

Exp. No. [REDACTED]

FINAL REPORT

# 試験報告書

トランスジェニックマウスを用いるラズベリーケトンの遺伝子突然変異試験

【GLP 非適用】

試験番号: [REDACTED]

[REDACTED]

試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

[REDACTED]

試験責任者の署名および日付

表 題： トランスジェニックマウスを用いるラズベリーケトンの遺伝子突然変異試験

試験番号：

試験責任者：

## 目 次

要 約	5
1. 表題	6
2. 試験目的	6
3. 参照したガイドライン	6
4. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則	6
5. 試験番号	6
6. 試験施設	6
7. 試験委託者	7
8. 試験責任者	7
9. 分担責任者	7
10. 試験日程	7
11. 被験物質	8
12. 対照物質	9
13. 試験材料および方法	10
14. 試験成立条件	22
15. 試験結果	22
16. 考察および結論	24
17. 試験関係資料の保管	24

## Tables

Table 1	Mortality in dose-finding study of raspberry keton [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]	25
Table 2	Mortality in dose-finding study of raspberry keton [Female mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]	26
Table 3	Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with raspberry keton [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	27
Table 4	Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with raspberry keton [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]	28

Appendices

Appendix 1 Body weight in dose-finding study of raspberry keton  
[Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....29

Appendix 2 Body weight in dose-finding study of raspberry keton  
[Female mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....30

Appendix 3 Clinical observations in dose-finding study of raspberry keton  
[Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....31

Appendix 4 Clinical observations in dose-finding study of raspberry keton  
[Female mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)].....32

Appendix 5 Body weight in the gene mutation assay of raspberry keton  
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....33

Appendix 6 Clinical observations in the gene mutation assay of raspberry keton  
[Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)].....35

Appendix 7 Individual gross findings on raspberry keton-treated transgenic mice for the gene mutation assay [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)] .....40

## 要 約

ラズベリーケトンの変異原性について、トランスジェニックマウス (Muta<sup>TM</sup>mouse) を用いて肝臓および胃 (腺胃) における遺伝子突然変異誘発性 (レポーター遺伝子: *lacZ*) を検討した。

用量設定試験の結果を基にガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし、500, 250 および 125 mg/kg/day の用量で各群雄 6 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 日に生存動物全例から肝臓および腺胃を摘出した。1000 mg/kg/day 群において 1 例の死亡が認められたが、評価数 5 匹を確保することができたため、1000, 500 および 250 mg/kg/day の 3 用量の肝臓および腺胃について、*lacZ* assay により遺伝子突然変異頻度を求めた。

その結果、ラズベリーケトン投与群の肝臓および腺胃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) 投与群では、肝臓および腺胃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、ラズベリーケトンはトランスジェニックマウスの肝臓および腺胃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。

## 1. 表題

トランスジェニックマウスを用いるラズベリーケトンの遺伝子突然変異試験

## 2. 試験目的

被験物質による標的器官での遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討する (レポーター遺伝子: *lacZ*).

## 3. 参照したガイドライン

- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 488 (26 July 2013: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays)

## 4. 遵守した動物実験関連規則および遺伝子組換え生物等関連規則

当該試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号, 最終改正:平成25年6月12日法律第38号), 「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」(平成18年4月28日環境省告示第88号, 最終改正:平成25年8月30日環境省告示第84号) および「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, 最終改正:平成26年6月13日法律第67号) を遵守して実施した。当該試験は [REDACTED] の動物実験委員会により試験開始前に審査, 承認されており (動物実験委員会承認番号 15-0200A, 遺伝子組換え実験承認受付番号 15-9), [REDACTED] 「動物実験に関する指針」(2014年6月2日) に記載された動物倫理評価基準に従って実施され, 遺伝子組換え生物等は適正に使用した。

## 5. 試験番号

[REDACTED]

## 6. 試験施設

[REDACTED]  
[REDACTED]

7. 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所

変異遺伝部

[Redacted]

8. 試験責任者

[Redacted]

9. 分担責任者

検疫：

飼育管理：

遺伝子突然変異試験：

投与液等調製：

病理学的検査：

[Redacted]

10. 試験日程

試験開始日：

【用量設定試験】

動物搬入日 (Day -6)：

群分け日 (Day 1)：

投与液調製日：

投与開始日 (Day 1, 実験開始日)：

投与終了日 (Day 7)：

観察終了日：

【遺伝子突然変異試験 (本試験)】

動物搬入日 (Day -7)：

投与液調製日：

群分け日 (Day 1)：

[Redacted]

《陰性対照群, 被験物質群》

投与開始日 (Day 1) :

投与終了日 (Day 28) :

標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 31) :

《陽性対照群》

投与日 (Day 2, Day 3) :

標的器官 (臓器) 摘出日 (Day 13) :

実験終了日 :

試験終了日 :

### 【Day の定義】

被験物質の投与開始日を Day 1 と定義し, その前日を Day -1 とした.

## 11. 被験物質

### 11.1. 名称

和名 : ラズベリーケトン

英名 : Raspberry keton

### 11.2. 別名 (化学名, 一般名等)

4-(*p*-hydroxyphenyl)-2-butanone

### 11.3. ロット番号

[REDACTED]

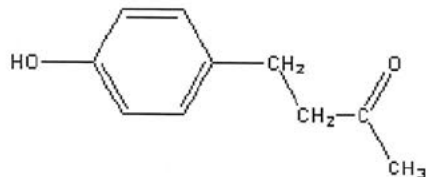
### 11.4. 提供元

[REDACTED]

### 11.5. CAS No.

5471-51-2

### 11.6. 構造式



### 11.7. 分子式

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

- 11.8. 分子量  
164.2
- 11.9. 純度  
99%以上
- 11.10. 融点  
82°C 以上
- 11.11. 物質の状態
- 11.11.1. 外観  
類白色の針状結晶
- 11.11.2. 臭い  
特有の香気を有する.
- 11.12. 溶媒に対する溶解度等  
水：不溶  
コーン油：100 mg/mL で良好に懸濁
- 11.13. 保証期限  
[REDACTED]
- 11.14. 保管条件  
遮光, 25°C 以下で保管
- 11.15. 取り扱い上の注意  
マスク, 手袋, 保護メガネを着用する.
- 11.16. 残余被験物質の処理  
試験終了後, 残余被験物質は, 専用の容器 (安全廃棄システム, NALGENE®) に廃棄する.
12. 対照物質
- 12.1. 陰性対照物質  
被験物質液調製に媒体として使用するコーン油を陰性対照物質に選択した.
- 12.1.1. 物質名  
コーン油

12.1.2. 製造元  
和光純薬工業株式会社

12.1.3. 保管条件  
室温

## 12.2. 陽性対照物質

ガイドラインで推奨されている、下記の物質を陽性対照物質に選択した。

12.2.1. 物質名  
N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU)

12.2.2. 製造元  
Toronto Research Chemicals Inc.

