 1,943,100 の内、ブラークが 49 出現し、その突然変異
頻度は 25.2×10^{-6} 、各個体の平均値で 25.6×10^{-6} であった。

アガリチン投与群における突然変異頻度は、低用量群で 25.0×10^{-6} (変異体数/総ブ
ラーク数:421,681,200), 中用量群で 23.8×10^{-6} (同:411,719,900), 高用量群で 19.5×10^{-6}
(同:371,900,800), キリン製品投与群で 22.6×10^{-6} (同:421,854,900) であり、陰性対
照群と同等の頻度であった。各個体の平均値は、低用量群, 中用量群, 高用量群および
キリン製品投与群でそれぞれ 25.0×10^{-6} , 23.9×10^{-6} , 19.2×10^{-6} および 22.4×10^{-6} であ
った。

陽性対照群の突然変異頻度は、 156.7×10^{-6} (同:144/918,900) と顕著な増加を示し、
陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は
 156.9×10^{-6} であった。

20.1.3. 骨髄

試験結果を Table 3 および Appendix 3 に示す。

陰性対照群では、総ブラーク数 2,412,900 の内、ブラークが 37 出現し、その突然変異
頻度は 15.3×10^{-6} 、各個体の平均値で 14.8×10^{-6} であった。

アガリチン投与群における突然変異頻度は、低用量群で 18.0×10^{-6} (変異体数/総ブ
ラーク数:472,617,200), 中用量群で 14.9×10^{-6} (同:392,614,500), 高用量群で 14.0×10^{-6}
(同:342,423,700), キリン製品投与群で 14.0×10^{-6} (同:282,003,400) であり、陰性対
照群と同等の頻度であった。各個体の平均値は、低用量群, 中用量群, 高用量群および
キリン製品投与群でそれぞれ 16.0×10^{-6} , 15.0×10^{-6} , 13.8×10^{-6} および 14.1×10^{-6} であ
った。

陽性対照群の突然変異頻度は、 431.0×10^{-6} (同:493/1,143,900) と顕著な増加を示し、
陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は

445.1×10^{-6} であった。

20.1.4. 甲状腺

試験結果を Table 4 および Appendix 4 に示す。

陰性対照群では、総ブラーク数 1,624,500 の内、ブラークが 34 出現し、その突然変異
頻度は 20.9×10^{-6} 、各個体の平均値で 21.1×10^{-6} であった。

アガリチン投与群における突然変異頻度は、低用量群で 21.5×10^{-6} (変異体数/総ブ
ラーク数:311,442,700), 中用量群で 19.3×10^{-6} (同:271,395,900), 高用量群で 19.7×10^{-6}
(同:251,267,200), キリン製品投与群で 23.4×10^{-6} (同:291,237,500) であり、陰性対
照群と同等の頻度であった。各個体の平均値は、低用量群, 中用量群, 高用量群および
キリン製品投与群でそれぞれ 21.5×10^{-6} , 19.1×10^{-6} , 20.0×10^{-6} および 23.7×10^{-6} であ
った。

陽性対照群の突然変異頻度は、 75.8×10^{-6} (同:54/712,800) と顕著な増加を示し、陰
性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は 75.8
 $\times 10^{-6}$ であった。

20.1.5. 肺

試験結果を Table 5 および Appendix 5 に示す。

陰性対照群では、総ブラーク数 1,971,000 の内、ブラークが 41 出現し、その突然変異
頻度は 20.8×10^{-6} 、各個体の平均値は 20.9×10^{-6} であった。

アガリチン投与群における突然変異頻度は、低用量群で 21.8×10^{-6} (変異体数/総ブ
ラーク数:361,650,600), 中用量群で 22.3×10^{-6} (同:371,659,600), 高用量群で 20.4×10^{-6}
(同:381,864,800), キリン製品投与群で 18.5×10^{-6} (同:341,840,500) であり、陰性対
照群と同等の頻度であった。各個体の平均値は、低用量群, 中用量群, 高用量群および
キリン製品投与群でそれぞれ 21.8×10^{-6} , 22.1×10^{-6} , 20.8×10^{-6} および 18.3×10^{-6} であ
った。

陽性対照群の突然変異頻度は、 96.1×10^{-6} (同:124/1,289,700) と顕著な増加を示し、
陰性対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は
 102.2×10^{-6} であった。

20.1.6. 前胃

試験結果を Table 6 および Appendix 6 に示す。

陰性対照群では、総ブラーク数 1,648,800 の内、ブラークが 34 出現し、その突然変異
頻度は 20.6×10^{-6} 、各個体の平均値は 20.8×10^{-6} であった。

アガリチン投与群における突然変異頻度は、低用量群で 23.1×10^{-6} (変異体数/総ブ
ラーク数:411,771,200), 中用量群で 19.9×10^{-6} (同:341,705,500), 高用量群で 21.3×10^{-6}

(同: 36/1,687,500), キリン製品投与群で 17.4×10^{-6} (同: 30/1,724,400) であり, 陰性対照群と同等の頻度であった。各個体の平均値は, 低用量群, 中用量群, 高用量群およびキリン製品投与群でそれぞれ 23.4×10^{-6} , 19.9×10^{-6} , 21.0×10^{-6} および 17.6×10^{-6} であった。

陽性対照群の突然変異頻度は, 160.0×10^{-6} (同: 147/918,900) と顕著な増加を示し, 媒体対照群と比べて統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められた。各個体の平均値は 160.1×10^{-6} であった。

20.2. 観察および測定

20.2.1. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 7 および 10 に示す。

アガリチン高用量群に一般状態の変化として, よろめき歩行またはひきずり歩行, 鼻端の汚れ, 削瘦および被毛の汚れが観察された。

よろめき歩行は, 投与 8 週頃から散見され, 投与 10 週頃からは全例 (6/6 例) に観察された。また, 投与 12 週頃よりよろめき歩行が悪化し, ひきずり歩行が観察された。鼻端の汚れは, 投与 8 週頃から散見され, 投与 13 週頃からは全例 (6/6 例) に観察された。削瘦は, 投与 9 週頃から 3/6 例に観察され, 投与 12 週頃より 5/6 例に認められた。被毛の汚れは, 投与 12 週頃より 1/6 例に観察された。

アガリチン高用量群では, 投与 2 週頃から有意な体重減少が観察され, 器官 (臓器) 摘出直前の体重は平均で 202 g 減少 (およそ 54% の減少) した。また, 中用量群では, 一般状態の顕著な変化は観察されなかったが, 器官 (臓器) 摘出直前の体重は平均で 85 g 減少 (およそ 23% の減少) した。

他の投与群および陽性対照群では, 毒性徴候を示す一般状態の変化および有意な体重減少は観察されなかった。

20.2.2. 摂餌量

試験結果を Appendix 8 に示す。

アガリチン高用量群では, 摂餌量が投与 1 週から陰性対照群と比較して, 有意な低値を示し, 投与期間中の総摂餌量は陰性対照群に対して, 44% 減少した。また, 中用量群では, 投与 3 週から陰性対照群と比較して, 15% 減少した。

他の投与群では, 有意な摂餌量の減少は示さなかった。

20.2.3. 被験物質摂取量

試験結果を Appendix 9 に示す。

アガリチン低用量群, 中用量群, 高用量群およびキリン製品投与群の投与期間中の平均被験物質摂取量は, 3.0, 13.3, 47.1 および 2711.2 mg/kg/day であった。

20.3. 病理学検査

20.3.1. 器官 (臓器) 重量測定

試験結果を Appendix 11 および 12 に示す。

アガリチン高用量群では, 肝臓, 腎臓, 肺, 心臓および精巣の絶対重量が陰性対照群と比較して明らかな低値を示した。中用量群の肝臓, 肺および心臓においても僅かな減少が観察された。

その他の投与群では, いずれの測定器官 (臓器) にも陰性対照群と間に明らかな差は認められなかった。

アガリチン投与群では, 腎臓, 肺, 心臓および精巣の相対重量が用量に依存して増加した。

20.3.2. 肉眼所見

試験結果を Appendix 13 に示す。

アガリチン投与群では, 被験物質投与の影響と考えられる変化として, 胸骨の変形が中用量群の 5/6 例および高用量群の全例に観察された。なお, 胸骨の変形は, キリン製品投与群の 2/6 例においても観察された。更に, 高用量群では, 胸腺の萎縮が全例に, 右肺の赤色斑が 1/6 例に観察された。

20.4. DNA 付加体解析

試験結果を添付資料 3 に示す。

アガリチン投与群 (低用量群, 中用量群, 高用量群) およびキリン製品投与群の肝臓および腎臓の DNA 中には, アガリチン由来の既知の DNA 付加体である 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dGuo (8-HMP-dGuo) および 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dAdo (8-HMP-dAdo) の生成は確認されなかった。

21. 考察および結論

アガリチンの標的器官 (臓器) における遺伝子突然変異誘発性を検討するため, トランスジェニックラット (Big Blue[®]) を用いて遺伝子突然変異試験を実施した。

