

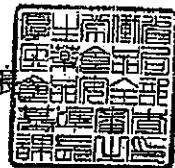
食安基発第1220001号
平成18年12月20日

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があった、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、別添のとおり回答を提出します。



(別添)

指摘事項 1.

今回、提出された「キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒」(以下「B 製品」という。) 中期多臓器発がん性試験を再度検証する観点から、関係者で協議の上、単一臓器(腎臓)を標的とした、二段階発がん試験を実施することが必要であること。また、併せて甲状腺刺激ホルモン(TSH)、甲状腺ホルモン(T3やT4)等を測定すること。

なお、試験を実施する際には、飼料中に配合されているアガリチンの安定性に配慮するとともに、含有量の確認が必要であること。

回答 1)

B 製品については、製造・販売企業により自主的な販売中止と製品の回収が行われており、今後、B 製品による健康影響が生じる危険性はないことから、厚生労働省としては、B 製品の二段階発がん試験を実施することは予定していないが、B 製品によって発がん促進作用が認められた原因の究明を行うため、回答 2、3 のとおり *in vivo* 遺伝毒性試験を優先して実施することとした。

なお、B 製品の製造・販売企業に当該試験実施の有無を確認したところ、企業においても、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験及びマウスを用いる小核試験を実施するなど自ら原因究明に努めているが、二段階発がん試験については実施する予定はないとのことである。併せて当該製品については、今後再度販売することはないと言っている。

指摘事項 2.

B 製品を用いた遺伝毒性試験の中で *in vivo* 骨髄小核試験において陰性結果となっているが、*in vitro* の復帰突然変異試験は陽性となっている。については、B 製品について、*in vivo* の突然変異検出用 TG ラットを用いて、標的臓器における突然変異試験を実施することが、必要であること。また、併せて、³²P ポストラベリング方法の実施についても検討すること。

回答 2)

ラットの標的臓器における遺伝毒性(DNA 損傷性)の有無を明確にするため、アガリチン及び B 製品を検体とし、トランスジェニックラット(Big Blue Rat)を用いて前胃、腎臓、甲状腺等に対する遺伝毒性試験を実施する予定である。

また、腎臓等の標的臓器の DNA が検体 B によって曝露されたかどうかを検証するため、トランスジェニックラットを用いた試験の実施に合わせて、ポストラベリング法による DNA 付加体試験を実施する予定である。(別添 1 参照)

指摘事項3.

B製品の発がん促進作用の原因物質の究明に努めること。

回答3)

B製品の遺伝毒性試験におけるアガリチンの関与を検証するため、アガリチン及びB製品について滅菌水に懸濁直後のものと、調整液を数日間放置しアガリチン含量の低下したものを検体とし、大腸菌 (WP2 *uvrA/pKM101* 株) を用いた復帰突然変異試験を実施した。

その結果、全ての検体で遺伝毒性陽性となったが、-S9 mix 条件下ではB製品がアガリチンよりも10倍以上低い用量で遺伝毒性を示した。

また、アガリチン及びB製品を加熱分解処理した標品について、同様の試験を実施したことろ、-S9 mix 条件下で変異原性を示し、最高用量においてアガリチン分解物は、陰性対照の10倍、B製品分解物は2～3倍の復帰株数を示したが、+S9 mix 条件下では全ての検体で陰性対照の2倍を超えていた。この結果から、アガリチンを分解することにより、アガリチン及びB製品の変異原性が減弱することが示唆された。

今回の追加試験の結果、アガリチンが主要な変異原性物質であることが確認されたが、一方B製品等の変異原性については、アガリチンのみによっては説明しがたいことも示唆された。(別添2参照)

このため、B製品によりラットに対する発がん促進作用がみられた原因については、回答2のとおり、さらに追加試験を実施し究明することとする。

確認事項 1.

今回、提出された B 製品の中期多臓器発がん性試験において、ラットに給与された飼料の給餌頻度について確認の上、回答すること。

回答 1) 給餌頻度は週 1 回である。

また、動物舎に一ヶ月間放置した飼料中のアガリチン濃度を測定し、アガリチン濃度に、ほとんど変化がないとの結果を得たので提出する（別添 3 参照）。

なお、飼料の保管条件、給餌器の形態等についても、試験実施施設に確認したので、提出する（別添 4 参照）。

確認事項 2.

B 製品に含まれているアガリチン含有量のロット間のバラツキについても確認の上、回答すること。

回答 2)

ロット間のバラツキについては、1割程度認められるものの、現在までに測定した値は全て、 $1000 \mu\text{g/g}$ を超えている。今回、新たにアガリチン含量（3 ロット）を計測したのでその結果を提出する。（別添 5 参照）

別添1

Exp. No. A260 (079-388)
PROTOCOL

Exp. No. A260 (079-388)
PROTOCOL

試験計画書

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)

2006年12月19日

1/19

1. 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

2. 試験目的

被験物質の *in vivo* における標的器官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. 参考とするガイドライン

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)に従って実施する。

4. 試験番号

A260 (079-388)

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

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）

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

6. 試験委託者

〒158-8501

東京都世田谷区上用賀一丁目 18番 1号

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

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

7. 試験責任者

中嶋 圭（第四試験室）

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

8. 被験物質等管理責任者

水橋 福太郎

2/19

9. 分担責任者

検査： 太田 奈史
病理学検査： 志賀 敏史
統計解析： 鈴木 雅也

10. 主担当者

遺伝毒性実験： 渥 美 務
器官摘出： 萩原 孝

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
動物入荷予定日： 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
器官摘出日： 2007年4月26日
アッセイ終了日： 2007年7月5日
速報予定日： 各器官のアッセイ終了後2週間以内
最終報告書草案提出予定日： 2007年8月15日
最終報告書作成予定日： 2007年8月31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

判明後記載

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

判明後記載

13.7. 安定性

飼料中：1ヶ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

14.1.2. 製造元

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

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

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

焼却処分する。

14.2. 配合飼料2

14.2.1. 名称

5%回収製品 (キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒, Lot No. 5001) 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

Exp. No. A260 (079-388)
PROTOCOL

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

焼却処分する。

15. 対照物質

15.1. 隠性対照

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

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)

Exp. No. A260 (079-388)
PROTOCOL

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

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 90~190 g)

16.1.6. 購入動物数

雄 60 匹

16.1.7. 使用動物数

雄 34 匹

16.1.8. 種・系統選択理由

遺伝子導入ラット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する。

16.1.9. 動物の適正使用について

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」、「実験動物の飼養並びに保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「財團法人 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」に従い、動物を適正に使用する。

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] (W 3.5 × D 5.5 × H 2.5 m, 48.1 m³) で動物を飼育し、環境調節の基準値は次の通りとする。

温度 24.5±2.5°C

湿度 55±20%

換気回数 8回以上/h

空気差圧 外気-1 mmH₂O以下

照明 12時間（午前7時点灯、午後7時消灯）

自動給水装置を取り付けたMicro-IsolatorTM System (Lab Products) ラックを使用し、ZyfoneTM製飼育ケージ (W 26.6 × D 48.2 × H 20.3 cm, 26,027.0 cm³) に床敷き (ALPHA-driTM, Shepherd Specialty Papers) を入れる。検疫・馴化期間中は、動物を1~3匹ずつ収容し、投与期間中および発現期間中は、動物を1匹ずつ収容する。

16.2.2. 飼料

検疫・馴化期間中は、基礎飼料 (CRF-1, Lot No. 061108, 国立医薬品食品衛生研究所提供) を動物に自由摂取させる。投与期間中 (91日間) は配合飼料1あるいは配合飼料2 (国立医薬品食品衛生研究所提供) を自由に摂取させる。発現期間中 (3日間) は、基礎飼料を自由に摂取させる。陰性対照群および陽性対照群は、試験期間中 (器官摘出日まで) を通じて基礎飼料を自由に摂取させる。

