

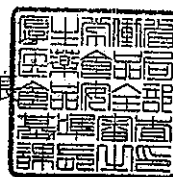
食安基発第1220001号
平成 18 年 12 月 20 日

内閣府

食品安全委員会事務局評価課長 殿

厚生労働省

医薬食品局食品安全部基準審査課長



食品健康影響評価に係る追加試験の実施及び資料の提出について（回答）

「食品健康影響評価について」（平成 18 年 5 月 9 日付け府食第 360 号）により貴委員会から依頼があった、食品健康影響評価に係る追加試験の実施及び資料の提出について、別添のとおり回答を提出します。



(別添)

指摘事項 1.

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

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

回答 1)

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

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。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、3 2 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。

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)

Exp. No. A260 (079-388)
PROTOCOL

試 験 計 画 書

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

試験番号：A260（079-388）

2006年12月19日

1. 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 90～190 g)

16.1.6. 購入動物数

雄 60 匹

16.1.7. 使用動物数

雄 34 匹

16.1.8. 種・系統選択理由

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

16.1.9. 動物の適正使用について

動物の飼育および動物の取り扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、
「実験動物の飼養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わる施設] (W 3.5 × D 5.5 × H 2.5 m, 48.1 m³) で動物を飼育し, 環境調節の基準値は次の通りとする.

温度	24.5±2.5°C
湿度	55±20%
換気回数	8 回以上/h
空気差圧	外気-1 mmH ₂ 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, Zyfone™製飼育ケージ (W 26.6 × D 48.2 × H 20.3 cm, 26,027.0 cm³) に床敷き (ALPHA-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)^{1.5}

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

16.2.3. 給水

水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させる.

16.3. 検疫および馴化

各動物について, 異常の有無を 1 日 1 回, 最低 5 日観察するとともに, 動物を飼育環

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

16.4. 個体識別および群分け

検疫・馴化期間中は、ケージに付した仮動物番号を記入したラベルと、動物の毛刈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
バクトアガー	7	g

オートクレーブで 20 分間滅菌する. 使用時までウォーターバスを用いて 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 ₄ ·7H ₂ O	2.03	g
1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] (ニッポンジーン)	50	mL
ゼラチン末 (関東化学)	100	mg

オートクレーブで 20 分間滅菌した後, 室温で保存する.

16.6. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

16.6.1. ダウンス緩衝液

[調製例]

1000 mL の超純水に下記の試薬を溶解させる.

Na ₂ HPO ₄	1.75	g
KH ₂ PO ₄	0.25	g
NaCl	8	g
KCl	0.2	g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	20	mL

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

16.6.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

ダウンス緩衝液 50 容に対し, RNase 溶液 (10 mg/mL, ニッポンジーン) 1 容を添加する. 用時調製とする.

16.6.3. 組織破碎用緩衝液

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 μ m) を過除菌後, 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] 注	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[®]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碎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, キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒を用いた中期多臓器発がん性試験における高用量群 (5%混餌) より算出したアガリチン用量を用いた。中用量は公比約 6 を用い 20 mg/kg とした。

キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒の用量は, 先般実施したキリン細胞壁破碎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 ** : キリン細胞壁破碎アガリクス顆粒 (%) *** : 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 100 g 当たり 1.0 mL とし、群分け時の体重を基に投与液量を決定する。

17.2.4. 発現期間

最終投与後 3 日間の発現期間の後（投与開始 94 日）、17.2.7.に記載する器官を摘出する。陽性対照群については最終投与後 3 日に器官を摘出する。

17.2.5. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検疫・馴化期間終了時（群分け時、投与 1 日）、投与 8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、91 日および器官摘出直前に電子天秤（PG2002 あるいは PG802-S、メトラー・トレド）を用いて体重を測定する。また、死亡動物については死亡発見時に体重を測定する。陽性対照群については、動物搬入時、検疫・馴化期間終了時（群分け時、投与 1 日）および器官摘出直前に電子天秤（PG2002 あるいは PG802-S、メトラー・トレド）を用いて体重を測定する。また、死亡動物については死亡発見時に体重を測定する。

器官摘出まで、最低 1 日 1 回、動物の一般状態を観察する。

17.2.6. 摂餌量

全動物について、投与 1 日（投与開始日）以降 91 日（配合飼料除去時）まで、体重測定日に餌重量を電子天秤（PG2002 あるいは PG802-S、メトラー・トレド）を用いて測定し、測定日間の平均 1 日摂餌量（g/day）を算出する。なお、給餌は、原則として毎週 1 回とするが、残量が不足しそうな場合には適宜給餌を実施する。なお、陽性対照群の摂餌量は測定しない。