その結果, アガリチン投与群およびキリン製品投与群において, 腎臓, 肝臓, 骨髄, 甲状腺, 肺および前胃における突然変異頻度は, 陰性対照群と比較していずれも統計学的に有意な増加を示さなかった。

アガリチンの代謝産物と考えられる 4-(hydroxymethyl)phenylhydrazine (HMBD) から生成される既知の DNA 付加体である, 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dGuo (8-HMP-dGuo) および 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dAdo (8-HMP-dAdo) の生成は確認されなかった。

陽性対照の N-ニトロソ-N-エチル尿素は, 検討した 6 器官 (臓器) とともに陰性対照群と比べて統計学的に有意 (いずれも $p \leq 0.05$) な遺伝子突然変異を誘発したことから, 当該

試験が適切な条件下でなされたと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、アガリチンのトランスジェニックラット (Big Blue®) の腎臓、肝臓、骨髄、甲状腺、肺および前胃に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された。

アガリチンは、細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験) で陽性を示しているが、トランスジェニックラットを用いた *in vivo* の試験では、遺伝子突然変異の誘発を確認することはできなかった。

22. 参考とした資料

- Gossen, J. A., *et al.* : Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 7971~7975, 1989.
- Gossen, J. A., and Vijg, J. : A selective system for *lacZ*- phage using a galactose-sensitive *E. coli* host. Biotechniques, 14, 326~330, 1993.
- Gossen, J. A., *et al.* : Application of galactose-sensitive *E. coli* strains as selective hosts for *lacZ*- plasmids. Nucleic Acids Res., 20, 3245~, 1992.
- Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O.: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, Mutat. Res., 9: 527-549, 1970.
- Takayoshi Suzuki, Satoru Itoh, Madoka Nakajima, Noriyuki Hachiya and Takumi Hara. Target organ and time-course in the Mutagenicity of five carcinogens in Muta™ Mouse: a summary report of the second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by JEMS/MMS. Mutat. Res. 1999; 444: 259-268.
- Ulrich Wahnshaffe, Janet Kielhorn, Annette Bitsch and Inge Mangelsdorf.: Transgenic animal Mutagenicity assays. International programme on chemical safety (ICPS) environmental health criteria (EHC), Post Task Group WHO, Jan. 2005.
- 組換え DNA 実験指針研究会 編: 組換え DNA 実験指針—解説・Q&A—, 科学技術庁ライフサイエンス課 監修, 第一法規, 1991.
- 改訂組換え DNA 実験指針研究会 編: 組換え DNA 実験指針—解説・Q&A—, 科学技術庁ライフサイエンス課 監修, 第一法規, 1997.
- SAS/STAT User's Guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC; 2000.

23. 試験関係資料の保存

当該試験の資料は、安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後5年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターで協議の上別途定める。

24. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事象および試験計画書に従わなかったこと

1. [内容]

試験計画書において、購入動物数は60匹と記載しているが、実際は59匹しか入荷しなかった。

[判定]

使用動物は34匹であることから、群分けの際に十分な動物が確保されていた。したがって、本逸脱が試験の信頼性に影響を及ぼすことはないとは判断した。

2. [内容]

投与1週において、アガリチン高用量群の摂餌量が減少し、体重増加抑制がみられた。用量を120 mg/kgから80 mg/kgに変更した。

したがって、高用量群に給餌されていた120 mg/kg群用アガリチン配合飼料を回収し、回収した配合飼料800.2 gと基礎飼料400.2 gを混合し、用量80 mg/kgの配合飼料を製造した。製造した用量80 mg/kgの配合飼料を高用量群に給餌した。

[判定]

投与1週における摂餌量の減少および体重増加抑制から、用量を変更することは、遺伝子突然変異データを得るために必要な措置であると判断した。その結果、投与終了日まで全例が生存し、評価動物数を得ることができたため本逸脱が試験の信頼性に及ぼす影響はないものと推測された。

3. [内容]

アガリチン投与群における投与1および2週の摂餌量の減少および体重増加抑制を考慮し、アガリチン中用量群の用量を20 mg/kgから250 ppmに、高用量群の用量を80 mg/kgから1000 ppmに変更した。

したがって、中用量群に給餌されていた20 mg/kg群用アガリチン配合飼料を回収し、回収した配合飼料877.2 gと基礎飼料322.8 gを混合し、基礎飼料を混合してアガリチン250 ppm配合飼料を調製した。調製した飼料をアガリチン中用量群に給餌した。また、高用量群には、アガリチン1000 ppm配合飼料を給餌した。

[判定]

アガリチン配合飼料に対する忌避がみられ、明確な体重減少がみられたことから、用量の変更は、遺伝子突然変異データを採取するため必要な措置であると判断した。また、単位の表記を mg/kg から ppm に変更しても、最終的に被験物質摂取量が確認されているため問題ないと考えた。

4. [内容]

投与 84 日目において、動物番号 1301 の「よろめき歩行」が悪化し「ひきずり歩行」になり、自動給水ノズルからの飲水が困難になった。水の摂取を可能にするため、寒天（商品名：トランスポートアガー、オリエンタル酵母工業）を与えた。

[判定]

飲水が困難となった 84 日目以降、他の動物と比べ 1301 の摂餌量および体重の低下が著しくなったため、遺伝子突然変異データを得ることを最優先させる上で必要な措置であると判断した。

Exp. No. A260(079-388)

Table 1: Mutant frequency (MF) of cII gene in kidney of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutant plaques	Mutant frequency ($\times 10^6$)	P-value
Commercial diet a)	0	5	2,253,600	43	19.1	-
Agaritine	62.5 b)	5	2,207,700	47	21.3	0.3395
	250 c)	5	2,922,300	61	20.9	0.3638
	750 d)	5	1,860,300	37	19.9	0.4696
Product B	5 (%)	5	2,340,000	44	18.8	0.5698
ENU e)	50 (mg/kg)	3	1,150,200	198	172.1 *	<0.0001

* : $p < 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 ml/kg, expression time: 3 days)

Table 2. Mutant frequency (MF) of *cII* gene in liver of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutant plaques	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	P-value
Commercial diet a)	0	5	1,943,100	49	25.2	-
Agaritine	62.5 b)	5	1,681,200	42	25.0	0.5585
	250 c)	5	1,719,900	41	23.8	0.6440
	750 d)	5	1,900,800	37	19.5	0.9034
Product B	5 (E)	5	1,854,900	42	22.6	0.7312
ENU e)	50 (mg/kg)	3	918,900	144	156.7 *	<0.0001

* : $p < 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a) : Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b) : Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c) : Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d) : Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e) : Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time:3 days)

Table 3. Mutant frequency (MF) of *cII* gene in bone marrow of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutant plaques	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	P-value
Commercial diet a)	0	5	2,412,900	37	15.3	-
Agaritine	62.5 b)	5	2,617,200	47	18.0	0.2713
	250 c)	5	2,614,500	39	14.9	0.5934
	750 d)	5	2,423,700	34	14.0	0.6891
Product B	5 (E)	5	2,003,400	28	14.0	0.6885
ENU e)	50 (mg/kg)	3	1,143,900	493	431.0 *	<0.0001

* : $p < 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a) : Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b) : Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c) : Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d) : Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e) : Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time:3 days)

Table 4. Mutant frequency (MF) of *cII* gene in thyroid gland of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutant plaques	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	P-value
Commercial diet a)	0	5	1,624,500	34	20.9	-
Agaritine	62.5 b)	5	1,442,700	31	21.5	0.5063
	250 c)	5	1,395,900	27	19.3	0.6669
	750 d)	5	1,267,200	25	19.7	0.6370
Product B	5 (%)	5	1,237,500	29	23.4	0.3726
ENU e)	50 (mg/kg)	3	712,800	54	75.8 *	<0.0001

* : $p < 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Table 5. Mutant frequency (MF) of *cII* gene in lung of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutant plaques	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	P-value
Commercial diet a)	0	5	1,971,000	41	20.8	-
Agaritine	62.5 b)	5	1,650,600	36	21.8	0.4617
	250 c)	5	1,659,600	37	22.3	0.4227
	750 d)	5	1,864,800	38	20.4	0.5804
Product B	5 (%)	5	1,840,500	34	18.5	0.7345
ENU e)	50 (mg/kg)	3	1,289,700	124	96.1 *	<0.0001

* : $p < 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Table 6. Mutant frequency (MF) of *cII* gene in forestomach of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period: 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutant plaques	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	P-value
Commercial diet a)	0	5	1,648,800	34	20.6	-
Agaritine	62.5 b)	5	1,771,200	41	23.1	0.3514
	250 c)	5	1,705,500	34	19.9	0.6030
	750 d)	5	1,687,500	36	21.3	0.4912
Product B	5 (%)	5	1,724,400	30	17.4	0.7894
ENU e)	50 (mg/kg)	3	918,900	147	160.0 *	<0.0001

