

食品健康影響評価に係る追加試験の結果等について

平成 18 年 8 月
厚生労働省食品安全部

アガリクスを含む製品については、「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）において、貴委員会へ食品健康影響評価を依頼していたところですが、当該製品（以下「B 製品」という。）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したので、別添のとおりその結果を報告するとともに、今後実施する追加試験の計画について報告します。

(別添)

追加試験の結果及び *in vivo* 遺伝毒性試験の試験計画について

厚生労働省では、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 1 参照)

このため、今後さらに追加試験を実施することとした。試験については、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、別添 2 のとおり *in vivo* 遺伝毒性試験を実施する予定である。

当該追加試験については、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の指摘事項も踏まえ、B 製品についても検体とし、トランスジェニックラット (Big Blue Rat) を用いた前胃、腎臓、甲状腺等に対する遺伝毒性試験及び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 2 参照)

なお、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及び 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したので併せて報告する。(別添 3、4、5 参照)

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 (臓器ホモジェネートの 9,000 x g 上清) は、通常用いられる薬物誘導したラットの肝臓の S9 の代わりにラットの腎臓の S9 を用いた。

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

また、同菌株及び薬物誘導したラットの肝臓の S9 を用い、検体 A (アガリチンの標準品)、B (B 製品ロット 1)、C (B 製品ロット 2)、D (B 製品ロット 3) の遺伝毒性物質を検索し、類似の結果を得た。-S9 mix 条件下での結果を前述の試験結果と比較すると、検体 A については本試験の方が 3-4 倍高い復帰株数を示したが、検体 C については、むしろ前に行われた試験の方が高い復帰株数を示した。検体 B および D については、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 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP) によって代謝を受けて DNA 損傷性を示す可能性が示唆されている。 γ -GTP の大腸菌における相同遺伝子である *ggt* 遺伝子を破壊した WP2 *uvrA*/pKM101 株を作製し、野生型

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

検体 A (アガリチン標準品) は、大腸菌 WP2 *uvrA*/pKM101 株に対して明確な遺伝毒性を示し、DNA に対する損傷性を有する物質 (遺伝毒性物質) と考えることができる。アガリチンを高濃度の含んだマッシュルーム抽出液については Big Blue mouse を用いて、腎臓と前胃に変異作用を示すことが報告されており、アガリチンの含量を基にしてアガリクス製品に対する (安全性に関する) 規制・指導を行うことには一定の根拠があると考えられる。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℃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、-S9mix 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、-S9mix 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℃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、-S9mix 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℃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、-S9mix 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ことが重要であろう。ラットの標的臓器において遺伝毒性が明確になれば、その遺伝毒性 (DNA 損傷性) が発がんにおいて重要な役割を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

使用菌株：大腸菌WP2uvrA/pKM101

試験番号： .9872 (079-361)

代謝活性化系の有無	検体A		検体B		検体C		検体D	
	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)
- S9mix	陰性対照	97 110 (104)	陰性対照	102 123 (113)	陰性対照	121 111 (116)	陰性対照	113 95 (104)
	39.1	124 123 (124)	0.797	130 142 (136)	0.977	129 135 (132)	0.977	116 112 (114)
	78.1	123 139 (131)	1.59	121 153 (137)	1.95	198 143 (171)	1.95	119 110 (115)
	156	180 186 (183)	3.19	162 153 (158)	3.91	163 170 (162)	3.91	126 129 (128)
	313	220 239 (230)	6.38	190 172 (181)	7.81	185 161 (173)	7.81	130 152 (141)
	625	322 298 (310)	12.8	223 227 (225)	15.6	229 186 (208)	15.6	162 151 (157)
	1250	361 408 (385)	25.5	275 289 (282)	31.3	278 329 (304)	31.3	212 219 (216)
	2500	561 560 (561)	51.0	364 441 (403)	62.5	363 448 (406)	62.5	290 288 (289)
	5000	776 830 (803)	102	611 580 (596)	125	663 777 (720)	125	431 408 (420)
+ S9mix	陰性対照	150 168 (159)	陰性対照	189 181 (185)	陰性対照	196 170 (183)	陰性対照	152 165 (159)
	39.1	250 260 (255)	0.797	233 222 (228)	0.977	194 201 (198)	0.977	169 178 (174)
	78.1	315 328 (322)	1.59	225 279 (252)	1.95	165 201 (183)	1.95	208 193 (201)
	156	445 436 (441)	3.19	231 236 (234)	3.91	217 234 (226)	3.91	237 214 (226)
	313	572 556 (564)	6.38	223 261 (242)	7.81	264 239 (252)	7.81	218 221 (220)
	625	718 705 (712)	12.8	273 273 (273)	15.6	272 277 (275)	15.6	217 238 (228)
	1250	907 874 (891)	25.5	323 314 (319)	31.3	305 291 (298)	31.3	253 272 (263)
	2500	1021 1074 (1048)	51.0	360 349 (355)	62.5	372 349 (361)	62.5	299 280 (290)
	5000	1338 1297 (1318)	102	417 401 (409)	125	451 422 (437)	125	291 302 (297)
陽性対照	名称	AF-2	名称	AF-2	名称	AF-2	名称	AF-2
	S9mixを必要としないもの	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
		コロニー数 /プレート	3495 3541 (3518)	コロニー数 /プレート	4739 5109 (4924)	コロニー数 /プレート	2799 2815 (2807)	コロニー数 /プレート
								3439 3328 (3384)
S9mixを必要とするもの	名称	2-AA	名称	2-AA	名称	2-AA	名称	2-AA
		用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2.00	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2.00	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)
		コロニー数 /プレート	1139 1093 (1116)	コロニー数 /プレート	1232 1392 (1312)	コロニー数 /プレート	1115 1185 (1150)	コロニー数 /プレート
								1125 1098 (1112)