12.2.3. 保管条件  
冷凍 (-30~-5°C)

## 13. 試験材料および方法

本試験では、使用する動物がトランスジェニックマウスであることから、本試験では、PIA レベルの拡散防止処置をとった。

### 13.1. 試験動物

13.1.1. 種  
用量設定試験：マウス  
本試験：マウス (Muta<sup>TM</sup>Mouse：トランスジェニックマウス)

13.1.2. 系統 [グレード]  
用量設定試験：CD2F1 (BALB/C×DBA/2) [SPF]  
本試験：CD<sub>2</sub>-LacZ80/HazfBR (Muta<sup>TM</sup>Mouse) [SPF]

13.1.3. 生産者  
用量設定試験：日本エスエルシー株式会社  
本試験：株式会社日本医科学動物資材研究所

13.1.4. 試験系の選択理由  
用量設定試験：本試験の親動物である本系統のマウスを選択した。  
本試験：遺伝子導入マウス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マウスを選択した。

## 13.1.5. 週齢

8 週齢の動物を購入し、被験物質の投与は 9 週齢に開始した。

## 13.1.6. 購入動物数

用量設定試験：雌雄各 14 匹

本試験：雄 36 匹

## 13.1.7. 使用動物数

用量設定試験：雌雄各 12 匹

本試験：雄 36 匹

## 13.2. 飼育管理

## 13.2.1. 飼育環境

バリアシステムの [REDACTED] (W 4.8 × D 10.3 × H 2.6 m) で動物を飼育した。環境調節の基準値は、次のとおりとした。なお、本試験では、飼育期間中、出入り口にネズミ返しを設置した。

温度 20～26℃

湿度 35～70%RH

換気回数 12 回以上/h

照明 12 時間 (7 時点灯, 19 時消灯)

エコケージ (W 18.2 × D 26.0 × H 12.8 cm) に床敷き (ALPHA-dri™, Shepherd Specialty Papers) を入れ、動物を 1～3 匹ずつ収容した。飼育ケージおよび給餌器は、群分け時および週 1 回、給水瓶は 2, 3 日に 1 回の頻度で交換した。床敷き中の汚染物質に関する分析証明書を製造元から入手しその値が日本実験動物飼料協会/コンタミナント分析基準案の許容基準値内であることを確認した。

## 13.2.2. 飼料

放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業) を自由に摂取させた。

使用した飼料中の汚染物質に関する分析成績書を製造元から入手し、分析値が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることを確認した。

餌の補給は、ケージ交換と同時に行った。

## 13.2.3. 給水

水道水を給水瓶から自由に摂取させた。

水道法に基づく水質検査を 6 ヶ月に 1 回、外部機関で行い、検査結果が上水道水質基準の基準値内であることを確認した。また、水質検査を実施しない月には、[REDACTED] で細菌検査 (一般細菌および大腸菌検査) を実施し、細菌が検出されていないことを確

認した。

### 13.3. 検疫・馴化

搬入後、動物の一般状態および体重推移を観察した。Day -6~1（用量設定試験）またはDay -7~1（本試験）の間動物を検疫・馴化させ、この間一般状態を1日1回以上（土、日曜日および祝日は除く）観察した。体重を搬入時および検疫・馴化期間終了時（Day 1）に測定した。

一般状態もしくは体重推移により試験に用いることが不適切と判断された動物は、認められなかった。

### 13.4. 群分け

群分けは、Day 1に行った。

動物を直前に測定した体重によって層別化し、無作為割り付け法により各試験群を構成するように割り付けた。

試験に用いる動物の体重範囲は、雌雄それぞれの平均体重 $\pm 20\%$ 以内とした。

群分けにより除外された動物は、試験系から除外し、余剰動物とした。

### 13.5. 個体識別

動物入荷時に雌雄別に通し番号（仮動物番号）を付し、仮動物番号カードを飼育ケージに掲示して識別した。用量設定試験では、動物の尾部にその仮動物番号を油性インク（雄：黒、雌：赤）で記入した。本試験では、動物の耳介に仮動物番号が刻印されたタグ（ら・ピアス、サイテック）を装着した。

群分け時、仮動物番号と動物番号とが記載された動物識別番号カード（ID カード）を飼育ケージに掲示し、動物を識別した。

### 13.6. 余剰動物の取り扱い

群分け後、動物管理部門に移管した。

### 13.7. ゲノム DNA 抽出試薬の調製

使用量に応じて調製量を変更した。

#### 13.7.1. ダウンス緩衝液

約 1600 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた。

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.0 g
NaCl	0.50 g
KCl	0.40 g
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]（ニッポンジーン）	40 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、超純水を用いて 2000 mL に定容した。オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌し、室温保管した。

13.7.2. RNase 含有ダウンス緩衝液

ダウンス緩衝液 100 mL に対し RNase 溶液 (RNase A 10 mg/mL, ニッポンジーン) を 2.0 mL の割合で添加し混合した。用時調製した。

13.7.3. 0.5 mol/L ショ糖溶液

以下の割合で試薬を調製した。

ショ糖 (MW = 342.30) 17.1 g を約 80 mL のダウンス緩衝液に溶解し、ダウンス緩衝液を用いて 100 mL に定容した。フィルター (孔径 0.20~0.22  $\mu\text{m}$ ) をろ過除菌後、冷蔵保管した。

13.7.4. 組織破碎用緩衝液

以下の試薬を混合した。

ダウンス緩衝液	74.97	mL
0.5 mol/L ショ糖溶液	74.97	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 8.0]	16.66	mL
RNase 溶液 (RNase A 10 mg/mL)	3.332	mL

用時調製した。

13.7.5. 10 w/v% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液

SDS (和光純薬工業) 20 g を約 160 mL の遺伝子工学研究用滅菌水 (ニッポンジーン) に溶解し、遺伝子工学研究用滅菌水を用いて 200 mL に定容した。フィルター (孔径 0.20  $\mu\text{m}$ ) をろ過除菌後、室温保管した。

13.7.6. プロテナーゼ K 溶液

以下の試薬を混合した。

プロテナーゼ K (和光純薬工業)	340	mg
遺伝子工学研究用滅菌水	102	mL
10 w/v% SDS 溶液	34	mL
0.5 mol/L EDTA [pH 7.5] <sup>注1)</sup>	34	mL

注1) 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 に調整した後に使用した。

用時調製した。

## 13.7.7. フェノール/クロロホルム (Ph/Cl) 混液

以下の試薬を混合した.