* : $p < 0.05$, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 1. Induction of mutation in kidney of transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period: 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Commercial diet a)	0	1001	470,700	11	23.4	19.3 \pm 3.9
		1002	415,800	7	16.8	
		1003	378,900	9	23.8	
		1004	405,900	7	17.2	
		1005	582,300	9	15.5	
Agaritine	62.5 b)	1101	302,400	7	23.1	21.4 \pm 6.7
		1102	379,800	7	18.4	
		1103	495,900	16	32.3	
		1104	475,200	8	16.8	
		1105	554,400	9	16.2	
	250 c)	1201	661,500	16	24.2	21.4 \pm 4.7
		1202	376,200	10	26.5	
		1203	619,200	9	14.5	
		1204	496,800	11	22.1	
		1205	768,500	15	19.5	
	750 d)	1301	399,600	6	15.0	20.3 \pm 5.0
		1302	371,700	7	18.8	
		1303	365,400	9	24.5	
		1304	302,400	8	26.5	
		1305	421,200	7	16.6	
Product B	5 (%)	1401	485,100	7	14.4	18.7 \pm 5.4
		1402	409,500	5	12.2	
		1403	461,700	11	23.8	
		1404	451,800	11	24.3	
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	422,100	71	168.2	177.2 \pm 76.7
		1502	398,700	42	105.3	
		1503	329,400	85	258.0	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 2. Induction of mutation in liver of transgenic rats treated with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Commercial diet a)	0	1001	306,000	10	32.7	25.6 \pm 5.1
		1002	377,100	9	23.9	
		1003	504,900	10	19.8	
		1004	450,900	13	28.8	
		1005	304,200	7	23.0	
Agaritine	62.5 b)	1101	332,100	9	27.1	25.0 \pm 3.4
		1102	303,300	7	23.1	
		1103	375,300	9	24.0	
		1104	337,500	10	29.6	
		1105	333,000	7	21.0	
	250 c)	1201	330,300	7	21.2	23.9 \pm 5.7
		1202	330,300	11	33.3	
		1203	324,000	8	24.7	
		1204	327,600	6	18.3	
		1205	407,700	9	22.1	
Product B	750 d)	1301	306,900	5	16.3	19.2 \pm 2.1
		1302	438,300	9	20.5	
		1303	332,100	6	18.1	
		1304	462,600	10	21.6	
		1305	360,900	7	19.4	
Product B	5 (e)	1401	363,600	7	19.3	22.4 \pm 3.4
		1402	381,600	10	26.2	
		1403	386,100	8	20.7	
		1404	302,400	6	19.8	
		1405	421,200	11	26.1	
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	304,200	57	187.4	156.9 \pm 28.0
		1502	305,100	46	150.8	
		1503	309,600	41	132.4	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-6; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 3. Induction of mutation in bone marrow of transgenic rats treated with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Commercial diet a)	0	1001	482,400	8	16.6	14.8 \pm 4.9
		1002	681,300	11	16.1	
		1003	302,400	2	6.6	
		1004	355,500	7	19.7	
		1005	591,300	9	15.2	
Agaritine	62.5 b)	1101	318,600	4	12.6	16.0 \pm 8.2
		1102	702,000	20	28.5	
		1103	532,800	8	15.0	
		1104	332,100	2	6.0	
		1105	731,700	13	17.8	
	250 c)	1201	565,200	8	14.2	15.0 \pm 1.6
		1202	552,600	7	12.7	
		1203	597,600	10	16.7	
		1204	594,900	9	15.1	
		1205	304,200	5	16.4	
Product B	750 d)	1301	488,700	7	14.3	13.8 \pm 3.5
		1302	349,200	3	8.6	
		1303	486,000	9	18.5	
		1304	351,900	5	14.2	
		1305	747,900	10	13.4	
Product B	5 (e)	1401	386,100	4	10.4	14.1 \pm 3.5
		1402	386,100	7	18.1	
		1403	369,900	6	16.2	
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	310,500	123	396.1	445.1 \pm 140.0
		1502	496,800	167	336.2	
		1503	336,600	203	603.1	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 4. Induction of mutation in thyroid gland of transgenic rats treated with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Commercial diet a)	0	1001	379,800	6	15.8	21.1 \pm 3.4
		1002	326,700	8	24.5	
		1003	347,400	8	23.0	
		1004	266,400	6	22.5	
		1005	304,200	6	19.7	
Agaritine 62.5 b)	62.5 b)	1101	239,400	7	29.2	21.5 \pm 5.3
		1102	356,400	8	22.4	
		1103	268,200	4	14.9	
		1104	315,000	7	22.2	
		1105	263,700	5	19.0	
250 c)	250 c)	1201	228,600	3	13.1	19.1 \pm 4.5
		1202	314,100	5	15.9	
		1203	312,300	7	22.4	
		1204	251,100	5	19.9	
		1205	290,700	7	24.1	
750 d)	750 d)	1301	233,100	4	17.2	20.0 \pm 2.3
		1302	221,400	5	22.6	
		1303	180,800	4	22.1	
		1304	307,800	6	19.5	
		1305	324,000	6	18.5	
Product B 5 (%)	5 (%)	1401	276,300	5	18.1	23.7 \pm 6.3
		1402	230,400	5	21.7	
		1403	234,000	6	25.6	
		1404	236,700	8	33.8	
		1405	260,100	5	19.2	
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	207,900	16	77.0	75.8 \pm 11.5
		1502	253,800	22	86.7	
		1503	251,100	16	63.7	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 5. Induction of mutation in lung of transgenic rats treated with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Commercial diet a)	0	1001	347,400	7	20.1	20.9 \pm 1.9
		1002	309,600	6	19.4	
		1003	343,800	8	23.3	
		1004	400,500	9	22.5	
		1005	569,700	11	19.3	
Agaritine 62.5 b)	62.5 b)	1101	329,400	6	18.2	21.8 \pm 4.3
		1102	315,900	7	22.2	
		1103	355,500	10	28.1	
		1104	304,200	7	23.0	
		1105	345,600	6	17.4	
250 c)	250 c)	1201	311,400	5	16.1	22.1 \pm 5.0
		1202	392,400	10	25.5	
		1203	313,200	9	28.7	
		1204	310,500	6	19.3	
		1205	352,100	7	21.1	
750 d)	750 d)	1301	320,400	7	21.8	20.8 \pm 5.3
		1302	304,200	9	29.6	
		1303	488,700	9	18.4	
		1304	441,900	8	18.1	
		1305	309,600	5	16.1	
Product B 5 (%)	5 (%)	1401	375,300	7	18.7	18.3 \pm 3.5
		1402	422,100	10	23.7	
		1403	340,200	6	17.6	
		1404	356,200	5	14.0	
		1405	344,700	6	17.4	
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	432,000	35	81.0	102.2 \pm 36.4
		1502	552,600	45	81.4	
		1503	305,100	44	144.2	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 6. Induction of mutation in forestomach of transgenic rats treated with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
Commercial diet a)	0	1001	306,000	7	22.9	20.8 \pm 2.6
		1002	355,500	6	16.9	
		1003	354,600	7	19.7	
		1004	301,500	7	23.2	
		1005	331,200	7	21.1	
Agaritine	62.5 b)	1101	322,200	9	27.9	23.4 \pm 3.3
		1102	318,600	8	25.1	
		1103	304,200	6	19.7	
		1104	342,000	8	23.4	
		1105	484,200	10	20.7	
	250 c)	1201	343,800	9	26.2	19.9 \pm 4.6
		1202	322,200	5	15.5	
		1203	370,800	6	16.2	
		1204	323,100	6	18.6	
		1205	345,600	8	23.1	
	750 d)	1301	306,000	4	13.1	21.0 \pm 7.5
		1302	352,800	6	17.0	
		1303	358,200	8	22.3	
		1304	306,900	6	19.6	
		1305	363,600	12	33.0	
Product B	5 (%)	1401	372,600	6	16.1	17.6 \pm 3.9
		1402	330,300	7	21.2	
		1403	360,000	5	13.9	
		1404	315,900	7	22.2	
		1405	345,600	5	14.5	
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	305,100	49	160.6	160.1 \pm 17.7
		1502	304,200	54	177.5	
		1503	309,600	44	142.1	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 7. Body weight in the gene mutation assay using transgenic rats treated with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Exp. No. A260(079-388)

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Body weight of each period (g)							
			Received	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29		
Commercial diet a)	0	1001	108	144	178	207	231	254		
		1002	105	145	178	210	235	256		
		1003	100	137	168	200	225	249		
		1004	105	136	162	190	213	236		
		1005	101	135	161	188	214	233		
		1006	114	156	192	233	258	281		
		Means \pm S.D.	106 \pm 5	142 \pm 8	173 \pm 12	205 \pm 16	229 \pm 17	252 \pm 17		
		Agaritine	62.5 b)	1101	107	147	178	210	230	252
				1102	101	145	173	205	230	249
				1103	116	146	173	205	227	249
1104	113			156	173	209	237	253		
1105	113			152	174	215	237	253		
1106	108			152	174	199	224	244		
Means \pm S.D.	110 \pm 5			146 \pm 2	173 \pm 3	207 \pm 5	230 \pm 5	250 \pm 3		
	250 c)			1201	111	145	168	194	216	232
				1202	97	141	169	194	212	225
				1203	111	150	172	198	212	224
		1204	113	148	174	201	219	232		
		1205	121	156	184	211	233	246		
		1206	105	139	167	193	211	222		
		Means \pm S.D.	110 \pm 8	147 \pm 6	172 \pm 6	199 \pm 7	217 \pm 6	230 \pm 9		
		Product B	5 (%)	1301	109	143	144	152	161	171
				1302	102	140	144	148	153	160
				1303	102	143	145	151	170	179
1304	108			139	138	150	156	168		
1305	96			138	135	145	153	154		
1306	97			134	136	149	158	168		
Means \pm S.D.	102 \pm 5			140 \pm 3	141 \pm 4	149 \pm 2	159 \pm 6	167 \pm 9		
ENU e)	50 (mg/kg)			1501	107	152	152	191	211	229
				1502	114	150	154	202	219	234
				1503	106	138	144	170	219	237
		1504	105	143	144	176	230	249		
		1505	105	143	144	170	216	233		
		1506	96	136	164	192	218	232		
Means \pm S.D.	102 \pm 8	141 \pm 8	170 \pm 4	197 \pm 6	219 \pm 6	236 \pm 7				