配合飼料は、毎週調製し、調製濃度は各用量群とも次式により算出する。

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

* : 投与1週、投与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)^{1.5}

投与4週以降に与える飼料 : [(最新の体重÷最新の摂餌量) ÷ (最新の1つ前の体重÷最新の1つ前の摂餌量)]^{1.5}

16.2.3. 給水

水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させる。

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、最低5日観察するとともに、動物を飼育環

境に馴化させる。検疫・馴化期間中の観察において、体重および健康状態により不適切と判断された動物は直ちに除外し、試験に使用しない。

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、動物の毛刈りにより個体の識別をする。

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る。各動物は、油性インクで尾部に識別マークを記入し識別する。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する。

なお、余剰動物については、器官摘出日に炭酸ガスを用いて安樂死させる。

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 の超純水に下記の試薬を溶解させる。

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で保存する。

16.5.2. LB 寒天培地

[調製例]

1000 mL の超純水に下記の試薬を溶解させる。

Bacto tryptone 10 g

Bacto yeast extract 5 g

NaCl 5 g

バクトアガー (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ずつ分注する。

16.5.3. トップアガー

[調製例]

1000 mL の超純水に下記の試薬を溶解させる。

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	5 g
バクトアガー	7 g

オートクレーブで 20 分間滅菌する。使用時までウォーターパスを用いて 50°C の条件で保温する。

16.5.4. SM 緩衝液

[調製例]

1000 mL の超純水に下記の試薬を溶解させる。

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 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、室温で保存する。

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 の超純水に下記の試薬を溶解させる。

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]	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、室温で保存する。

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 容を添加する。用時調製とする。

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

用時調製とする。

16.6.4. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

100 mL を調製する場合、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 を溶解する。フィルター (孔径 0.2 μm) ろ過除菌後、室温で保存する。

16.6.5. プロテナーゼ K 溶液

下記の通り調製する。

プロテナーゼ K (和光純薬工業)	200 mg
遺伝子工学用滅菌水 (ニッポンジーン)	60 mL
10 w/v% SDS 溶液	20 mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] ④	20 mL

注) pH 8.0 の EDTA 溶液 (ニッポンジーン) を 0.5~2 mol/L の塩酸で pH 7.5 に調整したもの用いる。

用時調製とする。

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 饱和フェノール (ニッポンジーン)	100 mL

調製後、直ぐに用いない場合は、冷凍 (基準値: -5°C 以下) で保存する。

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、大塚製薬工業) を加えて 20 mL に定容し調製原液 (5.0 mg/mL 溶液) を準備する。陽性対照物質液は、調製後速やかに使用する。

17. 試験方法

17.1. 対照群

17.1.1. 險性対照

基礎飼料を与える。

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.) 投与する。用量は、50 mg/kg とする。

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 週とする。

17.2.1. 用量

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、Big Blue®マウスを用いたアガリチン経口投与試験において、先般実施し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様の臓器（前胃、腎臓）に変異を誘発したとの報告があることから、この報告と同様の用量とした。

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性試験における高用量群 (5% 混餌) より算出したアガリチン用量を用いた。中用量は公比約 6 を用い 20 mg/kg とした。

キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒の用量は、先般実施し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の最高用量と同量とした。

試験群	用量 (mg/kg/day)	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
	3	90	6	5	1101～1106
アガリチン	20	90	6	5	1201～1206
	120	90	6	5	1301～1306
回収製品**	5**	90	6	5	1401～1406
陽性対照***	50***	5	4	3	1501～1504

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

17.2.2. 投与動物数

試験群では評価数 5 匹を確保するため、6 匹に投与する。死亡例等が認められない場合、動物番号の小さい順に 5 匹を評価に使用する。陽性対照群については 4 匹に投与し、3 匹を評価に使用する。評価に使用しない動物については、17.2.7.に記載する各器官を

摘出し、凍結保存する。ただし、ゲノム DNA の抽出は行わない。

17.2.3. 投与方法および投与期間 (回数)

被験物質および回収製品の投与経路は、経口投与とし、混餌法を使用する。通常の飼育用基礎飼料 (CRF-1) に被験物質あるいは回収製品を一定濃度となるように添加させた配合飼料 (試験委託者から入手) を自由に摂取させる。投与期間は 91 日間 (13 週間) とする。

陽性対照物質の場合は、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異性試験に通常用いられている投与経路である腹腔内投与とし、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 日間連続投与する。投与容量は、体重 100 g 当たり 1.0 mL とし、群分け時の体重を基に投与液量を決定する。

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)、17.2.7.に記載する器官を摘出する。陽性対照群については最終投与後 3 日に器官を摘出する。

17.2.5. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検疫・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 日および器官摘出直前に電子天秤 (PG2002 あるいは PG802-S, メトラー・トレド) を用いて体重を測定する。また、死亡動物については死亡発見時に体重を測定する。陽性対照群については、動物搬入時、検疫・馴化期間終了時 (群分け時、投与 1 日) および器官摘出直前に電子天秤 (PG2002 あるいは PG802-S, メトラー・トレド) を用いて体重を測定する。また、死亡動物については死亡発見時に体重を測定する。

器官摘出まで、最低 1 日 1 回、動物の一般状態を観察する。

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、体重測定日に餌重量を電子天秤 (PG2002 あるいは PG802-S, メトラー・トレド) を用いて測定し、測定日間の平均 1 日摂餌量 (g/day) を算出する。なお、給餌は、原則として毎週 1 回とするが、残量が不足しそうな場合には適宜給餌を実施する。なお、陽性対照群の摂餌量は測定しない。

被験物質摂取量 (mg/kg/day) は、体重および摂餌量から算出する。

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、大腿骨を摘出する。各器官の摘出および保存方法を以下に示す (添付資料 1 参照)。

Exp. No. A260 (079-388)
PROTOCOL

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 カ所くり抜く (添付資料 1 の病理組織標本に配慮してくりぬく)。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 (LN_2) 中で凍結させる (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、保存する (病理組織学検査用)。 残った辺縁部は、保存袋に入れ、 LN_2 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、凍結させる。 他の葉は、保存袋に入れそのまま LN_2 中で凍結させ、後日、国立がんセンター研究所に送付する (DNA 付加体測定用)。陽性対照群の場合は、保存袋に入れ、 LN_2 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、凍結させる。
腎臓	左侧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) する。各スライスをそれぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN_2) 中で凍結させる (遺伝子突然変異解析用 1 スライスを全量使用する)。その他の部位は保存袋に入れ、 LN_2 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、凍結させる。 右侧の腎臓は、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、保存する (病理組織学検査)。 残りの右侧の腎臓は、保存袋に入れそのまま LN_2 中で凍結させ、後日、国立がんセンター研究所に送付する (DNA 付加体測定用)。陽性対照群の場合は、保存袋に入れ、 LN_2 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、凍結させる。
肺	左肺、右肺を摘出した後、保存袋に入れ、 LN_2 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、凍結させる。
心臓	保存袋に入れ、 LN_2 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、凍結させる。
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、液体窒素 (LN_2) 中で凍結させる。
腎	腎を摘出し、切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出す。保存袋に入れ、液体窒素 (LN_2) 中で凍結させる。
精巢	左右の精巢を摘出した後、保存袋に入れ、 LN_2 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、凍結させる。
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す。マイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN_2) 中で凍結させる。
大腿骨	左右の大腿骨を摘出した後、チューブに入れ、 LN_2 中で凍結させる。

