

# 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 新開発食品調査部会

平成20年5月8日(木) 14:00～  
厚生労働省共用第8 会議室(6階)

## 議 事 次 第

### 議 事

1. 食品安全委員会に食品健康影響評価を依頼したアガリクス含有食品の取扱いについて
2. その他

### 資 料

- 1 食品安全委員会への食品健康影響評価の経緯
- 2-1 食品健康影響評価について  
(平成18年2月13日付けの食品安全委員会への評価依頼)
- 2-2 アガリクス(カワリハラタケ)を含む粉末剤型の加工食品に係るリスクプロファイルについて
- 3-1 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  
(平成18年5月9日付けの食品安全委員会事務局からの依頼)
- 3-2 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  
(平成18年12月20日付けの食品安全委員会事務局への回答)
- 3-3 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  
(平成20年2月28日付けの食品安全委員会事務局への回答)
- 4 食品健康影響評価に係る指摘事項について(平成20年3月28日付け)
- 5 議論のポイント

### 参考資料

- 1-1 関係法令
- 1-2 新開発食品等の販売禁止について
- 2 アガリクス(カワリハラタケ)を含む製品に関するQ&A(平成18年2月13日)

## アガリクスを含む製品の食品健康影響評価について

### 1. アガリクスとは

アガリクス属キノコ的一种(和名:カワリハラタケ、学名: *Agaricus blazei* Murrill)。免疫活性作用があるなどとして、これを原料とした健康食品が広く販売されている。

### 2. これまでの経緯

(1) アガリクス属のキノコには、アガリチンという成分が含まれており、以前よりその毒性が懸念されていた。<sup>※1</sup>

※1: 国立医薬品食品衛生研究所においては、以下の調査研究を実施

平成12年度: アガリクス属のキノコの毒性情報に関する文献検索を実施  
(アガリクスに関する毒性報告はなし)

平成14年度: アガリクスを含む製品のアガリチン含有量の実態調査

平成15年度: キノコ中のアガリチン及びその誘導体の分析法の開発に関する研究を実施。(アガリクス含有製品の一部にアガリチンを比較的高く含有するものがあることを確認)

このため、厚生労働省(国立医薬品食品衛生研究所)において調査研究を実施したところ、平成17年度に実施した遺伝毒性試験及び中期多臓器発がん性試験において、アガリクスを含む3製品<sup>※2</sup>のうち、1製品に発がん促進作用が認められた<sup>※3</sup>。

※2: 当時国内に広く流通していた製法の異なる代表的な3種を選択。

※3: 復帰突然変異及び染色体異常試験については陽性、小核試験は陰性(他の2製品については、試験結果はいずれも陰性)。

この試験結果を受けて、平成18年2月13日付けで食品安全委員会へ食品健康影響評価を依頼 → 資料2-1, 2-2

	製品名	販売者	諮問した食品健康影響評価の内容
B製品	キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒	キリンウェルフーズ(株)	食品衛生法第7条第2項の規定による本製品の販売禁止(食品安全基本法第24条第1項に基づく)
A製品	仙生露顆粒ゴールド	(株)サンドリー	当該製品の安全性について(食品安全基本法第24条第3項に基づく)
C製品	アガリクスK、ABPC顆粒	(株)サンヘルス	

上記評価依頼と同時に、B製品については、販売者による自主回収が行われ、現在は流通していない。

(2) 食品安全委員会においては、評価のためのワーキンググループを設置し、実験系において陽性反応が確認された突然変異及び染色体異常が動物実験においても同様に発現するか否かを確認するため、B製品について次の試験を追加的に実施すべきことを指摘(平成18年5月9日)した。→ 資料3-1

- ①トランスジェニックラットを用いた標的臓器における突然変異試験
- ②ポストラベリング法によるDNA付加体試験

(3) 指摘を受けて、国立医薬品食品衛生研究所において試験を実施し、本年2月末にイニシエーション作用を支持する結果はないとの追加試験が取りまとめられた → 資料3-2, 3-3

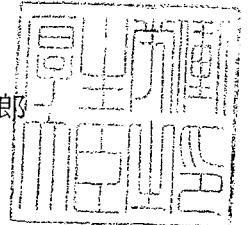
(4) 食品安全委員会においては、3月12日にワーキンググループを開催し、食品健康影響評価の内容について検討し、3月28日食品安全委員会より指摘事項が提示された。資料 → 4



厚生労働省発食安第0213001号  
平成 1 8 年 2 月 1 3 日

食品安全委員会  
委員長 寺田 雅昭 殿

厚生労働大臣 川崎 二郎



食品健康影響評価について

食品安全基本法(平成15年法律第48号)第24条第1項第1号の規定に基づき、下記事項に係る同法第11条第1項に規定する食品健康影響評価について、貴委員会の意見を求めます。

記

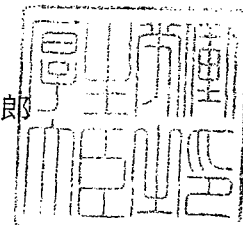
食品衛生法(昭和22年法律第233号)第7条第2項の規定に基づき、次に掲げるアガリクス (*Agaricus blazei* Murrill、別名カワリハラタケ) を含む製品について食品として販売することを禁止すること。

製品名：キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒  
販売者：キリンウェルフーズ株式会社

厚生労働省発食安第0213002号  
平成18年2月13日

食品安全委員会  
委員長 寺田 雅昭 殿

厚生労働大臣 川崎 二郎



食品健康影響評価について

食品安全基本法（平成15年法律第48号）第24条第3項の規定に基づき、下記事項に係る同法第11条第1項に規定する食品健康影響評価について、貴委員会の意見を求めます。

記

次に掲げるアガリクス（*Agricus blazei* Murrill、別名カワリハラタケ）を含む製品の安全性について

1. 製品名：仙生露顆粒ゴールド  
販売者：株式会社サンドリー
2. 製品名：アガリクス K<sub>2</sub>ABPC 顆粒  
販売者：株式会社サンヘルス

## アガリクス（カワリハラタケ）を含む粉末剤型の加工食品 に係るリスクプロファイル

### 1. 食品健康影響評価の対象となるアガリクスを含む加工食品の特徴

今回、健康影響評価を依頼したアガリクス（和名：カワリハラタケ、学名：*Agaricus blazei* Murrill）を含む顆粒状の加工食品3製品である。アガリクスは、キノコの種類であり、この乾燥物を粉末、顆粒及び錠剤にした食品、また乾燥物に栄養補助成分を添加後に粉末、顆粒、錠剤、カプセル状等の形状にした食品、及び菌糸体培養物を粉末、顆粒、錠剤、カプセル状等の形状にした食品が広く販売されている。

3製品のうち、今回、ラットによる中期多臓器発がん性試験の結果、発がんプロモーション作用が認められたキリンウェルフーズ（株）の製品「キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒」に関する製品の製造方法、分析試験成績等は提出資料のとおり。

（キノコは子実体と菌糸体に分けられる。子実体とは傘と軸の部分の名称で、菌糸体とは根の部分の細い糸のような形状をいう）<sup>資料4</sup>。

### 2. 経緯

アガリクス属のキノコに含まれるアガリチンについて、その毒性がかねてより指摘されていたことから、平成12年度厚生科学研究においてアガリクス属のキノコの毒性情報に関する文献検索を実施していたが、アガリクスに関して毒性報告はなかった。

その後、平成14年度にはアガリクスを含む製品のアガリチン含有量の実態調査に着手し、さらに平成15年度からキノコ中のアガリチン及びその誘導体の分析法の開発に関する研究を行い、アガリクス含有製品の一部にアガリチンが比較的高く含有するものがあることが初めて確認された。

一方、アガリクスを含む製品による健康被害が明らかとなった事例は報告されていないが、①アガリクスを含む製品による肝障害の疑い等の複数の事例が、学術雑誌等に掲載されていること ②アガリクスを含む製品が広域流通していることから、厚生労働省では平成15年度より、国立医薬品食品衛生研究所において、アガリクスを含む3製品の毒性試験を実施している。

この結果、国立医薬品食品衛生研究所の研究において、中期多臓器発がん試験を実施している3製品のうち、1製品（キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒）に発がんプロモーション作用が認められたとの中間報告があったため、今般、アガリクスを含む製品について、食品安全委員会に対し、食品健康影響調査を依頼した。

なお、その他の2製品（仙生露顆粒ゴールド、アガリクス K<sub>2</sub>ABPC 細粒）については、遺伝毒性試験の結果は陰性であり、中期多臓器発がん試験については、現在試験を実施中であるが、2製品とも、現時点（平成18年2月15日）においては、ラットにおける腫瘍性病変の変化は認められていない。今後、国立医薬品食品衛生研究所から試験の結果について報告があり次第、その結果を食品安全委員会に提出することとしている。

### 3. 遺伝毒性試験及び中期多臓器発がん性試験の概要

#### (1) 遺伝毒性試験及び中期多臓器発がん性試験に供試した製品

- ・ 仙生露顆粒ゴールド 販売者：(株)サンドリー(※) (以下「製品A」という)
- ・ キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒 販売者：キリンウェルフーズ(株)  
(以下「製品B」という)
- ・ アガリクス K<sub>2</sub>ABPC 細粒 販売者：(株)サンヘルス (以下「製品C」という)

(※) 試験対象とされた「仙生露顆粒ゴールド」は、(株)サンドリーが販売したものであるが、現在、(株)S. S. Iに経営譲渡されている。

#### (2) 遺伝毒性試験

ネズミチフス菌 4 株 (TA100, TA1535, TA98, TA1537) 及び大腸菌 1 株 (WP2 uvrA/pKM101 株) を用いてプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施し、チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用いて培養細胞に対する染色体異常誘発性を検索した。

また、雄の7週齢の ICR 系 (Crj:CD-1) マウスを用い、骨髄細胞における小核試験を実施した。

#### (3) 中期多臓器発がん性試験

本試験における試験法、投与量、検体は以下の考えに基づき選定した。

- 中期多臓器発がん性試験は、スクリーニング的意味合いが強いものの、ICH (日・米・EU 医薬品規制調和国際会議) においても発がん性評価における *in vivo* 追加試験のひとつとして推奨されており、国際的にも認められた方法であること、比較的短時間で発がん性に関する情報が得られることから、本試験を選択した。
- 投与用量は、本検体の人における摂取様態を勘案し、混餌投与とし、その場合の一般的に毒性が低いと思われる検体について設定する最高用量 5% (\*) を本試験での最高用量とした。
- 低毒性であることが事前に明らかであることから、用量設定試験は行っていない。5%混餌群が正常に摂取されるか否かのみを短期間 (1週間程度) 確認した。
- 検体の選定は、市販製品の中から、広域かつ一定期間継続的に市場に流通している製品のうち、製造法を大きく 3 種類に大別し、それぞれ、1 製品ずつ、合計 3 製品を選択した。

(\*) 5%最高用量は、混餌により (飼料が希釈されることなどから) 栄養障害を生じることが無いようにするために、経験的に設定された上限である。栄養価の低下した飼料を摂取させると、動物は総摂取量を増やして自動的に摂餌バランスを保とうとするが、5%を超えると飼料の希釈のみの影響で体重増加に差を生じること

が経験的にわかっている。

(食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針：厚生省生活衛生局食品化学課監修)

その結果、中期多臓器発がん性試験において、1製品(製品B)に、1.5%以上の用量で前胃、腎及び甲状腺において発がんプロモーション作用が示された。この用量はヒト推定暴露量の5~10倍程度であり、また、当該製品は遺伝毒性試験のうち、小核試験は陰性であったが、細菌を用いた復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験が陽性であった。そのため、当該製品の安全性について、食品安全委員会に、食品健康影響評価を依頼したものである。

なお、その他2製品については、遺伝毒性試験は全て陰性であり、現在、中期多臓器発がん性試験を実施中である。今後、国立医薬品食品衛生研究所から試験の結果について報告があり次第、その結果を食品安全委員会に提出することとしている。

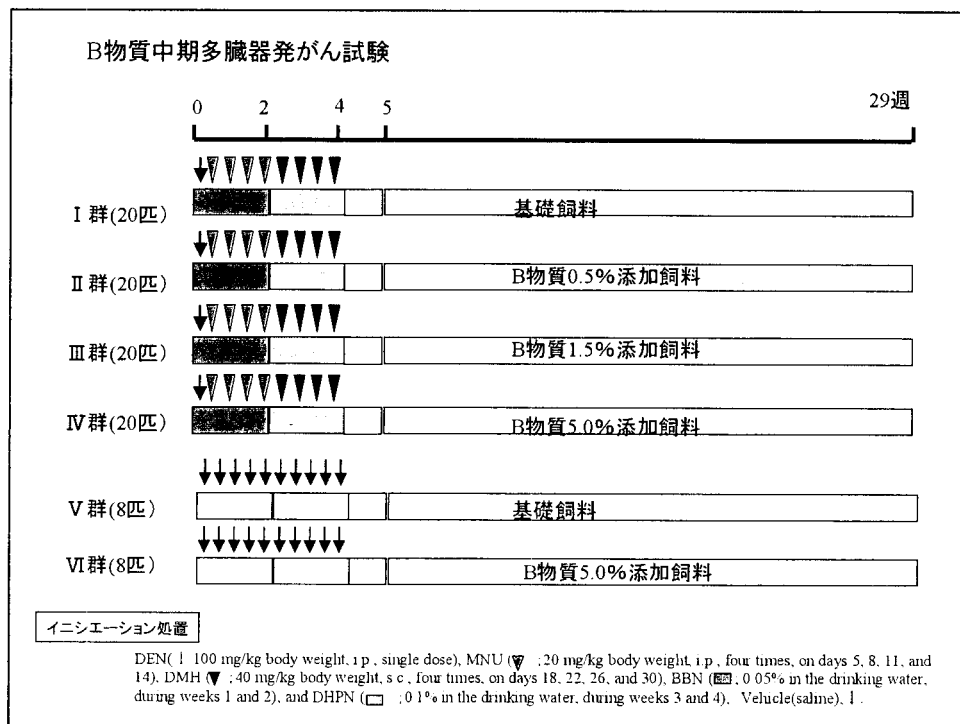
#### (4) 試験結果

##### ① 遺伝毒性試験

	遺伝毒性試験		
	復帰突然変異試験	染色体異常試験	小核試験
A 仙生露顆粒ゴールド	—	—	—
B キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒	+	+	—
C アガリクス K <sub>2</sub> ABPC 細粒	—	—	—

##### ② 中期多臓器発がん性試験

###### i) 試験方法概略：





F344 系雄ラットに、DEN (N-nitrosodiethylamine)MNU (N-methyl-N-nitrosourea), BBN (N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine), DMH (1,2'-dimethylhydrazine dihydrochloride (sym,N,N')) および DHPN (diisopropanolnitrosamine)による多臓器イニシエーション処置 (DMBDD 処置) を行った後、被験物質を 24 週間、0.5%、1.5%、及び 5.0%混餌投与した。対照群にはイニシエーション処置のみの群を置いた。また、参照群としてイニシエーション処置を施さない 2 群を用意し、その 1 群に 5.0%混餌投与を行った。

DMBDD 処置期間および被験物質投与期間を通じて一般状態の観察、体重、摂餌量および摂水量の測定を行い、被験物質投与期間終了時に臨床検査、病理学検査および肝臓の免疫組織学的検査を行った。

腫瘍発生等有害事象に関する有意差検定は、対照群との間のフィッシャー直接確率検定 (片側) によった。

#### ii) キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒 (製品 B) の試験結果

被験物質の平均摂取量は DMBDD+0.5%被験物質投与群で 231.0 (184~384) mg/kg/day, DMBDD+1.5%被験物質投与群で 685.7 (559~1,147) mg/kg/day, DMBDD+5.0%被験物質投与群で 2323.2 (1,818~3,715) mg/kg/day, 無処置+5.0%被験物質投与群で 1979.5 (1,721~2,833) mg/kg/day であった。

被験物質投与では、DMBDD イニシエーション処置に起因すると考えられる死亡例が、DMBDD+0%被験物質投与群で 4 例、DMBDD+5.0%被験物質投与群で 1 例認められた。

用量相関性を示し有意に増加した増殖性・腫瘍性病変は、肉眼的に前胃の白色斑と腎嚢胞であり、病理組織学的には前胃の扁平上皮過形成、腎細胞腺腫及び悪性腎間葉性腫瘍/腎芽腫、甲状腺濾胞細胞腺腫及び濾胞細胞腺癌であった。腎細胞腺腫、甲状腺濾胞細胞腺腫及び濾胞細胞腺癌は、DMBDD+1.5%被験物質投与群および DMBDD+5.0%被験物質投与群の両群で有意な増加が認められた。