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)
-: Not measured

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Body weight of each period (g)									
			Day 36	Day 43	Day 50	Day 57	Day 64	Day 71				
Commercial diet a)	0	1001	271	282	306	322	340	351				
		1002	274	294	310	325	337	344				
		1003	265	281	295	301	316	329				
		1004	256	271	290	299	317	330				
		1005	253	269	283	294	303	313				
		1006	300	316	316	322	332	338				
		Means±D.	270±17	287±17	300±12	313±18	328±18	338±17				
		Agaritine	62.5 b)	1101	274	289	290	317	332	339		
				1102	269	286	297	315	329	335		
				1103	278	293	309	309	318	330		
1104	288			288	298	298	312	320				
1105	272			286	296	310	321	334				
1106	282			280	290	306	320	329				
Means±D.	268±5			283±4	292±4	309±7	322±7	331±7				
250 c)				1201	245	235	261	269	279	285		
				1202	234	246	260	259	266	270		
				1203	245	245	280	264	270	268		
		1204	232	245	281	271	276	279				
		1205	241	233	272	278	290	296				
		1206	232	244	252	257	262	267				
		Means±D.	239±8	251±8	258±9	266±8	274±10	278±11				
		750 d)		1301	175	178	179	174	174	178		
				1302	168	172	172	171	175	180		
				1303	187	182	184	181	187	180		
1304	171			178	181	185	181	182				
1305	161			163	162	165	161	172				
1306	174			176	182	185	180	179				
Means±D.	173±9			177±9	176±8	176±7	179±8	181±7				
Product B	5 (g)			1401	241	251	261	269	282	287		
				1402	242	258	264	273	282	290		
				1403	247	262	277	285	297	303		
		1404	264	276	286	295	304	312				
		1405	245	260	271	279	293	305				
		1406	243	253	261	272	285	293				
		Means±D.	247±9	260±9	270±10	279±10	291±9	298±10				

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

Appendix 7. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Body weight of each period (g)						
			Day 78	Day 85	Day 91	Sacrificed #	Gain (g)		
Commercial diet a)	0	1001	363	370	381	387	243		
		1002	356	369	384	376	239		
		1003	337	346	354	360	223		
		1004	342	353	360	366	230		
		1005	323	332	340	347	212		
		1006	371	384	392	397	241		
		Means±D.	349±18	359±19	367±19	374±19	231±12		
		Agaritine	62.5 b)	1101	348	356	370	375	228
				1102	348	356	385	370	225
				1103	336	348	360	372	224
1104	328			341	344	352	204		
1105	346			354	361	369	217		
1106	350			342	359	368	222		
Means±D.	341±8			351±6	360±9	368±8	220±9		
250 c)				1201	289	293	285	284	149
				1202	270	278	282	284	143
				1203	273	282	282	279	129
		1204	281	282	293	291	143		
		1205	280	286	303	304	148		
		1206	278	277	278	281	142		
		Means±D.	280±11	285±10	289±10	289±9	142±7		
		750 d)		1301	177	149	143	136	-7
				1302	178	181	182	189	49
				1303	189	189	175	185	42
1304	192			193	196	199	60		
1305	172			169	173	176	36		
1306	176			177	161	146	-5		
Means±D.	181±8			176±16	172±18	172±23	33±25		
Product B	5 (g)			1401	283	300	303	306	172
				1402	285	297	300	302	159
				1403	312	315	319	320	185
		1404	319	323	329	330	178		
		1405	311	318	316	319	171		
		1406	297	304	308	310	174		
		Means±D.	305±11	310±11	313±11	315±10	173±9		
		ENU e)	50 (mg/kg)	1501	-	-	-	154	2
				1502	-	-	-	155	1
				1503	-	-	-	144	6
1504	-			-	-	144	1		
Means±D.	-	-	-	149±6	3±2				

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
 e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 ml/kg, expression time:3 days)
 f): Gain=Sacrificed-Day I (Allocated)

-: Not measured
 #: The positive control group was sacrificed on Day 8.

Appendix 8. Food consumption in the gene mutation assay using transgenic rats treated with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Food consumption (g/week)						
			Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5		
Commercial diet a)	0	1001	99	95	94	101	108		
		1002	95	104	105	99	103		
		1003	96	102	105	106	106		
		1004	96	95	94	97	104		
		1005	90	90	95	96	102		
		1006	101	118	118	120	120		
		Means±D.	96±4	101±10	102±9	102±9	107±7		
		Agaritine	62.5 b)	1101	90	98	98	102	104
				1102	96	99	101	99	106
				1103	100	101	99	102	97
				1104	93	95	99	103	103
				1105	91	102	101	106	104
				1106	92	95	98	98	106
Means±D.	94±4			98±3	99±1	102±3	103±3		
Product B	5 (f)			1201	85	86	88	84	91
				1202	87	93	90	88	80
				1203	91	89	86	89	90
				1204	85	92	92	90	90
				1205	93	95	100	96	90
				1206	91	94	96	91	93
		Means±D.	89±3	92±3	92±5	90±4	89±5		
		Agaritine	750 d)	1301	56	65	63	66	64
				1302	47	58	60	60	60
				1303	52	58	71	74	66
				1304	50	67	58	63	61
				1305	50	67	63	58	60
				1306	52	59	59	66	63
Means±D.	51±3			62±4	62±5	65±5	62±2		
Product B	5 (g)			1401	90	96	94	98	92
				1402	89	97	95	94	89
				1403	86	93	96	90	96
				1404	91	96	100	99	102
				1405	90	87	95	93	94
				1406	81	92	104	90	91
		Means±D.	88±4	94±4	97±4	94±4	94±5		

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

Appendix 8. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Food consumption (g/week)							
			Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10			
Commercial diet a)	0	1001	111	104	111	110	110	110	110	
		1002	100	107	110	109	105	105	105	
		1003	97	105	104	102	102	102	102	
		1004	102	98	102	104	104	108	108	
		1005	97	100	99	103	103	102	102	
		1006	113	108	113	117	110	110	110	
		Means±D.	103±7	104±4	107±6	108±6	106±4	106±4		
		Agaritine	62.5 b)	1101	102	101	106	106	103	103
				1102	105	102	105	106	101	101
				1103	95	98	103	99	104	104
				1104	97	90	95	98	96	96
				1105	101	98	104	98	106	106
				1106	102	102	108	107	105	105
Means±D.	100±4			99±5	104±5	102±4	103±4	103±4		
Product B	250 c)			1201	85	86	92	94	94	94
				1202	87	83	88	89	86	86
				1203	85	83	92	85	78	78
				1204	89	88	91	86	88	88
				1205	91	90	95	95	97	97
				1206	87	90	86	86	86	86
		Means±D.	87±2	87±3	91±3	89±4	89±7	89±7		
		Agaritine	750 d)	1301	59	58	54	57	62	62
				1302	59	58	51	59	56	56
				1303	67	55	56	63	54	54
				1304	60	60	61	66	62	62
				1305	55	56	55	57	57	57
				1306	63	60	63	59	60	60
Means±D.	61±4			58±2	57±4	60±4	59±3	59±3		
Product B	5 (g)			1401	89	85	96	94	93	93
				1402	92	89	93	89	89	89
				1403	90	91	93	94	94	94
				1404	97	94	92	95	91	91
				1405	94	90	90	99	99	96
				1406	87	89	90	95	95	95
		Means±D.	92±4	90±3	92±2	94±3	94±3	94±3		