凍結後の器官は、超低温フリーザー (MDF-493AT, 三洋電機、設定値: -80°C , 基準値: -60°C 以下) に保存する。

Exp. No. A260 (079-388)
PROTOCOL

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碎用緩衝液 (RNase を含む) 3 mL を分注し、氷中で冷却しておく。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する。

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碎液を静かに重層し、遠心機 (LC-122) を用いて 3000 r/min (1710 G) で 10 分間遠心する。上清をスポット等で除去し、冷却してある RNase 含有ダウンス緩衝液 3 mL を加え、よく懸濁させる (核/細胞懸濁液)。骨髄の場合には、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する (核/細胞懸濁液)。

この核/細胞懸濁液に Proteinase K 溶液 3 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 の条件で保温し消化させる。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 分間遠心する。上層 (水相) をトランسفァーピベットで静かに回収し、新たな 15 mL 容の遠心管に移す。本操作を 2 回繰り返す。ただし、加える Ph/Cl 混液の量は回収した水相と等量とする。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 分間遠心する。水相を回収し、新たな 50 mL 容の遠心管に移す。遠心管にエタノールを徐々に加え、ゲノム DNA を析出させる。析出したゲノム DNA を 70% エタノールの入ったマイクロチューブに移し、およそ 10 分間浸す。次いで、遠心機 (MX-160) を用いて 13000 r/min (13240 G) で 10 分間遠心する。上清をマイクロピベ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る。適量 (20~50 μL 程度) の TB 緩衝液 (ニッポンジーン) を加え、一晩室温に放置し、残渣の DNA を溶解させる。調製後は冷藏にて保存する。

突然変異頻度算出は腎臓を優先し、ついで肝臓、骨髄の解析を実施する。残りの 6 器官については試験委託者と協議の上、実施の有無を決定する。

全ての DNA 溶液は、最終報告書作成後 3 カ月以内に処分する。

17.2.9. 試験菌株の準備

容量 200 mL のパック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 を添加する。これに凍結保存 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 h^+ 株 (G1250) 懸濁液を融解した後 50 μL を接種する。30°C, 120 回/分の振盪条件で一晩培養し、前培養液とする。

容量 500 mL のパック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 1mL を植菌した後、同様に 4~6 時間培養を続ける。培養終了後、菌懸濁液を 10 分間遠心分離 (1000 r/min) する。上清を捨て、10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を用いて再懸濁する。

17.2.10. ゲノム DNA のパッケージング

Transpack (Stratagene) のチューブ (RED) を解凍する。300~600 µg/mL 程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液および 10 µL をチューブ (RED) に加え、ピペットイングにより混合し、30°C の条件で 90 分間インキュベートする。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、同様に混合する。さらに、30°C の条件で 90 分間インキュベートを続ける。各チューブに SM 緩衝液 700 µL を加え、十分に搅拌する。

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plaer数算出用 (タイマー用) に 1 mL、突然変異算出用 (セレクション用) に 2 mL、それぞれのチューブに分注しておく。パッケージング溶液の全量 (および 700 µL) をセレクション用チューブに加えた後 (およそ 2700 µL になる) 搅拌し、室温で 20~30 分放置してファージを大腸菌に感染させる。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 倍希釈する。本希釈液 30 µL をタイマー用チューブに加え搅拌する。タイマー用チューブに、トップアガー 17 mL を加え混和し、LB 寒天培地に全量を重層する。セレクション用チューブには、トップアガー 16 mL を加え、タイマー用と同様に LB 寒天培地に重層する。タイマー用プレートは、37°C の条件で 16~24 時間、セレクション用プレートは、24~25°C の条件で 44~48 時間培養する。

総plaer数が 30 万に達するまで上記のパッケージング操作、または、ゲノム DNA 抽出からパッケージング操作までを繰り返す。

17.3. プラーケの計数

17.3.1. 総plaer数算出

タイマー用プレートに出現したplaer数 (N) を計数し、下記の式を用いて総plaer数を求める。

$$\begin{aligned} \text{総plaer数} &= \frac{N \times 300(\mu\text{L}) \times 2700(\mu\text{L})}{30(\mu\text{L}) \times 30(\mu\text{L})} \\ &= 900 \times N \end{aligned}$$

17.3.2. 変異plaer数算出

セレクション用プレートに出現したplaer数を計数する。セレクション用プレートに出現したplaer数が、変異plaer数となる。

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る。

出現した変異plaer数を総plaer数で除したものが、当該組織での突然変異頻度となる。

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{変異plaer数}}{\text{総plaer数}}$$

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する。

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、陽性と判定する。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う。

18. 病理組織学検査およびDNAシークエンス解析

試験委託者と協議の上、必要に応じて病理組織学検査 (肝臓および腎臓)、DNA シークエンス解析を実施する。

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) により下記に送付する。DNA 付加体測定は、国立がんセンター研究所において実施する (添付資料 2 参照)。

試料送付先: 〒104-0045 東京都中央区築地 5 丁目 1 番 1 号
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
Tel: 03-3542-2511 Fax: 03-3543-9305

20. 報告

最終報告書は、要約および表から構成される。

21. 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。

22. 試験計画書の作成

試験責任者

静岡県磐田市塩新田 582-2
財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

中嶋 圭

中 嶋 圭

2006年12月19日

23. 試験計画書の承認

運営管理者

静岡県磐田市塩新田 582-2
財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

牧 篤

牧 篤

2006年12月19日

添付資料 I

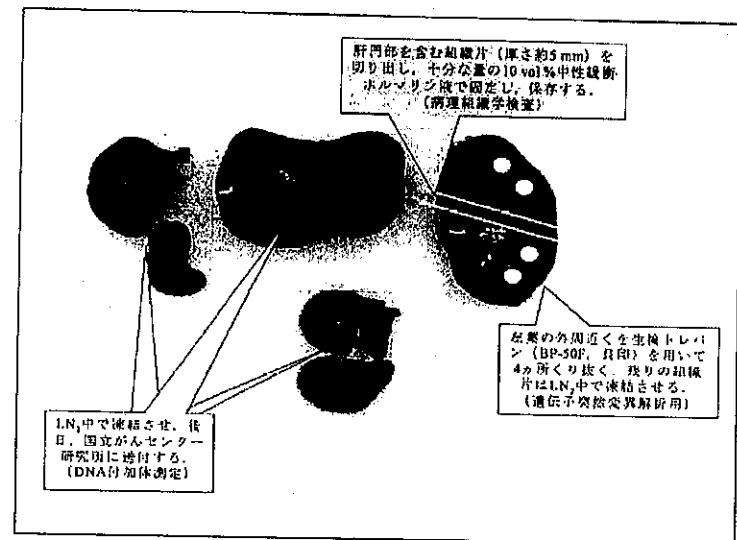


図1 肝臓のサンプリング

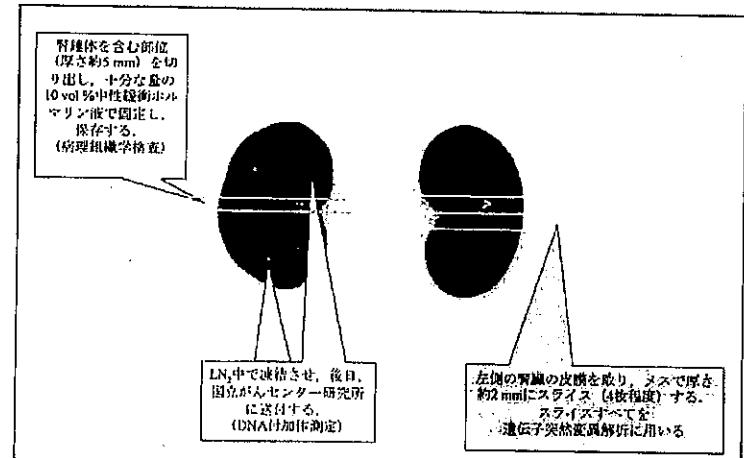


図2 腎臓のサンプリング

添付資料2

アガリチンのDNA付加体解析

試料：アガリチンを投与したBig Blue Ratより、肝臓、腎臓等の組織を摘出後、ゲノムDNAを抽出し、試料とする。DNA付加体の解析は肝臓及び腎臓を優先し、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。