クロロホルム (関東化学)	350	mL
TE 飽和フェノール (ニッポンジーン)	350	mL

用時調製した.

## 13.7.8. クロロホルム/イソアミルアルコール混液

以下の試薬を混合した.

クロロホルム (関東化学)	336	mL
イソアミルアルコール (和光純薬工業)	14	mL

用時調製した.

## 13.8. 培地および培養液等の調製

使用量に応じて調製量を変更した.

## 13.8.1. LB 培養液

以下の割合で試薬を混合した.

Bacto tryptone (Becton, Dickinson and Company)	10	g
Bacto yeast extract (Becton, Dickinson and Company)	5	g
NaCl	5	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 冷蔵保管した.

## 13.8.2. 200 mg/mL マルトース水溶液

マルトース一水和物 (和光純薬工業) 21.1 g を約 80 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 100 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20 μm) をろ過除菌後, 冷蔵保管した.

## 13.8.3. 1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液

硫酸マグネシウム七水和物 123 g を約 400 mL の超純水に溶解し, 超純水を用いて 500 mL に定容した. オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温保管した.

## 13.8.4. LB 寒天培地

以下の割合で試薬を混合した.

Bacto tryptone	10	g
Bacto yeast extract	5	g
NaCl	5	g
バクトアガー (Becton, Dickinson and Company)	15	g

超純水 1000 mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, シャーレ (直径 150 mm) に 20 mL ずつ分注した. 分注後のプレートは, 室温保管した.

13.8.5. 20 mg/mL カナマイシン水溶液

カナマイシン硫酸塩 (和光純薬工業) 96 mg を適量の超純水に溶解し, 超純水を用いて 4 mL に定容した. フィルター (孔径 0.20  $\mu$ m) をろ過除菌後, 冷凍保管した.

13.8.6. LB トップアガー

以下の割合で試薬を混合した.

Bacto tryptone	10	g
Bacto yeast extract	5	g
NaCl	5	g
バクトアガー	7	g
超純水	1000	mL

オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 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.

13.8.7. SM 緩衝液

約 800 mL の超純水に下記の試薬を溶解させた.

NaCl	5.84	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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

超純水を用いて 1000 mL に定容し, オートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌した後, 室温保管した.

13.8.8. P-gal 溶液

以下の試薬を混合した.

Phenyl $\beta$ -D-galactoside [P-gal]	5700	mg
ジメチルスルホキシド [DMSO] (和光純薬工業)	19	mL

用時調製した.

### 13.9. 被験物質液等

#### 13.9.1. 被験物質液等の調製

被験物質をコーン油に懸濁させた。

用量設定試験では、被験物質 4.0 g を量り、メノウの乳鉢に移した。被験物質を乳鉢、乳棒を用いて十分に粉碎した後、媒体を少しずつ添加し混合した。懸濁液をメスシリンダーに移した後、乳鉢に残った被験物質を少量の媒体で洗い、メスシリンダーに移した。さらに、媒体を加えて 40 mL に定容し、100 mg/mL 調製原液を調製した。この 100 mg/mL 調製原液 20 mL を媒体を用いて 40 mL に定容することにより、50.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、25.0 および 12.5 mg/mL 液を調製した。各被験物質液を各投与用に小分け（7 日分および予備 1 本）し、投与日まで冷蔵で保管した。

本試験では、被験物質 6.0 g を量り、メノウの乳鉢に移した。被験物質を乳鉢、乳棒を用いて十分に粉碎した後、媒体を少しずつ添加し混合した。懸濁液をメスシリンダーに移した後、乳鉢に残った被験物質を少量の媒体で洗い、メスシリンダーに移した。さらに、媒体を加えて 60 mL に定容し、100 mg/mL 調製原液を調製した。この 100 mg/mL 調製原液 25 mL を媒体を用いて 50 mL に定容することにより、50.0 mg/mL 液を調製した。以下同様に希釈を行い、25.0 および 12.5 mg/mL 液を調製した。各被験物質液を各投与用に小分け（それぞれ 7 日分および予備 1 本）し、投与日まで冷蔵で保管した。

#### 13.9.2. 被験物質液の安定性（試験施設データ）

被験物質液（1 および 100 mg/mL、媒体：コーン油）中のラズベリーケトンの安定性は、冷蔵の条件で 8 日間保管後、さらに室温、散光の条件下で 24 時間安定であることが確認されている。

#### 13.9.3. 残余被験物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム、NALGENE®）に廃棄した。

#### 13.9.4. 陽性対照物質液の調製

ENU 50 mg を量り、目盛り付試験管に移した後、1/15 M リン酸緩衝液（pH 6）を加えて 5 mL に定容し、10 mg/mL 液を準備した。陽性対照物質液は、用時調製した。

#### 13.9.5. 残余陽性対照物質液の処分

専用の容器（安全廃棄システム、NALGENE®）に廃棄した。

### 13.10. 対照群

#### 13.10.1. 陰性対照群

被験物質液調製に用いる媒体であるコーン油を使用した。

## 13.10.2. 陽性対照群

ENU を使用し、用量は 100 mg/kg とした。

## 13.11. 用量設定試験（予備試験）

## 13.11.1. 試験群の構成

用量 (mg/kg/day)	投与液 の濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
125	12.5	10	雄	3	1101～1103
250	25.0	10	雄	3	1201～1203
500	50.0	10	雄	3	1301～1303
1000	100	10	雄	3	1401～1403
125	12.5	10	雌	3	2101～2103
250	25.0	10	雌	3	2201～2203
500	50.0	10	雌	3	2301～2303
1000	100	10	雌	3	2401～2403

