

Ⅱ. 分担研究報告書

(6-2)原因物質と推定されるプベルル酸の遺伝毒性に関する研究

研究分担者 平林 容子

令和6年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価と その手法開発のための研究

分担研究報告書

(6-2)原因物質と推定されるペベルル酸の遺伝毒性に関する研究

研究分担者 平林容子 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

研究要旨

紅麹菌を用いて製造されたいわゆる健康食品による腎障害等の健康被害を起こした事例について、原因物質の一つとされるペベルル酸の突然変異誘発能の有無を明らかにするため、細菌を用いる復帰突然試験（Ames試験）と遺伝子改変げっ歯類（MutaMouse）を用いた遺伝子突然変異試験（TGR試験）を実施した。Ames試験については、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株においても復帰変異コロニー数の増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

TGR試験については、既存の試験結果から明確な性差が確認されていることから、本試験においては雌のみを使用した。用量設定試験から最大耐量付近と考えられた 5.00 mg/kg/day を最高用量として、以下、2.50, 1.25 および 0.625 mg/kg/day の計4用量を設定した。各群雌6匹(2.50 mg/kg/day 群のみ8匹)に1日1回、28日間連続強制経口投与した。最終投与後3日に全例から腺胃および腎臓を摘出し、lacZ assayにより遺伝子突然変異体頻度を算出した。その結果、ペベルル酸投与群の腺胃および腎臓のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の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-エチル-N-ニトロソウレア(ENU, 投与量100 mg/kg/day, 腹腔内投与, 1日1回2日間)投与群においては、腺胃および腎臓ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。以上の結果から、当該試験条件下において、ペベルル酸は遺伝子改変げっ歯類の腺胃および腎臓に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないもの(陰性)と判定された。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

出水 庸介、豊田 武士、杉山 圭一、花尻 (木倉) 瑠理

紅麹菌を用いて製造されたいわゆる健康食品によって腎障害等の健康被害が生じた事例について、国民の不安が募っている。本研究においては、原因物質の一つとされたペベルル酸について、遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、細菌を用いる復帰突然試験（Ames試験）と遺伝子改変げっ歯類

A. 研究目的

(MutaMouse) を用いた遺伝子突然変異試験 (TGR 試験) を行う。

B. 研究方法

1. プベルル酸の Ames 試験

プベルル酸 (Puberulic acid; CAS no. 99-23-0) の遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス 菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、ブレインキューベーション法により実施した。なお、被験物質 (国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部にて合成 : Lot no. 20240529、純度 98.78%) の溶媒にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。参考にしたガイドラインは、

- ・「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日:薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号)

- ・「OECD Guideline for Testing of Chemicals 471: Bacterial Reverse Mutation Test」(OECD : 2020 年 6 月 26 日)

である。

なお、Ames 試験は外部委託し、医薬品開発業務受託機関(CRO) が実施した。

2. プベルル酸の TGR 試験

プベルル酸の生体における遺伝子突然変異誘発能の有無について検討するため、遺伝子改変げっ歯類 (MutaMouse) を用い、標的器官におけるレポーター遺伝子 (*lacZ*) に対する遺伝子突然変異誘発性を検討した。被験物質 (国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部にて合成 : Lot no. 20240904、純度 98.5%) の溶媒には 0.5 w/v%メチルセルロース水溶液を用いた。用量設定試験には MutaMouse の親

動物である CD2F1 マウスを使用した。本試験の試験用量を設定するため、100 mg/kg/day を最高用量とし、公比約 3 で除した 30.0, 10.0 および 3.00 mg/kg/day の計 4 用量を設定し、CD2F1 マウスの雌雄に、1 日 1 回、14 日間反復強制経口投与した。

用量設定試験結果から顕著な性差は認められなかったものの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 病理部で実施したラットを用いた 28 日間反復投与試験において、腎毒性に明確な性差が確認されていた。そのため本試験においては雌のみを使用することとし、用量設定試験結果から最大耐量付近と考えられる 5.00 mg/kg/day を最高用量として以下、2.50、1.25 および 0.625 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。各群雌 6 匹 (2.50 mg/kg/day 群のみ 8 匹) に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与した。1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day の 3 用量の腺胃および腎臓について、*lacZ* assay により遺伝子突然変異体頻度を算出した。

本試験の実施においては、下記二つのガイドラインを参考とし、外部委託によって CRO が実施した。

- ・「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)