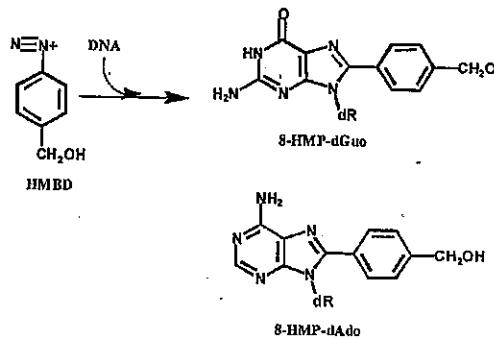
試験群：コントロール (n=3)

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³²P-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³²P-ポストラベル法等を用いて検討を行う予定である。

(注1) ³²P-ポストラベル法

³²P-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'-末端を[γ-³²P]ATPで標識し、2次元薄層クロマトグラフィー等で正常スクレオチドとDNA付加体を分離し、解析する。

追加遺伝毒性試験の結果について

① アガリチン及びアガリクス製品を用いた遺伝毒性試験（別紙1～4）

アガリクス抽出液については、キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒、（以下「B 製品」という。）に関して、ラット二段階発がん試験において腎臓と前胃に発がん促進作用が観察されている。

また、B 製品に関しては、大腸菌 WP2 *uvrA/pKM101* 株を用い-S9 mix、+S9 mix 両条件下において遺伝毒性が調べられ、同株に対する遺伝毒性陽性の結果が報告されている。

そこで、追加試験として、同菌株を用い検体A（アガリチンの標準品）、検体B（B 製品ロット1）、検体C（B 製品ロット2）、検体D（B 製品ロット3）の遺伝毒性を検索した。本試験では、S9（臓器ホモジネートの9,000 x g 上清）は、通常用いられる薬物誘導したラットの肝臓のS9の代わりにラットの腎臓のS9を用いた。

その結果、検体B、C、Dともに陽性の結果が得られた。検体B、C、Dは-S9 mix、+S9 mix 両条件下において同株に対し遺伝毒性を示したが、+S9 mix の条件でその遺伝毒性はやや減弱した。検体Aは-S9 mix、+S9 mix 両条件下において遺伝毒性陽性となり、+S9 mix の条件下でその遺伝毒性は若干上昇した。検体B、C、Dの遺伝毒性を、その中に含まれる検体Aで説明できるかを検討すると、+S9 mix 条件下ではほぼ説明できる結果となったが、-S9 mix 条件下では検体B、C、Dが検体Aよりも10倍以上低い用量で遺伝毒性を示し、検体Aのみによっては説明しがたいことが示唆された。（別紙1、2）

また、同菌株及び薬物誘導したラットの肝臓のS9を用い、検体A（アガリチンの標準品）、B（B 製品ロット1）、C（B 製品ロット2）、D（B 製品ロット3）の遺伝毒性物質を検索し、類似の結果を得た。-S9 mix 条件下での結果を前述の試験結果と比較すると、検体Aについては本試験の方が3-4倍高い復帰株数を示したが、検体Cについては、むしろ前に行われた試験の方が高い復帰株数を示した。検体BおよびDについて、両試験の結果は良い一致を示した。両試験の復帰株数の差の原因は不明であるが、本試験の結果も、-S9 mix 条件下では、検体B、C、Dの方が検体Aよりも低い用量で遺伝毒性を示し、その遺伝毒性を検体Aのみによって説明することは難しいことを示唆した。一方、+S9 mix の条件下では、4検体ともに同一用量域においてほぼ同一の復帰株数を示し、検体B、C、Dの遺伝毒性は検体Aによってほぼ説明できる結果となった。肝臓のS9を用いた場合には、S9 mix の添加により4検体ともに遺伝毒性が減弱した。（別紙3、4）

アガリチンについては、哺乳類のγグルタミルトランスペプチダーゼ(γ-GTP)によって代謝を受けてDNA損傷性を示す可能性が示唆されている。γ-GTPの大腸菌における相同遺伝子である*ggt*遺伝子を破壊したWP2 *uvrA/pKM101* 株を作製し、野生型

株との間で検体 A に対する変異感受性を比較した。だが、両者の間には差が見られず、少なくとも大腸菌の Ggt はアガリチンの遺伝毒性発現には関与しないことが示唆された。

検体 A (アガリチン標準品) は、大腸菌 WP2 *uvrA/pKM101* 株に対して明確な遺伝毒性を示し、DNA に対する損傷性を有する物質 (遺伝毒性物質) と考えることができる。アガリチンを高濃度の含んだマッシュルーム抽出液については Big Blue mouse を用いて、腎臓と前胃に変異作用を示すことが報告されており、アガリチンの含量を基にしてアガリクス製品に対する (安全性に関する) 規制・指導を行うことには一定の根拠があると考える。ただし検体 B, C, D の-S9 mix 条件下での大腸菌に対する遺伝毒性は、アガリチンの標準品だけでは説明できないため、他の遺伝毒性物質が混在している可能性を否定はできない。この点を明確にするために、検体 B, C, D のアガリチンを分解させた検体を用いて、大腸菌株に対する遺伝毒性を調べた。

② アガリチン分解物、アガリクス製品分解物を用いた遺伝毒性試験 (別紙 5、6)

検体 A (アガリチンの標準品)、検体 B (B 製品ロット 1)、検体 C (B 製品ロット 2)、検体 D (B 製品ロット 3) を加熱分解処理 (100°C で 2 日間) した検体 (国立医薬品食品衛生研究所食品部にて調製) について、大腸菌 WP2 *uvrA/pKM101* 株を用いて遺伝毒性を検索した。アガリチンの残存量はいずれも検出限界以下 (0.01 ppm) である。遺伝毒性は-S9 mix, +S9 mix の条件で行い、S9 は薬物誘導したラットの肝臓から調製したもの用いた。

検体 A の分解物は、-S9 mix の条件下で、用量依存的に復帰変異株数を増加させ、最高用量においては陰性対照の約 10 倍復帰株数を増大させた (256 revertants per plate versus 27 revertants per plate)。+S9 mix の条件下でも復帰株数の増大が観察されたが、陰性対照値の 2 倍には達しなかった。アガリチン分解物の遺伝毒性を分解前のアガリチンと-S9 mix の条件下において比較すると、分解物の遺伝毒性は 1/10 以下であった (256 versus 3,696)。この結果から、アガリチンの分解物は-S9 mix の条件下で大腸菌株に遺伝毒性を示すが、その遺伝毒性は弱いことが示唆された。

検体 B, C, D の分解物は、-S9 mix の条件下で遺伝毒性を示し、最高用量において陰性対照値の 2-3 倍の復帰株数を示した。+S9 mix の条件下では、復帰株数の増大は観察されたが陰性対照値の 2 倍を超えてなかった。検体 B, C, D の分解物の遺伝毒性を分解前の検体 B, C, D と比較すると、検体 B で 1/8 (75 versus 608)、検体 C で 1/3 (125 versus 392)、検体 D で 1/4 (119 versus 424) となり、アガリチンを分解することによりその遺伝毒性が減少することが明らかになった。この結果から、検体 B, C, D の分解物は-S9 mix の条件下で大腸菌株に遺伝毒性を示すが、分解処理前の検体に比べて遺伝毒性が減弱しており、検体 B, C, D の遺伝毒性にはアガリチンの寄与が大きいことが示唆された。