## 13.11.2. 用量設定理由

ガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とした 4 用量を設定した。

## 13.11.3. 投与方法および投与回数

被験物質の投与経路は、ヒトへの暴露経路と考えられる経口とし、プラスチック製注射筒とテフロン製胃ゾンデを用いて 1 日 1 回、およそ 24 時間間隔で 7 日間連続強制投与した。投与容量は体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、群分け時の体重から投与液量 (mL) を求めた。

## 13.11.4. 体重測定および一般状態観察

動物搬入時、検疫期間終了時（群分け時）および最終投与後 1 日に体重を測定した。

初回投与日から最終投与後 1 日まで最低 1 日 1 回、動物の一般状態を観察した。各用量の最終投与後 1 日での死亡率を求めた。

観察終了後、生存動物は炭酸ガスを用いて速やかに安楽死させた。

13.12. トランスジェニックマウスを用いる遺伝子突然変異試験 (TGR, 本試験)

13.12.1. 試験群の構成

用量 (mg/kg/day)	投与液 の濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
0*	0	10	雄	6	3001~3006
125	12.5	10	雄	6	3101~3106
250	25.0	10	雄	6	3201~3206
500	50.0	10	雄	6	3301~3306
1000	100	10	雄	6	3401~3406
100**	10	10	雄	6	3501~3506

\* : 陰性対照 (媒体のみを投与する.)    \*\* : 陽性対照 (ENU)

13.12.2. 用量設定根拠

用量設定試験の結果, 雄では, 1000 mg/kg/day 群で投与2日目の投与後に腹臥位, 歩行異常 (1/3 例), 投与3日目の投与後に歩行異常 (1/3 例), 投与7日目の投与後に流涙 (1/3 例) がそれぞれ認められた. 雌では, 1000 mg/kg/day 群で投与3日目の投与後に歩行異常 (1/3 例), 投与6日目の投与後に歩行異常 (1/3 例) がそれぞれ認められた. 500 mg/kg/day 以下の用量では, 雌雄ともに一般状態に変化は認められなかった. したがって, ガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし, 500, 250 および 125 mg/kg/day の計4用量を設定した. また, 用量設定試験の結果, 明確な性差が認められなかったため, 本試験では, 雄のみを使用した.

13.12.3. 投与動物数

評価数5匹を確保するため, いずれの試験群とも6匹に投与した. 1000 mg/kg/day 群において1例の死亡が認められたが, 評価数5匹を確保することができたため, 1000, 500 および 250 mg/kg/day の3群を評価に使用した. なお, 500 および 250 mg/kg/day 群では, 動物番号の小さい順に5匹を評価に使用した. 評価に使用しない動物については, 13.12.7.に記載する各器官 (臓器) を摘出した後保管し, ゲノム DNA の抽出は行わなかった.

13.12.4. 投与方法および投与回数

媒体および被験物質の投与経路は, ヒトへの暴露経路と考えられる経口とした.

プラスチック製注射筒およびテフロン製胃ゾンデを用いて被験物質液を強制経口投与した.

投与容量は、体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、13.12.6.の項で測定する最新の体重に基づいて算出した。

ガイドラインに従い、1 日 1 回、28 日間連続投与を行った。

陽性対照物質の投与経路は、腹腔内投与とし、25G 注射針を装着したプラスチック製注射筒を用いて 1 日 1 回、2 日間腹腔内投与した。投与容量は、体重 10 g 当たり 0.1 mL とし、Day 1 の体重に基づいて算出した。

#### 13.12.5. 投与期間および発現期間

Day 1 から Day 28 までを投与期間、Day 29 から Day 31 までを発現期間とするとともに、Day 1～7 を Week 1、Day 8～14 を Week 2、Day 15～21 を Week 3、Day 22～28 を Week 4 とした。最終投与後 3 日 (Day 31) に器官を摘出した。陽性対照群については、Day 2 および 3 に投与し、最終投与後 10 日 (Day 13) に器官を摘出した。

#### 13.12.6. 体重測定および一般状態観察

Day 1 [群分け日 (投与開始日)], 8, 15, 22, 29 および 31 (器官摘出直前) に体重を測定した。陽性対照群については、Day 1 および 13 (器官摘出直前) に体重を測定した。また、死亡動物については、死亡発見時に体重を測定した。

器官摘出まで、1 日 1 回、動物の一般状態を観察した。陽性対照群については、群分け後、投与開始までも同様に 1 日 1 回、動物の一般状態を観察した。

#### 13.12.7. 器官 (臓器) 摘出、肉眼的観察および保管

炭酸ガスを用いて安楽死させた動物から肝臓および胃 (腺胃) を摘出し、これら器官の肉眼的観察を行った。各器官の摘出・保管は、以下の方法に従った。なお、解剖室の出入り口にはネズミ返しを設置した。

肝臓：外側左葉を生検トレパン (BP-50F, 貝印) を用いて 2 ヶ所程度くり抜いた。くり抜いた肝臓は、それぞれ別のマイクロチューブに入れ、液体窒素 (LN<sub>2</sub>) で凍結させた。残った左葉およびその他の葉は、ビニール袋に入れ、LN<sub>2</sub> 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。

胃：大弯側を切開した後、内容物を生理食塩液で洗い出した。前胃と腺胃に分割し、腺胃を保管袋に入れ、LN<sub>2</sub> で凍結させた。前胃は、廃棄した。

凍結後は超低温フリーザー (設定値：-80°C, 基準値：-90~-60°C) に保管した。すべての摘出器官 (臓器) は、最終報告書作成まで保管される。その後の保管については、試験委託者と [REDACTED] で協議し、別途定める。