- ・ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 488 (30 June 2022: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

C. 研究結果及び考察

1. プベルル酸の Ames 試験

本試験の試験用量を設定するため 5000、1250、313、78.1、19.5、4.88 及び 1.22 µg/plate で用量設定試験を実施した。用量設

定試験の結果、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 5000 µg/plate の用量で認められた。本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。無菌試験では、最高用量の被験液及び S9 Mix に雑菌の生育は認められなかった。用量設定試験の結果に基づき本試験の用量は、代謝活性化の有無にかかわらず *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *E. coli* WP2 *uvrA* においては、復帰変異コロニー数の増加が認められたため、本試験では最大比活性化が得られるよう代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 においては 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313、156、78.1 及び 39.1 µg/plate の計 8 用量、代謝活性化しない場合の TA98、TA100 及び代謝活性化する場合のすべての菌株においては 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量の被験物質処理用量を設定した。代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* においては、復帰変異コロニー数の増加が認められるものの陰性対照値の 2 倍以上の増加は認められなかったため、生育阻害の認められた最低用量の 5000 µg/plate を最高用量として以下公比 2 で除した 2500、1250、625、313 及び 156 µg/plate の計 6 用量の被験物質処理用

量を設定した（表 1）。

本試験における本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの 用量においても認められなかった。菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び TA1537 の 1250 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 5000 µg/plate の用量で認められた。本被験物質による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。無菌試験では、最高用量の被験液及び S9 Mix に雑菌の生育は認められなかった（表 2）。

2. プベルル酸の TGR 試験

2-1. 用量設定試験結果および本試験における一般状態

用量設定試験の結果、雌雄の 100 mg/kg/day 群では Day 3 もしくは Day 4、雌雄の 30.0 mg/kg/day 群では、Day 7 もしくは Day 8 に全例の死亡もしくは瀕死が認められた。これらの死亡もしくは瀕死個体では、自発運動低下、腹臥位、呼吸不整、体温低下もしくは顕著な体重減少が認められた。10.0 mg/kg/day 群では、雌性の 1 例において、痩せが認められ、雌雄の全例において、顕著な体重減少が認められた。3.00 mg/kg/day 群では、雌雄ともに一般状態の変化および顕著な体重減少は認められなかった。Day 15 の剖検時、雌雄の 10.0 mg/kg/day 群において、腎臓の腫大、淡色化が認められた。3.00 mg/kg/day 群では、雌雄とも特筆すべき変化は認められなかった（表 3）。

本試験においては、いずれの被験物質投与

群においても一般状態および体重推移に変化は認められなかった(表 4)。剖検時、5.00 mg/kg/day 群の 1/6 例において、腎臓の淡色化が認められた。その他の投与群においては特筆すべき変化は認められなかった。すべての投与群において、評価数 5 匹を確保することができたため、腺胃および腎臓からゲノム DNA を抽出し、1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day の 3 用量について、*lacZ* assay による遺伝子突然変異頻度体評価対象とした。

2-2. 腺胃における *lacZ* assay 結果

結果を表 5 に示す。陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $26.8 \pm 5.3 (\times 10^{-6})$ であった。プベルル酸投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day 群で、それぞれ $32.7 \pm 7.6 (\times 10^{-6})$ 、 $32.5 \pm 7.0 (\times 10^{-6})$ および $35.5 \pm 14.6 (\times 10^{-6})$ であり、陰性対照群と比較し統計学的に有意な差は認められなかった。また陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $472.3 \pm 71.8 (\times 10^{-6})$ であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

2-3. 腎臓における *lacZ* assay 結果

結果を表 6 に示す。陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は、 $30.0 \pm 7.5 (\times 10^{-6})$ であった。プベルル酸投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は、1.25、2.50 および 5.00 mg/kg/day 群で、それぞれ $35.0 \pm 11.8 (\times 10^{-6})$ 、 $48.8 \pm 37.0 (\times 10^{-6})$ および $38.1 \pm 10.1 (\times 10^{-6})$ であり、陰性対照群と比較し統計学的に有意な差は認められなかった。動物番号 3303 における突然変異体頻度は、 114.5×10^{-6} と高値を示したが、他の動物では突然変異体頻度の増加傾向は認められなかった。陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は、 $127.1 \pm 41.3 (\times 10^{-6})$ であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