表1 The increasing incidence of gross findings in the groups treated with DMBDD and Test substance

Group		I	II	III	IV	V	VI
No. of animals examined		20	20	20	20	8	8
Organ	findings						
Stomach	white patch/zone	4	11*	13**	15**	0	0
Kidney	cyst	0	2	6*	7**	0	0

Significant difference from Group I: \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$

表2 The increasing incidence of histopathological findings in the groups treated with DMBDD and Test substance

Group		I	II	III	IV	V	VI	
No. of animals examined		20	20	20	20	8	8	
Organ	Findings							
Proliferation or neoplastic lesions								
Forestomach	squamous hyperplasia	6	10	10	15**	0	0	
Kidney	adenoma, renal tubule	3	6	10*	11**	0	0	
	mesenchymal tumor, malignant	10	10	13	16*	0	0	
Thyroid gland	follicular cell adenoma	9	14	17**	20**	0	0	
	follicular cell carcinoma	1	5	6*	8**	0	0	
Non neoplastic lesions								
Heart	cellular infiltration, mononuclear	All	7	16**	17**	18**	8	6
		Slight	7	16	17	18	6	4
		Moderate	0	0	0	0	2	2
Sternum	chondromucinous degeneration	All	5	7	10	20**	2	7#
		Slight	5	7	10	11	2	3
		Moderate	0	0	0	9	0	4
Liver	fatty change, hepatocyte	All	12	19**	20**	18**	0	1
		Slight	12	18	20	18	0	1
		Moderate	0	1	0	0	0	0

Significant difference from Group I, \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$

Significant difference from Group V, #:  $p \leq 0.05$

### 考察

本試験は、5種類の発がん物質を実験開始初期に発がんイニシエーターとして投与し、複数の臓器について、発がんプロモーター活性を同時に検出するものである。プロモーター活性を示す物質の多くは、標的臓器に細胞増殖などの変化を誘発することが多いため、その作用を確認するための参照群として、イニシエーションを行わないサテライト群を設けている。尚、ほとんどの遺伝毒性発がん物質及び非遺伝毒性発がん物質は、ともにプロモーション作用も同時に持っていると考えられている。従って、本実験では、この様な発がん物質とプロモーター作用のみをもつ非遺伝毒性発がん物質を明確に区別することは困難である。他方、プロモーター化学物質は、標的臓器にプロモーション作用に関連する変化を背景変化として誘発することがある。そうした背景変化としては、例えば、甲状腺については、血中 TSH の上昇による瀰漫性濾胞過形成 (diffuse follicular hyperplasia)、肝については、アポトーシス、核分裂像や変異細胞巣などがある。

本検体は、イニシエーター処置群において腫瘍性病変として、甲状腺濾胞上皮、前胃扁平上皮、及び腎の腫瘍を用量相関性を持って有意に誘発したことから、これら3

臓器に対して発がんプロモーション作用を示すと判定された。

甲状腺濾胞上皮由来の腫瘍の発生機序としては、化学物質が直接濾胞上皮細胞に作用する場合と甲状腺ホルモンの合成を阻害もしくは代謝を促進することにより negative-feedback 機構が持続的に働き、濾胞上皮の過形成を経て腫瘍性病変へと発展する間接作用による場合がある。

今回の試験では、参照サテライト群に於ける背景像として、被検物質による増殖促進作用を示唆する所見が乏しいことが指摘される。

甲状腺においては、濾胞上皮細胞の明瞭な過形成性反応は見られず、ごく軽微な濾胞上皮細胞の細胞の丈の増加（おそらく、画像解析による定量を行って、検出されるかどうかぎりぎりの程度）が観測される。即ち、下垂体を解した刺激による発がんプロモーション作用以外の作用が働いた可能性がある。

腎尿細管に於ける変性病変（ $\alpha 2u$ -グロブリンと腎腫瘍発生の関連性の有無の確認の意味を含む）についても、被検物質による（慢性腎症の）増悪所見は明らかでない。このことから、腎発がんプロモーション作用がラット特有の $\alpha 2u$ -グロブリン関連のものではない可能性が指摘される。

非腫瘍性病変には、心臓の単核球浸潤、胸骨の軟骨基質粘液変性、及び肝細胞の脂肪化を認められている。

### iii) 他の2製品について

今後、国立医薬品食品衛生研究所から試験の結果について報告があり次第、その結果を食品安全委員会に提出することとしている。

## 4. 対象となる危害要因の科学的特性と分析法

### (1) 概要

アガリクスは、地面から生え、柄が長くて太く、香りが強いキノコ的一种である。現在では「アガリクス」という名称が一般的であるが、日本ではカワリハラタケ（学名：*Agaricus blazei* Murrill）として知られている。1965年にブラジルで日本人が初めて栽培に成功したキノコで、ブラジル産、中国産のものが多いが、国内でも人工栽培されるようになった。

### (2) 成分

他のキノコに比べて粗タンパク質が43%と多い。多糖類、ビタミンB2、ビタミンD、マグネシウム、カリウムなどを多く含む。また、アガリクス属キノコには、アガリチンというフェニルヒドラジン誘導体が含まれている<sup>資料1</sup>。

### (3) 分析方法

アガリクスは他のキノコ製品・酵母製品と同様に $\beta$ -D-グルカンを含有している。 $\beta$ -D-グルカンの構造特性や分子量分布はキノコの種類により大きく異なり、その構

造と活性の関連については一致した見解が得られていない。特異検出キットによるキノコ中  $\beta$ -グルカン総量が測定されている。アガリクス特有の  $\beta$ -D-グルカンに関しては構造決定に関する報告がある。

ビタミンD前駆物質であるエルゴステロールについてはガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS)を用いた分析法の報告がある。

アガリチン分析法は、LC/MS/MS を用いた方法により分析した。

(平成 15 年度厚生労働科学研究の「担子菌類中の有害物質の評価に関する研究」報告書)

#### (4) 毒性関連情報

##### ① 構造及び物性

- ・ アガリクス属キノコに含まれるアガリチンそのものには毒性が報告されていないが、アガリチンが生体内の  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase により分解され、4-(Hydroxymethyl)phenylhydrazine(HMPH)を産生し、さらに HMPH が酸化されて 4-(Hydroxymethyl)benzenediazonium ion (HMBD)が生成されると考えられている<sup>資料1,資料2</sup>。アガリチンの前駆物質として 4-Hydrazinobenzoic acid (CPH)、 $\beta$ -N-[ $\gamma$ -L-(+)glutamyl]-4-(carboxy)-phenylhydrazine (GCPH)が考えられている。
- ・ マッシュルーム中のアガリチン量については、加熱加工(煮る、揚げる、電子レンジによる加熱)により減衰されるという報告がある。またアガリチンは開放系の水溶液中では、2 日間で完全に分解されることが明らかになっている<sup>資料4</sup>。
- ・ マッシュルーム中のアガリチン量については、種々報告されている<sup>資料5</sup>。平成 15 年度厚生労働科学研究の調査ではマッシュルーム中のアガリチン量は湿重量で 198  $\mu$ g/g と測定された。

##### ② 体内動態

- ・ マウスやラット等の動物実験で経口投与された放射同位元素標識アガリチンの代謝は速やかに行われ、消失する。数時間で血中放射活性レベルはピークに達し、3 時間後消化管内には検出されなくなる。アガリチンの代謝体で考えられる毒性が強い第一候補として HMBD があるが、動態研究では血液からは検出されていない。
- ・ アガリクス経口投与マウスでは、アガリチンは 20 分で血中濃度が最大となり、その後急速に消失、90 分以降は検出されなかった。アガリチン標準品を用いた実験においても同様の傾向が見られた。(平成 16 年度厚生労働科学研究)
- ・ 経口投与された放射同位元素標識アガリチンを用いた代謝実験では、投与後数日たっても、肝臓、腎臓、胃などで共有結合された放射活性が残存する。最も高い放射活性が残存するのは胃である。 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase はアガリチンを 2 化合物に分解する。そのうち主要のものが HMPH であり、次に強い変異原性のある HMBD に代謝すると考えられている。<sup>資料2-1</sup>

### ③ DNA 結合性と変異原性

- ・ アガリチンの代謝体で考えられる HMBD は強い変異原性及び発がん性が示唆されている。
- ・ HMBD は aryl diazenyl ラジカルと aryl ラジカルの 2 種のラジカルを産生し、DNA の deoxyribose 単位の C や、プリン環の N に反応し、DNA 損傷を起こすと考えられている<sup>資料2-2</sup>。
- ・ Ames テストでマッシュルームの水抽出・エタノール抽出に弱い活性があることが示されている。また精製されたアガリチンにおいても弱い変異原性があることが示されている。そのためマッシュルーム抽出物の遺伝毒性はアガリチンやその代謝誘導体によるものと示唆されている<sup>資料6, 資料7</sup>。なお、アガリチンの変異原性は、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase の高い腎ホモジネートを代謝活性化系として用いた場合の方が肝ミクロソームを用いた場合より強く現れることが確認されている。
- ・ また、トランスジェニックマウス (LacI gene を挿入した組換えマウス) を用いた粗抽出アガリチン経口投与実験において、粗抽出アガリチンは前胃、腎臓に変異を誘発したとの報告がある。また HMBD が末梢のリンパ球に小核を誘発するとの報告がある。

### ④ 毒性試験

- ・ 発がん性の観点としてアガリチスの慢性毒性実験は行われていないが、マッシュルームとそのフェニルヒドラジンのマウスを用いた長期発がん性試験研究が以下の論文で行われており、発がん性を示すことが示されている<sup>資料8-1, 2, 3</sup>。肺、前胃、肝臓、卵巣、腺胃等で腫瘍発生が高い。  
Toth B. and Ericson, Cancer Research 46, 4007-4011 (1986), Toth B. et al. Oncology Rep. 4,931-936 (1997a), Toth B. et al. in vivo. 11,227-232 (1997b), Toth B. et al. in vivo. 12,239-244 (1998), McManus et al., Laboratory Invest., 57, 78-85 (1987), Toth B. et al. Anticancer Research. 6,917-920 (1986a), Toth B. et al. Bt. J. Cancer. 46,417-422 (1982)
- ・ マッシュルームの長期発がん性動物実験の 4 つの研究のうち、信頼性のあると思われる 3 つの研究で発がん性があることが示されている<sup>資料9-1, 2, 3</sup>。残りの 1 つの研究では加工したマッシュルームを用いたもので、腫瘍発生の増加は有意ではないと結論している。
- ・ 一方、ラットの長期毒性試験では、腫瘍が発生しなかったと報告されている。しかし試験動物数が少なく、腫瘍発生の頻度が低いケースは検出できなかったとされている。またこれらの研究では、マッシュルームを加工した飼料をもちいており、そのような加工過程で顕著に活性フェニルヒドラジン誘導体は分解されると考えられている。
- ・ アガリチンの水溶液での溶解したものを長期投与した実験では、発がん性が見られていない。しかし近年、水溶液中で比較的酸化分解することがわかり、この実験の信頼性が疑問視されている<sup>資料9-1</sup>。

- ・ 関連代謝物 CPH, GCPH, HMBD は高い投与量で発がん性があることが示されている<sup>資料9-2, 3, 4</sup>。
- ・ 信頼性のあるマッシュルーム及び関連毒性物質の慢性毒性研究をまとめたものを資料 10 に示す。また北欧のマッシュルーム及び関連毒性物質のリスク評価を資料 11 に示す。

#### (5) その他アガリクスに関する毒性情報

- ・ *Agaricus* の熱水抽出物をマウスに経口投与した場合、脾臓細胞中の Thy1.2 (pan T cells)、L3T4 (CD4, helper T cells) および Lyt2 (CD8, cytotoxic T cells) 陽性の細胞集団の割合が有意に増加した。
- ・ マウスにおいて、double-grafted tumor system を用い、アガリクス子実体の酸処理画分(ATF)で原発性腫瘍(primary tumor)を処理したところ、抗腫瘍活性の著しく上昇した NK 細胞が、腫瘍部位へ浸潤した。また、ATF は、試験管内においてアポトーシス誘導によって腫瘍細胞の増殖を直接抑制した。
- ・ 一部のアガリクス製品には、カドミウムの含有量が高いものが見られたが、自主的な基準等を持って対応が図られている。
- ・ 食品添加物であるヒメマツタケ (アガリクス) の水抽出物 (*Agaricus blazei* Murrill) の菌糸体および子実体より水で抽出して得られたもの) をラットに投与し、90 日間反復投与毒性試験を行った報告では、ヒメマツタケ水抽出物の NOAEL (無毒性量) は食餌中に 5%、すなわち 2654mg/kg/日 (雄)、2965mg/kg/日 (雌) であった。また、遺伝毒性試験は陰性であった。

### 5. 対象となる危害要因の海外及び国内における含有実態調査等

#### (1) これまでの国内外の試験結果

アガリクス属のキノコには、アガリチン ( $\beta$ -N-[ $\gamma$ -L-(+)Glutamy]l]-4-hydroxy- methyl phenylhydrazine, Agaritine) <sup>資料2</sup> というフェニルヒドラジン誘導体が含まれており、その毒性についてかねてから指摘されていた。

平成 12 年度厚生科学研究費補助金生活総合安全研究事業「食品中の有害物質等の評価に関する研究 (主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 合田幸広)」において、アガリクス属キノコ 27 種のヒドラジン誘導体の存在及びその毒性情報に関する文献調査が行われ、アガリクス (*Agaricus blazei* Murrill) に関しては、アガリチンを含めたヒドラジン誘導体の存在、及びその毒性情報に関する報告は見受けられていなかった<sup>資料12</sup>。また、マッシュルーム (*Agaricus bisporous*) にはアガリチンが含まれており、マウスを用いた動物実験において発がん性が確認されているとの文献報告があった。

平成 14 年度厚生労働省により、アガリクスを含む食品について簡易分析によるアガリチン含有量の実態調査が行われ、市販の粉末、顆粒及び錠剤等の形状のアガリクスを含む食品の一部にアガリチンが比較的高く含有されていることが認められた。

平成 15 年度から平成 17 年度の厚生労働科学研究費補助金食品の安全性高度化推進研究事業「担子菌類中の有害物質の評価に関する研究 (主任研究者 国立医薬品食

品衛生研究所 穂山浩)」において開発した、LC/MS/MS を用いた高選択的高感度分析法により、種々のキノコ及びアガリクスを含む食品中のアガリチン含有量を調査したところ、一部のアガリクスを含む製品にアガリチンが N.D.~最大 2,017  $\mu\text{g/g dry}$  の範囲でアガリチンが含まれているものがあることが確認された<sup>資料3</sup>。また、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) 中には 198  $\mu\text{g/g wet}$ , のアガリチンが検出された。シイタケ (*Lentinus edodes*), マイタケ (*Grifola frondosa*), ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*), エリンギ (*Pleurotus eryngii*) 中にはアガリチンは検出されなかった。

(2) 評価依頼した当該製品中のアガリチン含量<sup>資料3</sup>

	( $\mu\text{g/g dry}$ )
	H17 年度調査
製品 A 仙生露顆粒ゴールド	408
製品 B キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒	1348
製品 C アガリクス K <sub>2</sub> ABPC 細粒	N. D.