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	104	陰性対照	113	陰性対照
0.977			132	114	39.1	124	0.797	136	0.977
1.59		137			78.1	131	1.59	137	1.95
1.95			171	115	156	183	3.19	158	3.91
3.19		158			313	230	6.38	181	7.81
3.91			162	128	625	310	12.8	225	15.6
6.38		181			1250	385	25.5	282	31.3
7.81			173	141	2500	561	51.0	403	62.5
12.8		225			5000	803	102	596	125
15.6			208	157					
25.5		282			+S9mix				
31.3			304	216	陰性対照	159	陰性対照	185	陰性対照
39.1	124				39.1	255	0.797	228	0.977
51.0		403			78.1	322	1.59	252	1.95
62.5			406	289	156	441	3.19	234	3.91
78.1	131				313	564	6.38	242	7.81
102		596			625	712	12.8	273	15.6
125			720	420	1250	891	25.5	319	31.3
156	183				2500	1048	51.0	355	62.5
313	230				5000	1318	102	409	125
625	310								
1250	385								
2500	561								
5000	803								

+S9mix	A	B	C	D
0.797		228		
0.977			198	174
1.59		252		
1.95			183	201
3.19		234		
3.91			226	226
6.38		242		
7.81			252	220
12.8		273		
15.6			275	228
25.5		319		
31.3			298	263
39.1	255			
51.0		355		
62.5			361	290
78.1	322			
102		409		
125			437	297
156	441			
313	564			
625	712			
1250	891			
2500	1048			
5000	1318			