(別紙 5)

また、検体 A (アガリチンの標準品)、検体 B (B 製品ロット 1)、検体 C (B 製品ロット 2)、検体 D (B 製品ロット 3) を加熱分解処理 (100°C で 5-6 時間) した検体 (国立医薬品食品衛生研究所食品部にて調製、アガリチンの残存は 3% 以下) につ

いて、大腸菌 WP2 *uvrA/pKM101* 株を用いて遺伝毒性を検索した。この際に用いた S9 はラットの腎臓から調製したものである。検体 A の分解物は、-S9 mix の条件下で、用量依存的に復帰変異株数を増加させた。+S9 mix の条件下でも復帰株数の増大が観察されたが、陰性対照値の 2 倍には達しなかった。アガリチン分解物の遺伝毒性を分解前のアガリチンと-S9 mix の条件下において比較すると、アガリチンの標準品に比べて分解物の遺伝毒性は 1/3 以下であった (242 versus 803)。この結果は、前述の、検体を加熱分解処理 (100°C で 2 日間) した検体を用いた試験結果と傾向の一一致を示しており、アガリチンの分解物は-S9 mix の条件下で大腸菌株に遺伝毒性を示すが、その遺伝毒性は減弱することが示唆された。

検体 B, C, D の分解物は、-S9 mix の条件下で遺伝毒性を示し、最高用量において陰性対照値の 2 倍以上の復帰株数を示した。+S9 mix の条件下では、復帰株数の増大は観察されたが陰性対照値の 2 倍を超えてなかった。検体 B, C, D の分解物の遺伝毒性を分解処理前の検体 B, C, D と比較すると、検体 B (247 versus 596)、検体 C (295 versus 720)、検体 D (236 versus 420) で約 1/2 となり、アガリチンを分解することによりその遺伝毒性が減少した。この結果から、検体 B, C, D の分解物は-S9 mix の条件下で大腸菌株に遺伝毒性を示すが、分解処理前の検体に比べて遺伝毒性が減弱することが示された。

(別紙 6)

以上の結果から、アガリチンの分解物にも遺伝毒性があること、検体 B, C, D の分解物にも遺伝毒性があることが示された。検体 B, C, D の遺伝毒性が熱処理により減弱したことから、検体 B, C, D の遺伝毒性にはアガリチンの寄与が大きいことが示唆された。

ラット二段階癌試験で陽性となった B 製品については、Big Blue Rat を使い腎臓に対する遺伝毒性を調べることが重要であろう。ラットの標的臓器において遺伝毒性が明確になれば、その遺伝毒性 (DNA 損傷性) が発がんにおいて重要な役割をはたしていることが示唆される。また、トランシスジェニック試験の際に、ポストラベル法にて DNA に付加体が生じているかを調べれば、トランシスジェニック試験が陰性結果となった場合にも、標的臓器 (腎臓) の DNA が B 製品によって曝露された証拠となる。

Ames test

試験結果表

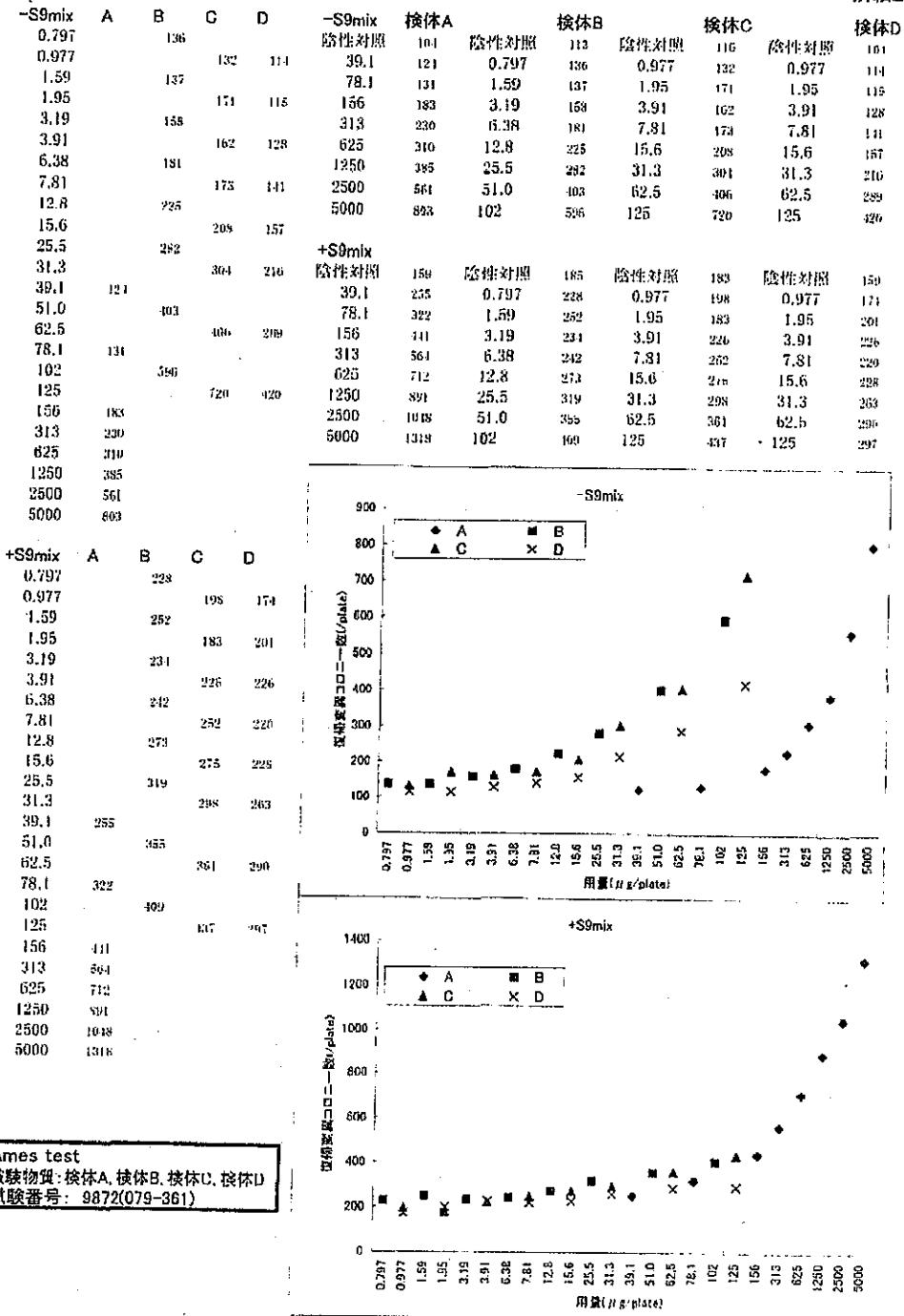
被験物質：検体A、検体B、検体C、検体D

試験番号: 9872(079-361)