N. D. : 検出限界以下

(3) アガリチン摂取状況

① 北欧のマッシュルームからのアガリチン暴露評価

- ・ デンマーク、アイスランド、ノルウェー、スウェーデンの北欧の国々では、マッシュルーム を 食用習慣として摂取している。
- ・ アガリチンの 1 日摂取量は 2.1-36  $\mu\text{g/day/kg body weight}$  (北欧人の平均体重 60 kg で換算) 年間 48-788 mg/year の摂取量
- ・ マウスの慢性投与毒性実験のデータからリスク評価が平均して  $200 \times 10^6$  と計算されている。これは生やフリーズドライのマッシュルームを 1 日に 0.1 g/kg body weight (1 日摂取量 6 g) を一生涯食べ続けると 1/5000 の確率でがんが発生する危険性があると評価されている<sup>資料12</sup>。(がん発生リスクは Linear extrapolation 法によって計算された。マウスの平均体重を 25g、ヒトの平均体重を 60kg で、マウスの平均寿命を 70 weeks とし、加工による影響などは考慮していない。)

② 我が国のマッシュルームからのアガリチン暴露評価

- ・ 国民栄養摂取の調査のキノコ類内訳から 1 日に摂取する平均マッシュルーム量は下記となっている。マッシュルーム 0.062 g、マッシュルーム(ゆで) 0.019 g、マッシュルーム水煮缶詰 0.283 g
- ・ 調査したマッシュルーム及び缶詰の測定データから、缶詰中のマッシュルームは乾燥重量で 6.7  $\mu\text{g/g}$  でマッシュルームは湿重量で 198  $\mu\text{g/g}$  となる。缶詰のマッシュルームは乾燥重量の値なので若干多く見積もることになるが、この測定値を用いてアガリチン摂取量を計算すると、合計で 14.3  $\mu\text{g/g}$  になる。これを日本人の平均体重 50 kg として、kg body weight に計算すると 0.29  $\mu\text{g/day/kg body weight}$  になる。

- ・ 北欧のマッシュルーム中アガリチンの摂取量 2.1-36  $\mu\text{g/day/kg body weight}$  なので、1日に約 5-6 g マッシュルームを摂取する北欧人に比べて、約 1/10 以下の摂取量になる。

### ③ アガリクス乾燥物食品からのアガリチン摂取試算

- ・ キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒の推奨される 1 日摂取量 (5 g) とアガリチンの定量値 (1.35 mg/g) から 1 日摂取量を計算すると、1.35 mg/g (最大値)  $\times$  5 g = 6.75 mg になり、日本人の平均体重を 50 kg として 1 kg あたりで計算すると  $6.75 \text{ mg} / 50 \text{ kg} = 135 \mu\text{g/day/kg body weight}$  となる。
- ・ 仙生露顆粒ゴールドの推奨される 1 日摂取量 (1.8-5.4 g) とアガリチンの定量値 (0.41 mg/g) から 1 日摂取量を計算すると、 $0.41 \text{ mg/g} \times 1.8-5.4 \text{ g} = 0.74-2.21 \text{ mg}$  になり、日本人の平均体重を 50 kg として 1 kg あたりで計算すると  $0.74-2.21 \text{ mg} / 50 \text{ kg} = 14.8-44.3 \mu\text{g/day/kg body weight}$  となる。

## 6. 対象となる危害要因の既知の食品からの低減方法

過剰摂取しないこと (バランスのよい食事に気をつけること。)

## 7. 対象となる危害要因のリスクに対する消費者の認識

リスクに対する認識はおそらくないと思われる。

## 8. 対象となる危害要因に対する国際的及び各国の取り組み状況

アガリクスに関する規制はないと考えられる。

## 9. その他の参考事項 (アガリチンについて)

### (1) 対象となる危害要因の既知の食品からの低減方法

マッシュルーム中のアガリチン量については、加熱加工(煮る、揚げる、電子レンジによる加熱)により減衰されるという報告がある。

### (2) 対象となる危害要因のリスクに対する消費者の認識

一般に認識されていないと考えられる。

### (3) 対象となる危害要因に対する国際的及び各国の取り組み状況

#### ① 国際がん研究機関 (IARC)

アガリチン ( $\beta$ -N-[ $\gamma$ -L-(+)Glutamyl]-4-hydroxy- methyl phenylhydrazine ) について、グループ 3 (人に対する発がん性について分類できないもの) とされている。

#### ② FAO/WHO 合同食品添加物専門家会合 (JECFA)

これまでに評価は行われていない。Phenylhydrazines (Agaritine を含む) について、PRIORITY LIST に掲載されている。



(4) その他

物質の特定	
CAS No.	2757-90-6
英名	Agaritine
和名	アガリチン
分子式	$C_{12}H_{17}N_3O_4$
分子量	267.28
別名(英名)	$\beta$ -N-[ $\gamma$ -L-(+)-Glutamyl]-4-hydroxy- methyl phenylhydrazine
別名(和名)	$\beta$ -N-[ $\gamma$ -L-(+)-グルタミル]-4-ヒドロキシ-メチル フェニルヒドラジン

10. 現時点で不足しているデータ

被験物質 B の遺伝毒性におけるアガリチンの関与を検証するため、細菌を用いた復帰突然変異試験を実施する必要がある。

アガリチン、被験物質 B について滅菌水に懸濁直後のものと、調製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) を用いてプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施する予定。



府食第 360 号  
平成 18 年 5 月 9 日

厚生労働省医薬食品局  
食品安全部基準審査課長 殿

内閣府食品安全委員会事務局評価課長

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 (依頼)

「食品健康影響評価について」(平成 18 年 2 月 13 日厚生労働省発食安第 0213001 号)により貴省から意見を求められていることについて、平成 18 年 4 月 19 日に開催された食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループ (第 1 回) において審査を実施したところ「キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒」について、別紙のとおり追加試験の実施及び資料の提出をお願いします。

<連絡先>

内閣府食品安全委員会事務局  
評価課 中山、浦野  
TEL : 03-5251-9138、9169  
FAX : 03-3591-2236

アガリクスを含む製品について、平成18年4月19日に開催された食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループ(第1回)で審査を行い、以下のとおり指摘等がありましたので、追加資料の提出をよろしく申し上げます。

<指摘事項>

1 今回提出された「キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒」(以下「B製品」という)の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。

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、<sup>32</sup>Pポストラベリング方法の実施についても検討すること。

3 B製品の発がん促進作用の原因物質の究明に引き続き努めること。

<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。

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。

以 上



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「キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒」(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い。

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聞いている。

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ところ、-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 倍を超えなかった。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)

## 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. 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 圓 (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



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. 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

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

- 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. 陰性対照

- 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)

- 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90~190g)
- 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」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る施設] (W 3.5 × D 5.5 × H 2.5 m, 48.1 m<sup>3</sup>) 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 mmH <sub>2</sub> O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-Isolator™ System (Lab Products) ラックを使用し, Zyfon™ 製飼育ケージ (W 26.6 × D 48.2 × H 20.3 cm, 26,027.0 cm<sup>3</sup>) に床敷き (ALPHA-dri™, 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)<sup>1.5</sup>

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))<sup>1.5</sup>

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楽死させる。

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
バクタアガー	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バスを用いて 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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.75	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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) をろ過除菌後、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] <sup>注</sup>	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 に調整したものをを用いる。

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 飽和フェノール (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, 大塚製薬工場) 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. 陰性対照

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<sup>®</sup>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、ディスプレイブルシリンジと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100g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)。

肝臓	左葉の外周近くを生検トレビン (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 <sub>2</sub> ) 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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) 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 <sub>2</sub> ) 中で凍結させる (遺伝子突然変異解析用。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 <sub>2</sub> 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、保存する (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LN <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> ) 中で凍結させる。
胃	胃を摘出し、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 <sub>2</sub> ) 中で凍結させる。
精巣	左右の精巣を摘出した後、保存袋に入れ、LN <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> ) 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 <sub>2</sub> 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。

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分間遠心する。上清をスポイト等で除去し、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る。適量 (20~50 µL程度) のTE緩衝液 (ニッポンジーン) を加え、一晚室温に放置し、残渣のDNAを溶解させる。調製後は冷蔵にて保存する。

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ヵ月以内に処分する。

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を添加する。これに凍結保存 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌hfr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 を接種した後、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 溶液およそ 10 µL をチューブ (RED) に加え、ピペッティングにより混合し、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、十分に攪拌する。

#### 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、総ブランク算出用 (タイター用) 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 になる) 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 をタイター用チューブに加え攪拌する。タイター用チューブに、トップアガー 17 mL を加え混合し、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、タイター用と同様に LB 寒天培地に重層する。タイター用プレートは、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、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. ブランクの計数

#### 17.3.1. 総ブランク数算出

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る。

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

#### 17.3.2. 変異ブランク数算出

セレクション用プレートに出現したブランク数を計数する。セレクション用プレートに出現したブランク数が、変異ブランク数となる。

#### 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。

出現した変異ブランク数を総ブランク数で除したものが、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 圓

中嶋 圓

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 榮二

牧 榮二

2006年12月19日

添付資料1

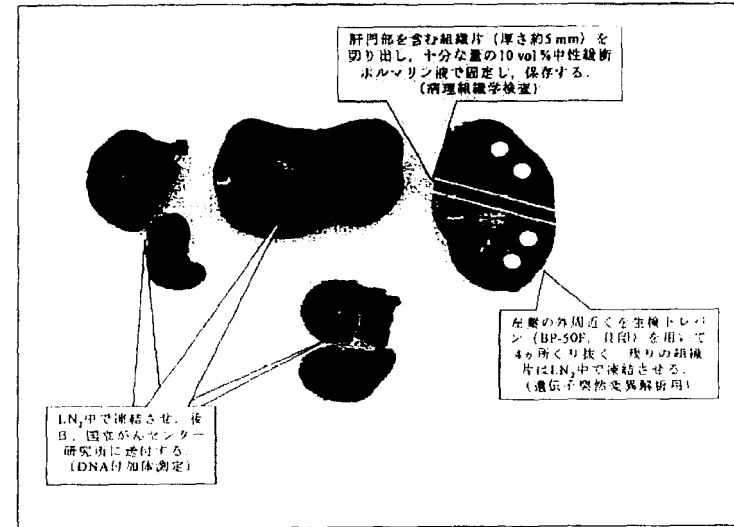


図1 肝臓のサンプリング

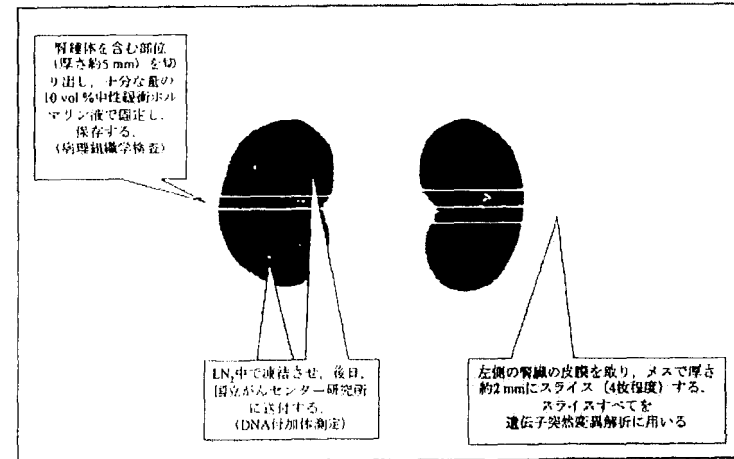


図2 腎臓のサンプリング



## 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。

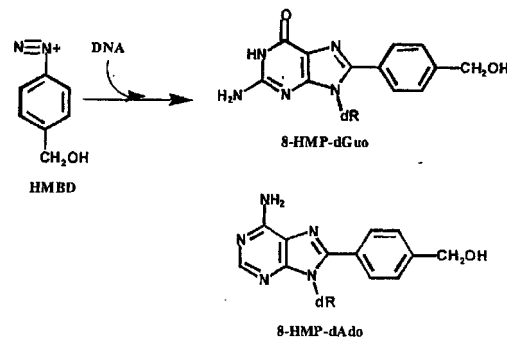
試験群：コントロール (n=3)

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 <sup>32</sup>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 <sup>32</sup>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) <sup>32</sup>P-ポストラベル法

<sup>32</sup>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'-末端を [<sup>32</sup>P]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、キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒、(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きれな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 については、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  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ ( $\gamma$ -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。 $\gamma$ -GTP の大腸菌における相同遺伝子である *ggi* 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られる。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をを用いた。

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致を示しており、アガリチンの分解物は -S9 mix の条件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。

ラット二段階発がん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のが重要であろう。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果たしていることが示唆される。また、トラン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	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		検体A	検体B	検体C	検体D	
		WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	
-S9mix	陰性対照	97 110 ( 104)	102 123 ( 113)	121 111 ( 116)	113 95 ( 104)	
	39.1	124 123 ( 124)	130 142 ( 136)	129 135 ( 132)	118 112 ( 114)	
	78.1	123 139 ( 131)	121 183 ( 137)	198 143 ( 171)	119 110 ( 115)	
	156	180 186 ( 183)	162 153 ( 158)	153 170 ( 162)	128 129 ( 128)	
	313	220 239 ( 230)	190 172 ( 181)	185 161 ( 173)	130 152 ( 141)	
	625	322 298 ( 310)	223 227 ( 225)	229 186 ( 208)	162 151 ( 157)	
	1250	361 408 ( 385)	275 289 ( 282)	278 329 ( 304)	212 219 ( 216)	
	2500	581 560 ( 561)	364 441 ( 403)	363 448 ( 406)	290 288 ( 289)	
	5000	776 830 ( 803)	811 580 ( 596)	663 777 ( 720)	431 408 ( 420)	
	+S9mix	陰性対照	150 168 ( 159)	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	315 328 ( 322)	226 279 ( 252)	165 201 ( 183)	193 193 ( 201)
156		445 436 ( 441)	231 236 ( 234)	217 234 ( 226)	237 214 ( 226)	
313		572 556 ( 564)	223 261 ( 242)	264 239 ( 252)	218 221 ( 220)	
625		718 705 ( 712)	273 273 ( 273)	272 277 ( 275)	217 238 ( 238)	
1250		907 874 ( 891)	323 314 ( 319)	305 291 ( 298)	253 272 ( 263)	
2500		1021 1074 ( 1048)	360 349 ( 355)	372 349 ( 361)	299 280 ( 290)	
5000		1338 1297 ( 1318)	417 401 ( 409)	451 422 ( 437)	291 302 ( 297)	
陽性対照		名称	AF-2	AF-2	AF-2	AF-2
		用量(μg/プレート)	0.01	0.01	0.01	0.01
		コロニー数/プレート	3495 3541 ( 3518)	4739 5109 ( 4924)	2799 2815 ( 2807)	3439 3328 ( 3384)
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
S9mixを必要とするもの	名称	AF-2	AF-2	AF-2	AF-2	
	用量(μg/プレート)	2.00	2.00	2	2	
	コロニー数/プレート	1139 1093 ( 1116)	1232 1392 ( 1312)	1115 1185 ( 1150)	1126 1098 ( 1112)	
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	

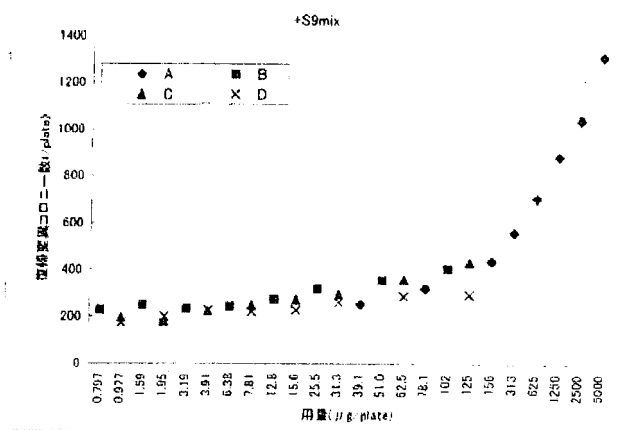
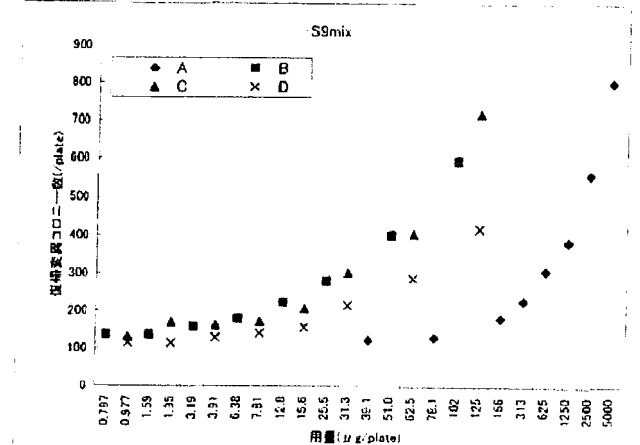
AF-2 :2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2-AA :2-Aminoanthracene