## 13.12.8. 摘出器官の選択理由

肝臓：主要な代謝器官であり，被験物質が比較的高濃度で存在すると考えられるため。

胃：経口投与では初期に被験物質と接触する器官であるため。

## 13.12.9. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに組織破碎用緩衝液 (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 (組織破碎液)。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碎液を静かに重層し，3000 rpm (1710 G) で 10 分間遠心した。上清をスポイト等で除去後，冷却した RNase 含有ダウンス緩衝液 3 mL を加え，よく懸濁させた (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 を加えて静かに転倒混和し，約 2.5 時間 (懸濁液が透明になるまで) 50°C の条件で保温し，消化させた。等量 (約 6 mL) の Ph/Cl 混液を加え，数回転倒混和し，さらに 10 分間回転混和させた後，2500 rpm (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。回収した水相と等量の Ph/Cl 混液を加え，数回転倒混和し，さらに 10 分間回転混和させた後，2500 rpm で 10 分間遠心し，水相を回収した。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混液を加え，数回転倒混和し，さらに 10 分間回転混和させた後，2500 rpm (1190 G) で 10 分間遠心した。水相を回収し，50 mL 容の遠心管に移した。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%エタノールが入ったマイクロチューブに移し，およそ 10 分間浸した。次いで，13000 rpm (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。TE 緩衝液 (ニッポンジーン) 100  $\mu$ L を加え，一晚室温に放置し，残渣の DNA を溶解させた。溶解後は，冷蔵にて保管した。ゲノム DNA 溶液中の DNA 濃度を NanoDrop (AGC TECHNO GLASS) を用いて測定した。DNA 濃度が 100~600  $\mu$ g/mL 程度の濃度になるように，TE 緩衝液を用いて希釈した。

## 13.12.10. 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  $\mu$ L，アンピシリン溶液 (50 mg/mL) 30  $\mu$ L およびカナマイシン溶液 (20 mg/mL) 30  $\mu$ L を添加した。凍結保管 (設定値: -80°C) しておいた大腸菌 C 株 (*lacZ*<sup>-</sup>, *gal E*<sup>-</sup>) 懸濁液を融解した後，これに 50  $\mu$ L 接種した。37°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 および 200 mg/mL

マルトース水溶液 1 mL を添加し、次いで先の前培養液を 1 mL 植菌した後、同様に約 2.5 時間 (OD : 約 0.9) 培養を続けた。培養終了後、菌懸濁液を 10 分間遠心分離 (1000 rpm) した。10 mmol/L の硫酸マグネシウムを含む LB 培養液を用いて再懸濁した (大腸菌懸濁液)。

#### 13.12.11. ゲノム DNA を用いた *in vitro* パッケージング

Transpack (Stratagene) 製品添付の Instruction Manual に従ってパッケージングを実施した。Transpack のチューブ (RED) を解凍した。ゲノム DNA 溶液を約 10  $\mu$ L 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  $\mu$ L をチューブ (RED) に加え、同様に混合した。さらに、30°C の条件で 90 分間インキュベートした。各チューブに SM 緩衝液 700  $\mu$ L を加え、十分に攪拌した (パッケージング溶液)。パッケージング溶液は使用時まで、水中にて保管した。

#### 13.12.12. パッケージング溶液のプレーティング

大腸菌懸濁液を総ブランク算出用 (タイター用) に 1 mL、突然変異算出用 (セレクション用) に 2 mL、それぞれのチューブに分注しておいた。パッケージング溶液の全量 (およそ 700  $\mu$ L) をセレクション用チューブに加えた後 (およそ 2700  $\mu$ L になる) 攪拌し、室温に 30 分程度放置してファージを大腸菌に感染させた。本溶液 30  $\mu$ L を 10 mmol/L 硫酸マグネシウムを含む LB 培養液 270  $\mu$ L に加えて 10 倍希釈した。本希釈液 30  $\mu$ L をタイター用チューブに加え攪拌した。

タイター用トップアガーの場合は、LB トップアガー 100 容量に対して、1 mol/L 硫酸マグネシウム水溶液 2 容量を加えた。セレクション用トップアガーの場合は、LB トップアガー 100 容量に対して、P-gal 溶液 2 容量を加えた。

タイター用チューブに、タイター用トップアガー 17 mL を加え混和し、LB 寒天培地に全量を重層した。セレクション用チューブには、セレクション用トップアガー 16 mL を加え、タイター用と同様に LB 寒天培地に重層した。各プレートを 37°C の条件で一晩培養した。

なお、1 回のパッケージング操作で総ブランク数が 30 万に達した。

#### 13.12.13. 総ブランク数の算出

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。

$$\begin{aligned} \text{総ブランク数} &= \frac{N \times 300(\mu\text{L}) \times 2700(\mu\text{L})}{30(\mu\text{L}) \times 30(\mu\text{L})} \\ &= 900 \times N \end{aligned}$$

#### 13.12.14. 変異プラーク数の算出

セレクション用プレートに出現したプラーク数を計数した。出現したプラーク数を変異プラーク数とした。

#### 13.12.15. 突然変異頻度 (Mutant Frequency) の算出

出現した変異プラーク数を総プラーク数で除して、当該組織での突然変異頻度を求めた。

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

#### 13.13. データ処理

当該試験の磁気データは、コンピュータ・システム (LATOX-F/V5) を用いて記録し、処理した。

#### 13.14. 結果の解析

各被験物質投与群の突然変異頻度について、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散 (有意差が認められない) の場合は、Dunnett の多重比較検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定し、不等分散 (有意差が認められる) の場合は、Steel の検定で陰性対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した。

陰性対照群と陽性対照群での突然変異頻度の比較は、最初に F 検定を実施し、有意差が認められない場合は、Student の t 検定を実施した。F 検定で有意差が認められる場合は、Aspin-Welch の t 検定を実施した。

各検定の有意水準は両側 5% とした。

陰性対照群と比較し、被験物質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に、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。

#### 14. 試験成立条件

陽性対照群の肝臓における突然変異頻度において、陰性対照値と比較して統計学的に有意な増加が認められた場合に、試験は成立したと判断した。

#### 15. 試験結果

##### 15.1. 用量設定試験

結果を Table 1 および 2 ならびに Appendix 1~4 に示す。

ラズベリーケトン投与群の雄では、1000 mg/kg/day 群で投与 2 日目の投与後に腹臥位、歩行異常 (1/3 例)、投与 3 日目の投与後に歩行異常 (1/3 例)、投与 7 日目の投与後に流涙 (1/3 例) がそれぞれ認められた。雌では、1000 mg/kg/day 群で投与 3 日目の投与後

に歩行異常 (1/3 例), 投与 6 日目の投与後に歩行異常 (1/3 例) がそれぞれ認められた。  
500 mg/kg/day 以下の用量では, 雌雄ともに一般状態に変化は認められなかった。