被験物質摂取量（mg/kg/day）は、体重および摂餌量から算出する。

17.2.7. 摘出器官（臓器）および保存

動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈からの放血により安楽死させた動物より、肝臓、腎臓、肺、心臓、甲状腺、胃、精巣、大腸、大腿骨を摘出する。各器官の摘出および保存方法を以下に示す（添付資料 1 参照）。

肝臓	左葉の外周近くを生検トレパン (BP-50F, 貝印) を用いて4カ所くり抜く (添付資料1の病理組織標本に配慮してくりぬく)。くり抜いた肝臓は、それぞれマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN₂) 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、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、凍結させる。 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する (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 (LN₂) 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、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LN₂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、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、凍結させる。
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、凍結させる。
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 (LN₂) 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 (LN₂) 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、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 (LN₂) 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、LN₂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 分間ローテ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 μ L 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 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 μ L および 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液 300 μ L 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 μ L 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、次の

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

17.2.10. ゲノム DNA のパッケージング

Transpack (Stratagene) のチューブ (RED) を解凍する。300~600 µg/mL 程度の濃度に調製したゲノム DNA 溶液およそ 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、総プラーク算出用 (タイター用) に 1 mL、突然変異算出用 (セクション用) 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て攪拌する。タイター用チューブに、トップアガー 17 mL を加えて混和し、LB 寒天培地に全量を重層する。セ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。

総プラーク数が 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. プラークの計数

17.3.1. 総プラーク数算出

タイター用プレートに出現したプラーク数 (N) を計数し、下記の式を用いて総プラーク数を求める。

$$\begin{aligned}\text{総プラーク数} &= \frac{N \times 300(\mu\text{L}) \times 2700(\mu\text{L})}{30(\mu\text{L}) \times 30(\mu\text{L})} \\ &= 900 \times N\end{aligned}$$

17.3.2. 変異プラーク数算出

セクション用プレートに出現したプラーク数を計数する。セクション用プレートに出現したプラーク数が、変異プラーク数となる。

17.3.3. 突然変異頻度算出

cH 遺伝子をレポーターとして用いる。

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

$$\text{突然変異頻度} = \frac{\text{変異プラーク数}}{\text{総プラーク数}}$$

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検査 (肝臓および腎臓)、DNA シーケ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℃ 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