-S9mix

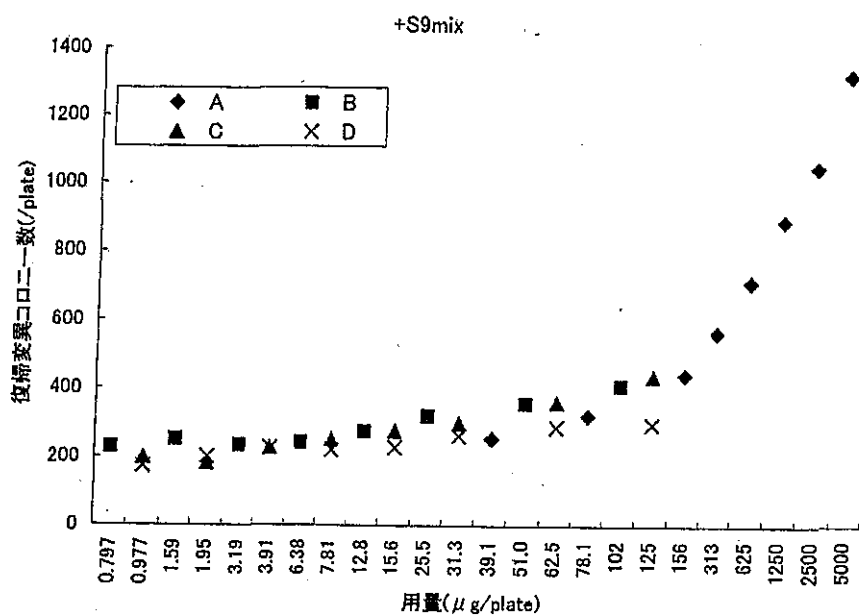
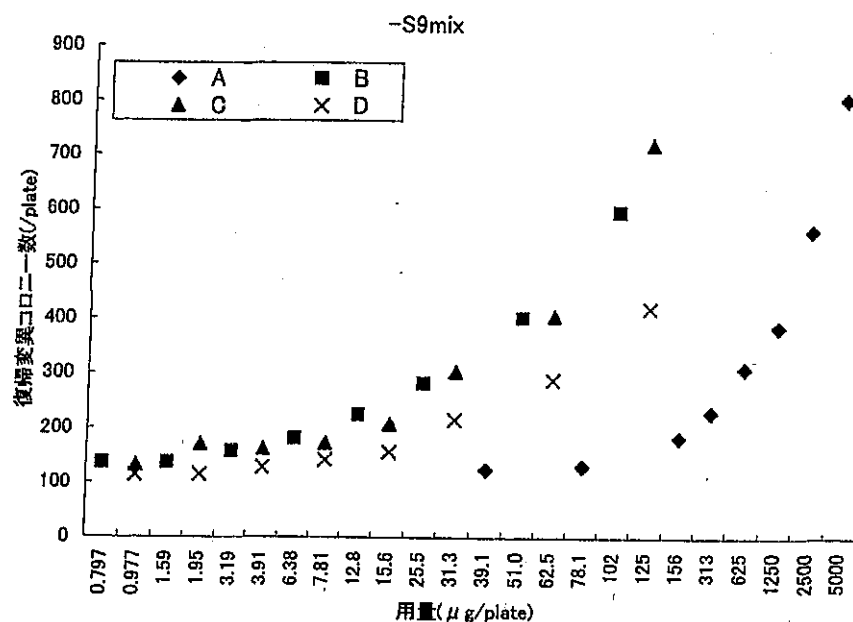
Y-axis: 復帰変異口数(plate)
X-axis: 用量(μg/plate)

Legend: A (diamond), B (square), C (triangle), D (cross)

+S9mix

Y-axis: (plate)
X-axis: 用量(μg/plate)

Legend: A (diamond), B (square), C (triangle), D (cross)



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/pKM101S9: PB+5,6-BF誘導rat liver 50 μ L/plate

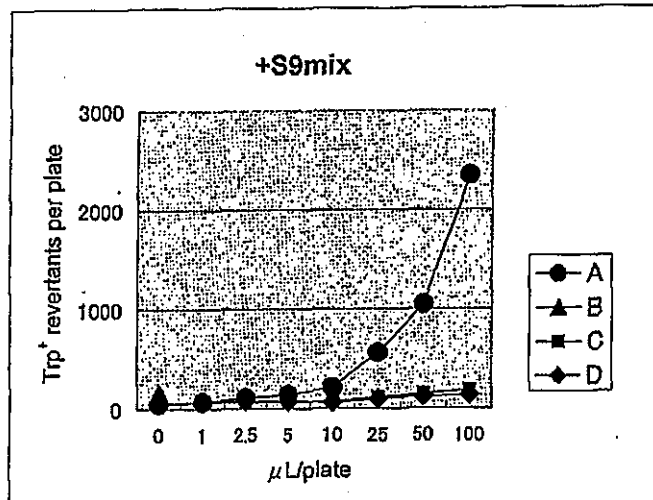
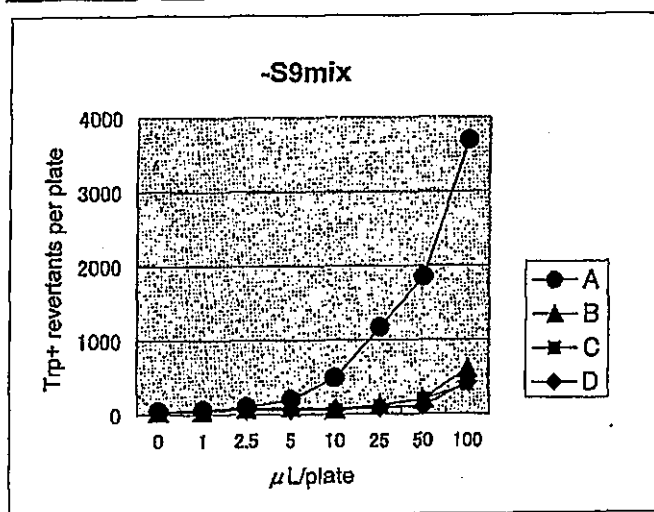
solvent: Water