## 15.2. トランスジェニックマウスを用いる遺伝子突然変異試験 (本試験)

### 15.2.1. *lacZ* assay (肝臓および腺胃)

#### 15.2.1.1. 肝臓

結果を Table 3 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は,  $47.6 \pm 15.4 (\times 10^{-6})$  であった。

ラズベリーケトン投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は, 250, 500 および 1000 mg/kg/day 群で, それぞれ  $48.2 \pm 8.9 (\times 10^{-6})$ ,  $66.9 \pm 13.3 (\times 10^{-6})$  および  $48.5 \pm 17.5 (\times 10^{-6})$  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。

陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は,  $193.1 \pm 38.3 (\times 10^{-6})$  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。

#### 15.2.1.2. 腺胃

結果を Table 4 に示す。

陰性対照群での突然変異体頻度の平均値±SD は,  $47.5 \pm 5.8 (\times 10^{-6})$  であった。

ラズベリーケトン投与群での突然変異体頻度の平均値±SD は, 250, 500 および 1000 mg/kg/day 群で, それぞれ  $49.5 \pm 7.7 (\times 10^{-6})$ ,  $35.7 \pm 14.1 (\times 10^{-6})$  および  $54.2 \pm 10.4 (\times 10^{-6})$  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。

陽性対照群における突然変異体頻度の平均値±SD は,  $552.2 \pm 108.3 (\times 10^{-6})$  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。

### 15.2.2. 一般状態観察および体重

結果を Appendix 5 および 6 に示す。

1000 mg/kg/day 群で投与 3 日目に 1 例の死亡が認められた。一般状態の変化は, 1000 mg/kg/day 群で腹臥位, 側臥位, 呼吸不整, 自発運動の減少, 歩行異常, 被毛の退色が認められた。被毛の退色については, 投与 15 日目以降 1/6 例で認められた。500 mg/kg/day 群では, 投与 25 日目以降に外傷 (2/6 例) が認められた。250 mg/kg/day 群以下の用量では, 一般状態に変化は認められなかった。

1000 mg/kg/day 群では, 第 1 週に陰性対照群と比較して体重の減少が認められた。

### 15.2.3. 解剖時の肉眼観察

結果を Appendix 7 に示す。

いずれの投与群においても被験物質の影響と考えられる肉眼的異常は認められなかった。

## 16. 考察および結論

ラズベリーケトンの肝臓および胃（腺胃）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マウス（Muta<sup>TM</sup>mouse）を用いた遺伝子突然変異誘発性（レポーター遺伝子：*lacZ*）試験を実施した。

用量設定試験の結果を基にガイドライン上定められた 1000 mg/kg/day を最高用量とし、500、250 および 125 mg/kg/day の用量で各群雄 6 匹に 1 日 1 回、28 日間連続強制経口投与し、3 日間の遺伝子突然変異発現期間をおいた後、肝臓および腺胃を摘出した。1000 mg/kg/day 群において 1 例の死亡が認められたが、評価数 5 匹を確保することができたため、1000、500 および 250 mg/kg/day の 3 用量の肝臓および腺胃について、*lacZ* assay により遺伝子突然変異頻度を求めた。

その結果、ラズベリーケトン投与群の肝臓および腺胃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 ENU 投与群では、肝臓および腺胃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、ラズベリーケトンはトランスジェニックマウスの肝臓および腺胃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。

## 17. 試験関係資料の保管

当該試験の試験関係資料は、[REDACTED] 資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保管される。その後の保管については、試験委託者と [REDACTED] で協議し、別途定める。なお、DNA 溶液および凍結器官の保管については試験委託者と [REDACTED] で協議し、別途定める。

Table 1. Mortality in dose-finding study of raspberry keton  
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment								Mortality	
			1	2	3	4	5	6	7	8		
Raspberry keton	125	1101	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1102	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1103	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	250	1201	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1202	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1203	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	500	1301	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		1302	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		1303	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
1000	1401	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3	
	1402	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live		
	1403	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live		

Table 2. Mortality in dose-finding study of raspberry keton  
[Female mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment								Mortality
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Raspberry keton	125	2101	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		2102	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		2103	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	250	2201	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		2202	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		2203	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
	500	2301	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3
		2302	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
		2303	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	
1000	2401	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	0 / 3	
	2402	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live		
	2403	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live	Live		

Table 3. Induction of mutation in liver of transgenic mice treated with raspberry keton  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

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. ( $\times 10^{-6}$ )
Corn oil	0	3001	1,152,900	1	84	72.9	47.6 $\pm$ 15.4
		3002	783,900	1	29	37.0	
		3003	970,200	1	35	36.1	
		3004	858,600	1	35	40.8	
		3005	997,200	1	51	51.1	
Raspberry keton	250	3201	1,458,900	1	52	35.6	48.2 $\pm$ 8.9
		3202	1,161,000	1	58	50.0	
		3203	1,660,500	1	85	51.2	
		3204	1,038,600	1	62	59.7	
		3205	1,152,000	1	51	44.3	
	500	3301	863,100	1	70	81.1	66.9 $\pm$ 13.3
		3302	783,000	1	45	57.5	
		3303	503,100	1	37	73.5	
		3304	1,413,000	1	104	73.6	
		3305	1,006,200	1	49	48.7	
	1000	3402	1,195,200	1	55	46.0	48.5 $\pm$ 17.5
		3403	707,400	1	34	48.1	
		3404	746,100	1	43	57.6	
		3405	419,400	1	29	69.1	
		3406	1,100,700	1	24	21.8	
ENU	100	3501	634,500	1	102	160.8	193.1 $\pm$ 38.3 *(S)
		3502	709,200	1	145	204.5	
		3503	530,100	1	78	147.1	
		3504	365,400	1	78	213.5	
		3505	930,600	1	223	239.6	

Corn oil: Negative control (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 ( $p \leq 0.05$ )

(S): Student's *t* test

Table 4. Induction of mutation in glandular stomach of transgenic mice treated with raspberry keton  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