-S9mix	A	B	C	D	-S9mix	検体A	検体B	検体C	検体D		
0.797		136			陰性対照	101	陰性対照	113	陰性対照	101	
0.977			132	114	39.1	121	0.797	136	0.977	132	
1.59		137			78.1	131	1.59	137	1.95	171	
1.95			171	115	156	183	3.19	158	3.91	162	
3.19		158			313	230	6.38	181	7.81	173	
3.91			162	128	625	310	12.8	225	15.6	208	
6.38		181			1250	385	25.5	282	31.3	304	
7.81			172	141	2500	561	51.0	403	62.5	406	
12.8		225			5000	893	102	506	125	720	
15.6			208	157							
25.5		282									
31.3			304	216	+S9mix	陰性対照	159	陰性対照	185	陰性対照	183
39.1	121				39.1	235	0.797	228	0.977	198	
51.0		103			78.1	322	1.59	252	1.95	183	
62.5			106	208	156	111	3.19	231	3.91	224	
78.1	131				313	564	6.38	242	7.81	252	
102		396		220	625	712	12.8	273	15.6	275	
125			220	420	1250	891	25.5	319	31.3	298	
156	183				2500	1018	51.0	355	62.5	361	
313	230				5000	1318	102	160	125	437	
625	310										
1250	385										
2500	561										
5000	893										

+S9mix	A	B	C	D
0.797				
0.977		228		198
1.59		252		174
1.95			183	201
3.19		231		
3.91			226	226
6.38		242		
7.81		273		220
12.8			275	228
15.6		319		
25.5			208	263
31.3	255			
39.1		355		
51.0			361	290
62.5				
78.1	322			
102		309		
125			337	347
156	111			
313	564			
625	712			
1250	891			
2500	1018			
5000	1318			

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(用量)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 50 $\mu$ L/plate

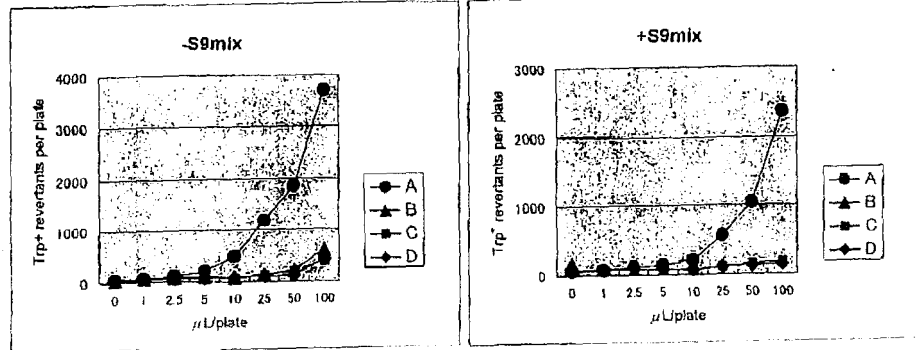
solvent: Water

without S9

$\mu$ L/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	40	38	39	40	44	42	39	33	36
1	63		63	48	54	51	63	51	57	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	61	82	72	43	62	63	62	69	66
25	1168	1184	1176	152	106	129	147	68	118	91	98	95
50	1020	1784	1052	188	218	204	182	217	200	120	103	112
100	3856	3536	3696	640	576	608	336	448	392	432	416	424

with S9

$\mu$ L/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	46	45	68	57	50	51	51
1	69		69	54	58	56	75	72	74	76	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	191	211	78	52	64	59	82	71	51	79	65
25	520	608	564	125	128	128	117	113	116	105	93	99
50	1072	1024	1048	125	154	140	151	150	161	121	121	121
100	2272	2432	2352	155	160	158	192	179	188	133	140	137



Ames test

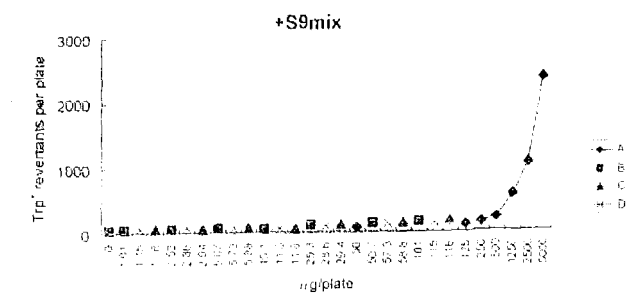
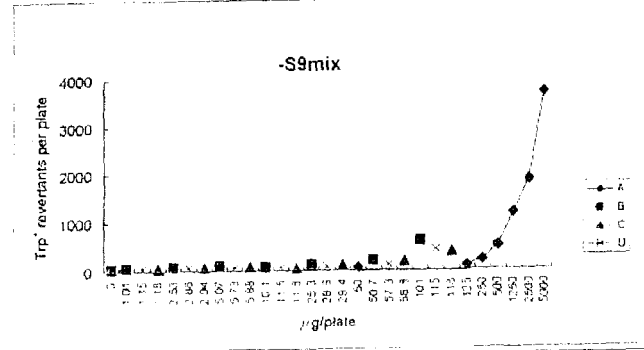
被験物質： 検体A、検体B、検体C、検体D

strain: *E. coli* WP2 uvrA/pKM101

S9: PB+5,6-BF誘導rat liver 50 $\mu$ L/plate

solvent: Water

$\mu$ g/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	54
1.01		51				58		
1.15				63				68
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				64		
11.45				66				65
11.75			53				71	
25.33		129				126		
28.63				95				99
29.38			118				115	
50	63				69			
50.65		204				140		
57.25				112				127
58.75			200					151
101.3		608					158	
114.5				424				137
117.5			392					186
125	103				111			
250	200					142		
500	488					211		
1250	1176					664		
2500	1852					1048		
5000	3696					2352		



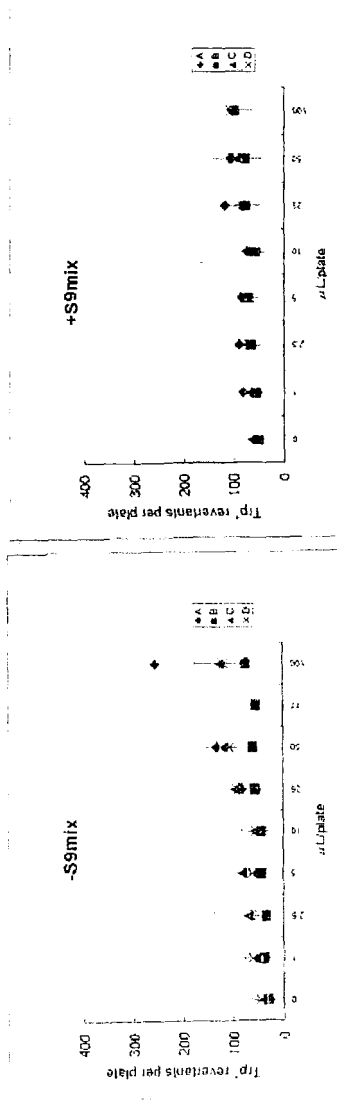
Ames test

試験物質: 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)

stain: E.coli WP2uvrA/pKM101  
S9: PB+5.6g/plate  
solvent: Water

Table with columns for sample type (without S9), concentration (μL/plate), and Ames test results for samples A, B, C, and D across different dates (2006.6.7, 2006.6.16, 2006.6.21).

Table with columns for sample type (with S9), concentration (μL/plate), and Ames test results for samples A, B, C, and D across different dates (2006.6.7, 2006.6.16, 2006.6.21).



Ames test

試験物質: 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)

Large table showing Ames test results for samples A, B, C, and D with and without S9 mix, including colony counts and average values. Includes a summary table at the bottom for S9mix requirements and solvent.

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

2-AA :2-Aminoanthracene

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(湿度、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。抽出液をエバポレーターで乾固させ、0.01%酢酸: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(湿度、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)	5.20(μg/g)	4.88(μg/g)
調製当日100とした比率	100	103.4	97.1
5%	46.9(μg/g)	44.6(μg/g)	45.3(μg/g)
調製当日100とした比率	100	95.2	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、動物が入らず、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（添付ファイル被験被験物質 A 飼料保管条件参照）

- 1) 給餌器は床置きものを使用。
- 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ぼなく、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℃）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℃、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℃、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した。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

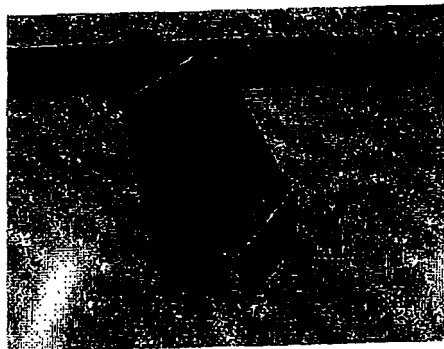
ポリカーボネート製飼育ケージ（W21.5×D37.4×H20.0 cm, 16,082 cm<sup>3</sup>）を使用しました。

## ⑦ ケージ内の飼育匹数

原則 2 匹飼育ケージでした。

## 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. 餌の保管条件 (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℃: 実測値: 4~6℃) 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℃: 実測値: 2~8℃ 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 $22 \pm 3$ ℃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. 餌の交換頻度

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せん。

##### 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㈱: W260×L412×H195mm)、ステンレス製ケージ蓋は高圧蒸気滅菌して使用しています。

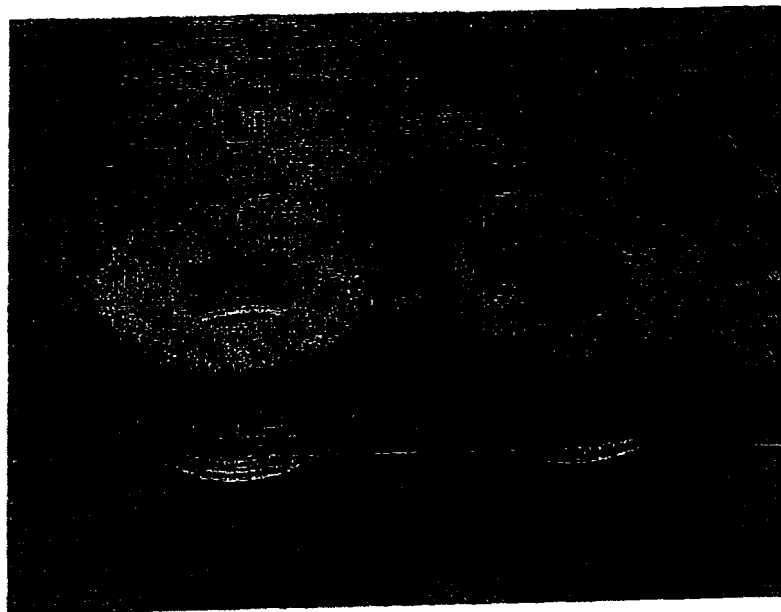
##### 7. ケージ内の飼育匹数

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。





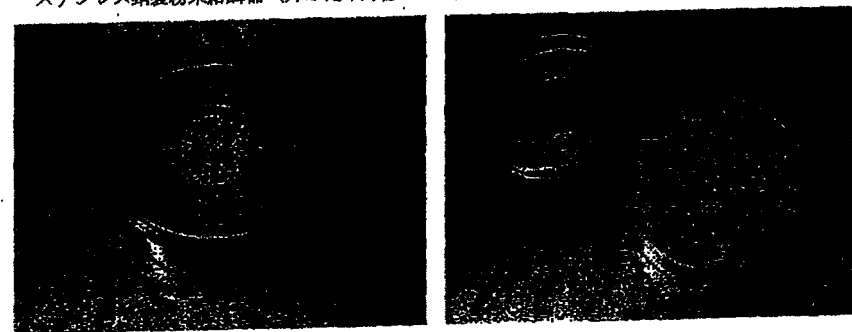
被験物質 A 給餌器

被験物質 C

① 餌の保管条件 (衛研が提供しました調製飼料)  
冷蔵暗所保管

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 餌の交換頻度  
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

## 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

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>cII</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>cII</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>cII</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>cII</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>cII</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>cII</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 器官 (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  $p \leq 0.05$ ) 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（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】  
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】  
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 (キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒, 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 134～156 g)
- 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る施設] (W 3.5 × D 5.5 × H 2.5 m) で動物を飼育した。試験期間中の温度は 23.4～24.8℃，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 mmH<sub>2</sub>O 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，Zyfone™ 製飼育ケージ (W 26.6 × D 48.2 × H 20.3 cm) に床敷き (ALPHA-dri™) 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/コンタミネーション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)<sup>15</sup>

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資料と混合し，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 群用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スバスを用いて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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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) をろ過除菌後、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] <sup>注)</sup>	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<sup>®</sup> 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。(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、先に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 (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 <sup>#</sup>	90	6	5	1101~1106
アガリチン	250 <sup>#</sup>	90	6	5	1201~1206
	750 <sup>#</sup>	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 \*\* : キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒 (%) \*\*\* : ENU (mg/kg)

<sup>#</sup> : 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	62.5 ppm	250 ppm	1000 ppm
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			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

摘出し、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）を摘出した。陽性対照群については、最終投与後3日に器官（臓器）を摘出した。

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（臓器）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した。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（臓器）摘出直前に電子天秤（PG2002あるいはPG802-S）を用いて体重を測定した。

器官（臓器）摘出の日まで、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、大腿骨を摘出した。摘出後、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）の摘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カ所くり抜いた (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 (LN<sub>2</sub>) 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、LN<sub>2</sub>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LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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、LN<sub>2</sub>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 分間ローテ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 分間ローテ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、一晩室温に放置し、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<sup>-</sup> 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 を接種した後、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 (セレクトション用) 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) をセレクト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。セレクト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、セレクト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 (セレクトション用)

セレクト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 ゆ加里  
〒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  $19.1 \times 10^{-6}$ 、各個体の平均値は  $19.3 \times 10^{-6}$  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  $21.3 \times 10^{-6}$  (変異体数/総ブ  
ラーク数: 472,207,700), 中用量群で  $20.9 \times 10^{-6}$  (同: 612,922,300), 高用量群で  $19.9 \times 10^{-6}$   
(同: 371,860,300), キリン製品投与群で  $18.8 \times 10^{-6}$  (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  $21.4 \times 10^{-6}$ ,  $21.4 \times 10^{-6}$ ,  $20.3 \times 10^{-6}$  および  $18.7 \times 10^{-6}$  であっ  
た。

陽性対照群の突然変異頻度は、 $172.1 \times 10^{-6}$  (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  
 $177.2 \times 10^{-6}$  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  $25.2 \times 10^{-6}$ , 各個体の平均値で  $25.6 \times 10^{-6}$  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  $25.0 \times 10^{-6}$  (変異体数/総ブ  
ラーク数: 421,681,200), 中用量群で  $23.8 \times 10^{-6}$  (同: 411,719,900), 高用量群で  $19.5 \times 10^{-6}$   
(同: 371,900,800), キリン製品投与群で  $22.6 \times 10^{-6}$  (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  $25.0 \times 10^{-6}$ ,  $23.9 \times 10^{-6}$ ,  $19.2 \times 10^{-6}$  および  $22.4 \times 10^{-6}$  であっ  
た。

陽性対照群の突然変異頻度は、 $156.7 \times 10^{-6}$  (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  
 $156.9 \times 10^{-6}$  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  $15.3 \times 10^{-6}$ , 各個体の平均値で  $14.8 \times 10^{-6}$  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  $18.0 \times 10^{-6}$  (変異体数/総ブ  
ラーク数: 472,617,200), 中用量群で  $14.9 \times 10^{-6}$  (同: 392,614,500), 高用量群で  $14.0 \times 10^{-6}$   
(同: 342,423,700), キリン製品投与群で  $14.0 \times 10^{-6}$  (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  $16.0 \times 10^{-6}$ ,  $15.0 \times 10^{-6}$ ,  $13.8 \times 10^{-6}$  および  $14.1 \times 10^{-6}$  であっ  
た。

陽性対照群の突然変異頻度は、 $431.0 \times 10^{-6}$  (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

$445.1 \times 10^{-6}$  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  $20.9 \times 10^{-6}$ , 各個体の平均値で  $21.1 \times 10^{-6}$  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  $21.5 \times 10^{-6}$  (変異体数/総ブ  
ラーク数: 311,442,700), 中用量群で  $19.3 \times 10^{-6}$  (同: 271,395,900), 高用量群で  $19.7 \times 10^{-6}$   
(同: 251,267,200), キリン製品投与群で  $23.4 \times 10^{-6}$  (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  $21.5 \times 10^{-6}$ ,  $19.1 \times 10^{-6}$ ,  $20.0 \times 10^{-6}$  および  $23.7 \times 10^{-6}$  であっ  
た。