代謝活性化系 の有無	被験物質の用置 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	復帰突異数(コロニー数/プレート)			
		検体A		検体B	
		WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101
-S9mix	陰性対照	97 110 (104)	102 123 (113)	121 114 (116)	113 95 (104)
	39.1	124 123 (124)	130 142 (136)	129 135 (132)	116 112 (114)
	78.1	123 139 (181)	121 163 (137)	198 143 (171)	119 110 (115)
	156	180 186 (183)	162 153 (158)	153 170 (162)	128 129 (128)
	313	220 239 (230)	199 172 (181)	185 161 (173)	130 152 (141)
	625	322 298 (310)	223 227 (226)	229 186 (208)	162 151 (157)
	1250	361 408 (385)	275 289 (282)	278 329 (304)	212 219 (216)
	2500	561 580 (561)	364 441 (403)	363 448 (405)	290 288 (289)
	5000	776 830 (803)	811 580 (690)	663 777 (720)	431 408 (420)
	陰性対照	160 168 (169)	189 181 (185)	196 170 (183)	152 165 (159)
	39.1	250 260 (255)	233 222 (228)	194 201 (198)	169 178 (174)
	78.1	316 328 (322)	225 279 (262)	165 201 (183)	208 193 (201)
	156	445 436 (441)	231 236 (234)	237 234 (226)	237 214 (226)
	313	572 565 (564)	223 261 (242)	264 239 (252)	218 221 (220)
	625	718 705 (712)	273 273 (273)	272 277 (276)	217 238 (228)
	1250	907 874 (891)	323 314 (319)	305 291 (296)	253 272 (263)
	2500	1021 1074 (1048)	360 349 (355)	372 349 (361)	299 280 (299)
	5000	1338 1297 (1318)	417 401 (409)	451 422 (437)	291 302 (297)
陽性 对照	S9mix を必要と しないもの	名称 用置($\mu\text{g}/\text{plate}$)	AF-2 0.01	AF-2 0.01	AF-2 0.01
		コロニー数 /プレート	4739 3541 (3518)	2799 5109 (4924)	3439 3328 (3384)
	S9mix を必要と するもの	名称 用置($\mu\text{g}/\text{plate}$)	2-AA 2.00	2-AA 2.00	2-AA 2
		コロニー数 /プレート	1138 1093 (1116)	1232 1392 (1312)	1116 1185 (1150)
					1126 1098 (1112)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2-AA : 2-Aminanthracene



Ames test
被験物質: 検体A、検体B、検体C、検体D
試験番号: 9872(079-361)

上記の2表とも、横軸(用置)は等間隔ではない。

Ames test

被験物質：検体A、検体B、検体C、検体D

strain: *E.coli* WP2 uvrA/pKM101

S9:PB+5,6-BF誘導rat liver 50μL/plate

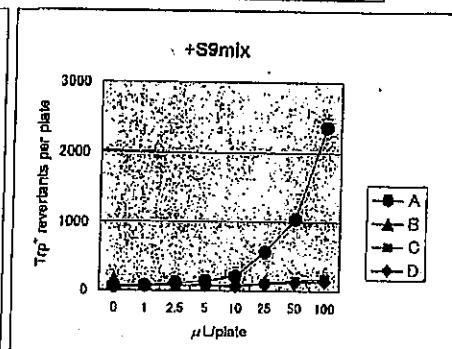
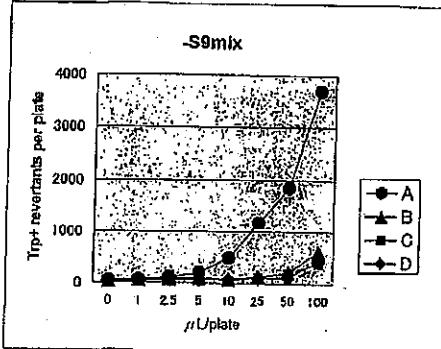
solvent:Water

without S9

μL/plate	検体A			検体B			検体C			検体D		
	#1	#2	average	#1	#2	average	#1	#2	average	#1	#2	average
0	43	40	42	38	39	40	42	44	42	39	33	36
1	63		63	48	54	51	63	51	57	49	53	
2.5	105	100	103	83	70	77	70	82	76	66	58	62
5	212	188	200	95	104	100	75	90	83	64	67	66
10	498	480	488	51	82	72	43	52	53	62	69	65
25	1168	1164	1176	152	106	128	147	86	118	91	98	95
50	1020	1784	1052	188	218	204	182	217	200	120	103	112
100	3856	3536	3685	640	576	598	336	448	392	432	416	424

with S9

μL/plate	検体A			検体B			検体C			検体D		
	#1	#2	average	#1	#2	average	#1	#2	average	#1	#2	average
0	40	57	49	51	40	48	45	68	57	50	51	51
1	69		69	54	58	56	75	72	74	78	56	66
2.5	94	127	111	75	53	64	75	62	69	81	71	76
5	140	143	142	78	53	66	74	80	77	77	73	75
10	230	161	211	76	52	64	59	82	71	51	78	65
25	520	608	564	125	126	126	117	113	116	105	93	89
50	1072	1024	1048	125	154	140	151	150	161	121	121	121
100	2272	2432	2352	155	160	158	192	179	168	133	140	137



Ames test

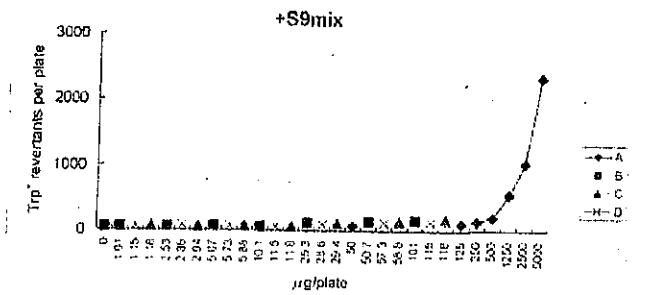
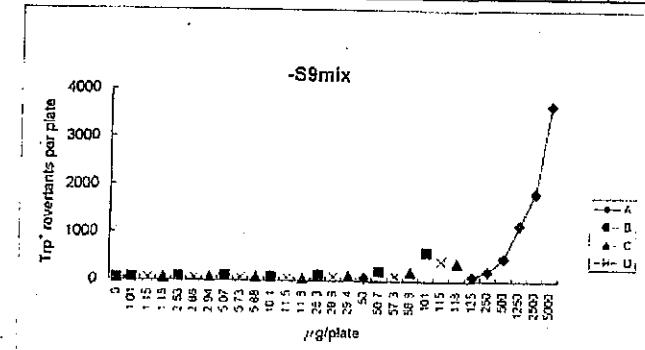
被験物質: 検体A、検体B、検体C、検体D

strain: *E.coli* WP2 uvrA/pKM101

S9:PB+5,6-BF誘導rat liver 50μL/plate

solvent:Water

μg/plate	Without S9				With S9			
	検体A	検体B	検体C	検体D	検体A	検体B	検体C	検体D
0	42	39	42	36	49	46	57	51
1.01		51				66		
1.15					63			66
1.18			57			74		
2.53		77				64		
2.86					62			76
2.94					76			69
5.07		100				66		
5.73					66			75
5.88			83			77		
10.13		72			66			65
11.45					64			
17.75			53			71		
25.33		128				126		
28.63					96			88
29.38			118			115		
50	63				68			
50.65		204			140			
57.25					112			121
59.75		200			151			
101.3		608			158			
114.5			424		187			
117.5		392			186			
125	103				111			
250	200				142			
500	488				211			
1250	1176				564			
2500	1852				1048			
5000	3696				2352			



Ames test

被験物質：検体A(分解物)、検体B(分解物)、検体C(分解物)、検体D(分解物) (100°C、2日間)

別紙5

strain E. coli WP2uvrA/pKM101
SSCPb5.6-E75 rat liver S9/L-plate
solvent/Water

without S9

検体A(分解物)		検体B(分解物)		検体C(分解物)		検体D(分解物)	
2005.6.6		2005.6.16		2005.6.7		2005.6.16	
#1	#2	#1	#2	Average	SD	#1	#2
0	29	25	27	33	33	22	29
1	37	35	36	38	37	45	39
2	39	34	37	36	34	34	39
5	46	47	50	43	41	42	42
10	49	54	51	42	46	38	43
25	83	81	92	61	50	60	53
50	131	131	69	53	57	59	69
77	239	232	256	53	55	65	65
100	239	232	256	77	72	75	70
				170	165	172	175
						49.7	161
							119
							547

