

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)
		168 153 (161)	185 178 (182)	198 172 (185)	165 152 (159)
+ S9mix	陰性対照	168 177 (173)	218 224 (221)	166 179 (173)	166 176 (171)
	0.781	161 158 (160)	201 210 (206)	187 222 (205)	194 203 (199)
	1.56	174 190 (182)	232 211 (222)	175 200 (188)	201 203 (202)
	3.13	191 178 (185)	257 262 (260)	170 228 (199)	169 179 (174)
	6.25	178 195 (187)	250 228 (239)	213 222 (218)	209 198 (204)
	12.5	188 183 (186)	273 254 (264)	246 204 (225)	187 198 (193)
	25.0	224 209 (217)	257 247 (252)	247 251 (249)	201 190 (196)
	50.0	233 261 (247)	280 278 (279)	280 257 (269)	203 195 (199)
	100				
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

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 32～71% の範囲内でした。空調機の点検やフィルター交換により、湿度で数回下限からの逸脱がありますが、いずれも軽微で短時間の逸脱であり、問題としておりません。

③ 給餌器の形態（写真）

写真を添付いたします。

④ 餌の交換頻度

摂餌量の測定毎に交換しており、週に 1 回交換しておりました。

⑤ 交換時の餌の状態（尿、糞等に汚染等、特に飲料水による餌の湿り気状態）

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

⑥ ケージの種類

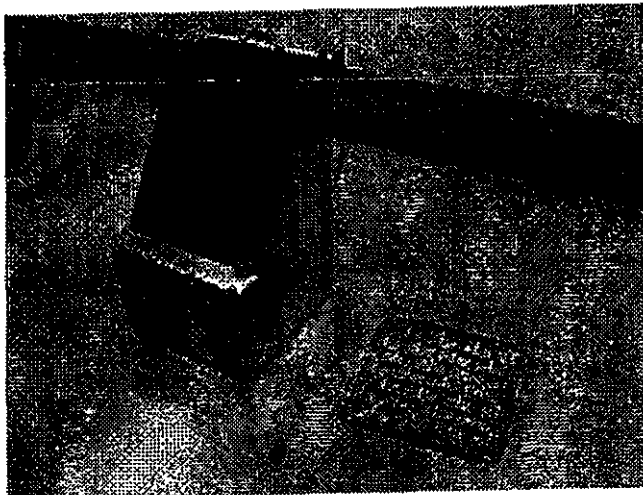
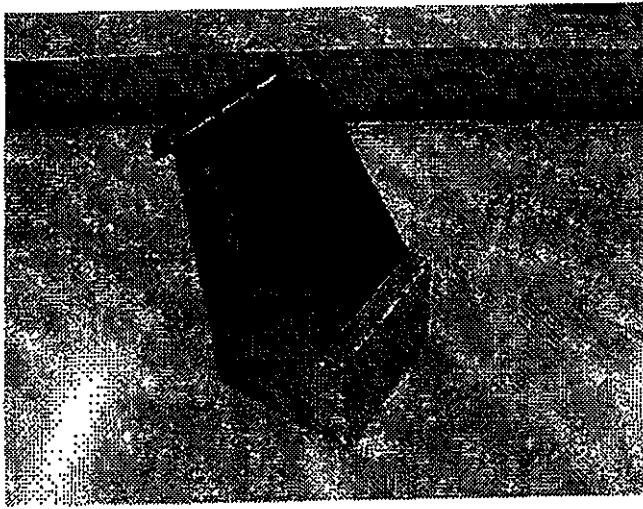
ポリカーボネート製飼育ケージ（W 21.5 × D 37.4 × H 20.0 cm, $16,082 \text{ cm}^3$ ）を使用しました。