D. 結論

1. プベルル酸の Ames 試験

用量設定試験及び本試験共に、本被験物質は、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株においても復帰変異コロニー数の増加が認められ、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* を除く菌株において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は認められた。なお、最大比活性値は、用量設定試験の代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100 の $1250 \mu\text{g}/\text{plate}$ における 2.78×10^2 (Revertant/mg) であった。一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下においてプベルル酸は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する(陽性)と判定した(表 1, 2)。

2. プベルル酸の TGR 試験

プベルル酸の生体における遺伝子突然変異誘発能の有無について検討するため、遺伝子改変げっ歯類(MutaMouse)を用い、標的器官での遺伝子突然変異誘発性を評価した。5.00、2.50 および 1.25 mg/kg/day の 3 用量の腺胃および腎臓について、*lacZ* assay による遺伝子突然変異体頻度を算出した。その結果、プベルル酸投与群の腺胃および腎臓のいずれにおいても陰性対照群と比較して遺伝子突然変異体頻度の統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照の ENU 投与群では、腺胃および腎臓ともに陰性対照群と比較して統計学的に有意な遺伝子突然変異体頻度の増加が認められたことから、当該試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、当該試験条件下において、
プベルル酸はトランスジェニックマウスの腺
胃および腎臓に対して遺伝子突然変異誘発性
を示さないもの（陰性）と判定された。

E. 参考文献

該当無し

F. 研究業績

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

表 1 Ames 用量設定試験結果

被験物質の名称： プベルル酸 (CAS RN 99-23-0)

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μ g/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	118 117 (118)	7 7 (7)	30 28 (29)	19 22 (21)	10 7 (9)	
	1.22	130 110 (120)	10 3 (7)	28 32 (30)	22 19 (21)	8 5 (7)	
	4.88	102 105 (104)	9 8 (9)	36 34 (35)	22 24 (23)	5 13 (9)	
	19.5	106 127 (117)	11 7 (9)	32 31 (32)	15 18 (17)	6 6 (6)	
	78.1	128 119 (124)	15 10 (13)	27 30 (29)	36 35 (36)	15 8 (12)	
	313	196 179 (188)	28 22 (25)	32 27 (30)	52 26 (39)	13 17 (15)	
	1250	453 479 (466)	60 * 49 * (55)	50 48 (49)	63 79 (71)	35 * 26 * (31)	
	5000	462 * 549 * (506)	10 * 21 * (16)	5 * 2 * (4)	202 * 233 * (218)	50 * 41 * (46)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	122 129 (126)	9 14 (12)	23 27 (25)	26 31 (29)	13 6 (10)
		1.22	150 142 (146)	7 5 (6)	25 28 (27)	24 32 (28)	10 13 (12)
4.88		152 129 (141)	5 5 (5)	39 20 (30)	24 34 (29)	7 5 (6)	
19.5		134 149 (142)	10 13 (12)	27 26 (27)	20 35 (28)	5 6 (6)	
78.1		153 163 (158)	14 11 (13)	33 24 (29)	35 33 (34)	14 9 (12)	
313		187 175 (181)	19 16 (18)	27 33 (30)	28 33 (31)	13 9 (11)	
1250		294 329 (312)	56 78 (67)	43 58 (51)	30 30 (30)	11 8 (10)	
5000		548 * 453 * (501)	27 * 19 * (23)	8 * 7 * (8)	121 * 109 * (115)	55 * 42 * (49)	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 (μ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	710 693 (702)	211 206 (209)	101 133 (117)	479 500 (490)	1417 1444 (1431)	
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
	用量 (μ g/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニー数/プレート	1171 1231 (1201)	245 233 (239)	710 667 (689)	293 290 (292)	96 67 (82)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
 SAZ : アジ化ナトリウム
 ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
 2AA : 2-アミノアントラセン
 B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 ()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

表 2 Ames 本試験結果

被験物質の名称： プベール酸 (CAS RN 99-23-0)