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. ( $\times 10^{-6}$ )
Corn oil	0	3001	730,800	1	40	54.7	47.5 $\pm$ 5.8
		3002	439,200	1	22	50.1	
		3003	382,500	1	19	49.7	
		3004	430,200	1	18	41.8	
		3005	557,100	1	23	41.3	
Raspberry keton	250	3201	589,500	1	26	44.1	49.5 $\pm$ 7.7
		3202	409,500	1	22	53.7	
		3203	718,200	1	43	59.9	
		3204	508,500	1	25	49.2	
		3205	470,700	1	19	40.4	
	500	3301	533,700	1	19	35.6	35.7 $\pm$ 14.1
		3302	500,400	1	13	26.0	
		3303	420,300	1	8	19.0	
		3304	580,500	1	32	55.1	
		3305	864,900	1	37	42.8	
	1000	3402	924,300	1	44	47.6	54.2 $\pm$ 10.4
		3403	598,500	1	24	40.1	
		3404	665,100	1	37	55.6	
		3405	1,148,400	1	75	65.3	
		3406	944,100	1	59	62.5	
ENU	100	3501	545,400	1	341	625.2	552.2 $\pm$ 108.3 *(A)
		3502	688,500	1	467	678.3	
		3503	391,500	1	155	395.9	
		3504	657,000	1	340	517.5	
		3505	665,100	1	362	544.3	

Corn oil: Negative control (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 ( $p \leq 0.05$ )

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

Appendix 1. Body weight in dose-finding study of raspberry keton  
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)			Gain (g)
			Day -6 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8 (Sacrificed)	
Raspberry keton	125	1101	22.9	24.1	22.6	-1.5
		1102	23.4	25.0	23.1	-1.9
		1103	21.5	23.7	23.9	0.2
		Mean±S.D.	22.6±1.0	24.3±0.7	23.2±0.7	-1.1±1.1
	250	1201	23.0	24.5	23.7	-0.8
1202		21.6	23.6	23.1	-0.5	
1203		22.5	25.3	23.9	-1.4	
Mean±S.D.		22.4±0.7	24.5±0.9	23.6±0.4	-0.9±0.5	
500	1301	22.2	24.4	22.3	-2.1	
	1302	23.0	24.9	24.2	-0.7	
	1303	22.7	24.0	21.3	-2.7	
	Mean±S.D.	22.6±0.4	24.4±0.5	22.6±1.5	-1.8±1.0	
1000	1401	23.1	24.3	22.8	-1.5	
	1402	23.7	25.0	23.5	-1.5	
	1403	22.0	24.0	20.8	-3.2	
	Mean±S.D.	22.9±0.9	24.4±0.5	22.4±1.4	-2.1±1.0	

Gain= Day 8 (Sacrificed)-Day 1 (Allocated)

Appendix 2. Body weight in dose-finding study of raspberry keton  
 [Female mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)			Gain (g)
			Day -6 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8 (Sacrificed)	
Raspberry keton	125	2101	20.1	21.2	19.6	-1.6
		2102	20.1	21.8	19.7	-2.1
		2103	19.7	20.7	19.2	-1.5
		Mean±S.D.	20.0±0.2	21.2±0.6	19.5±0.3	-1.7±0.3
	250	2201	19.4	21.1	19.8	-1.3
		2202	20.7	21.5	20.7	-0.8
		2203	19.1	19.8	18.9	-0.9
		Mean±S.D.	19.7±0.9	20.8±0.9	19.8±0.9	-1.0±0.3
	500	2301	19.4	21.0	17.8	-3.2
		2302	19.6	21.4	20.1	-1.3
		2303	18.1	19.6	18.6	-1.0
		Mean±S.D.	19.0±0.8	20.7±0.9	18.8±1.2	-1.8±1.2
	1000	2401	20.9	21.5	20.3	-1.2
		2402	20.6	21.0	19.9	-1.1
		2403	19.8	20.9	18.1	-2.8
		Mean±S.D.	20.4±0.6	21.1±0.3	19.4±1.2	-1.7±1.0

Gain= Day 8 (Sacrificed) - Day 1 (Allocated)

Appendix 3. Clinical observations in dose-finding study of raspberry keton  
 [Male mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Raspberry keton	125	1101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	1201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	1301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		1303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	1401	N	PP, AG	N	N	N	N	N	N	N	
	1402	N	N	N	N	N	N	N	L	N	
	1403	N	N	AG	N	N	N	N	N	N	

N: Normal

PP: Prone position

AG: Abnormal gait

L: Lacrimation

Appendix 4. Clinical observations in dose-finding study of raspberry keton  
 [Female mice dosed once a day, for 7 days (Oral administration, a day after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
Raspberry keton	125	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	AG	N	N	AG	N	N	

N: Normal

AG: Abnormal gait

Appendix 5. Body weight in the gene mutation assay of raspberry keton  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)							Gain (g)
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 8	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)	
Corn oil	0	3001	25.2	27.1	26.7	27.1	28.8	29.0	28.2	1.1
		3002	22.3	24.2	24.4	24.6	24.9	25.2	25.0	0.8
		3003	23.7	25.7	26.8	26.5	27.3	27.8	27.7	2.0
		3004	23.8	26.0	27.3	27.3	28.2	28.8	28.3	2.3
		3005	23.2	24.4	25.3	24.9	25.4	25.7	25.8	1.4
		3006	25.3	26.1	27.1	27.4	28.4	27.9	27.7	1.6
		Mean±S.D.	23.9±1.2	25.6±1.1	26.3±1.2	26.3±1.2	27.2±1.6	27.4±1.6	27.1±1.4	1.5±0.6
Raspberry keton	125	3101	22.7	25.6	24.7	24.3	24.6	25.0	24.9	-0.7
		3102	22.9	24.1	25.5	25.2	26.4	26.6	27.0	2.9
		3103	24.8	26.5	28.7	28.6	28.7	28.5	28.5	2.0
		3104	23.9	25.8	26.7	26.9	26.8	25.7	24.9	-0.9
		3105	23.1	28.0	26.4	26.3	27.9	27.7	27.2	-0.8
		3106	23.0	24.9	26.2	26.1	26.6	26.8	26.8	1.9
		Mean±S.D.	23.4±0.8	25.8±1.3	26.4±1.4	26.2±1.5	26.8±1.4	26.7±1.3	26.6±1.4	0.7±1.7
	250	3201	23.7	26.4	27.6	27.5	28.3	28.0	28.2	1.8
		3202	24.5	26.8	26.9	27.1	27.1	28.0	27.5	0.7
		3203	23.6	24.6	24.6	24.4	25.2	25.3	25.8	1.2
		3204	24.2	25.8	26.2	26.5	27.1	28.2	27.5	1.7
		3205	24.2	25.6	26.1	27.0	27.5	27.7	27.8	2.2
		3206	22.3	23.0	23.0	23.0	23.1	23.5	23.3	0.3
Mean±S.D.	23.8±0.8	25.4±1.4	25.7±1.7	25.9±1.8	26.4±1.9	26.8±1.9	26.7±1.8	1.3±0.7		
500	3301	23.5	25.1	25.4	25.1	26.1	26.2	26.5	1.4	
	3302	24.9	26.2	26.7	26.8	27.0	27.4	27.1	0.9	
	3303	24.3	27.2	27.9	27.8	28.9	28.9	29.5	2.3	
	3304	21.7	24.1	23.8	23.6	24.6	24.6	24.0	-0.1	
	3305	23.7	25.5	25.1	25.3	26.2	27.2	27.2	1.7	
	3306	22.9	25.7	25.3	25.1	26.1	25.9	25.9	0.2	
	Mean±S.D.	23.5±1.1	25.6±1.0	25.7±1.4	25.6±1.5	26.5±1.4	26.7±1.5	26.7±1.8	1.1±0.9	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