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

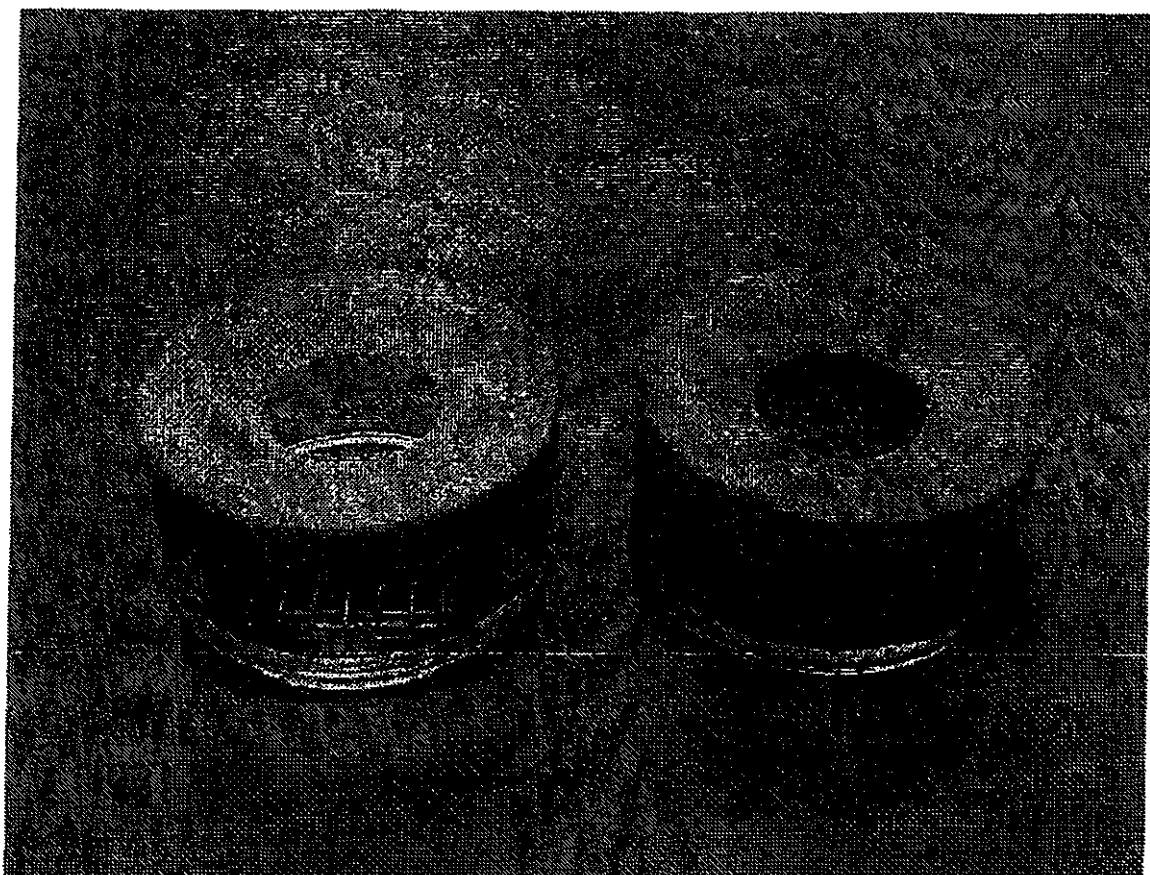
常圧蒸気滅菌したプラスチック製ケージ（トキワ科学器械㈱：W260×L412×H195mm）、
ステンレス製ケージ蓋は高圧蒸気滅菌して使用しています。

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）

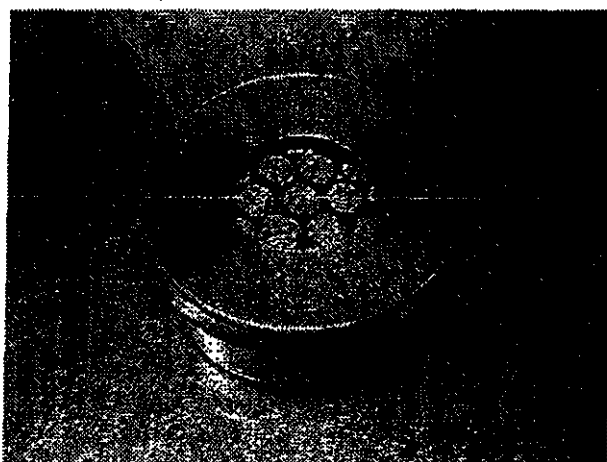
冷蔵暗所保管

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（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