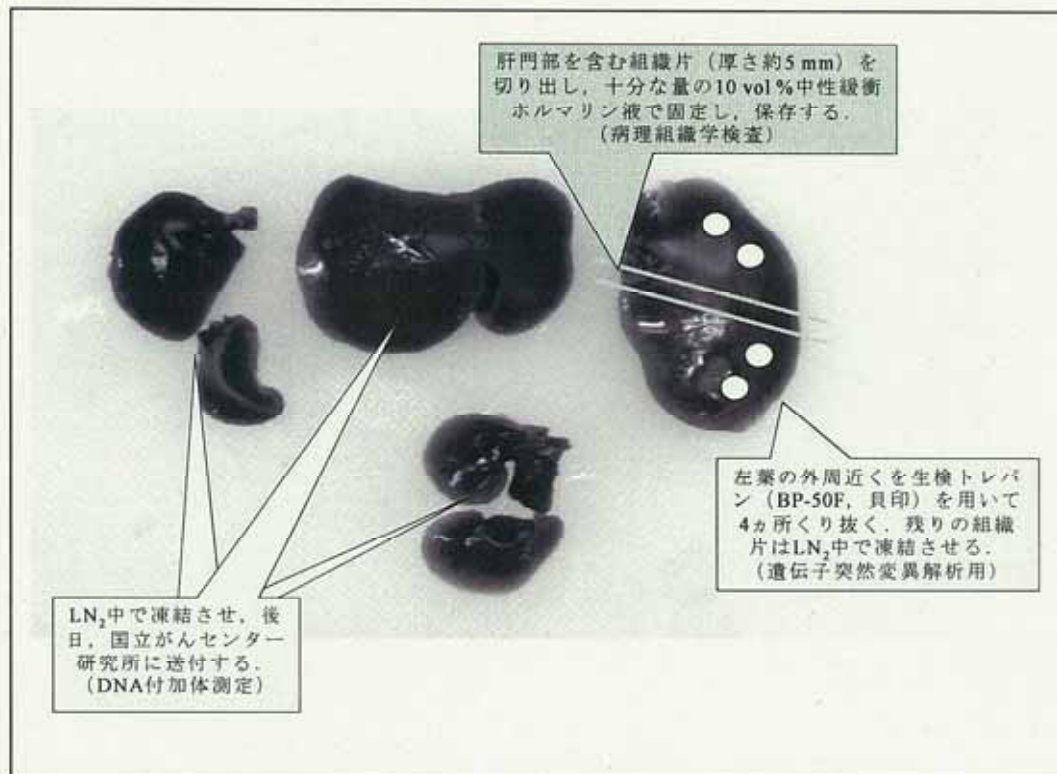


図1 肝臓のサンプリング

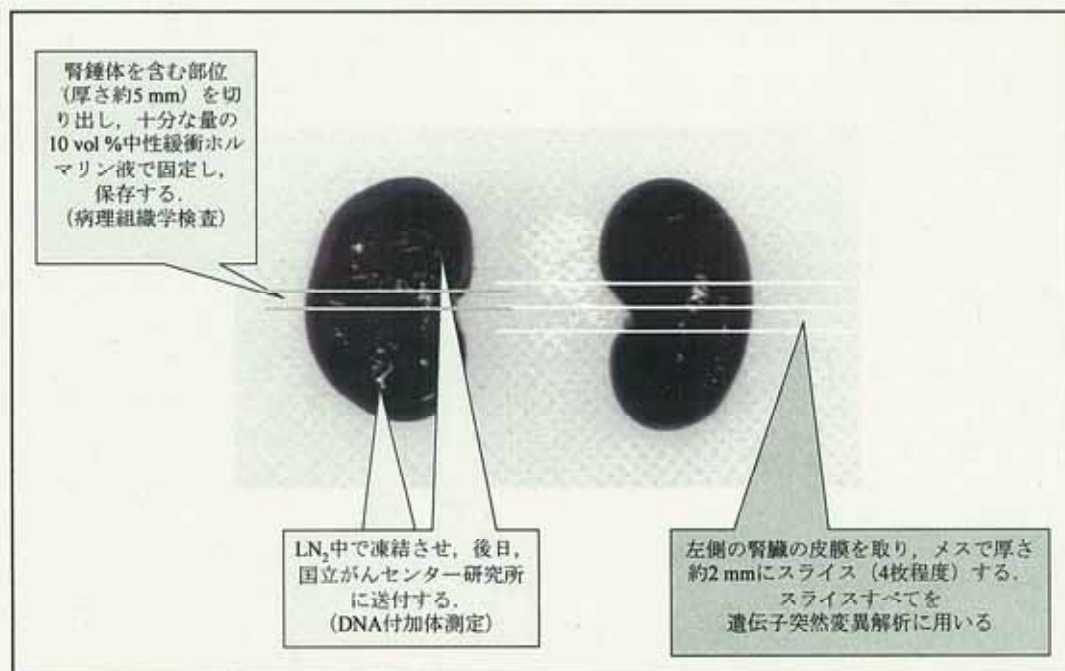


図2 腎臓のサンプリング

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。

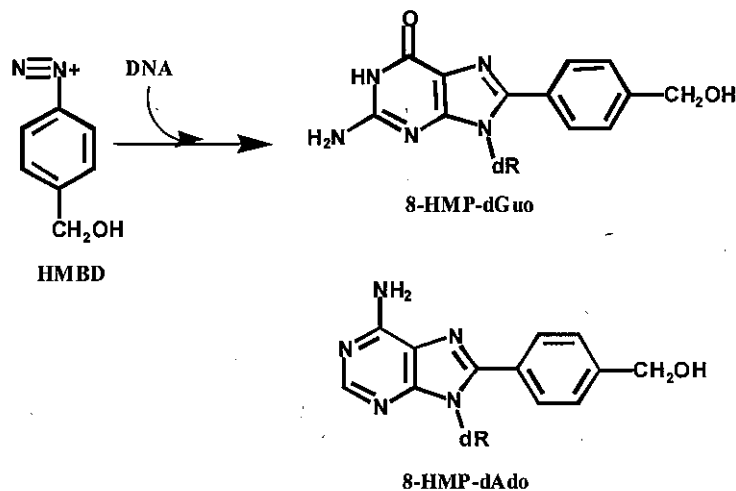
試験群：コントロール (n=3)

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



(注 1) ^{32}P -ポストラベル法

^{32}P -ポストラベル法とは DNA 付加体を好感度で検出する方法で、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。

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

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

（別紙 3、4）

アガリチンについては、哺乳類の γ グルタミルトランスぺプチダーゼ (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は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。