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

Appendix 8. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Food consumption (g/week)				Total	
			Week 11	Week 12	Week 13	Week 14		
Commercial diet a)	0	1001	108	106	97	1354		
		1002	107	110	91	1345		
		1003	104	100	90	1319		
		1004	107	107	93	1307		
		1005	102	98	90	1264		
		1006	125	124	104	1491		
		Means±D.	109±8	106±9	94±5	1347±78		
		Agaritine	62.5 b)	1101	102	101	90	1303
				1102	106	100	93	1318
				1103	98	102	90	1288
1104	98			101	80	1250		
1105	104			104	89	1308		
1106	111			104	93	1321		
Means±D.	103±5			102±2	89±5	1298±26		
Product B	5 (%)			1201	90	89	72	1136
				1202	87	84	71	1113
				1203	85	86	73	1112
		1204	83	85	74	1133		
		1205	90	90	79	1201		
		1206	87	84	77	1148		
		Means±D.	87±3	86±3	74±3	1141±33		
		Product B	5 (%)	1301	56	31	34	725
				1302	56	56	51	738
				1303	61	57	46	780
1304	59			62	51	780		
1305	57			53	48	737		
1306	54			55	36	748		
Means±D.	57±2			53±1	44±8	751±23		
Product B	5 (%)			1401	91	89	78	1186
				1402	89	88	72	1168
				1403	94	93	76	1187
		1404	97	96	82	1232		
		1405	92	93	77	1190		
		1406	91	90	77	1172		
		Means±D.	92±3	92±3	77±3	1189±23		

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

Appendix 9. Test substance intake in the gene mutation assay using transgenic rats treated with agaritine [Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period; 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Test substance intake at each period (mg/kg/day)						
			Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5		
Agaritine	62.5 a)	1101	2.8	2.8	3.3	3.9	3.6		
		1102	3.1	2.9	3.3	3.6	3.6		
		1103	3.0	2.8	3.4	3.9	3.4		
		1104	2.8	2.8	3.3	3.9	3.6		
		1105	2.7	3.0	3.2	3.8	3.6		
		1106	2.8	2.9	3.4	3.7	3.7		
		Means±D.	2.9±0.2	2.9±0.1	3.3±0.1	3.8±0.1	3.6±0.1		
		Product B	250 b)	1201	17.7	17.0	15.9	13.4	13.6
				1202	17.9	18.4	16.0	14.8	12.0
				1203	18.7	18.1	14.6	14.9	14.2
1204	17.2			17.8	15.5	14.4	13.7		
1205	17.7			18.2	15.8	14.6	13.1		
1206	19.6			18.6	17.3	15.0	14.3		
Means±D.	18.1±0.9			18.0±0.6	15.9±0.9	14.5±0.6	13.5±0.8		
Product B	750 c)			1301	77.2	62.6	57.3	54.2	52.0
				1302	68.5	56.4	59.6	57.3	54.9
				1303	67.5	55.7	62.1	62.9	49.2
		1304	69.9	71.5	52.3	55.6	52.9		
		1305	71.0	73.0	60.4	51.9	57.0		
		1306	72.0	57.6	51.9	55.2	52.6		
		Means±D.	71.0±3.4	62.8±7.7	57.3±4.3	56.2±3.7	53.1±2.7		
		Product B	5 (%)	1401	4333.3	3910.6	3233.8	3181.8	2766.0
				1402	4113.9	3743.3	3317.5	2863.4	2731.1
				1403	3921.6	3532.6	3365.4	2850.9	2892.6
1404	3963.4			3645.8	3196.3	2916.7	2918.3		
1405	4088.1			3278.7	3398.1	2888.9	2719.7		
1406	4000.0			3651.7	3658.5	2888.9	2731.1		
Means±D.	4070.1±148.2			3627.1±212.2	3361.6±164.4	2931.8±124.6	2793.1±88.8		

a): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

b): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

c): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

Appendix 9. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Test substance intake at each period (mg/kg/day)						
			Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10		
Agaritine	62.5 a)	1101	3.3	3.0	3.1	2.9	2.8		
		1102	3.4	3.2	3.1	2.9	2.6		
		1103	3.2	3.1	3.1	2.8	2.9		
		1104	3.2	2.9	3.0	2.9	2.8		
		1105	3.1	3.0	3.1	3.0	2.9		
	Mean±S.D.	3.3±0.1	3.1±0.1	3.1±0.0	2.9±0.1	2.8±0.1			
	250 b)	1201	12.0	11.6	12.3	11.9	11.5		
		1202	12.6	12.2	12.8	12.4	11.2		
		1203	12.5	12.1	12.6	11.2	10.2		
		1204	13.1	12.6	12.2	10.9	11.7		
1205		12.6	12.1	12.7	12.3	11.9			
Mean±S.D.	12.6±0.4	12.3±0.5	12.4±0.4	11.5±0.6	11.3±0.6				
750 c)	1301	45.2	44.7	45.2	34.5	38.4			
	1302	47.1	46.5	40.7	34.7	33.7			
	1303	52.6	42.6	43.7	36.7	32.6			
	1304	51.4	50.0	49.2	35.9	35.2			
	1305	49.4	49.1	48.8	35.9	35.1			
	1306	51.4	50.8	50.3	33.1	37.5			
	Mean±S.D.	49.5±2.9	47.3±3.2	46.3±3.7	35.1±1.3	35.4±2.2			
	Product B	1401	2642.3	2343.8	2641.5	2355.1	2280.7		
		1402	2600.0	2490.4	2416.4	2338.1	2272.7		
		1403	2549.0	2407.4	2313.2	2233.7	2233.3		
1404		2582.6	2313.2	2233.7	2333.3	2110.4			
1405		2569.2	2443.6	2363.6	2447.6	2341.1			
1406		2419.4	2529.2	2434.5	2509.0	2422.1			
Mean±S.D.		2562.1±76.7	2421.3±83.4	2400.5±138.8	2369.5±96.4	2293.4±104.4			

a): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

b): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

c): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

Appendix 9. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Test substance intake at each period (mg/kg/day)						
			Week 11	Week 12	Week 13	Mean (1-13)			
Agaritine	62.5 a)	1101	2.7	2.5	2.6	3.0			
		1102	2.7	2.5	2.8	3.1			
		1103	2.6	2.7	2.6	3.0			
	1104	2.7	2.6	2.4	3.0				
	1105	2.8	2.7	2.6	3.0				
	1106	3.0	2.7	2.8	3.1				
	Mean±S.D.	2.8±0.1	2.6±0.1	2.6±0.2	3.0±0.1				
250 b)	1201	11.3	11.2	10.2	13.0				
	1202	11.1	10.9	10.7	13.3				
	1203	11.1	10.9	10.8	13.2				
	1204	10.7	10.6	10.3	13.1				
	1205	10.9	10.9	10.8	13.4				
	1206	11.2	10.9	11.7	13.8				
Mean±S.D.	11.1±0.2	10.9±0.2	10.8±0.5	13.3±0.3					
750 c)	1301	33.7	18.4	30.8	45.7				
	1302	33.5	33.3	37.1	46.4				
	1303	36.5	31.7	33.0	46.7				
	1304	31.1	35.0	34.6	48.0				
	1305	34.9	35.1	35.1	49.0				
	1306	33.7	33.9	26.5	46.7				
	Mean±S.D.	33.9±1.8	31.2±6.4	32.9±3.7	47.1±1.2				
Product B	1401	2241.4	2188.6	2152.3	2790.1				
	1402	2218.4	2195.9	2066.7	2716.0				
	1403	2110.4	2070.1	2090.5	2663.9				
	1404	2215.2	2160.7	2147.2	2674.4				
	1405	2110.4	2063.5	2050.5	2674.1				
	1406	2203.4	2159.5	2124.2	2748.6				
	Mean±S.D.	2183.2±57.7	2143.1±60.3	2088.6±60.6	2711.2±50.2				

a): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

b): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

c): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

Appendix 10. Clinical observations in the gene mutation assay with agaritine
[Male rats (Dietary administration for 91 days, expression period, 3 days)]

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment									
			1	2	3	4	5	6	7			
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

a): Negative control (CRF-1 Powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
 e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)
 N : Normal

Appendix 10. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment									
			8	9	10	11	12	13	14			
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1504	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
 e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)
 - : Not observed
 N : Normal

Appendix 10. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment								
			15	16	17	18	19	20	21		
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Product B	5 (e)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

N : Normal

Appendix 10. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment								
			22	23	24	25	26	27	28		
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Product B	5 (e)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

N : Normal

Appendix 10. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment											
			29	30	31	32	33	34	35					
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Agarittine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1: 35 ppm, Week 2: 39 ppm, Week 3: 52 ppm, Week 4-13: 62.5 ppm
 c): Week 1: 231 ppm, Week 2: 257 ppm, Week 3-13: 250 ppm
 d): Week 1: 1389 ppm, Week 2: 1030 ppm, Week 3-8: 1000 ppm, Week 9-13: 750 ppm
 N : Normal

Appendix 10. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment											
			36	37	38	39	40	41	42					
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Agarittine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1: 35 ppm, Week 2: 39 ppm, Week 3: 52 ppm, Week 4-13: 62.5 ppm
 c): Week 1: 231 ppm, Week 2: 257 ppm, Week 3-13: 250 ppm
 d): Week 1: 1389 ppm, Week 2: 1030 ppm, Week 3-8: 1000 ppm, Week 9-13: 750 ppm
 N : Normal

Appendix 10. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment						
			43	44	45	46	47	48	49
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N
Agarittine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N

a) : Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b) : Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c) : Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d) : Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