without S9

μ 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	496	480	488	61	82	72	43	62	53	62	69	66
25	1168	1184	1176	152	106	129	147	88	118	91	98	95
50	1920	1784	1852	188	219	204	182	217	200	120	103	112
100	3856	3536	3696	640	576	608	336	448	392	432	416	424

with S9

μ 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	76	52	64	59	82	71	51	79	65
25	520	608	564	125	126	126	117	113	115	105	93	99
50	1072	1024	1048	125	154	140	151	150	151	121	121	121
100	2272	2432	2352	155	160	158	192	179	186	133	140	137



Ames test

別紙4

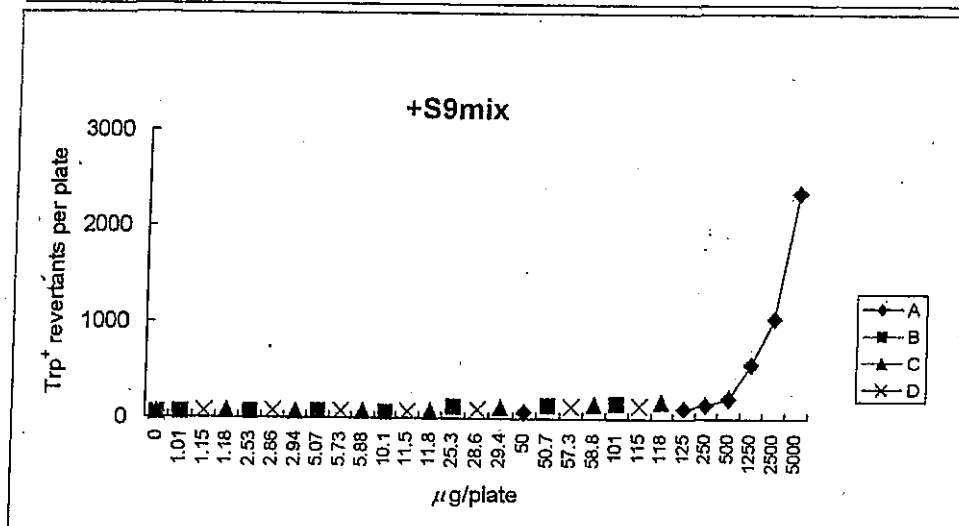
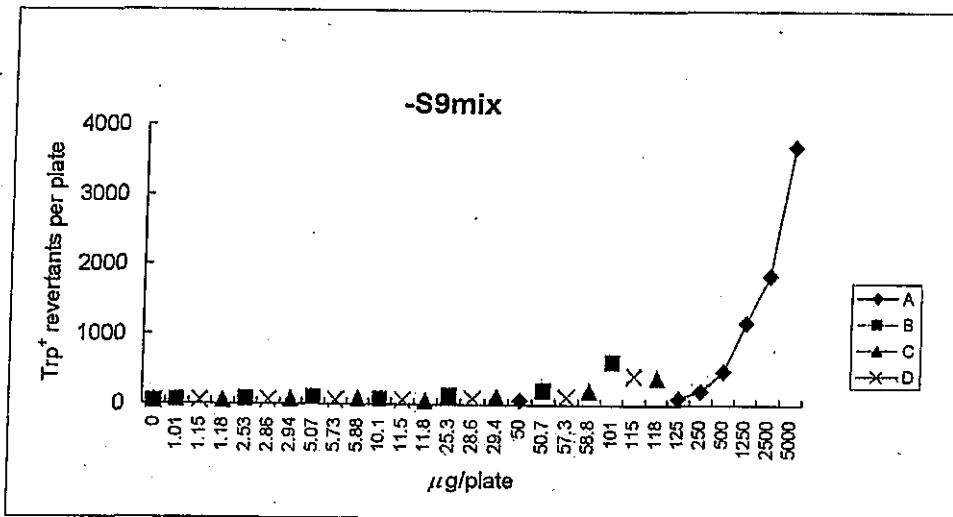
被験物質: 検体A、検体B、検体C、検体D