代謝活性化系の有無	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)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	139 152 (146)	9 10 (10)	27 29 (28)	16 24 (20)	10 8 (9)
	39.1	NT	10 9 (10)	NT	NT	14 10 (12)
	78.1	NT	17 14 (16)	NT	NT	5 10 (8)
	156	180 202 (191)	13 22 (18)	21 23 (22)	23 27 (25)	6 8 (7)
	313	202 216 (209)	34 20 (27)	39 27 (33)	28 40 (34)	9 11 (10)
	625	269 305 (287)	39 42 (41)	27 32 (30)	43 54 (49)	8 13 (11)
	1250	456 452 (454)	59 * 66 * (63)	34 28 (31)	78 67 (73)	34 * 32 * (33)
	2500	643 698 (671)	75 * 91 * (83)	54 37 (46)	120 126 (123)	51 * 41 * (46)
	5000	370 * 578 * (474)	18 * 6 * (12)	6 * 1 * (4)	245 * 238 * (242)	50 * 51 * (51)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	162 147 (155)	9 12 (11)	31 29 (30)	28 31 (30)
156		176 179 (178)	18 22 (20)	35 36 (36)	33 32 (33)	8 8 (8)
313		169 160 (165)	34 42 (38)	42 42 (42)	28 32 (30)	4 9 (7)
625		216 223 (220)	43 51 (47)	42 38 (40)	25 42 (34)	11 8 (10)
1250		299 344 (322)	76 91 (84)	53 67 (60)	31 43 (37)	11 17 (14)
2500		457 524 (491)	96 116 (106)	53 54 (54)	63 64 (64)	22 25 (24)
5000		447 * 498 * (473)	101 * 68 * (85)	5 * 0 * (3)	119 * 146 * (133)	54 * 44 * (49)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	576 557 (567)	267 295 (281)	86 98 (92)	461 461 (461)	1506 1628 (1567)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1048 1245 (1147)	222 207 (215)	736 779 (758)	300 300 (300)	78 84 (81)

(備考)

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- SAZ : アジ化ナトリウム
- ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
- 2AA : 2-アミノアントラセン
- B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

表 3 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験のための用量設定試験における臨床症状

Sex: Male	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																			
		1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10
		BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF
3.00 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-
	Prone position	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
100 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Normal	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hypothermia	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dead	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Moribund	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sex: Male	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																			
		11	11	12	12	13	13	14	14	15											
		BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BC											
3.00 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3											
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3												
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	3											
10.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3											
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3											
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	3											
30.0 mg/kg/day	Animals Examined	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Prone position	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
100 mg/kg/day	Animals Examined	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Hypothermia	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-											

Values = Specific Number of Animals Affected
 .=Not Present
 BF: Before administration
 AF: After administration
 BC: Before carrying out

Sex: Female	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																			
		1 BF	1 AF	2 BF	2 AF	3 BF	3 AF	4 BF	4 AF	5 BF	5 AF	6 BF	6 AF	7 BF	7 AF	8 BF	8 AF	9 BF	9 AF	10 BF	10 AF
3.00 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Emaciation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	Prone position	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
100 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Normal	3	3	3	3	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Prone position	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Irregular respiration	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dead	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Moribund	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sex: Female	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date												
		11 BF	11 AF	12 BF	12 AF	13 BF	13 AF	14 BF	14 AF	15 BC				
3.00 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
	Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	3				
10.0 mg/kg/day	Animals Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
	Normal	3	3	3	3	3	3	2	2	2				
	Emaciation	-	-	-	-	-	-	1	1	1				
	Sacrificed	-	-	-	-	-	-	-	-	3				
30.0 mg/kg/day	Animals Examined	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Prone position	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
100 mg/kg/day	Animals Examined	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Normal	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Prone position	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Dead	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Values = Specific Number of Animals Affected
 .=Not Present
 BF: Before administration
 AF: After administration
 BC: Before carrying out

表 4 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験の本試験における臨床症状

Sex: Female	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																			
		1 BF	1 AF	2 BF	2 AF	3 BF	3 AF	4 BF	4 AF	5 BF	5 AF	6 BF	6 AF	7 BF	7 AF	8 BF	8 AF	9 BF	9 AF	10 BF	10 AF
NC 0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed
0.625 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed
1.25 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed
2.50 mg/kg/day	Animals Examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Normal	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Sacrificed
5.00 mg/kg /day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed

Sex: Female	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																			
		11 BF	11 AF	12 BF	12 AF	13 BF	13 AF	14 BF	14 AF	15 BF	15 AF	16 BF	16 AF	17 BF	17 AF	18 BF	18 AF	19 BF	19 AF	20 BF	20 AF
NC 0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed
0.625 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed
1.25 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed
2.50 mg/kg/day	Animals Examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Normal	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Sacrificed
5.00 mg/kg /day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed

Sex: Female	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date																		
		21 BF	21 AF	22 BF	22 AF	23 BF	23 AF	24 BF	24 AF	25 BF	25 AF	26 BF	26 AF	27 BF	27 AF	28 BF	28 AF	29 MP	30 MP	31 MP
NC 0 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed	6
0.625 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed	6
1.25 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed	6
2.50 mg/kg/day	Animals Examined	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Normal	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Sacrificed	8
5.00 mg/kg /day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed	6

Sex: Female	Observation Type: All Types	Day(s) Relative to Start Date														
		1 BF	2 BF	2 AF	3 BF	3 AF	4 MP	5 MP	6 MP	7 MP	8 MP	9 MP	10 MP	11 MP	12 MP	13 MP
PC 100 mg/kg/day	Animals Examined	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Sacrificed	6

Values = Specific Number of Animals Affected
 .=Not Present
 PC: Positive Control
 BF: Before administration
 AF: After administration
 MP: Manifestation period

表 5 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験の腺胃における *lacZ assay* 結果

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
0.5% MC	0	3001	330,300	1	7	21.2	26.8 \pm 5.3
		3002	591,300	1	18	30.4	
		3003	807,300	1	18	22.3	
		3004	607,500	1	16	26.3	
		3005	856,800	1	29	33.8	
Puberulic acid	1.25	3201	728,100	1	24	33.0	32.7 \pm 7.6
		3202	1,125,000	1	44	39.1	
		3203	655,200	1	16	24.4	
		3204	1,124,100	1	29	25.8	
		3205	1,280,700	1	53	41.4	
	2.50	3301	1,297,800	1	47	36.2	32.5 \pm 7.0
		3302	634,500	1	15	23.6	
		3303	710,100	1	19	26.8	
		3304	544,500	1	22	40.4	
		3305	706,500	1	25	35.4	
	5.00	3401	1,743,300	1	52	29.8	35.5 \pm 14.6
		3402	1,804,500	1	103	57.1	
		3403	856,800	1	32	37.3	
		3404	657,900	1	11	16.7	
		3405	899,100	1	33	36.7	
ENU	100	3501	1,057,500	1	463	437.8	472.3 \pm 71.8 *(AW)
		3502	1,262,700	1	694	549.6	
		3503	1,284,300	1	662	515.5	
		3504	353,700	1	174	491.9	
		3505	608,400	1	223	366.5	

0.5% MC: Negative control (0.5 w/v% Methylcellulose solution, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

(AW): Aspin-Welch's *t* test

表 6 MutaMouse を用いた遺伝子突然変異試験の腎臓における *lacZ assay* 結果

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Number of plaque forming units	Number of packagings	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Group Mean \pm S.D. ($\times 10^{-6}$)
0.5% MC	0	3001	784,800	1	15	19.1	30.0 \pm 7.5
		3002	1,080,900	1	35	32.4	
		3003	1,199,700	1	46	38.3	
		3004	994,500	1	34	34.2	
		3005	954,900	1	25	26.2	
Puberulic acid	1.25	3201	1,162,800	1	24	20.6	35.0 \pm 11.8
		3202	1,493,100	1	49	32.8	
		3203	1,147,500	1	46	40.1	
		3204	2,002,500	1	59	29.5	
		3205	1,540,800	1	80	51.9	
	2.50	3301	1,746,000	1	67	38.4	48.8 \pm 37.0
		3302	1,369,800	1	47	34.3	
		3303	1,292,400	1	148	114.5	
		3304	681,300	1	18	26.4	
		3305	1,113,300	1	34	30.5	
	5.00	3401	906,300	1	24	26.5	38.1 \pm 10.1
		3402	1,187,100	1	40	33.7	
		3403	1,076,400	1	57	53.0	
		3404	963,000	1	41	42.6	
		3405	1,345,500	1	47	34.9	
ENU	100	3501	1,100,700	1	136	123.6	127.1 \pm 41.3 *(AW)
		3502	1,359,000	1	267	196.5	
		3503	1,426,500	1	159	111.5	
		3504	1,111,500	1	131	117.9	
		3505	730,800	1	63	86.2	

0.5% MC: Negative control (0.5 w/v% Methylcellulose solution, 10 mL/kg)

ENU: Positive control (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 10 mL/kg, i.p., dose once a day, for 2 days, expression period; 10 days)

*: Significant difference from negative control ($p \leq 0.05$)

(AW): Aspin-Welch's *t* test