Gain= Day 31(Sacrificed) - Day 1(Allocated)

## Appendix 5. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Body weight (g)									Gain (g)	
			Day -7 (Received)	Day 1 (Allocated)	Day 3	Day 8	Day 13 (Sacrificed)	Day 15	Day 22	Day 29	Day 31 (Sacrificed)		
Raspberry keton	1000	3401	22.8	23.8	20.4D								
		3402	23.7	26.0		18.0		23.3	25.2	26.4	27.5	1.5	
		3403	23.8	26.1		24.3		25.2	26.3	24.5	24.7	-1.4	
		3404	22.7	24.6		25.1		25.4	26.2	25.9	26.4	1.8	
		3405	24.2	25.3		26.0		25.9	24.7	26.3	26.2	0.9	
		3406	24.0	28.4		25.8		25.9	26.9	26.6	26.6	-1.8	
		Mean±S.D.	23.5±0.6	25.7±1.6		23.8±3.3		25.1±1.1	25.9±0.9	25.9±0.8	26.3±1.0	0.2±1.7	
ENU	100	3501	22.6	23.9			23.8					-0.1*	
		3502	23.2	25.5			24.6					-0.9*	
		3503	22.8	25.0			24.9					-0.1*	
		3504	23.8	25.7			25.4					-0.3*	
		3505	24.0	27.2			27.1					-0.1*	
		3506	25.0	26.2			26.1					-0.1*	
		Mean±S.D.	23.6±0.9	25.6±1.1			25.3±1.2					-0.3±0.3	

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

Gain= Day 31(Sacrificed) - Day 1(Allocated)

\*: Gain= Day 13(Sacrificed) - Day 1(Allocated)

D: Dead

Appendix 6. Clinical observations in the gene mutation assay of raspberry keton  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Corn oil	0	3001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Raspberry keton	125	3101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	3201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	3301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	3401	N	PP, IR	D									
	3402	N	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	IR	N	
	3403	N	IR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	DL, IR	N	
	3405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3406	N	DL, IR	N	DL, IR	DL, IR	DL, IR	DL, IR	N	LP, DL, IR	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal D: Dead

PP: Prone position IR: Irregular respiration DL: Decrease in locomotor activity LP: Lateral position

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ENU	100	3501	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3502	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3503	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3504	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3505	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3506	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

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

N: Normal

## Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment										
			11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Corn oil	0	3001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Raspberry keton	125	3101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	3201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	3301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	3402	N	N	N	N	DL, IR	DL	N	N	N	N	N	
	3403	N	N	N	N	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	
	3404	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3405	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

DL: Decrease in locomotor activity IR: Irregular respiration FC: Fur color fading(Head)

Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, i.p.)	Animal ID No.	Day of experiment		
			11	12	13
ENU	100	3501	N	N	N
		3502	N	N	N
		3503	N	N	N
		3504	N	N	N
		3505	N	N	N
		3506	N	N	N

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

N: Normal

## Appendix 6. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Day of experiment											
			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
Corn oil	0	3001	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3002	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3003	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3004	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3005	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3006	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Raspberry keton	125	3101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3104	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3105	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3106	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	250	3201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3205	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3206	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	500	3301	N	N	N	N	T	T	T	T	T	T	T	T
		3302	N	N	N	N	T	T	T	T	T	T	T	T
		3303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3304	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1000	3402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3403	DL, IR, FC	FC	AG, FC	FC	FC	FC	FC	FC	DL, IR, FC	FC	FC	FC	
	3404	DL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3405	DL, IR	N	N	N	N	N	N	DL	N	N	N	N	
	3406	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

N: Normal

T: Trauma(Right pinna) DL: Decrease in locomotor activity IR: Irregular respiration

FC: Fur color fading(Head) AG: Abnormal gait

Appendix 7. Individual gross findings on raspberry keton-treated transgenic mice for the gene mutation assay  
 [Male mice dosed once a day, for 28 days (Oral administration, 3 days after final administration)]

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings
Corn oil	0	3001	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3002	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3003	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3004	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3005	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3006	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
Raspberry keton	125	3101	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3102	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3103	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3104	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3105	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3106	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
	250	3201	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3202	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3203	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3204	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3205	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3206	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -

Corn oil: Negative control (10 mL/kg)

-: No remarkable change

## Appendix 7. Continued

Substance	Dose (mg/kg/day, p.o.)	Animal ID No.	Classification	Day at necropsy	Organs	Findings
Raspberry keton	500	3301	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3302	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3303	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3304	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3305	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3306	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
	1000	3402	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3403	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3404	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3405	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		3406	Sacrificed	31	Liver Stomach	- -
		ENU	100	3501	Sacrificed	13
3502	Sacrificed			13	Liver Stomach	- -
3503	Sacrificed			13	Liver Stomach	- -
3404	Sacrificed			13	Liver Stomach	- -
3505	Sacrificed			13	Liver Stomach	- -
3506	Sacrificed			13	Liver Stomach	- -

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

-: No remarkable change