strain: *E.coli* WP2 uvrA/pKM101

S9: PB+5,6-BF誘導rat liver 50 μ L/plate

solvent: Water

μ 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	51
1.01		51				56		
1.15				53				66
1.18			57				74	
2.53		77				64		
2.86				62				76
2.94			76				69	
5.07		100				66		
5.73				66				75
5.88			83				77	
10.13		72				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				121
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				564			
2500	1852				1048			
5000	3696				2352			



Ames test

別紙5

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

strain:E.coli WP2 uvrA7pKM101

S9:PB+5,6-BF誘導rat liver 50μL/plate

solvent:Water

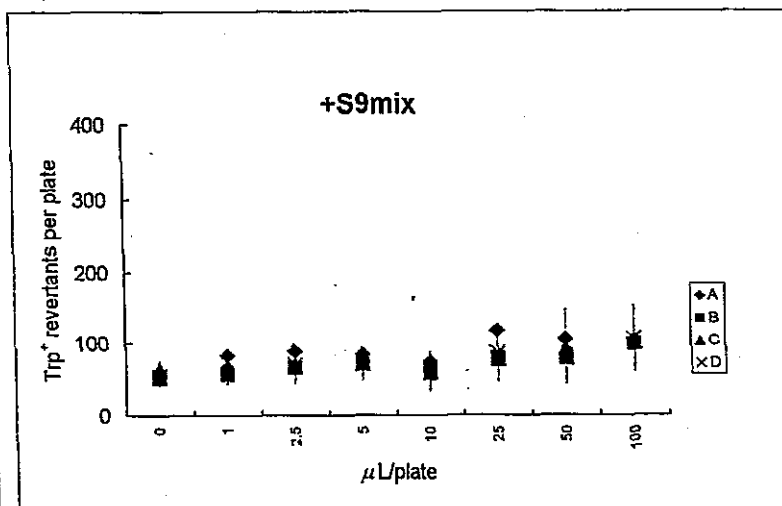
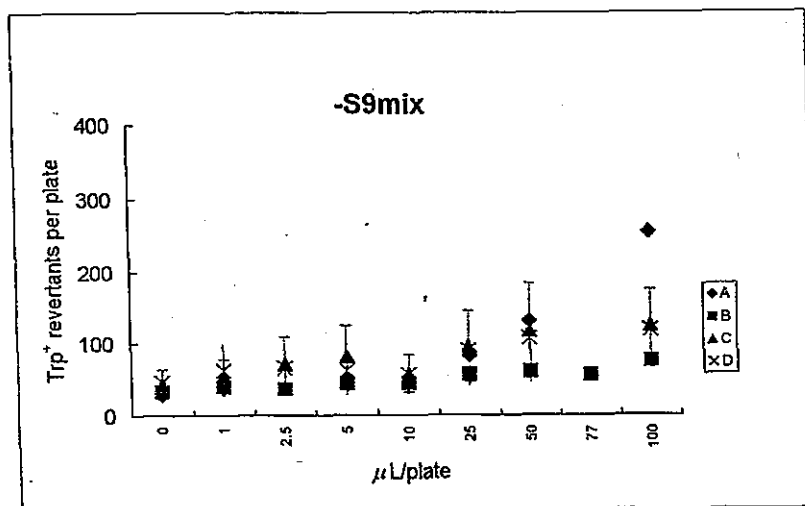
without S9

2006.6.27

μL/plate		検体A(分解物)			検体B(分解物)						検体C(分解物)						検体D(分解物)					
		2006.6.16			2006.6.6		2006.6.16		average	SD	2006.6.7		2006.6.16		average	SD	2006.6.7		2006.6.16		average	SD
		#1	#2	average	#1	#2	#1	#2			#1	#2	#1	#2			#1	#2	#1	#2		
0	29	25	27	33	33	32	29	32	1.9	55	64	26	23	42	20.6	49	69	30	32	45	18.1	
1	37	35	36	37	38	37	45	39	3.9	76	72	35	36	55	22.3	98	86	33	30	62	35.3	
2.5	39	34	37	36	34	34	38	36	1.9	99	108	38	38	71	38.0	92	96	42	28	65	34.6	
5	46	47	47	50	43	41	35	42	6.2	121	117	43	45	82	43.3	74	103	30	37	61	34.0	
10	48	54	51	42	46	36	48	43	5.3	58	93	40	37	57	25.7	81	80	30	33	56	28.3	
25	83	81	82	61	50	60	53	56	5.4	146	131	52	53	96	50.0	137	128	46	46	89	50.1	
50	131	130	131	69	53	57	57	59	6.9	182	166	54	67	117	66.1	151	168	60	46	106	62.1	
77				55				55														
100	259	252	256			77	72	75		170	166	82	82	125	49.7	161	171	73	70	119	54.7	