陽性対照群の突然変異頻度は、 $75.8 \times 10^{-6}$  (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  $20.8 \times 10^{-6}$ , 各個体の平均値は  $20.9 \times 10^{-6}$  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  $21.8 \times 10^{-6}$  (変異体数/総ブ  
ラーク数: 361,650,600), 中用量群で  $22.3 \times 10^{-6}$  (同: 371,659,600), 高用量群で  $20.4 \times 10^{-6}$   
(同: 381,864,800), キリン製品投与群で  $18.5 \times 10^{-6}$  (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  $21.8 \times 10^{-6}$ ,  $22.1 \times 10^{-6}$ ,  $20.8 \times 10^{-6}$  および  $18.3 \times 10^{-6}$  であっ  
た。

陽性対照群の突然変異頻度は、 $96.1 \times 10^{-6}$  (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  
 $102.2 \times 10^{-6}$  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  $20.6 \times 10^{-6}$ , 各個体の平均値は  $20.8 \times 10^{-6}$  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  $23.1 \times 10^{-6}$  (変異体数/総ブ  
ラーク数: 411,771,200), 中用量群で  $19.9 \times 10^{-6}$  (同: 341,705,500), 高用量群で  $21.3 \times 10^{-6}$



(同: 36/1,687,500), キリン製品投与群で  $17.4 \times 10^{-6}$  (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  $23.4 \times 10^{-6}$ ,  $19.9 \times 10^{-6}$ ,  $21.0 \times 10^{-6}$  および  $17.6 \times 10^{-6}$  であった。

陽性対照群の突然変異頻度は,  $160.0 \times 10^{-6}$  (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  $160.1 \times 10^{-6}$  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 週頃からは 2/6 例に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 週頃からは 5/6 例に認められた。被毛の汚れは, 投与 12 週頃からは 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違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<sup>®</sup>) 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) とも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態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を及ぼすものと推測された。

### 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。

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 (f)	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 (%)	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 (%)	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 (f)	5	1,237,500	29	23.4	0.3726
ENU e)	50 (mg/kg)	3	712,800	54	75.8 *	<0.0001

\* :  $p \leq 0.05$ , 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 (f)	5	1,840,500	34	18.5	0.7345
ENU e)	50 (mg/kg)	3	1,289,700	124	96.1 *	<0.0001

\* :  $p \leq 0.05$ , 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

\* :  $p \leq 0.05$ , 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	26.6	
		1203	619,200	9	14.5	
		1204	496,800	11	22.1	
		1205	768,600	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	24.6		
	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	
		1405	531,900	10	18.8	
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	
	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 (%)	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 3-8; 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 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	
	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 (%)	1401	386,100	4	10.4	14.1 $\pm$ 3.5
		1402	386,100	7	18.1	
		1403	369,900	6	16.2	
		1404	471,600	5	10.6	
		1405	389,700	6	15.4	
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)	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)	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)	1301	233,100	4	17.2	20.0 $\pm$ 2.3
		1302	221,400	5	22.6	
		1303	180,900	4	22.1	
		1304	307,800	6	19.5	
		1305	324,000	6	18.5	
Product B	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)	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)	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	332,100	7	21.1	
	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 (%)	1401	375,300	7	18.7	18.3 $\pm$ 3.5
		1402	422,100	10	23.7	
		1403	340,200	6	17.6	
		1404	358,200	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)]

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		
		1006	114	156	192	233	258	281		
		MeantS.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			148	179	206	227	249		
1104	113			148	175	209	233	253		
1105	113			152	181	215	237	253		
1106	108		146	174	199	224	244			
1106	108		146	174	199	224	244			
MeantS.D.	110 $\pm$ 5		148 $\pm$ 2	177 $\pm$ 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		
	1206		105	139	167	193	211	222		
	MeantS.D.	110 $\pm$ 8	147 $\pm$ 6	172 $\pm$ 6	199 $\pm$ 7	217 $\pm$ 8	230 $\pm$ 9			
	750 d)	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	136	145	153	154			
1306		97	134	136	149	158	168			
1306		97	134	136	149	158	168			
MeantS.D.		102 $\pm$ 5	140 $\pm$ 3	141 $\pm$ 4	149 $\pm$ 2	159 $\pm$ 6	167 $\pm$ 9			
Product B	5 (%)	1401	94	134	166	191	211	229		
		1402	101	143	172	202	219	234		
		1403	97	135	170	197	219	237		
		1404	114	152	176	207	230	249		
		1405	111	148	170	195	216	233		
		1406	96	136	164	192	218	232		
		1406	96	136	164	192	218	232		
MeantS.D.	102 $\pm$ 8	141 $\pm$ 8	170 $\pm$ 4	197 $\pm$ 6	219 $\pm$ 6	236 $\pm$ 7				
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	107	152	-	-	-	-		
		1502	114	154	-	-	-	-		
		1503	106	138	-	-	-	-		
		1504	105	143	-	-	-	-		
		1504	105	143	-	-	-	-		
MeantS.D.	108 $\pm$ 4	147 $\pm$ 8	-	-	-	-				

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 35	Day 43	Day 50	Day 57	Day 64	Day 71
Commercial diet a)	0	1001	271	292	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	285	294	303	313
		1006	300	316	316	338	352	358
		Mean±S.D.	270±17	287±17	300±12	313±18	328±18	338±17
Agaritrine	62.5 b)	1101	274	289	290	317	332	339
		1102	269	286	297	315	329	335
		1103	264	278	293	309	318	330
		1104	268	280	288	298	312	320
		1105	272	286	296	310	321	334
		1106	262	280	290	306	320	329
		Mean±S.D.	268±5	283±4	292±4	309±7	322±7	331±7
	250 c)	1201	245	255	261	269	279	285
		1202	232	243	249	259	266	270
		1203	234	245	250	264	270	268
		1204	242	255	261	271	276	279
		1205	251	263	272	278	290	296
		1206	232	244	252	257	262	267
		Mean±S.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	192	184	181	187	181	
	1304	171	178	181	185	191	193	
	1305	161	163	162	165	169	172	
	1306	174	176	177	181	180	179	
	Mean±S.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
		Mean±S.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

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Body weight of each period (g)				
			Day 78	Day 85	Day 91	Sacrificed #	Gain (f)
Commercial diet a)	0	1001	363	370	381	387	243
		1002	356	369	376	384	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
		Mean±S.D.	349±18	359±19	367±19	374±19	231±12
Agaritrine	62.5 b)	1101	348	356	370	375	228
		1102	348	356	365	370	225
		1103	336	348	360	372	224
		1104	328	341	344	352	204
		1105	346	354	361	369	217
		1106	342	350	359	368	222
		Mean±S.D.	341±8	351±6	360±9	368±8	220±9
	250 c)	1201	289	293	295	294	149
		1202	270	278	282	284	143
		1203	273	276	279	279	129
		1204	281	286	293	291	143
		1205	298	300	303	304	148
		1206	270	277	279	281	142
		Mean±S.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	176	169	173	176	38	
	1306	176	177	161	148	14	
	Mean±S.D.	181±8	176±16	172±18	172±25	33±25	
Product B	5 (g)	1401	293	300	303	306	172
		1402	295	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
		Mean±S.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
		Mean±S.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 mg/kg, expression time: 3 days)

f): Gain=Sacrificed-Day 1(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
		Mean±S.D.	96±4	101±10	102±9	103±9	107±7
Agaritine	62.5 b)	1101	90	98	98	102	104
		1102	96	98	101	99	106
		1103	100	101	99	102	97
		1104	93	95	99	105	103
		1105	91	102	101	106	104
		1106	92	95	98	98	106
		Mean±S.D.	94±4	98±3	99±1	102±3	103±3
	250 c)	1201	85	86	88	84	91
		1202	87	93	90	88	80
		1203	91	89	86	89	90
		1204	85	92	90	90	90
		1205	93	95	100	96	90
		1206	91	94	96	91	93
		Mean±S.D.	89±3	92±3	92±5	90±4	89±5
	750 d)	1301	56	65	63	66	64
		1302	47	58	60	65	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
		Mean±S.D.	51±3	62±4	62±5	65±5	62±2
Product B	5 (%)	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
		Mean±S.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
		1002	100	107	110	109	105
		1003	97	105	104	102	102
		1004	102	98	102	104	108
		1005	97	100	99	103	102
		1006	113	108	113	117	110
		Mean±S.D.	103±7	104±4	107±6	108±6	106±4
Agaritine	62.5 b)	1101	102	101	106	106	103
		1102	105	102	105	106	101
		1103	95	98	103	99	104
		1104	97	90	95	98	96
		1105	101	98	104	98	106
		1106	102	102	107	107	105
		Mean±S.D.	100±4	99±5	104±5	102±4	103±4
	250 c)	1201	85	86	92	94	94
		1202	87	83	88	89	86
		1203	85	83	92	85	78
		1204	89	88	91	86	88
		1205	91	90	95	95	97
		1206	87	90	86	86	86
		Mean±S.D.	87±2	87±3	91±3	89±4	88±7
	750 d)	1301	59	58	54	57	62
		1302	59	58	51	59	56
		1303	67	55	56	63	54
		1304	60	60	61	66	62
		1305	55	56	56	57	57
		1306	63	60	63	58	60
		Mean±S.D.	61±4	58±2	57±4	60±4	59±3
Product B	5 (%)	1401	89	86	96	94	93
		1402	92	89	93	89	92
		1403	90	91	93	94	95
		1404	97	94	92	95	91
		1405	94	90	90	99	96
		1406	87	89	90	95	95
		Mean±S.D.	92±4	90±3	92±2	94±3	94±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

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Food consumption (g/week)			
			Week 11	Week 12	Week 13	Total
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
		Mean±S.D.	109±8	108±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
		Mean±S.D.	103±5	102±2	89±5	1298±26
	250 c)	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
		Mean±S.D.	87±3	86±3	74±3	1141±33
750 d)	1301	56	31	34	725	
	1302	56	58	51	738	
	1303	61	57	46	780	
	1304	59	62	51	780	
	1305	57	53	48	737	
	1306	54	55	36	748	
	Mean±S.D.	57±2	53±11	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
		Mean±S.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
		Mean±S.D.	2.9±0.2	2.9±0.1	3.3±0.1	3.8±0.1	3.6±0.1
	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
		Mean±S.D.	18.1±0.9	18.0±0.6	15.9±0.9	14.5±0.6	13.5±0.8
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	
	Mean±S.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
		Mean±S.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	2.8	2.9
		1106	3.5	3.3	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
		1206	12.6	13.1	11.8	11.5	11.3
		Mean±S.D.	12.6±0.4	12.3±0.5	12.4±0.4	11.7±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	5 (%)	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	2333.3
		1404	2592.6	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

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	26.6	46.7	
	Mean±S.D.	33.9±1.8	31.2±6.4	32.9±3.7	47.1±1.2	
Product B	5 (%)	1401	2241.4	2188.6	2152.3	2790.1
		1402	2218.4	2195.9	2006.7	2716.0
		1403	2110.4	2070.1	2050.5	2663.9
		1404	2215.2	2180.7	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

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
		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
	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
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	N	N	N	N	N	N	N
		1502	N	N	N	N	N	N	N
		1503	N	N	N	N	N	N	N
		1504	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
		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
	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
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	N	-	-	-	-	-	-
		1502	N	-	-	-	-	-	-
		1503	N	-	-	-	-	-	-
		1504	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
		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
	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						
			22	23	24	25	26	27	28
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
	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						
			29	30	31	32	33	34	35
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
	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

-57-

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
		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
	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

-58-



## 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
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
	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
		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
	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	AG	AG	AG	AG	AG, SP
		1302	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	AG	AG	AG	AG	AG
		1304	N	N	N	N	N	N	N
		1305	N	N	N	N	N	N	N
		1306	N	N	AG	AG	AG	AG	AG, SP
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 , AG : Ataxic gait , SP : Smudge of perinasal area

## Appendix 10. Continued

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
	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	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 (%)	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 , AG : Ataxic gait , SP : Smudge of perinasal area , W : Wasting

## Appendix 10. Continued

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
		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
	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	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, 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	
	1304	N	N	N	AG	AG	AG	AG	
	1305	N	N	N	AG	AG	AG	AG, SP	
	1306	AG, SP	AG, SP	AG, SP	AG, SP	AG, SP	AG, SP	AG, SP	
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 , AG : Ataxic gait , SP : Smudge of perinasal area , W : Wasting

## Appendix 10. Continued

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
		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
	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	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
		1303	AG, W	AG, W	AG, W	AG, SP, W	AG, SP, W	AG, SP, W	AG, SP, W
		1304	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
		1305	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
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 , AG : Ataxic gait , SP : Smudge of perinasal area , W : Wasting

## Appendix 10. Continued

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
		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
	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	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
		1303	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
		1305	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
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 , 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
		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
Agaritrine	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	SP,W,DH	SP,W,DH	SP,W,DH,SF	SP,W,DH,SF	SP,W,DH,SF	SP,W,DH,SF	SP,W,DH,SF	
	1302	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	
	1304	AG	AG	AG	AG	AG,SP	AG,SP	AG,SP	
	1305	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
	1306	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
Product B	5 (%)	1401	N	N	N	N	N	N	
		1402	N	N	N	N	N	N	
		1403	N	N	N	N	N	N	
		1404	N	N	N	N	N	N	
		1405	N	N	N	N	N	N	
		1406	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 , SF : Soiled fur (Back)

Compound	Dose (ppm)	Animal ID No.	Day of experiment		
			92	93	94
Commercial diet a)	0	1001	N	N	N
		1002	N	N	N
		1003	N	N	N
		1004	N	N	N
		1005	N	N	N
		1006	N	N	N
Agaritrine	62.5 b)	1101	N	N	N
		1102	N	N	N
		1103	N	N	N
		1104	N	N	N
		1105	N	N	N
		1106	N	N	N
	250 c)	1201	N	N	N
		1202	N	N	N
		1203	N	N	N
		1204	N	N	N
		1205	N	N	N
		1206	N	N	N
750 d)	1301	SP,W,DH,SF	SP,W,DH,SF	SP,W,DH,SF	
	1302	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
	1303	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
	1304	AG,SP	AG,SP	AG,SP	
	1305	AG,SP,W	AG,SP,W	AG,SP,W	
	1306	AG,SP,W	SP,W,DH	SP,W,DH	
Product B	5 (%)	1401	N	N	N
		1402	N	N	N
		1403	N	N	N
		1404	N	N	N
		1405	N	N	N
		1406	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 , SF : 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
		Mean±S.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)	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
		Mean±S.D.	12.101±0.396	2.081±0.075	1.182±0.050	0.920±0.011	2.828±0.101
	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
		Mean±S.D.	9.472±0.401	1.968±0.065	0.938±0.042	0.815±0.033	2.696±0.154
	750 d)	1301	3.885	1.370	0.587	0.580	1.244
		1302	6.312	1.476	0.672	0.589	2.167
		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	
Mean±S.D.		5.501±1.124	1.441±0.055	0.645±0.062	0.607±0.057	2.010±0.406	
Product B	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
		Mean±S.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	1.583
		1504	5.819	1.082	0.684	0.497	1.908
		Mean±S.D.	6.379±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; 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 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 (%)	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
		Mean±S.D.	374±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)	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
		Mean±S.D.	368±8	3.291±0.038	0.566±0.014	0.322±0.015	0.251±0.007	0.770±0.036
	250 c)	1201	294	3.150	0.650	0.341	0.281	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	0.315	0.277	0.897
		1206	281	3.170	0.667	0.332	0.282	0.882
		Mean±S.D.	289±9	3.280±0.116	0.682±0.023	0.325±0.010	0.282±0.010	0.933±0.041
	750 d)	1301	136	2.857	1.007	0.432	0.426	0.915
		1302	189	3.340	0.781	0.356	0.312	1.147
		1303	185	3.268	0.815	0.383	0.324	1.234
		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	
Mean±S.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 (%)	1401	306	3.210	0.654	0.323	0.276	0.810
		1402	302	3.302	0.652	0.337	0.277	0.823
		1403	320	3.200	0.640	0.327	0.258	0.837
		1404	330	3.375	0.610	0.323	0.265	0.792
		1405	319	3.044	0.576	0.328	0.258	0.797
		1406	310	3.173	0.624	0.346	0.276	0.888
		Mean±S.D.	315±10	3.217±0.113	0.626±0.030	0.331±0.009	0.268±0.009	0.825±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
		Mean±S.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	Non remarkable
		1203	94	Non remarkable
		1204	94	Sternum:deformed
		1205	94	Sternum:deformed
		1206	94	Sternum:deformed
	750 d)	1301	94	Thymus:atrophy Sternum:deformed
		1302	94	Thymus:atrophy Sternum:deformed
		1303	94	Thymus:atrophy Sternum:deformed
		1304	94	Thymus:atrophy Sternum:deformed
		1305	94	Thymus:atrophy Sternum:deformed
		1306	94	Thymus:atrophy Sternum:deformed
Product B	5 (8)	1401	94	Non remarkable
		1402	94	Sternum:deformed
		1403	94	Non remarkable
		1404	94	Non remarkable
		1405	94	Sternum:deformed
		1406	94	Non remarkable
ENU e)	50 (mg/kg)	1501	8	Non remarkable
		1502	8	Non remarkable
		1503	8	Non remarkable
		1504	8	Non remarkable