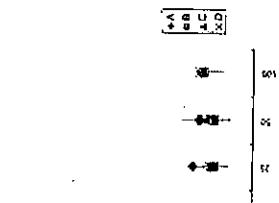
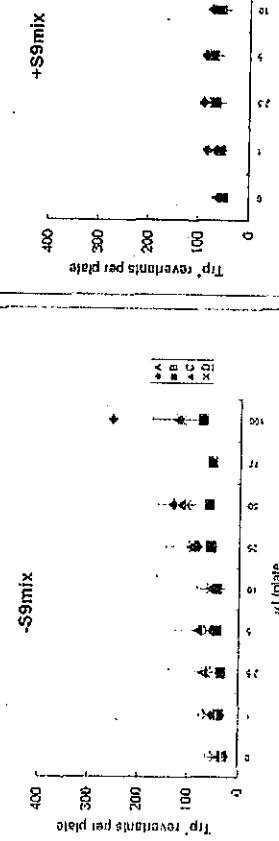
2005.6.27

検体A(分解物)		検体B(分解物)		検体C(分解物)		検体D(分解物)	
2005.6.6		2005.6.16		2005.6.7		2005.6.16	
#1	#2	#1	#2	Average	SD	#1	#2
0	29	25	27	33	33	22	29
1	37	35	36	38	37	45	39
2	39	34	37	36	34	34	39
5	46	47	50	43	41	42	42
10	49	54	51	42	46	38	43
25	83	81	92	61	50	60	53
50	131	131	69	53	57	59	69
77	239	232	256	53	55	65	65
100	239	232	256	77	72	75	70
				170	165	172	175
						49.7	161
							119
							547

with S9

2005.6.6

検体A(分解物)		検体B(分解物)		検体C(分解物)		検体D(分解物)	
2005.6.6		2005.6.16		2005.6.7		2005.6.16	
#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
0	55	64	50	50	47	50	21
1	83	83	52	41	70	51	120
2	95	92	89	59	70	65	77
5	81	87	84	61	87	73	71
10	78	70	74	47	63	57	70
25	100	133	118	77	68	93	73
50	105	94	106	69	92	81	78
77	113	105	96	101	99	142	134
100	91	113	105	96	101	99	105
				120	125	73	83
						40.8	153
							105
							47.3



Ames test

被験物質：検体A(分解物)、検体B(分解物)、検体C(分解物)、検体D(分解物) (100°C、5~6時間)

試験番号: 9873(079-362)

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg)	損傷変異数(コロニー数/プレート)			
		検体A(分解物)		検体B(分解物)	
		WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101
-S9mix	0.0	102	102	111	97
	0.781	109 (103)	126 (114)	123 (117)	110 (104)
	1.56	117	107	111	97
	3.13	105	117	109	112
	6.25	101 (103)	129 (123)	138 (124)	120 (116)
	12.5	127	164	147	126
	25.0	104 (116)	152 (163)	135 (141)	140 (133)
	50.0	136	131	156	127
	100	121 (129)	143 (137)	148 (132)	142 (135)
	168	148	182	164	137
+S9mix	0.781	135 (142)	160 (161)	189 (177)	140 (139)
	1.56	200	208	246	207
	3.13	181 (191)	218 (213)	243 (245)	198 (203)
	6.25	241	242	293	224
	12.5	243 (242)	251 (247)	296 (295)	247 (236)
	25.0	168	185	198	165
	50.0	153 (161)	178 (182)	172 (185)	162 (169)
	100	177 (173)	224 (221)	179 (173)	176 (171)
	168	181	201	187	194
	168	158 (160)	210 (206)	222 (205)	203 (199)
陽性対照	AF-2	AF-2	AF-2	AF-2	AF-2
	用液(μg/プレート)	0.01	0.01	0.1	0.01
	コロニー数/プレート	3482	5261	2797	3304
	名称	3371 (3427)	4709 (4985)	2803 (2800)	3385 (3345)
	用液(μg/プレート)	2.00	2.00	2	2
S9mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	1118 (1098)	1441	1106	1066
	名称	1078 (1098)	1392 (1417)	1169 (1138)	1131 (1099)

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2-AA : 2-Aminoanthracene

別紙6

動物舎に一ヶ月間放置する前後の調製飼料中アガリチン濃度の変化の検討

I. 目的

食品安全委員会の新開発食品専門調査会ワーキンググループの指摘に回答するため、調製飼料中アガリチンの分析の検討及び一ヶ月間の安定性の検討について行った。

- ①飼料(CRF-1)中に添加したアガリクス製品のアガリチン濃度測定を行なうにあたり前処理を検討する。
- ②アガリクス添加した飼料中のアガリチン濃度が、動物舎内の環境下(温度、温度一定)に一週間及び一ヶ月間置くことにより変化するかどうか確認する。

II. 方法

サンプル

キリンアガリクス製品を0.5%あるいは5%添加した飼料(CRF-1)
(国立医薬品食品衛生研究所毒性部調製。)

飼料1gを秤量し、メタノール30mlで20分抽出し、1,000rpmで5分間遠心後、ろ紙でろ過を行なう。この操作を2回繰り返す。抽出液をエバボレーターで乾固させ、0.01硝酸:メタノール=9:1液を3ml加えて軽く超音波処理し、溶解させたものを、0.45μmフィルター付のシリンジでろ過する。そのうち1mlをC18にアプライし、前出の9:1液2mlで溶出し、計3mlをアガリチン画分とする。

III. 結果

- ①アガリクス製品入り飼料(CRF-1)におけるアガリチン濃度測定について
(各濃度、n=3ずつで行ない、平均回収率を算出した)

	飼料中アガリクス製品濃度	
	0.5%	5%
平均回収率(%)	83.8	78.2

⇒以前の検討では、飼料中のアガリチン濃度の分析は不可能であったが、前処理を改良することにより、飼料中アガリチン濃度を良好に定量分析することが可能となった。

- ②アガリクス製品入り飼料を、動物舎内の環境下(温度、温度一定)に一週間あるいは一ヶ月間置くことによるアガリチン濃度の変化について

飼料中アガリクス 製品濃度	調製当日 水(-)	1週間後 水(-)	1ヶ月後 水(-)
0.50%	5.03(μg/g) 調製当日100とした比率 100	5.20(μg/g) 103.4	4.88(μg/g) 97.1
5%	46.9(μg/g) 調製当日100とした比率 100	44.6(μg/g) 95.2	45.3(μg/g) 96.6

⇒・通常の動物舎の環境下状態では、一ヶ月間動物舎に放置する前後で、agaritineの分解はほぼないと考えられる。

IV. 結論

尿や水分が入らない状態では、調製飼料中のアガリチンは一ヶ月間、安定であると考えられる。試験実施者等に確認したところ、B製品の毒性試験は、動物が入れず、水も混入することがない特殊なゲージを用いており、尿や糞及び飲料水が混入することはないとのことであった(別添3)。これらのことから、一ヶ月間動物舎に放置する前後で、アガリチンの分解はほぼないと考えられる。

給餌頻度及び粉末飼料の尿、糞及び飲水による汚染について

B 被験物質添加飼料（添付ファイル被験物質B 飼料保管条件参照）

- 1) 給餌器は床置きのものではなく、ケージの縁から吊るすタイプのものを使用しています。
- 2) 飼料交換は週1回。また、飼料の保管は給餌器にあるとき以外は冷蔵保存されています。
- 3) 給餌器内の餌は、多少糞が混じることはあっても尿が飼料に混じることはほとんどなく、飲料水により湿ることもなかった。したがって、湿り気はなかったと考えております。