N : Normal

Appendix 10. Continued

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment							
			50	51	52	53	54	55	56	
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N
Agarittine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N
	750 d)	1301	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N
		1304	N	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	N	N	N	N	N	N
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N

a) : Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b) : Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c) : Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d) : Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

N : Normal , AG : Ataxic gait , SP : Smudge of perinasal area

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment						
			57	58	59	60	61	62	63
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N
Product B	750 d)	1201	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N
Product B	5 (e)	1301	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W
		1302	W	W	W	SP,W	SP,W	SP,W	SP,W
		1303	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W
		1304	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N
		1306	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP
Product B	5 (f)	1401	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1: 35 ppm, Week 2: 39 ppm, Week 3: 52 ppm, Week 4-13: 62.5 ppm

c): Week 1: 231 ppm, Week 2: 257 ppm, Week 3-13: 250 ppm

d): Week 1: 1389 ppm, Week 2: 1030 ppm, Week 3-8: 1000 ppm, Week 9-13: 750 ppm

e): Week 1: 1389 ppm, Week 2: 1030 ppm, Week 3-8: 1000 ppm, Week 9-13: 750 ppm

f): Normal, AG: Ataxic gait, SP: Smudge of perinasal area, W: Wasting

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment							
			64	65	66	67	68	69	70	
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N
Product B	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N
Product B	750 d)	1301	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W
		1302	SP,W	SP,W	SP,W	AG,SE,W	AG,SE,W	AG,SE,W	AG,SE,W	AG,SE,W
		1303	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W
		1304	N	N	N	AG	AG	AG	AG	AG
		1305	N	N	N	AG	AG	AG	AG	AG
		1306	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP
Product B	5 (e)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1: 35 ppm, Week 2: 39 ppm, Week 3: 52 ppm, Week 4-13: 62.5 ppm

c): Week 1: 231 ppm, Week 2: 257 ppm, Week 3-13: 250 ppm

d): Week 1: 1389 ppm, Week 2: 1030 ppm, Week 3-8: 1000 ppm, Week 9-13: 750 ppm

e): Normal, AG: Ataxic gait, SP: Smudge of perinasal area, W: Wasting

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment									
			71	72	73	74	75	76	77			
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	750 d)	1301	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
		1302	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
		1303	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	AG,W	
		1304	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	
		1305	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP
		1306	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP
Product B	5 (f)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
 N : Normal , AG : Ataxic gait , SP : Smudge of perinasal area , W : Wasting

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment									
			78	79	80	81	82	83	84			
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	750 d)	1301	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	SP,W,DH	
		1302	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
		1303	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
		1304	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	
		1305	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP
		1306	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP
Product B	5 (f)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
 N : Normal , AG : Ataxic gait , SP : Smudge of perinasal area , W : Wasting , DH : Dragging of hindlimbs

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment									
			85	86	87	88	89	90	91			
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Product B	250 c)	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Product B	750 d)	1301	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	
		1302	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	
		1303	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1304	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1305	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1306	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		1406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1: 35 ppm, Week 2: 39 ppm, Week 3: 52 ppm, Week 4-13: 62.5 ppm

c): Week 1: 231 ppm, Week 2: 257 ppm, Week 3-13: 250 ppm

d): Week 1: 1389 ppm, Week 2: 1030 ppm, Week 3-8: 1000 ppm, Week 9-13: 750 ppm

N : Normal, AG : Ataxic gait, SF : Smudge of perinasal area, W : Wasting

DH : Dragging of hindlimbs, S : Soiled fur (Back)

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment			
			92	93	94	
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N	N
		1002	N	N	N	N
		1003	N	N	N	N
		1004	N	N	N	N
		1005	N	N	N	N
		1006	N	N	N	N
Agaritine	62.5 b)	1101	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N
		1104	N	N	N	N
		1105	N	N	N	N
		1106	N	N	N	N
Product B	250 c)	1201	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N
		1204	N	N	N	N
		1205	N	N	N	N
		1206	N	N	N	N
Product B	750 d)	1301	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1302	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1303	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1304	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1305	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
		1306	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG	SP,W,DH,SF AG,SP,W AG,SP,W AG
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N
		1402	N	N	N	N
		1403	N	N	N	N
		1404	N	N	N	N
		1405	N	N	N	N
		1406	N	N	N	N

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1: 35 ppm, Week 2: 39 ppm, Week 3: 52 ppm, Week 4-13: 62.5 ppm

c): Week 1: 231 ppm, Week 2: 257 ppm, Week 3-13: 250 ppm

d): Week 1: 1389 ppm, Week 2: 1030 ppm, Week 3-8: 1000 ppm, Week 9-13: 750 ppm

N : Normal, AG : Ataxic gait, SF : Smudge of perinasal area, W : Wasting

DH : Dragging of hindlimbs, S : Soiled fur (Back)

Appendix 11. Organ weight in the gene mutation assay with agaritine [Male rats (dietary administration for 91 days, expression period: 3 days)] Exp. No. A260(079-388)

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Liver (g)	Kidneys (g)	Lungs (g)	Heart (g)	Testes (g)		
Commercial diet a)	0	1001	12.322	2.077	1.261	0.923	2.800		
		1002	12.480	2.000	1.167	0.977	2.808		
		1003	11.460	1.954	1.118	0.890	2.702		
		1004	12.358	1.958	1.166	0.898	2.630		
		1005	11.109	1.893	1.109	0.883	2.849		
		1006	13.524	2.213	1.149	0.983	3.033		
		Means±D.	12.209±0.850	2.016±0.114	1.162±0.054	0.926±0.044	2.804±0.138		
		Agaritine 62.5 b)	62.5 b)	1101	12.455	2.131	1.141	0.922	2.900
				1102	12.158	2.014	1.271	0.935	2.761
				1103	12.368	2.121	1.157	0.914	2.860
1104	11.340			1.964	1.157	0.930	2.912		
1105	12.100			2.104	1.155	0.913	2.883		
1106	12.184			2.152	1.211	0.908	2.653		
Means±D.	12.101±0.396			2.081±0.075	1.182±0.050	0.920±0.011	2.828±0.101		
Agaritine 250 c)	250 c)			1201	9.261	1.910	1.004	0.827	2.842
				1202	9.705	2.015	0.898	0.859	2.714
				1203	9.490	1.973	0.891	0.774	2.549
		1204	9.378	1.990	0.946	0.794	2.862		
		1205	10.088	2.046	0.958	0.842	2.728		
		1206	8.908	1.874	0.932	0.793	2.479		
		Means±D.	9.472±0.401	1.968±0.065	0.938±0.042	0.815±0.033	2.695±0.154		
		Agaritine 750 d)	750 d)	1301	3.885	1.370	0.587	0.580	1.244
				1302	6.312	1.476	0.672	0.589	2.187
				1303	6.045	1.507	0.709	0.599	2.282
1304	6.841			1.466	0.714	0.722	2.336		
1305	5.395			1.447	0.613	0.573	2.146		
1306	4.530			1.378	0.572	0.579	1.886		
Means±D.	5.501±1.124			1.441±0.055	0.645±0.062	0.607±0.057	2.010±0.406		
Product B 5 (%)	5 (%)			1401	9.822	2.002	0.987	0.844	2.479
				1402	9.971	1.968	1.018	0.836	2.485
				1403	10.240	2.049	1.046	0.826	2.679
		1404	11.136	2.013	1.065	0.874	2.612		
		1405	9.711	1.839	1.047	0.822	2.544		
		1406	9.837	1.935	1.074	0.855	2.752		
		Means±D.	10.120±0.530	1.968±0.074	1.040±0.032	0.843±0.019	2.592±0.110		
		ENU e)	50 (mg/kg)	1501	6.805	1.210	0.710	0.548	2.150
				1502	6.752	1.144	0.735	0.554	2.170
				1503	6.140	1.089	0.726	0.484	1.863
1504	5.819			1.082	0.684	0.497	1.908		
Means±D.	6.378±0.480			1.131±0.059	0.714±0.022	0.521±0.035	1.953±0.274		

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 35 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
 e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Appendix 12. Organ weight per body weight in the gene mutation assay with agaritine [Male rats (dietary administration for 91 days, expression period: 3 days)] Exp. No. A260(079-388)