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)

添付資料 1

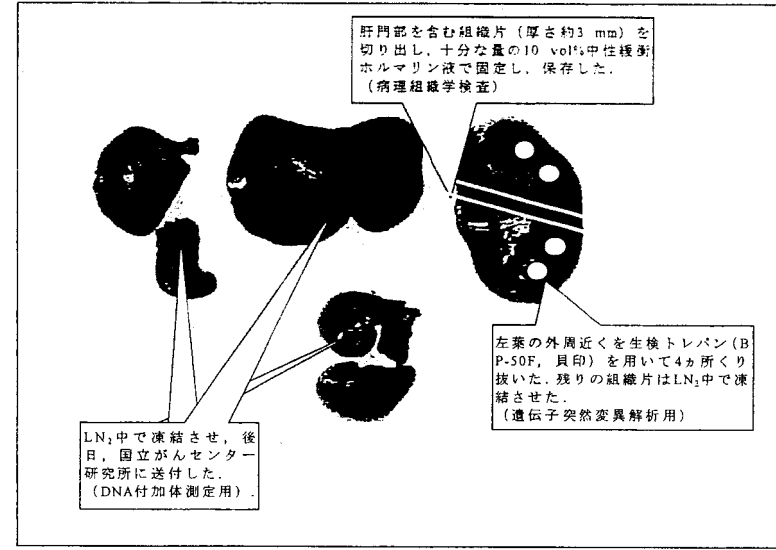


図1 肝臓のサンプリング

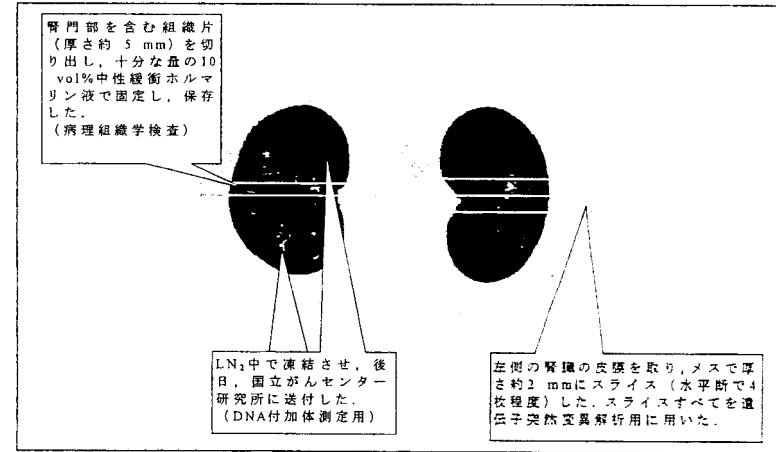


図2 腎臓のサンプリング

## 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。

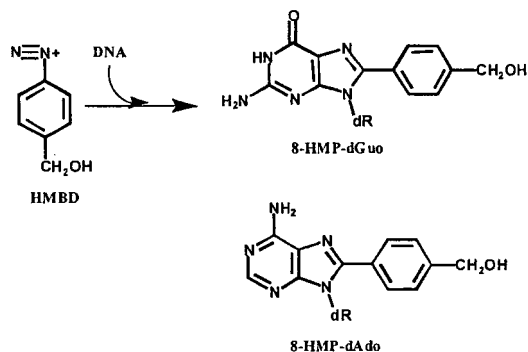
試験群：コントロール (n=3)

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  $^{32}\text{P}$ -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  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法等を用いて検討を行う予定である。



(注 1)  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法

$^{32}\text{P}$ -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'-末端を  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  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)

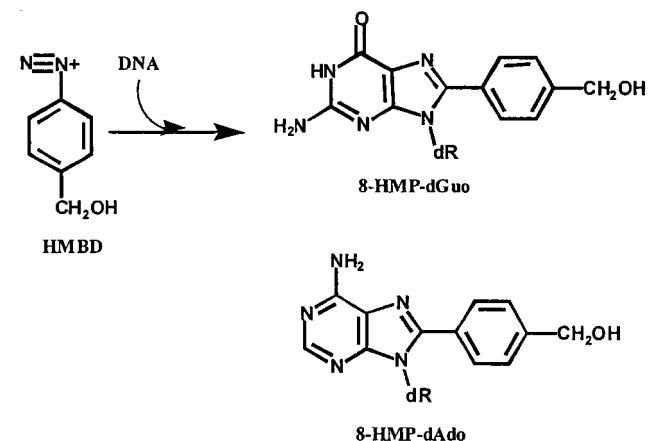
アガリチン中用量群 (n=3)

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  $\mu$ 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  $\mu$ g 相当を DNA 分解酵素 (マイクロコッカルヌ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

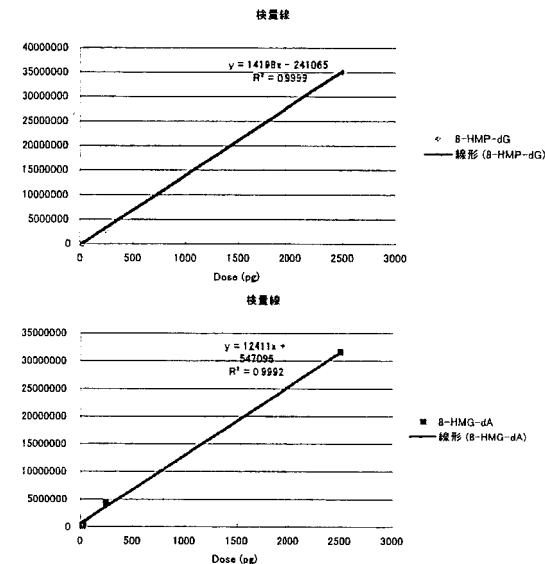




図 2

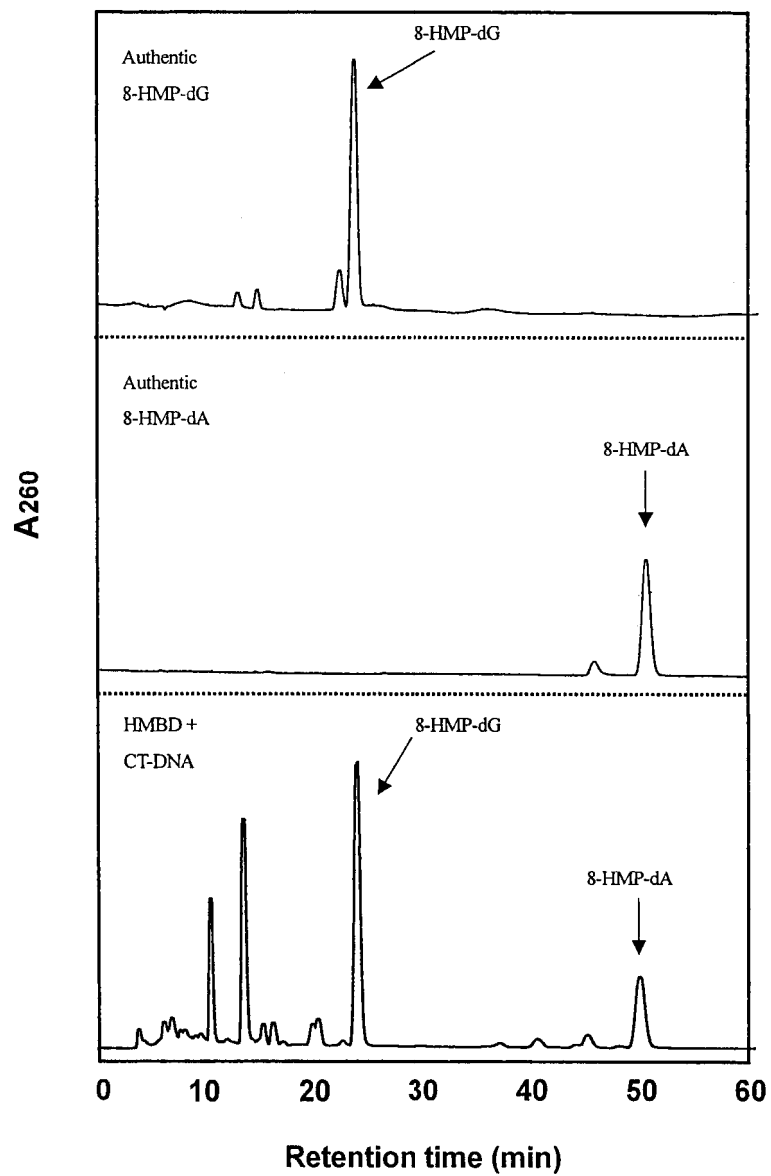
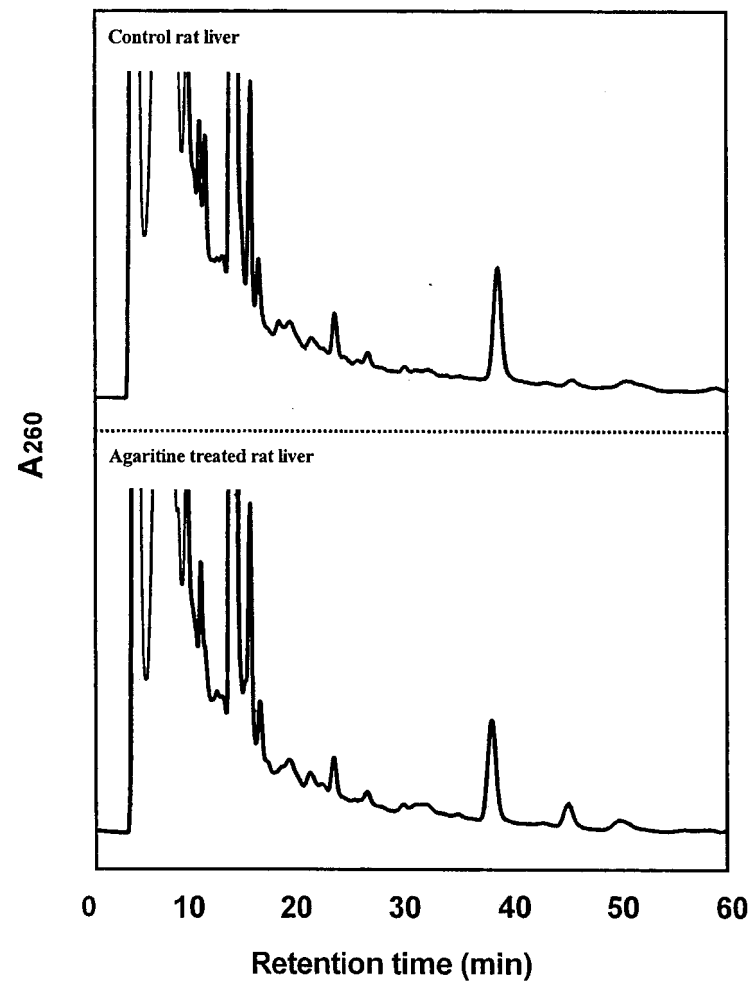


図 3





府食第 319 号

平成 20 年 3 月 28 日

厚生労働省医薬食品局  
食安全部基準審査課長 殿

内閣府食品安全委員会事務局評価課長

食品健康影響評価に係る指摘事項について（依頼）

「食品健康影響評価について」（平成 18 年 2 月 13 日付け厚生労働省発食安第 0213001 号及び同日付け厚生労働省発食安第 0213002 号）により貴省から意見を求められている品目について、平成 20 年 3 月 12 日に開催した食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループ（第 2 回）において審査を実施したところ、別紙のとおり追加試験の実施等に係る指摘事項が出されましたので、対応方をお願いします。

<連絡先>

内閣府食品安全委員会事務局

評価課 鶴身、舟渡

TEL : 03-5251-9168、9172

FAX : 03-3591-2236

## 食品健康影響評価に係る指摘事項について（依頼）

アガリクスを含む製品について、食品安全委員会第2回新開発食品専門調査会ワーキンググループ（平成20年3月12日）で審査を行ったところ、以下のとおり追加試験の実施等に係る指摘事項が出されましたので、対応方をお願いします。

### 1. B製品について

#### （1）二段階発がん試験の実施について

食品安全委員会新開発食品専門調査会ワーキンググループでは、平成20年2月28日付食安基発第0228001号の回答に基づき、アガリチン及び「キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒」（以下、B製品という。）を検体としたトランスジェニックラットを用いた標的臓器に対する遺伝毒性試験の結果を検討した結果、アガリチン及びB製品は生体内において遺伝毒性を有さないと考えられた。

しかし、前回指摘のとおり、ラットを用いた中期多臓器発がん性試験の結果認められた発がん促進作用について再度検証する観点及び発がん促進作用における閾値の検討の観点から、関係者で協議の上、標的臓器における二段階発がん試験を実施すること。

また、試験を実施する際には、以下の点に留意すること。

- ① 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、含有量の確認を行うこと。
- ② 用量相関性及び閾値を十分確認できるような用量設定（特に発がん促進作用が認められた中期多臓器発がん試験における低用量～中用量域）を行うこと。
- ③ 雌特有の臓器、特に乳腺についても標的臓器として実施すること。

#### （2）B製品の発がん促進作用の原因物質の究明に引き続き努めること。

### 2. A及びC製品について

仙生露顆粒ゴールド（以下、A製品という。）及びアガリクス K<sub>2</sub>ABPC 顆粒（以下、C製品という。）については、中期多臓器発がん性試験において発がん促進作用を示さないという結果が得られている。一方、B製品については、発がん促進作用が認められるとの結果が示されている。

また、B製品で認められた発がん促進作用については、現在、発がん促進作用における閾値の検討及び原因物質の特定に努めて頂いているところである。

このような状況の下、A及びC製品の安全性については、上記のB製品における発がん促進作用の原因物質の究明結果等を参考に、健康影響評価を行うこととする。

なお、A及びC製品の健康影響評価においても、二段階発がん試験等のデータの提出を依頼する場合もあるので申し添える。

## 議論のポイント

### I. B製品について

B製品について、食品衛生法第7条第2項の適用に係る食品健康影響評価のため、食品安全委員会より指摘した試験を実施すべきか、実施する場合には具体的にどのように行うのか

#### 1. 再追加試験を実施すべきと判断する場合

- 試験実施主体は誰か。公費によって試験を実施する必要があるのか。また、販売者に実施主体を求めた場合、検査を強要することができるのか。その際の根拠は何か。
- 食品安全委員会からはアガリチンの安定性について留意することが求められているが、B製品については既に販売流通が自粛されており、検体は賞味期限の切れたものしか入手できないが試験の実施に問題はないか。
- 食品安全委員会 WG の中では単一臓器(腎臓)を標的として二段階発がん試験を実施することとされていたが、今回の指摘事項においては乳腺以外明確にされていない。標的臓器は乳腺、腎臓でよいか。

#### 2. 再追加試験を実施すべきと判断できない場合

- 試験を実施しないこととする理由は何か。
- 食品衛生法第7条第2項の適用に係る食品健康影響評価であれば、限られた知見であっても速やかに評価結果が取りまとめられることが重要ではないか

### II. A, C製品について

A, C製品については、B製品の評価結果に応じて食品健康影響評価値が取りまとめられる見込み。

食品衛生法(抄)  
(昭和22年法律第233号)

(新開発食品の販売禁止)