with S9

with S9																							
μL/plate	検体A(分解物)				検体B(分解物)						検体C(分解物)						検体D(分解物)						
	2006.6.21			average	2006.6.6		2006.6.21		SD	2006.6.7		2006.6.21		average	SD	2006.6.7		2006.6.21		average	SD		
	#1	#2	#1		#2	#1	#2	#1		#2	#1	#2	#1			#2							
	#1	#2	#1		#2	#1	#2	#1		#2	#1	#2	#1			#2							
0	55	64	60	50	47	50	52	50	2.1	64	73	55	64	64	7.3	55	71	40	47	53	13.3		
1	83	83	83	52	41	70	57	55	12.0	70	77	64	70	70	5.3	82	75	72	70	75	5.3		
2.5	96	82	89	59	59	70	72	65	7.0	68	78	71	67	71	5.0	84	98	41	55	70	26.1		
5	81	87	84	61	62	87	73	71	12.1	95	79	59	62	74	16.7	90	91	52	47	70	23.8		
10	78	70	74	47	63	58	60	57	7.0	81	82	41	44	62	22.6	84	84	36	38	61	27.1		
25	100	136	118	77	88	83	70	80	7.8	99	89	68	53	77	20.7	116	124	48	57	86	39.3		
50	118	94	106	69	68	92	81	78	11.3	120	125	72	64	95	31.7	139	141	41	59	95	52.5		
100	91	118	105			96	101	99		142	134	73	63	103	40.8	153	140	60	71	106	47.3		



Ames test

被験物質: 検体A(分解物)、検体B(分解物)、検体C(分解物)、検体D(分解物)

(100°C、5～6時間)

試験番号: 9873(079-362)

代謝活性化系の有無	被験物質の用量(%)	復帰変異数(コロニー数/プレート)			
		検体A(分解物)	検体B(分解物)	検体C(分解物)	検体D(分解物)
		WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101	WP2uvrA/pKM101
-S9mix	陰性対照	96 109 (103)	102 126 (114)	111 123 (117)	97 110 (104)
	0.781	117 110 (114)	107 120 (114)	111 123 (117)	97 108 (103)
	1.56	105 101 (103)	117 129 (123)	109 138 (124)	112 120 (116)
	3.13	127 104 (116)	154 152 (153)	147 135 (141)	126 140 (133)
	6.25	136 121 (129)	131 143 (137)	156 148 (152)	127 142 (135)
	12.5	148 135 (142)	162 160 (161)	164 189 (177)	137 140 (139)
	25.0	137 152 (145)	183 196 (190)	222 194 (208)	167 177 (172)
	50.0	200 181 (191)	208 218 (213)	246 243 (245)	207 198 (203)
	100	241 243 (242)	242 251 (247)	293 296 (295)	224 247 (236)
+S9mix	陰性対照	168 153 (161)	185 178 (182)	198 172 (185)	165 152 (159)
	0.781	168 177 (173)	218 224 (221)	166 179 (173)	166 176 (171)
	1.56	161 158 (160)	201 210 (206)	187 222 (205)	194 203 (199)
	3.13	174 190 (182)	232 211 (222)	175 200 (188)	201 203 (202)
	6.25	191 178 (185)	257 262 (260)	170 228 (199)	169 179 (174)
	12.5	178 195 (187)	250 228 (239)	213 222 (218)	209 198 (204)
	25.0	188 183 (186)	273 254 (264)	246 204 (225)	187 198 (193)
	50.0	224 209 (217)	257 247 (252)	247 251 (249)	201 190 (196)
	100	233 261 (247)	280 278 (279)	280 257 (269)	203 195 (199)
陽性対照	S9mixを必要としないもの	名称	AF-2	AF-2	AF-2
		用量(μg/プレート)	0.01	0.01	0.1
		コロニー数/プレート	3482 3371 (3427)	5261 4709 (4985)	2797 2803 (2800)
	S9mixを必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA
		用量(μg/プレート)	2.00	2.00	2
		コロニー数/プレート	1118 1078 (1098)	1441 1392 (1417)	1106 1169 (1138)

