

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【主担当者】
夏 目 匡 克, 岩 倉 佳奈子, 大 野 久 美,
鈴 木 ゆみ子, 杉 麻 衣, 國 枝 正 幹,
名 波 加 奈, 山 本 裕里子, 太 田 泰 史,
大久保 陽 子
検疫： 太 田 泰 史【分担責任者】
松 本 覚, 渥 美 務, 岩 倉 佳奈子
器官（臓器）摘出： 萩 原 孝【主担当者】
渥 美 務, 岩 倉 佳奈子, 芝 田 真 希,
牧 田 真 輝, 鈴 木 ゆみ子, 大 野 久 美,
志 賀 敦 史, 中 嶋 圓
病理学検査： 志 賀 敦 史【分担責任者】
宇 野 冬 美, 加 藤 睦 美, 萩 原 孝
統計解析： 鈴 木 雅 也【分担責任者】
渥 美 務

11. 資料保存施設管理責任者

柴 田 典 昭

12. 試験日程

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

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

アガリチン

13.2. ロット番号

DPE0013

13.3. 純度/含量

97.0% (HPLC法)

13.4. 保存条件

室温・遮光

13.5. 保存場所

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

13.6. 物質の状態

白色粉末

13.7. 安定性

飼料中:1ヵ月間安定であることが確認されている。

14. 被験物質配合飼料

14.1. 配合飼料1

14.1.1. 名称

3 mg/kg, 20 mg/kg, 120 mg/kg 群用アガリチン配合飼料(投与1週)

3 mg/kg, 20 mg/kg, 80 mg/kg 群用アガリチン配合飼料(投与2週)

3 mg/kg 群用アガリチン配合飼料, 250 ppm, 1000 ppm アガリチン配合飼料(投与3週)

62.5 ppm, 250 ppm, 1000 ppm アガリチン配合飼料(投与4～8週)

62.5 ppm, 250 ppm, 750 ppm アガリチン配合飼料(投与9～13週)

14.1.2. 製造元

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

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

14.1.3. 保存条件

冷蔵

14.1.4. 保存場所

安評センター6号館1階冷蔵庫

保存期間:2007年1月18日～同年4月23日

実測値:3.8～8.5°C

14.1.5. 取り扱い上の注意

取り扱いに際しては、マスクおよびグローブを着用する。

14.1.6. 残余被験物質含有飼料の処理

焼却処分した。

14.2. 配合飼料2

14.2.1. 名称

5%キリン製品(キリン細胞壁破砕アガリクス顆粒, 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 mmH₂O 以下，照明 12 時間（午前 7 時点灯，午後 7 時消灯）に設定した。

自動給水装置を取り付けた Micro-Isolator™ System ラックを使用し，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)¹⁵

配合飼料は，毎週，国立医薬品食品衛生研究所にて調製された。ただし，投与 2 週用の 80 mg/kg 群用アガリチン配合飼料，投与 3 週用の 250 ppm アガリチン配合飼料および投与 9 週用の 750 ppm アガリチン配合飼料は，国立医薬品食品衛生研究所より提供された配合飼料を，安評センターで基礎資料と混合し，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バスを用いて50°Cの条件で保温した。

16.5.4. SM 緩衝液

[調製例]

1000 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

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

オートクレーブで20分間滅菌した後、室温で保存した。

16.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

16.6.1. ダウンス緩衝液

[調製例]

1000 mL の超純水に以下の試薬を溶解させた。

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

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

16.6.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

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

16.6.3. 組織破砕用緩衝液

102 mL を調製する場合の組成を以下に示す。

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

用時調製した。

16.6.4. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

[調製例]

100 mL の遺伝子工学用滅菌水 (ニッポンジーン) に SDS (和光純薬工業) 10 g を溶解した。フィルター (孔径 0.2 μm) をろ過除菌後、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] ^{注)}	20 mL

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

16.6.6. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

200 mL を調製する場合の組成を以下に示す。

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

用時調製した。

16.7. 陽性対照物質液の調製

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

17. 試験方法

17.1. 対照群

17.1.1. 陰性 (媒体) 対照

基礎飼料を与えた。

17.1.2. 陽性対照

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

17.2. トランスジェニック (TG) 試験

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

17.2.1. 用量

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

最高用量は、先に実施されたキリン細胞壁破砕ア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 [#]	90	6	5	1101~1106
アガリチン	250 [#]	90	6	5	1201~1206
	750 [#]	90	6	5	1301~1306
キリン製品**	5**	90	6	5	1401~1406
陽性対照***	50***	5	4	3	1501~1504