- 第7条 厚生労働大臣は、一般に飲食に供されることがなかつた物であつて人の健康を損なうおそれがない旨の確証がないもの又はこれを含む物が新たに食品として販売され、又は販売されることとなつた場合において、食品衛生上の危害の発生を防止するため必要があると認めるときは、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、それらの物を食品として販売することを禁止することができる。
- 2 厚生労働大臣は、一般に食品として飲食に供されている物であつて当該物の通常の方法と著しく異なる方法により飲食に供されているものについて、人の健康を損なうおそれがない旨の確証がなく、食品衛生上の危害の発生を防止するため必要があると認めるときは、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、その物を食品として販売することを禁止することができる。
- 3 厚生労働大臣は、食品によるものと疑われる人の健康に係る重大な被害が生じた場合において、当該被害の態様からみて当該食品に当該被害を生ずるおそれのある一般に飲食に供されることがなかつた物が含まれていることが疑われる場合において、食品衛生上の危害の発生を防止するため必要があると認めるときは、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、その食品の販売することを禁止することができる。
- 4 厚生労働大臣は、前三項の規定による販売の禁止をした場合において、厚生労働省令で定めるところにより、当該禁止に関し利害関係を有する者の申請に基づき、又は必要に応じ、当該禁止に係る物又は食品に起因する食品衛生上の危害が発生するおそれがないと認めるときは、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、当該禁止の全部又は一部を解除するものとする。
- 5 厚生労働大臣は、第一項から第三項までの規定による販売の禁止をしたとき、又は前項の規定による禁止の全部若しくは一部の解除をしたときは、官報で告示するものとする。

**食品安全基本法(抄)**  
**(平成15年法律第48号)**

(食品健康影響評価の実施)

第11条 食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たっては、人の健康に悪影響を及ぼすおそれがある生物学的、化学的若しくは物理的な要因又は状態であつて、食品に含まれ、又は食品が置かれるおそれがあるものが当該食品が摂取されることにより人の健康に及ぼす影響についての評価(以下「食品健康影響評価」という。)が施策ごとに行われなければならない。ただし、次に掲げる場合は、この限りでない。

- 一 当該施策の内容からみて食品健康影響評価を行うことが明らかに必要でないとき。
- 二 人の健康に及ぼす悪影響の内容及び程度が明らかであるとき。
- 三 人の健康に悪影響が及ぶことを防止し、又は抑制するため緊急を要する場合で、あらかじめ食品健康影響評価を行ういとまがないとき。

2・3 (略)

(委員会の意見の聴取)

第24条 関係各大臣は、次に掲げる場合には、委員会の意見を聴かななければならない。ただし、委員会が第11条第1項第1号に該当すると認める場合又は関係各大臣が同項第3号に該当すると認める場合は、この限りでない。

- 一 食品衛生法第6条第2号ただし書(同法第62条第2項において準用する場合を含む。)に規定する人の健康を害う虞がない場合を定めようとするとき、同法第7条第1項から第3項までの規定による販売の禁止をしようとし、若しくは同条第4項の規定による禁止の全部若しくは一部の解除をしようとするとき、同法第9条第1項の厚生労働省令を制定し、若しくは改廃しようとするとき、同法第10条に規定する人の健康を損なうおそれのない場合を定めようとするとき、同法第11条第1項(同法第62条第2項において準用する場合を含む。)若しくは同法第18条第1項(同法第62条第3項において準用する場合を含む。)の規定により基準若しくは規格を定めようとするとき、又は同法第50条第1項の規定により基準を定めようとするとき。

二～十四 (略)

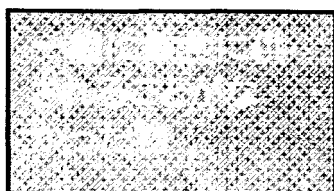
2 (略)

- 3 第1項に定めるもののほか、関係各大臣は、食品の安全性の確保に関する施策を策定するため必要があると認めるときは、委員会の意見を聴くことができる。

# 新開発食品等の販売禁止（食品衛生法第7条）

平成15年8月29日施行

[第1項]

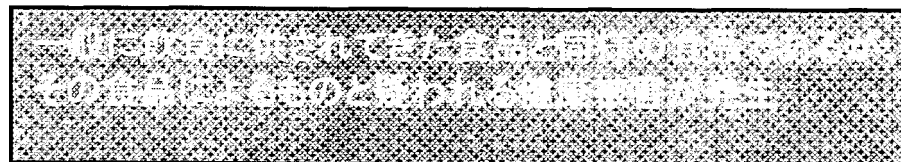


[第2項]

濃縮等した成分を錠剤化、カプセル化する等により、通常の食品の一般的な摂取方法とは著しくことなる方法により摂取される食品



[第3項]



人の健康を損なうおそれがない旨の確証がない

食品衛生法第7条第3項の食品の製造、加工、包装、容器の詰め、表示、販売、譲渡、譲渡の申込み、譲渡の承諾、譲渡の拒否、譲渡の撤回、譲渡の取り消し、譲渡の取り消しの申込み、譲渡の取り消しの承諾、譲渡の取り消しの拒否、譲渡の取り消しの撤回、譲渡の取り消しの取り消し、譲渡の取り消しの取り消しの申込み、譲渡の取り消しの取り消しの承諾、譲渡の取り消しの取り消しの拒否、譲渡の取り消しの取り消しの撤回、譲渡の取り消しの取り消しの取り消し

食品衛生上の危害の発生を防止するため必要

食品安全委員会、薬事・食品衛生審議会の意見

食品として販売することを禁止

薬食発第 0829006 号  
平成 15 年 8 月 29 日

各 

都道府県知事
保健所設置市長
特別区長

 殿

厚生労働省医薬食品局長

食品衛生法第 4 条の 2 の規定による食品又は物の販売禁止処分の  
運用指針（ガイドライン）について

食品衛生法等の一部を改正する法律（平成 15 年法律第 55 号）は、本年 5 月 30 日に公布され、特殊な方法により摂取する食品等の暫定流通禁止措置については、本日施行されたところである。

当該暫定流通禁止措置については、食品衛生上の危害を防止する観点から講じられるものであるが、食品と健康被害の間の高度の因果関係が認められない段階において当該食品の流通を暫定的ながら禁止するものであることから、その運用に係る指針をあらかじめ定めることとしたものである。

今般改正された食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）においては、国、都道府県、保健所を設置する市及び特別区は、食品衛生に関する施策が総合的かつ迅速に実施されるよう、相互に連携を図らなければならない、とされたところであり、貴職におかれても別添の運用指針（ガイドライン）について十分御了知願いたい。



(別添)

## 食品衛生法第4条の2の規定による食品又は物の販売禁止処分の運用指針(ガイドライン)

### 第1 規定の趣旨

#### 1 食品衛生法の一部改正

食品衛生法等の一部を改正する法律(平成15年法律第55号)による食品衛生法(以下「法」という。)第4条の2の改正は、食品の製造技術の高度化の進展やいわゆるダイエット用健康食品による健康被害の発生等を踏まえ、必ずしも食品と健康被害との間の高度の因果関係が認められず、結果、法第4条各号のいずれにも該当しない場合であっても、危害発生の未然防止や拡大防止のため、法第4条の2第1項の規定と同様に、流通禁止措置を行えるようにしたものであり、

- ・一般に食品として飲食に供されている物であって当該物の通常の方法と著しく異なる方法により飲食に供されているもの
- ・食品によるものと疑われる人の健康に係る重大な被害が生じた場合において、当該被害の態様からみて当該食品に当該被害を生ずるおそれのある一般に飲食に供されることがなかった物が含まれていることが疑われるもの

について、食品衛生上の危害の発生の防止の観点から、食品安全委員会及び薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、当該食品又は物の販売を暫定的に禁止できることとしたものである。

#### 2 第1項、第2項及び第3項の趣旨・相互関係

##### (1) 昭和47年食品衛生法改正による第1項の導入趣旨

昭和40年代以降、科学技術の発展により従来利用されなかった資源の活用や新しい物質の開発が行われ、石油から分離したノルマルパラフィン等を基にたんぱく質を作ろうとする等(いわゆる「石油たんぱく」)従来自然界の動植物の採取等による食品の調達方法とは違った新しい方法で食品を開発しようという試みが実際に行われるに至っていた。これら食経験のない「一般に飲食に供されることがなかつた物」については、物自体の安全性そのものが未知数であり、法第4条各号に該当するものであるか等、従来食品衛生法の規定のみでは、必ずしも十分にこれらの新しい問題に対処することが難しい面があった。このため、昭和47年改正により追加されたものである。

#### ア 食品又は食品に含まれる特定の成分を大量に摂取させる食品

これは、食品又は食品に含まれる特定の成分を抽出・濃縮して、当該食品又は特定成分をこれまで摂取した経験のない量で摂取させること（短期的であるか長期的であるかを問わない。）を意図する食品である。こうした食品の場合、当該食品又は成分について食経験があっても、こうした量の摂取については食経験がないことから、本項の対象となり得る。なお、抽出・濃縮技術自体は、加工方法として従来より一般化しているものであるが、その結果、食経験のない水準で大量に特定成分を摂取させることとなる限りにおいて、当該技術により加工された食品は本項の規制対象となり得ることとなる。

また、抽出や濃縮の程度が低い場合であっても、当該特定成分を大量に摂取させることを意図するものは、本項の対象となる場合があり得る。

#### イ 通常の方法とは異なる方法により消化吸収される食品

通常、食品は、胃、小腸、大腸等における消化を経て吸収されることとなるが、例えば、通常胃における消化を経て小腸で吸収される成分を摂取する際に、胃における消化吸収を受けないカプセル等を用いることによって、小腸で食品の成分が直接消化吸収されることを意図する食品については、こうした形で摂取することに関する食経験がないため、本項の対象となり得る。

### (3) 「人の健康を損なうおそれがない旨の確証がないもの」の意義

「人の健康を損なうおそれがない旨の確証がないもの」とは、法第4条の2第1項と同様に、人の健康を損なうおそれがあるもののみでなく、いずれとも判断できない場合も含むものである。すなわち、当該食品を原因とした健康被害発生を疑いを払拭できないという趣旨をいうものである。具体的には、食品に含まれる特定の成分について、① 研究機関における試験研究結果、② 諸外国からの情報提供、③ 保健所等からの報告等を通じ健康上の懸念が強く指摘（示唆）された場合、「人の健康を損なうおそれがない旨の確証がないもの」に該当することとなる。なお、国が安全性及び効果を審査して許可した特定保健用食品等十分な科学的評価を受けているものは、基本的に「確証がある」と考えられる。

こうした「確証のない」に該当する食品がすべて販売を禁止されるものではなく、第4の手続を経て、暫定流通禁止措置が実際に適用された上で、その販売が禁止されることとなる。

## 2 本項による暫定流通禁止措置の適用

### (1) 本項の適用基準

本項に基づく暫定流通禁止措置を適用すべきか否かについては、「食品衛生上の危害の発生を防止するための必要性があると認める」ときに、食品安全委員会及び薬事・食品衛生審議会の意見を聴いた上で判断されるが、食品衛生上の危害の発生を防止するため必要か否かは、

ア 当該物の摂取により人の健康を損なうおそれの程度

イ 当該物による食品衛生上の危害の発生防止について、本項の規定による処分以外の方法により期待できる効果

の2つの観点から判断されることとなる。

このうち、ア「当該物の摂取により人の健康を損なうおそれの程度」については、原則として食品安全委員会による食品健康影響評価（リスク評価）を踏まえ、その物の摂取により国民の健康の保護の観点から問題となる程度の健康被害が発生するおそれがあるかどうかを判断する。

また、イ「当該物による食品衛生上の危害の発生防止について、本項の規定による処分以外の方法により期待できる効果」とは、本項に基づく措置が他の手段によっては危害発生を防止し得ない場合の手段として制限的に運用すべきものであることを踏まえ、食品衛生法に基づく他の措置やその他の方法により食品衛生上の危害の発生を防止できるか否かの効果を薬事・食品衛生審議会において考慮すべきことを明らかにしたものである。例えば、「情報提供等を通じた注意喚起により国民において適切に対処することが可能な場合」、「新たな規格基準の設定を通じて危害の発生のおそれのある製造加工方法を禁止することができる場合」や「適切な表示により過剰摂取を回避できる場合」等により、時間的にも人の健康を保護するのに十分な措置であると認められる場合には、あえて本項を適用する必要はないこととなる。

なお、実際には、上記ア及びイの必要性の判断も、第3項の適用事例のように特定の食品について危害の程度や他の方法の可能性を個別に判断するのではなく、第2の1の(3)の①～③に掲げる場合に、毒性試験結果等から判断して、当該成分を含む食品のうち通常とは著しく異なる方法により摂取されるもの一般のうちから、本措置以外の方法では危害が回避できないようなものを絞り込んでいく形で行われることとなる。

### (2) 適用の効果

本項の規定に基づき販売を禁止する場合は、本条の規定の内容を踏まえ、販

売の禁止の対象となる物及び摂取方法を併せて指定することとなる。

このため、当該物を、指定を受けていない方法により摂取する場合は、本項の規定による禁止の対象とはならない。また、本項では、食品として販売が禁止されるのみであるため、安全性に問題がないことが確認されるまでの間、販売せずに保管すること等は禁止の対象とはならない。

### 第3 本条第3項による暫定禁止措置

#### 1 適用対象となる食品

(1)「食品によるものと疑われる人の健康に係る重大な被害が生じた場合」の意義

「食品によるものと疑われる」とは、人の健康に係る重大な被害が生じた場合において、公衆衛生学的に健康被害の原因を確定することはできないが、

ア 当該健康被害について、医師より、当該患者の症状の経過等が明らかにされており、当該製品を摂取したことが原因であると疑われる旨の情報が得られた場合

イ アには該当しないが、同種の食品を摂取したことにより、同種の健康被害が複数発生している場合

ウ 当該食品の製造業者等の証言、行政庁による立入検査などから判断して、人の健康に係る被害を生ずるおそれのある物質が、当該食品に含有されている蓋然性が高い場合

など、当該食品により当該健康被害が発生したことについて一定の蓋然性が認められる場合に本項の措置の適用を検討することとする。なお、ここでは「食品」という用語を用いているため、法第2条第1項の規定により、原因となった飲食物が医薬品である場合は、本条の適用の対象とはならない。

また、「人の健康に係る重大な被害」とは、死亡事例や、劇症肝炎等の重篤な疾患が少数の人にでも発生した場合などが対象となり、重篤でない疾患が少数の人に生じているのみの場合に対する当該措置の適用を排除する趣旨である。なお、比較的軽症な健康被害の場合であっても、健康被害の発生件数や広がり具合等によっては、この文言に該当する場合もある。

(2)「当該被害の態様からみて当該食品に当該被害を生ずるおそれのある一般に飲食に供されることがなかつた物が含まれていることが疑われる場合」の意義

被害の態様からみて、当該食品に一般に食品として利用されることがなかつ

た物が含まれており、その物により健康被害が発生したおそれがある場合には、適用対象になることを明らかにしている。

なお、一般に飲食に供されることがなかった物の内容及びその毒性が特定できる場合など、当該食品と健康被害との間の因果関係が明確となった場合には適用されず、この場合には法第4条の規定の適用を受けることとなる。また、健康被害の態様等から原因が明らかな場合も同様に法第4条の規定の適用を受ける。

## 2 本項による暫定流通禁止措置の適用

### (1) 本項の適用基準

基本的に第2の2の(1)と同様の基準で判断されることとなるが、実際には「いわゆる健康食品」を対象に行っている健康被害の公表の取組(平成14年10月4日付医薬発第1004001号医薬局長通知。以下同じ。)により、公表が行われたような事案のうち、特に重大な健康被害が生じた場合について、本項の適用の是非を判断することが想定される。

### (2) 適用の効果

第2の2の(2)と同様である。

## 第4 本措置適用の手続(第2項及び第3項共通)

### 1 原則として、以下の手続によることとする。

(1) まず、食品安全基本法(平成15年法律第48号)第24条第1項第1号に基づき、食品安全委員会に対し諮問を行い、人の健康に及ぼす影響についての食品健康影響評価(リスク評価)を受ける。

(2) その後、食品安全委員会において人の健康を損なうおそれがないとされたものを除き、薬事・食品衛生審議会に諮問する。

ただし、死亡事例等の重篤な健康被害が生じている場合で、速やかに本項の暫定流通禁止措置を適用する必要があると認められるときは、可及的速やかに薬事・食品衛生審議会に諮問するとともに、事後に食品安全委員会の意見を聴くこととする(食品安全基本法第24条第1項ただし書及び同条第2項)。

## 2 対象の公表等

### (1) 健康被害が既に発生してしまった場合

都道府県等から報告された健康被害については、現行の公表の取組により製品名が公表されているところであるが、本措置の適用がなされた場合、別途その旨を公表することとする。