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

2-AA :2-Aminoanthracene

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 試験計画 (案)

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を検討する。

動物：ラット (Big BlueTM トランスジェニックラット)、系統：Fischer 344 [SPF]

週 齢： 購入時：5～7 週齢 群分け時：6～8 週齢

購入動物数：雄 36 匹 (使用動物数：雄 34 匹)

投与経路：経口投与 (混餌法) 投与期間：90 日間

被験物質：アガリチン 陽性対照物質：エチルニトロソウレア (ENU)

群 構 成：3 mg/kg, 20 mg/kg, 120 mg/kg アガリチン配合飼料投与群

5%製品 (キリン細胞壁破碎アガリスク顆粒) 配合飼料投与群

陰性対照群：基礎飼料を与える

陽性対照群：ENU を 1 日 1 回, 最初の 5 日間連続、50 mg/kg/日腹腔内 (i.p) 投与

飼料提供元：国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

トランスジェニック (TG) 試験

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。

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 **：キリン細胞壁破碎アガリスク顆粒 (%) ***：ENU (mg/kg)

最終投与後 3 日間の退薬期間の後 (投与開始 93 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初回投与後 93 日に器官を摘出する。

摘出器官 (臓器) および保存：

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物より、肝臓、腎臓、肺、心臓、甲状腺、胃、精巣、大腸を摘出する。凍結後の器官は、超低温フリーザーに保存する。

ゲノム DNA の抽出および パッケージング：

凍結組織片よりゲノム DNA を抽出する。Transpack (Stratagene) を用い、パッケージング法によりゲノム DNA を回収し、総プラーク数に対する突然変異プラークの割合を求めることにより当該組織での突然変異頻度を算出する。突然変異頻度算出は腎臓を優先し、ついで肝臓の解析を実施する。

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。

各病理組織学的検査および DNA シーケンス解析：

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

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℃ 以下）により国立がんセンター研究所に送付する。

添付資料

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。

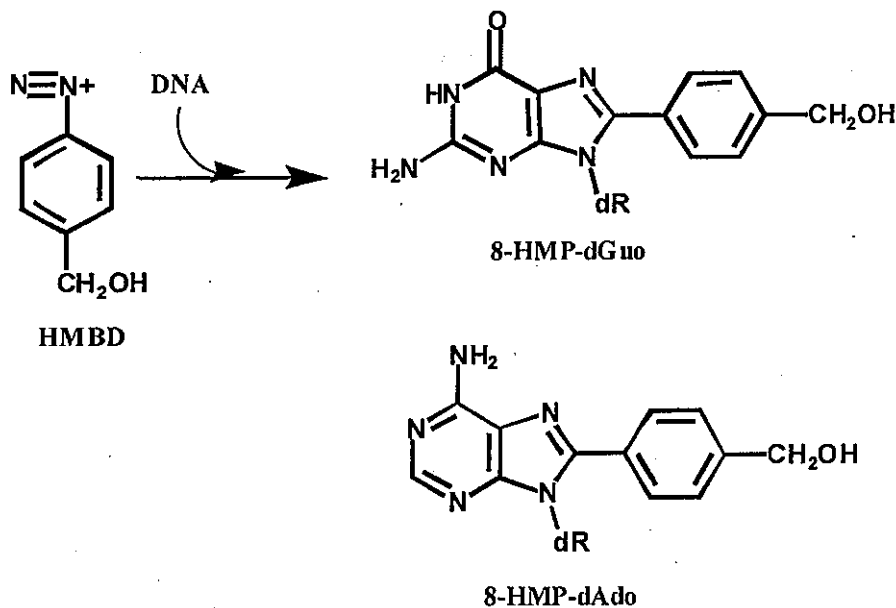
試験群: コントロール (n=3)