A 被験物質添加飼料（添付ファイル被験物質A 飼料保管条件参照）

- 1) 給餌器は床置きのものを使用。
- 2) 飼料交換は週1回の交換。また、飼料の保管は給餌器にあるとき以外は冷蔵保存。
- 3) 尿および糞は多少給餌器内に入ります。飲料水が給餌器の中に入ることはありません。

C 被験物質添加飼料（添付ファイル被験物質C 飼料保管条件参照）

- 1) 給餌器は床置きタイプを使用。
- 2) 餌は週2回の交換。動物室へ搬入後は動物室内環境
- 3) ラットの場合、尿、糞等による汚染はほとんどありません。また飲料水により餌が湿ることもほとんどなく、残余飼料は乾燥した状態です。

被験物質B

① 餌の保管条件（衛研が提供しました調製飼料）

ご提供いただきました調製飼料は、2004年11月2日に入荷し、2005年5月10日に返却しております（返却分：コントロール33kg、検体B5.0%添加34kg）。入荷した全ての飼料は、一旦、研究棟1階飼料保管庫（保管条件：冷蔵）で保管し、使用の都度、必要量を飼育室のある棟（遺伝毒性試験棟）に移し、そこの冷凍冷蔵庫（サンヨー冷凍冷蔵庫SR-33R、利用期間中の実測値：1.2から10.3°C）で保管しておりました。さらにそこから給餌器に充填しておりました。

② 動物室への搬入後の保管条件

給餌器に充填し、動物に与えてからは飼育室の環境下になります。飼育室（804号室）の環境調節の基準値は温度24.5±2.5°C、湿度55±20%であり、投与期間（2004年11月8日～2005年4月24日）中の実測値は、温度21.1～25.1°C、湿度32～71%の範囲内でした。空調機の点検やフィルター交換により、湿度で数回下限からの逸脱がありますが、いずれも軽微で短時間の逸脱であり、問題としておりません。

③ 給餌器の形態（写真）

写真を添付いたします。

④ 餌の交換頻度

摂餌量の測定毎に交換しており、週に1回交換しておりました。

⑤ 交換時の餌の状態（尿、糞等に汚染等、特に飲料水による餌の湿り気状態）

飼育従事者に確認しましたが、多少糞が混じることはあっても尿が飼料に混じることはほとんどなかったとのことでした。飲料水により湿ることもなかったとのことです。したがって、湿り気はなかったと考えております。

⑥ ケージの種類

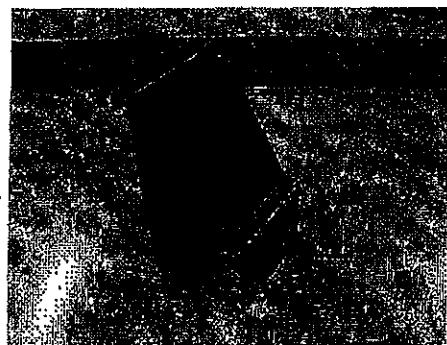
ポリカーボネート製飼育ケージ（W21.5×D37.4×H20.0cm、16,082cm³）を使用しました。

⑦ ケージ内の飼育匹数

原則2匹飼いケージでした。

⑧ その他、餌に関する情報

特になし。



被験物質 B 給餌器

被験物質 A

1. 飼の保管条件（衛研が提供しました調製飼料）

弊社へ搬入後、冷蔵飼料保管庫（設定温度 2~10°C：実測値：4~6°C）にて保存致しました。

2. 動物室への搬入後の保管条件

動物室内では使用するまで調製飼料保管室内冷蔵庫（設定温度 2~10°C：実測値：2~8°C
2005年2月1日11度まで一時的に上昇）にて保存致しました。

飼育室内へは給餌分のみを搬入し、給餌いたしました。残余飼料は廃棄しております。
動物室内は 22±3°C の設定になっております。

3. 給餌器の形態（写真）

写真を添付いたします。

4. 飼の交換頻度

週に1回追給餌、週に1回給餌器ごと交換をしています。追給餌の際は、食べ残してある餌は廃棄しています。

5. 交換時の餌の状態（尿、糞等に汚染等、特に飲料水による餌の湿り気状態）

尿および糞は多少給餌器内に入ります。飲料水が給餌器の中に入ることはあります。

6. ケージの種類

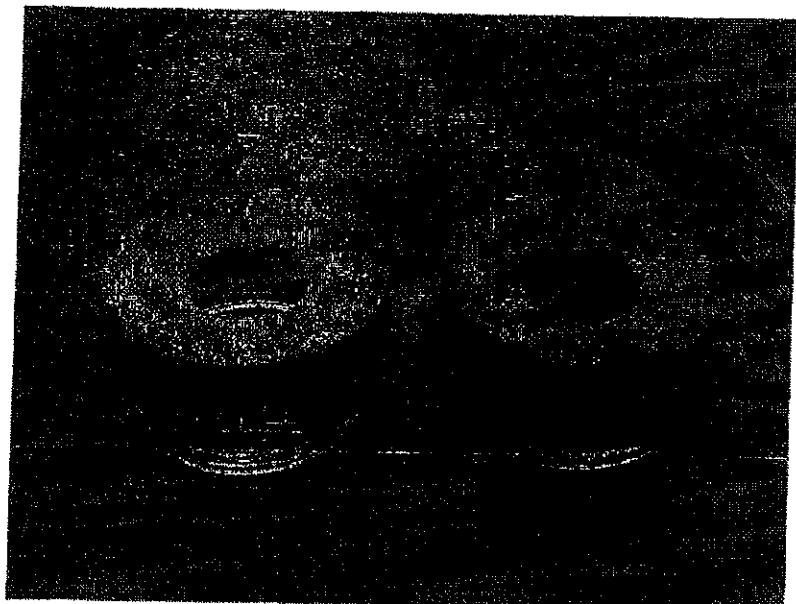
常圧蒸気滅菌したプラスチック製ケージ（トキワ科学器械倅：W260×L412×H195mm）、
ステンレス製ケージ蓋は高压蒸気滅菌して使用しています。

7. ケージ内の飼育匹数

3匹/ケージで飼育いたしました。

8. その他、餌に関する情

特記事項なし。



被験物質 A 給餌器

被験物質 C

① 飼の保管条件 (衛研が提供しました調製飼料)

冷蔵庫所保管

② 動物室への搬入後の保管条件

室温保管

③ 給餌器の形態 (写真)

ステンレス鋼製粉末給餌器 (外ふた: 外径 11 cm, 内径 5 cm)



④ 飼の交換頻度

週 2 回交換 (火, 金曜日)

⑤ 交換時の餌の状態 (尿、糞等による汚染等、特に飲料水による餌の湿り気状態)

ラットの場合、尿、糞等による汚染はほとんどありません。また飲料水により餌が湿ることもほぼなく、残余飼料は乾燥した状態です。

⑥ ケージの種類

ステンレス鋼製金網ケージ (810W × 440D × 230H mm)

⑦ ケージ内の飼育匹数

4 匹

⑧ その他、餌に関する情報

特になし

別添5

キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒(製品B)中のアガリチン含量

検体	キリン細胞壁破碎製品	agaritin 含量
A	消費期限2007/5/30	1025 ppm
B	消費期限2007/7/30	1227 ppm
C	消費期限2007/9/16	1287 ppm
	AVG	1180 ppm
	CV	11.60%
D	毒性実験検体 2004年購入	1348 ppm