### (2) 健康被害が未だ生じていない場合

薬事・食品衛生審議会の開催に併せ、本措置の適用を検討している対象を公表することとする。

なお、食品安全委員会は食品健康影響評価（リスク評価）を行ったときに評価結果を公表することとされている。

## 第5 暫定禁止措置の解除手続

法第4条の2第4項では、当該禁止に関し利害関係を有する者の申請等を踏まえ、同条第1項から第3項までの規定による販売禁止処分の解除手続について規定している。

同条第4項で規定する、「厚生労働省令」の内容としては、以下のものが規定されている。

- ・申請者の住所及び氏名（法人にあっては、その名称、主たる事務所の所在地及び代表者の氏名）
- ・解除を申請する食品又は物の範囲
- ・当該禁止に係る食品又は物に起因する食品衛生上の危害が発生するおそれのない理由その他の厚生労働大臣が必要と認める事項

また、同項の「必要に応じ」とは、当該食品に関して、人の健康を損なうおそれがない旨の確証について知見が得られたことや、他のより効果的な手段によって食品衛生上の危害の発生の防止が可能となった場合を想定している。

同項の規定による解除については、利害関係者が申請してきた事項や、当該食品について新たに得られた知見等を踏まえ、当該食品について第2の2の(1)と同様に、食品安全委員会及び薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、当該物が人の健康を損なうおそれの程度及び当該食品による食品衛生上の危害の発生の防止について、同条の規定による販売禁止処分以外の方法により期待できる効果を踏まえ、食品衛生上の危害が発生するおそれがないと認めるときは、当該禁止の全部又は一部を解除することとなる。

戻る

## アガリクス(カワリハラタケ)を含む製品に関するQ&A(平成18年2月13日)

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課新開発食品保健対策室

### <目次>

#### 【語句説明】

1. 中期多臓器発がん性試験
2. 発がんプロモーション(作用) Promotion Action
3. イニシエーター(Initiator)
4. 遺伝毒性試験

#### 【一般的な事項について知りたい方へ】

- 問1 : アガリクス(カワリハラタケ)とは何ですか。
- 問2 : 今回何が問題となったのですか。
- 問3 : 今回ラット(ネズミの一種)で発がんを促進する作用が認められた製品は今後も販売されるのですか。
- 問4 : アガリクスを含む製品を摂取するとがんになるのですか。そもそもがんに効くのではなかったのですか。
- 問5 : アガリクスを含む製品にはどのようなものがありますか。
- 問6 : 今回試験を行った3製品のうち、問題とされた1製品以外の2製品は大丈夫ですか。
- 問7 : 今回試験を行った3製品以外のアガリクス製品は大丈夫ですか。
- 問8 : アガリクスを含む製品による健康被害はどれくらい出ているのですか。
- 問9 : もし、アガリクスを含む製品等を摂取し、健康被害があった場合にはどうしたら良いですか。
- 問10: どうして食品安全委員会に評価を依頼することになったのですか。
- 問11: 今回評価依頼をした3製品はどのようなものですか。
- 問12: 厚生労働省では、どのような対応を図ったのですか。

#### 【さらに詳細に知りたい方へ】

- 問13: 特定の3製品を試験の対象に選定した理由は何ですか。
- 問14: 今回行った発がん性試験の結果はどのようなものですか。
- 問15: 問題とされた製品の試験で、使用されたラットが当該製品を摂取した量は、ヒトの摂取目安量に比較して体重あたり何倍くらいですか。
- 問16: 今後、アガリクスを含むすべての製品について、同様の試験を行う予定はありますか。
- 問17: キリンの製品で発がん促進作用が疑われましたが、原因はわかったのですか。

#### 【語句説明】

##### 1. 中期多臓器発がん性試験

生体に悪性腫瘍を発生させる能力である発がんを促進する作用(発がんプロモーション作用)を確認する試験のひとつ。げっ歯類(ネズミ等)を用いた二段階発がん試験のひとつで、最大5種類のイニシエーターを投与して発がんの感受性を高め、次いで被験物質を数カ月間投与する試験です。

## 2. 発がんプロモーション(作用) Promotion Action

それ自身が発がんを引き起こすものではなく、他の発がん物質による発がん作用を促進する作用をいいます。プロモーション作用がある物質をプロモーターといいます。

## 3. イニシエーター(Initiator)

発がんの過程にはいくつかのステップが存在し、多段階的に進行していると考えられており、その最初のステップのことをイニシエーション(Initiation)といえます。化学物質や放射線などによって引き起こされたDNA損傷が修復されず、突然変異として遺伝子に固定され、腫瘍発生に関与する遺伝子に機能異常をもたらす過程をさします。イニシエーションを起こす物質をイニシエーターと呼びます。

## 4. 遺伝毒性試験

遺伝毒性とは、遺伝子またはDNAに変化を与え、細胞または個体に悪影響をもたらす性質をいいます。この遺伝毒性を検索するための試験として、細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験等があります。

### 【一般的な事項について知りたい方へ】

**問1: アガリクス(カワリハラタケ)とは何ですか。**

アガリクスという名称が一般的に知られていますが、日本名をカワリハラタケ(学名: *Agaricus blazei* Murrill)といい、ハラタケ科に属するブラジル原産のキノコです。また、ヒメマツタケと呼ばれることもあります。

このキノコを原料としたいわゆる「健康食品」が広く販売され、アガリクスの名称が使用されています。

詳細は、独立行政法人国立健康・栄養研究所の「健康食品」の素材情報データベース <http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail75.html> をご覧ください。

**問2: 今回何が問題となったのですか。**

アガリクスを含む3製品について、ラット(ネズミの一種)を用いた発がんを促進する作用を確認する試験を行ったところ、「キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒(販売者:キリンウェルフーズ(株))」について、製品の摂取目安量の約5倍から10倍程度の量を与えられたラットで、発がんを促進する作用が認められました。

**問3: 今回ラット(ネズミの一種)で発がんを促進する作用が認められた製品は今後も販売されるのですか。**

厚生労働省は、平成18年2月13日に、この製品(キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒)を販売しているキリンウェルフーズ(株)に対し、製品の自主的な販売停止と回収を要請しました。

同日、同社は、製品の自主的な販売停止と回収を行うことを決定しましたので、今後、問題となった製品の販売は行われなくなることになります。

**問4: アガリクスを含む製品を摂取するとがんになるのですか。そもそもがんに効くのではなかったのですか。**



ラット(ネズミの一種)を用いた動物の試験で、製品の摂取目安量の約5倍から10倍程度の量を与えたところ、発がんを促進する作用が認められたものであり、ヒトに対してただちにがんを引き起こすという結果ではありません。

今回、ヒトへの健康被害を未然に防ぐため、製品名を公表して注意喚起しているところで、食品安全委員会による評価に基づき、改めて取扱いを検討するまでの間、念のため、「キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒」を摂取するのはお控えください。

また、アガリクスは、「抗がん効果がある」、「免疫力を高める」などといわれていますが、一般の食品として販売されており、医薬品等とは異なり効能効果を標榜することはできず、また、国が事前に審査を行う仕組みではないことから、厚生労働省では、ヒトに対する有効性について確認しておりません。

**問5: アガリクスを含む製品にはどのようなものがありますか。**

アガリクスの乾燥物を粉末、顆粒、錠剤等の形状にした製品や、菌糸の状態で培養したものを粉末、顆粒、錠剤等の形状にした製品が広く販売されていますが、厚生労働省では個々の製品名は把握していません。

**問6: 今回試験を行った3製品のうち、問題とされた1製品以外の2製品は大丈夫ですか。**

今回の2製品(「仙生露顆粒ゴールド」(販売者:(株)サンドリー(注))及び「アガリクスK<sub>2</sub>ABPC細粒」(販売者:(株)サンヘルス))については、厚生労働省が実施した試験のうち遺伝毒性試験は陰性で、中期多臓器発がん性試験においても、発がんを促進する作用は認められておりません。

厚生労働省では、今回の報告された試験結果について、食品安全委員会に報告することとしています。

(注): 試験対象となった「仙生露顆粒ゴールド」は(株)サンドリーが販売したのですが、現在、(株)S・S・IIに営業譲渡されています。

**問7: 今回試験を行った3製品以外のアガリクス製品は大丈夫ですか。**

現在、アガリクスを含む製品の中で、発がんを促進する作用が疑われる製品は、「キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒」のみです。

今回試験を行った3製品のうち、問題とされた1製品以外の2製品については、遺伝毒性試験は陰性であり、発がんを促進する作用を確認する試験においても発がんを促進する作用は認められていません。

このように、今回報告された試験結果は、アガリクスを含む製品全体に発がんを促進する作用が疑われるというものではありませんが、1製品でこのような作用が疑われたことから、試験を行った3製品以外の関連する製品の摂取にはご注意ください。

(\*) 安全性の確認状況をその製品の製造者・販売者に問い合わせるなどしていただき、慎重に判断してください。また、医療機関を受診されている方は、主治医にご相談ください。なお、食品関係事業者は、自らの責任において、販売する食品の安全性を確保する必要があります。

**問8: アガリクスを含む製品による健康被害はどれくらい出ているのですか。**

厚生労働省にアガリクスを含む製品による健康被害が明らかとなった事例が報告されたことはありませんが、肝障害の疑い等の事例が報道されたことや、肺炎や肝障害等の複数の事例が学術雑誌等に掲載されています。

本件は、今回試験を行った3製品のうち1製品において、ラット(ネズミの一種)を用いた動物の試験で、製品の摂取目安量の約5倍から10倍程度の量を与えたところ、発がんを促進する作用が認められたものであり、ヒトに対してただちにがんを引き起こすという結果ではありません。ヒトへの健康被害を未然に防ぐため、製品名を公表して注意喚起しているものです。

**問9:もし、アガリクスを含む製品を摂取し、健康被害があった場合にはどうしたら良いですか。**

体調に問題がある場合には、その製品の摂取を中止し、医療機関にご相談ください。また、健康食品等による健康被害に関する情報は、最寄りの保健所で受け付けておりますので、ご相談ください。

(全国保健所一覧:<http://idsc.nih.go.jp/hcl/index.html>)

**問10:どうして食品安全委員会に評価を依頼することになったのですか。**

製造方法が異なる3つのアガリクスを含む製品について、ラット(ネズミの一種)を用いた発がんを促進する作用を確認する試験を行ったところ、そのうちの1製品について発がんを促進する作用が認められています。

このため、当該製品について、食品衛生法※に基づき、食品として販売することを暫定的に禁止するかどうかが判断するため、食品安全委員会に評価を依頼することとしました。

また、その他の2製品については発がんを促進する作用を確認する試験では、発がんを促進する作用は、認められていませんが、問題となった1製品と併せて念のため食品安全委員会に評価を依頼しているところです。

**※食品衛生法第7条第2項**

厚生労働大臣は、一般に食品として飲食に供されている物であって当該物の通常の方法と著しく異なる方法により飲食に供されているものについて、人の健康を損なうおそれがない旨の確証がなく、食品衛生上の危害の発生を防止するため必要があると認めるときは、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、その物を食品として販売することを禁止することができる。

**問11:今回評価依頼をした3製品はどのようなものですか。**

今回、3製品のうちの1製品((1))については、食品としての販売を暫定的に禁止することについて、他の2製品((2)、(3))については、念のため製品の安全性について食品安全委員会に評価を依頼しています。

- (1)キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒(販売者:キリンウエルフーズ(株))  
キノコ全体を乾燥させて粉末化し、顆粒状にしたもの
- (2)仙生露顆粒ゴールド(販売者:(株)サンドリー(注))  
栄養補助成分を添加した形態
- (3)アガリクスK<sub>2</sub>ABPC顆粒(販売者:(株)サンヘルス)  
菌糸体培養物を顆粒にしたもの

(注):試験対象となった「仙生露顆粒ゴールド」は(株)サンドリーが販売したのですが、現在、

(株)S・S・IIに営業譲渡されています。

**問12:厚生労働省では、どのような対応を図ったのですか。**

今回の試験結果は、ラット(ネズミの一種)を用いた動物の試験で、発がんを促進する作用が認められたというものであり、ヒトに対してただちにがんを引き起こすという結果ではありませんが、ヒトへの健康被害を未然に防ぐため、厚生労働省では、次のような対応を図りました。

- (1)ラットに発がんを促進する作用が認められた製品(キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒)の販売者に対し、自主的な販売停止と回収を要請
- (2)消費者に対し当該製品の摂取を控えるよう、注意喚起することとし、アガリクスを含む製品に関するQ&Aを厚生労働省のホームページに掲載し、適切な情報を提供
- (3)各都道府県、関係団体等に対し、周知の協力を要請するための通知を発出
- (4)厚生労働省にアガリクスを含む製品に関する相談専用電話を設置  
(連絡先 厚生労働省代表 03-5253-1111 内線2479、4271、4272)

**【さらに詳細に知りたい方へ】**

**問13:特定の3製品を試験の対象に選定した理由は何ですか。**

アガリクスを含む各種製品の中で、

- (1)広域流通しているもので、
- (2)一定期間継続的に市場に流通しているもののうち、製造方法が異なるものを選定しました。

※健康被害報告等を基準としてこれらの製品を選択したものではありません。

**問14:今回行った発がん性試験の結果はどのようなものですか。**

今回行った試験は、5週齢の雄ラットに、発がんイニシエーターを投与した後、被験物質(「キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒」、「仙生露顆粒ゴールド」及び「アガリクスK2ABPC細粒」)を0、0.5、1.5及び5.0%濃度で24週間餌に混ぜて投与した群と、イニシエーターを投与せず、当該製品を0及び0.5%濃度で餌に混ぜて投与した群を用いて発がんプロモーション作用の有無を確認しました。

その結果、「キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒」を投与したイニシエーション処置群では、腎臓、甲状腺などに腫瘍性の病変の増加が認められ、当該製品にラット(ネズミの一種)に発がんプロモーション作用が認められました。

なお、「仙生露顆粒ゴールド」及び「アガリクスK2ABPC細粒」では、発がんプロモーション作用は認められていません。

**問15:問題とされた製品の試験で、使用されたラットが当該製品を摂取した量は、ヒトの摂取目安量に比較して体重あたり何倍くらいですか。**

今回の発がんプロモーション試験において、当該製品(キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒)を投与されたラット(ネズミの一種)のうち、発がんプロモーション作用が認められたのは、飼料に当該製品が1.5%濃度以上を含まれたものを摂取した群です。これをヒトが摂取する場合に換算すると、1.5%濃度で約5.6~11.5倍(平均6.9倍)、5.0%濃度で約18.2倍~37.2倍(平均23.2倍)になります。

なお、ヒトが摂取する場合において安全性を評価する場合には、ヒトとラットという動物種の違いによる感度の違い、あるいは、ヒトにおいても人種、性別等の個体要因による違い等を考慮して評価する必要があります。

**問16: 今後、アガリクスを含むすべての製品について、同様の試験を行う予定はありますか。**

食品安全基本法第8条や食品衛生法第3条により、食品関係事業者（製造業者、販売業者等）は、自ら販売する食品の安全性を確保する必要があることが規定されており、各事業者においては、自らの責任において、製品の安全性について確認していただく必要があります。

そのため、例えば錠剤、カプセル状等の成分が濃縮された形状の食品について一定の安全性を確保するため、厚生労働省では、「錠剤、カプセル状等食品の適正な製造に係る基本的考え方について」及び「錠剤、カプセル状等食品の原材料の安全性に関する自主点検ガイドライン」（平成17年2月1日）(PDF)を通知し、安全確保について事業者の自主的な取組みを促しているところです。

厚生労働省としては、アガリクスを含む製品の安全性等について、国民に対し適切な情報を広く提供していくこととしています。

消費者におかれましても、多種多様な食品の中から自らのライフスタイルや健康状態に合わせて製品を慎重に選んでいただくことが重要です。

**問17: キリンの製品で発がん促進作用が疑われましたが、原因はわかったのですか。**

キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒で、発がん促進作用が認められた原因については、まだわかっていません。厚生労働省で本年2月13日付けで食品安全委員会に対し、健康影響評価を依頼したところであり、食品安全委員会の評価結果を踏まえてさらに必要な対応を図るとともに、今後原因究明のための追加調査等を実施することとしています。

**<Q&A作成経緯>**

平成18年2月13日 作成  
平成18年2月16日 更新  
平成18年2月24日 更新  
平成18年3月20日 更新

[トップへ](#)

[戻る](#)