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

[#] : 投与用量一覧表参照

《投与用量一覧表》

投与週	アガリチン 低用量群	アガリチン 中用量群	アガリチン 高用量群
1	3 mg/kg (35 ppm)	20 mg/kg (231 ppm)	120 mg/kg (1389 ppm)
2	3 mg/kg (39 ppm)	20 mg/kg (257 ppm)	80 mg/kg (1030 ppm)
3	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 (LN₂) 中で凍結させた (遺伝子突然変異解析用)。
迅速に左葉の肝門部を含む組織片 (厚さ約 3 mm) を切り出し、十分な量の 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した (病理組織学検査用)。
残った辺縁部は、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
他の葉は、保存袋に入れそのままLN₂中で凍結させ、後日、国立がんセンター研究所に送付した (DNA付加体測定用)。陽性対照群の場合は、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 腎臓 左側の腎臓の皮膜を取り、メスで厚さ約 1~2 mmにスライス (水平断で4枚程度) した。各スライスをそれぞれ別のマイクロチューブに入れ、LN₂中で凍結させた (遺伝子突然変異解析用スライスを全量使用した)。その他の部位は保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
右側の腎臓は、腎門部を含む組織片 (厚さ約 5 mm) を切り出し、十分な量の 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した (病理組織学検査)。
残りの右側の腎臓は、保存袋に入れそのままLN₂中で凍結させ、後日、国立がんセンター研究所に送付した (DNA付加体測定用)。陽性対照群の場合は、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 肺 左肺、右肺を摘出した後、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 心臓 保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 甲状腺 気管から両側にある甲状腺を剥離し、マイクロチューブに入れ、LN₂中で凍結させた。
- 胃 胃を摘出し、切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。保存袋に入れ、LN₂中で凍結させた。
- 精巣 左右の精巣を摘出した後、保存袋に入れ、LN₂を入れた底面が平らな金属性容器を用いて上から押し潰し、凍結させた。
- 大腸 (結腸) 結腸を摘出し、切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。マイクロチューブに入れ、LN₂中で凍結させた。
- 大腿骨 左右の大腿骨を摘出した後、チューブに入れ、LN₂で凍結させた。

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

突然変異頻度の算出は、腎臓、肝臓、骨髄、甲状腺、肺、前胃の順に実施した。

17.2.8. ゲノム DNA の抽出

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

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

この核/細胞懸濁液にプロテナーゼ K 溶液 3 mL (甲状腺の場合は 1.5 mL) を加えて静かに混和転倒し、1~5 時間程度 (懸濁液が透明になるまで) 50°C に保温し、消化させた。等量 (約 6 mL) の Ph/Cl 混液を加え数回混和転倒し、さらに、10 分間ロー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⁻ 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 19.1×10^{-6} 、各個体の平均値は 19.3×10^{-6} であった。

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

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

20.1.2. 肝臓

試験結果を Table 2 および Appendix 2 に示す。

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

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

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

20.1.3. 骨髄

試験結果を Table 3 および Appendix 3 に示す。

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

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

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

445.1×10^{-6} であった。

20.1.4. 甲状腺

試験結果を Table 4 および Appendix 4 に示す。

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

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

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

20.1.5. 肺

試験結果を Table 5 および Appendix 5 に示す。

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

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

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

20.1.6. 前胃

試験結果を Table 6 および Appendix 6 に示す。

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

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

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

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

20.2. 観察および測定

20.2.1. 体重および一般状態観察

試験結果を Appendix 7 および 10 に示す。

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

よろめき歩行は, 投与 8 週頃から散見され, 投与 10 週頃からは全例 (6/6 例) に観察された。また, 投与 12 週頃からは 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[®]) 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。

Exp. No. A260 (079-388)

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

Compound	Dose (ppm)	Number of animals	Number of plaque forming units	Number of mutant plaques	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	P-value
Commercial diet a)	0	5	2,253,600	43	19.1	-
Agaritine	62.5 b)	5	2,207,700	47	21.3	0.3395
	250 c)	5	2,922,300	61	20.9	0.3638
	750 d)	5	1,860,300	37	19.9	0.4696
Product B	5 (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)