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 ^{32}P -ポストラベル法(注 1)等を用いて解析する。
- 2) 試料中から 8-HMP-dGuo および 8-HMP-dAdo が検出されない場合は、その他のアガリチン由来の DNA 付加体の生成について更に LC/MS/MS および ^{32}P -ポストラベル法等を用いて検討を行う予定である。



(注 1) ^{32}P -ポストラベル法

^{32}P -ポストラベル法とは DNA 付加体を好感度に検出する方法で、具体的には、

DNA を分解酵素で 2'-deoxynucleoside 3'-monophosphate に分解した後、5'-末端を [γ - ^{32}P]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。

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

A 被験物質添加飼料（添付ファイル被験被験物質 A 飼料保管条件参照）

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

C 被験物質添加飼料（添付ファイル被験被験物質 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 $24.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 20\%$ 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 $21.1 \sim 25.1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $32 \sim 71\%$ 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とはあっても尿が飼料に混じること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

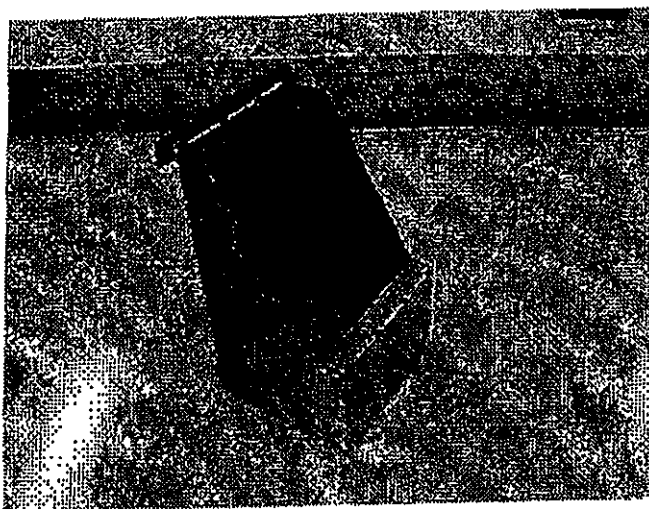
ポリカーボネート製飼育ケージ（W 21.5 × D 37.4 × H 20.0 cm, 16,082 cm³）を使用しました。

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±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)

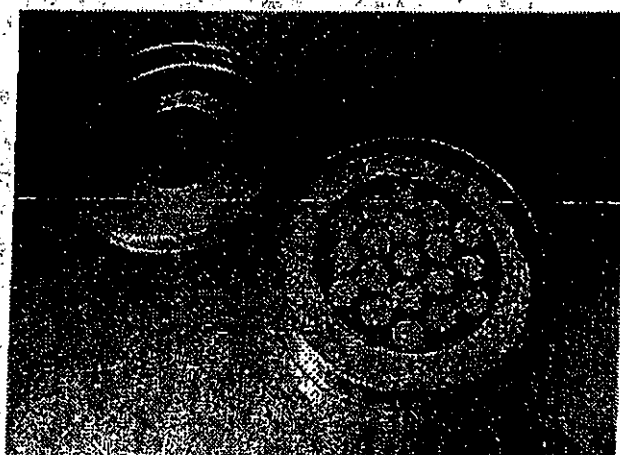
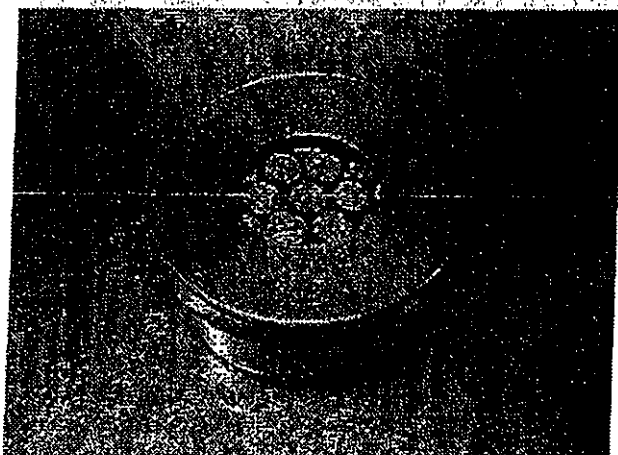
冷蔵暗所保管

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 (310W×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

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、0.45 μ m 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、動物が入れず、水も混入することがない特殊なゲージを用いており、尿や糞及び飲料水が混入することはないとのことであつた（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。

麒麟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	麒麟細胞壁破碎製品	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