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Body weight (g)	Liver (mg)	Kidneys (%)	Lungs (%)	Heart (%)	Testes (%)		
Commercial diet a)	0	1001	387	3.184	0.537	0.326	0.239	0.724		
		1002	384	3.250	0.521	0.304	0.254	0.731		
		1003	360	3.183	0.543	0.311	0.247	0.751		
		1004	366	3.377	0.535	0.319	0.245	0.719		
		1005	347	3.201	0.546	0.320	0.254	0.821		
		1006	397	3.407	0.557	0.289	0.248	0.764		
		Means±D.	376±19	3.267±0.100	0.540±0.012	0.312±0.013	0.248±0.006	0.752±0.038		
		Agaritine 62.5 b)	62.5 b)	1101	375	3.321	0.568	0.304	0.246	0.773
				1102	370	3.286	0.544	0.344	0.253	0.746
				1103	372	3.325	0.570	0.311	0.246	0.769
1104	352			3.222	0.558	0.329	0.264	0.827		
1105	369			3.279	0.570	0.313	0.247	0.781		
1106	368			3.311	0.585	0.329	0.247	0.721		
Means±D.	368±8			3.291±0.038	0.566±0.014	0.322±0.015	0.251±0.007	0.770±0.036		
Agaritine 250 c)	250 c)			1201	294	3.150	0.650	0.341	0.261	0.967
				1202	284	3.417	0.710	0.316	0.302	0.956
				1203	279	3.401	0.707	0.319	0.277	0.914
		1204	291	3.223	0.684	0.325	0.273	0.984		
		1205	304	3.318	0.673	0.313	0.277	0.897		
		1206	281	3.170	0.667	0.332	0.262	0.882		
		Means±D.	289±9	3.280±0.116	0.682±0.023	0.322±0.010	0.262±0.010	0.933±0.041		
		Agaritine 750 d)	750 d)	1301	136	2.857	1.007	0.432	0.426	0.915
				1302	189	3.540	0.781	0.356	0.312	1.147
				1303	185	3.268	0.815	0.385	0.324	1.124
1304	199			3.438	0.737	0.359	0.363	1.174		
1305	176			3.065	0.822	0.348	0.326	1.219		
1306	148			3.061	0.931	0.386	0.391	1.274		
Means±D.	172±25			3.172±0.215	0.849±0.101	0.377±0.031	0.357±0.045	1.161±0.128		
Product B 5 (%)	5 (%)			1401	306	3.210	0.654	0.323	0.276	0.810
				1402	302	3.200	0.652	0.337	0.277	0.823
				1403	320	3.200	0.640	0.327	0.258	0.837
		1404	350	3.375	0.610	0.323	0.265	0.782		
		1405	319	3.044	0.576	0.328	0.258	0.707		
		1406	310	3.173	0.624	0.346	0.276	0.868		
		Means±D.	313±10	3.217±0.113	0.626±0.030	0.331±0.009	0.268±0.009	0.823±0.035		
		ENU e)	50 (mg/kg)	1501	154	4.419	0.786	0.461	0.356	1.396
				1502	155	4.356	0.738	0.474	0.357	1.400
				1503	144	4.264	0.756	0.504	0.336	1.099
1504	144			4.041	0.751	0.475	0.345	1.325		
Means±D.	149±6			4.270±0.165	0.758±0.020	0.479±0.018	0.349±0.010	1.305±0.142		

a): Negative control (CRF-1 powder, Oriental Yeast)
 b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 39 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm
 c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 257 ppm, Week 3-13; 250 ppm
 d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-8; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm
 e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 mL/kg, expression time: 3 days)

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment	Findings and comments
Commercial diet a)	0	1001	94	Non remarkable
		1002	94	Non remarkable
		1003	94	Non remarkable
		1004	94	Non remarkable
		1005	94	Non remarkable
		1006	94	Non remarkable
Agaritine	62.5 b)	1101	94	Non remarkable
		1102	94	Non remarkable
		1103	94	Non remarkable
		1104	94	Non remarkable
		1105	94	Non remarkable
		1106	94	Non remarkable
	250 c)	1201	94	Sternum:deformed
		1202	94	Sternum:deformed
		1203	94	Non remarkable
		1204	94	Sternum:deformed
		1205	94	Sternum:deformed
		1206	94	Sternum:deformed
	750 d)	1301	94	Thymus:atrophy
		1302	94	Sternum:deformed
		1303	94	Thymus:atrophy
		1304	94	Sternum:deformed
		1305	94	Thymus:atrophy
		1306	94	Sternum:deformed
Product B	5 (%)	1401	94	Non remarkable
		1402	94	Sternum:deformed
		1403	94	Non remarkable
		1404	94	Non remarkable
		1405	94	Sternum:deformed
		1406	94	Non remarkable
END e)	50 (mg/kg)	1501	8	Non remarkable
		1502	8	Non remarkable
		1503	8	Non remarkable
		1504	8	Non remarkable

a): Negative control (CRE-1 powder, Oriental Yeast)

b): Week 1; 35 ppm, Week 2; 30 ppm, Week 3; 52 ppm, Week 4-13; 62.5 ppm

c): Week 1; 231 ppm, Week 2; 250 ppm, Week 3-13; 250 ppm

d): Week 1; 1389 ppm, Week 2; 1030 ppm, Week 3-6; 1000 ppm, Week 9-13; 750 ppm

e): Positive control (N-nitroso-N-ethylurea, i.p. once a day for 5 days, 10 ml/kg, expression time:3 days)

添付資料 1

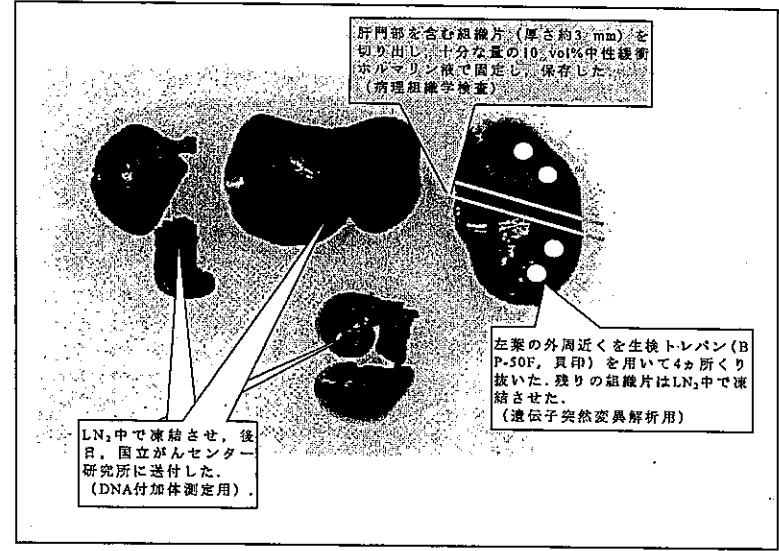


図1 肝臓のサンプリング

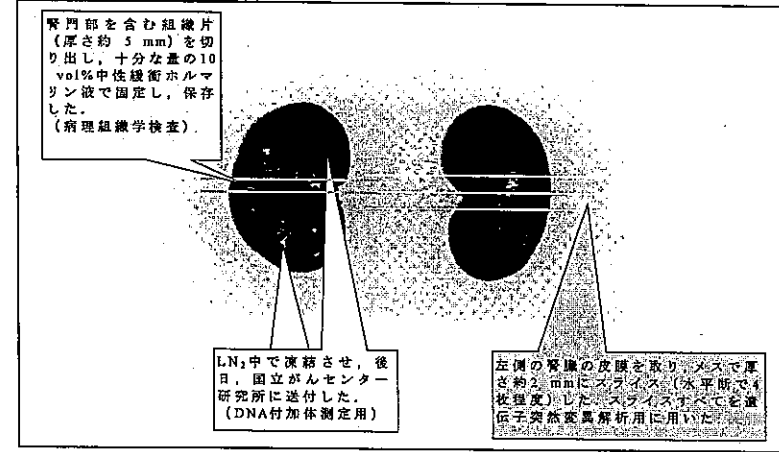


図2 腎臓のサンプリング

アガリチンのDNA付加体解析 (試験計画書)

試料: アガリチンを投与した Big Blue Rat より, 肝臓, 腎臓等の組織を抽出後, ゲノム DNA を抽出し, 試料とする. DNA 付加体の解析は肝臓および腎臓を優先し, その他の臓器に関しては関係者と協議の上, 実施の有無を決定する.

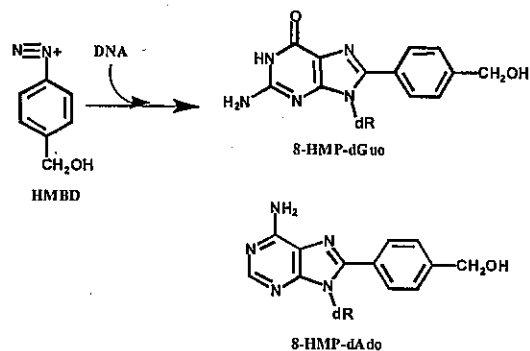
試験群: コントロール (n=3)

アガリチン高用量群 (120 mg/kg) (n=3-5)

キリン製品投与群 (n=3-5)

DNA 付加体の解析方法

- 1) まずはアガリチンの代謝産物と考えられる 4-(hydroxymethyl)phenylhydrazine (HMBO) から生成される既知の DNA 付加体である, 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dGuo (8-HMP-dGuo) および 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dAdo (8-HMP-dAdo) の形成の有無について, HPLC, LC/MS/MS または ^{32}P -ポストラベル法 (注 1) 等を用いて解析する.
- 2) 試料中から 8-HMP-dGuo および 8-HMP-dAdo が検出されない場合は, その他のアガリチン由来の DNA 付加体の生成についてさらに LC/MS/MS および ^{32}P -ポストラベル法等を用いて検討を行う予定である.



(注 1) ^{32}P -ポストラベル法

^{32}P -ポストラベル法とは DNA 付加体を好感度に検出する方法で, 具体的には, DNA を分解酵素で 2'-deoxynucleoside 3'-monophosphate に分解した後, 5'-末端で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ で標識し, 2 次元薄層クロマトグラフィー等で正常ヌクレオチドと DNA 付加体を分離し, 解析する.

アガリチンのDNA付加体解析 (試験報告書)

国立がんセンター研究所
がん予防基礎研究プロジェクト
戸塚ゆ加里

[試料] アガリチンを投与した Big Blue Rat の肝臓, 腎臓からゲノム DNA を抽出し, 試料とした.

試験群: コントロール (n=3)

アガリチン低用量群 (n=3)

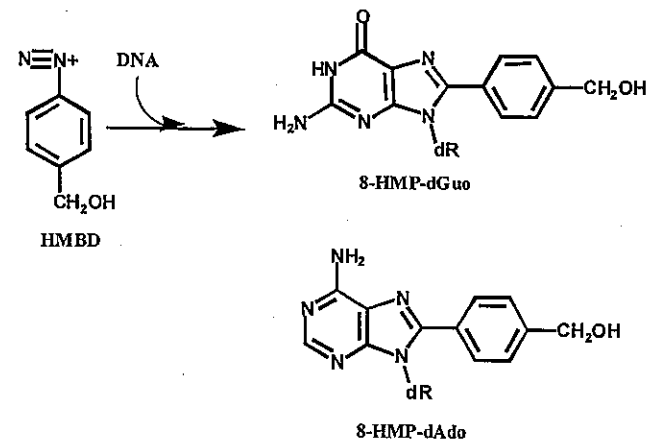
アガリチン中用量群 (n=3)

アガリチン高用量群 (n=3)

キリン製品投与群 (n=3)

[方法]

アガリチンの代謝産物と考えられる 4-(hydroxymethyl)phenylhydrazine (HMBO) から生成される既知の DNA 付加体である, 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dGuo (8-HMP-dGuo) および 8-[4-(hydroxymethyl)phenyl]dAdo (8-HMP-dAdo) の解析を, 蛍光検出器を用いた HPLC により行った.



HPLC 分析条件

検出波長：励起波長; 300 nm, 蛍光波長; 400 nm

カラム：TSK-gel ODS 80Ts (5 μ M, 4.6 x 250 mm)

流速：0.5 mL/min

溶離液：30%メタノール- 20mM ギ酸アンモニウム

高分子 DNA サンプル (ウシ胸腺 DNA およびラット組織のゲノム DNA) は, 100 μ g 相当を DNA 分解酵素 (マイクロコッカルスクレアーゼおよびホスホジエステラーゼ II) で分解した後, 更にアルカリホスファターゼで脱リン酸化を行ない, モノヌクレオシドに分解して HPLC で解析した.

【結果】

まず始めに, 既知濃度の標準品 (8-HMP-dGuo および 8-HMP-dAdo) を HPLC で分析し, 検量線の作成を行った (図 1). その結果, この条件下におけるこれら付加体の検出限界は, 絶対量で 25 pg, 付加体レベルに換算すると, 約 2 adducts / 10^7 nucleotide であることが分かった. 次に, HMBD をウシ胸腺 DNA と反応させて生成した HMP-DNA の解析を行った. その結果, 8-HMP-dGuo および 8-HMP-dAdo と同じ保持時間に溶出されるピークが観察された (図 2). これらのピークは HMBD と反応させていないウシ胸腺 DNA を解析した場合には観察されないこと, また, 付加体標準品 (8-HMP-dGuo, 8-HMP-dAdo) との co-chromatography でピークが一致したことから, HMBD と反応させたウシ胸腺 DNA サンプル中に 8-HMP-dGuo および 8-HMP-dAdo が生成していることがわかった. この時の付加体レベルは, 8-HMP-dGuo が 1 adduct / 10^4 nucleotides であり, 8-HMP-dAdo が 0.6 adduct / 10^4 nucleotides であった.

一方, アガリチンおよびキリン製品を投与した Big Blue Rat の肝臓, 腎臓からゲノム DNA を抽出し, 同様に解析を行ったところ, 8-HMP-dGuo および 8-HMP-dAdo に相当するピークは観察されなかった (図 3).

【考察】

今回解析したアガリチン (低, 中, 高用量) およびキリン製品を投与した Big Blue Rat の肝臓および腎臓 DNA 中には, アガリチン由来の既知の DNA 付加体である 8-HMP-dGuo, 8-HMP-dAdo の生成は観察されなかった. その理由として, 以下の事が考えられる.

- 1) これら実験動物の生体内で生成する DNA 付加体のレベルが低く, 検出限界以下であった.
- 2) サンプリングのタイミングが, アガリチンおよびキリン製品投与 3 日後であることから, 8-HMP-dGuo, 8-HMP-dAdo が速やかに生体内から排除された.
- 3) 8-HMP-dGuo, 8-HMP-dAdo は試験管内では生成するが, 生体内においてはこれら既知の付加体は生成せず, アガリチン由来の未知の付加体が生成している.

生体内におけるアガリチン由来の DNA 付加体の解析は, 検出方法の高感度化や試料採取のタイミング等, 更に検討する事が望ましいと思われる.

図 1

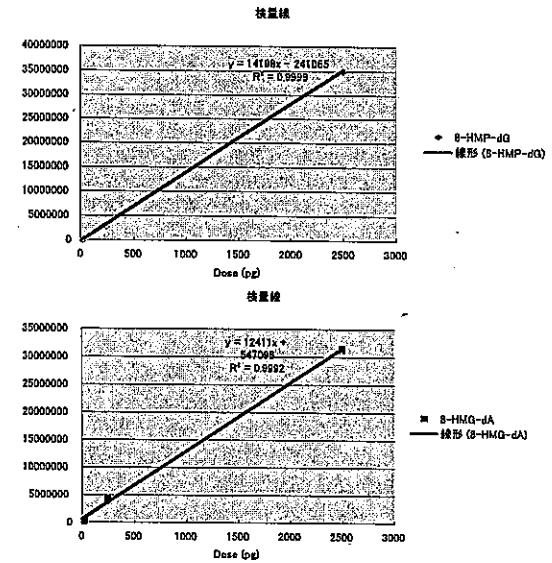


图 2

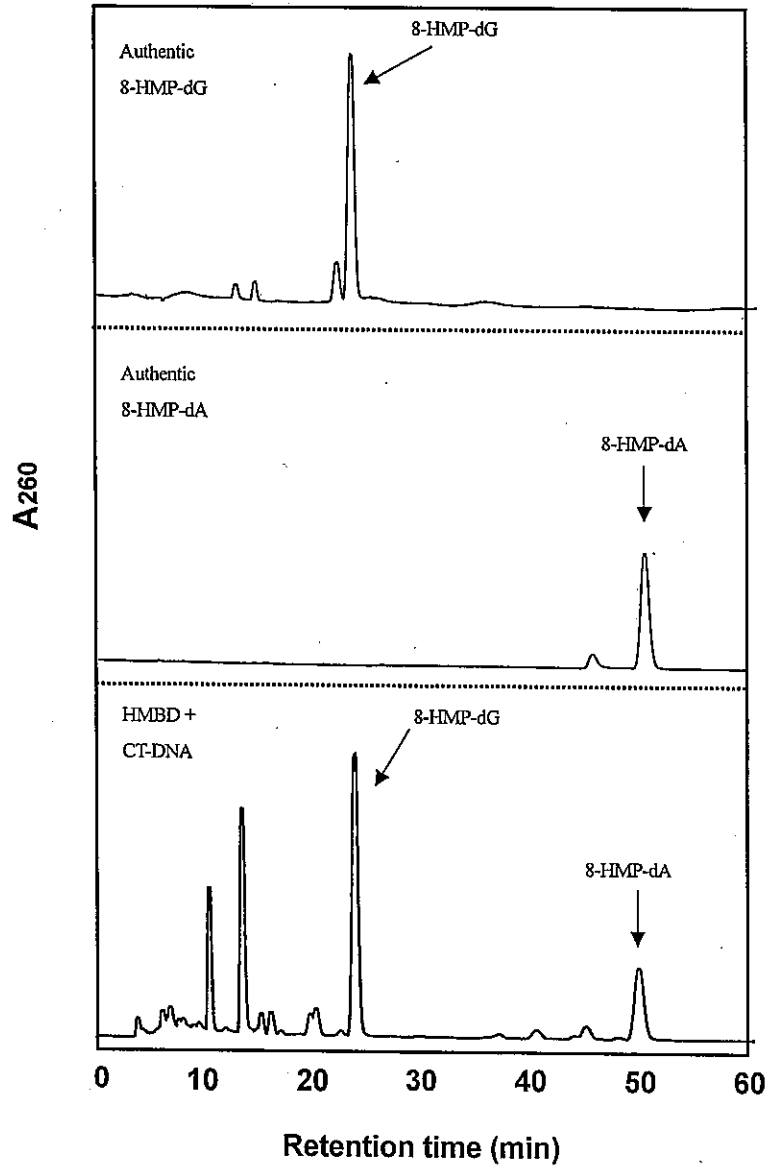


图 3

