Attachment M

資料番号　8

対象家畜等を用いた飼養試験（鶏）

試験報告書

Bacillus subtilis DB9011 の対象家畜等を用いた飼養試験(鶏)

(試験番号 SY011074,　京動検 1921 号)

２００２年2月

株式会社　京都動物検査センター

1．表題

Bacillus subtilis DB9011 の対象家畜等を用いた飼養試験(鶏)

2．試験番号

ＳＹ０１１０７４，京動検１９２１号

3．飼料添加物の動物試験の実施に関する基準（ＧＬＰ）の適用

この試験は，「飼料添加物の動物試験の実施に関する基準」（昭和 63 年 7 月 29 日,63 畜Ａ第 3039 号，改正平成 4 年 3 月 16 日，4 畜Ａ第 201 号「飼料添加物の評価基準の制定について」農林水産省畜産局長　水産庁長官通達）に従って実施した。

4．試験委託者

[redacted]

5．試験実施機関

名　称　　：株式会社　京都動物検査センター

所在地　　：京都市伏見区下板橋町５８５番地

代表者　　：代表取締役社長　　浦　重義

運営管理者：専務取締役　山田　耕司

6．試験実施施設

名　称：株式会社　京都動物検査センター　三和農場

所在地：京都府天田郡三和町字中出小字鍋坂９９１番地

7．試験責任者及び担当者

試験責任者

氏　名：中西信夫

所　属：株式会社　京都動物検査センター

試験担当者

氏　名：塚原隆充，林　純子

長命幸夫，内海恭太，松井輝美，村松敏雄，大矢恵一

所　属：株式会社　京都動物検査センター

8．試験期間

試験開始日　　:2001 年 11 月 28 日

投与開始日　　:2001 年 12 月 13 日

投与終了日　　:2002 年 2 月7日

最終報告書提出日:2002 年2月 28 日

Bacillus subtilis DB9011 の対象家畜等を用いた飼養試験(鶏)

株式会社　京都動物検査センター
中西信夫，塚原隆充，林純子

要　旨

DB9011(*Bacillus subtilis* DB9011)を鶏用飼料に添加し，8週間連続投与した場合の鶏に及ぼす影響を検討した。試験群は対照群，DB9011 1×10^7CFU/g 添加（予定常用量）群，DB9011 1×10^8CFU/g 添加群（予定常用量の10倍量）群の3群を設けた。各試験群とも死亡動物はなく，一般状態，体重，飼料摂取量において DB9011 の投与によると思われる異常は認められなかった。

なお，増体量において統計学的有意差は認められなかったものの，常用量群及び10倍量群で4%の増体改善傾向が認められた。

試　験　目　的

この試験は，家畜等の飼養者段階における飼料添加物の使用実態を考慮し，*Bacillus subtilis* DB9011 を飼料添加物として用いる鶏（対象家畜等）に連続投与し，鶏に及ぼす影響を明らかにするものである。

試験材料及び方法

1．検体

検体コード：DB9011

検体名：*Bacillus subtilis* DB9011

含量：本品1g中に *Bacillus subtilis* DB9011 を 5×10^9CFU 含有する。

ロット番号：451113

製造年月日：平成13年11月15日

保存条件：室温，遮光容器にて保存

有効期限：製造日より2年間

[redacted]

入手日及び量：平成13年12月3日，10kg

残余検体の処理：残余検体は試験終了後，試験委託者に返却した。

2．試験方法

1）供試動物

動物種：鶏

系統：ブロイラー専用種チャンキー

性別，導入羽数：雄30羽，雌30羽，合計60羽

導入時日齢及び体重範囲：0日齢，体重40～45g

動物選択理由：対象家畜として条件に適合する。

導入先：株式会社　ヤマモト（京都府亀岡市保津町上火無66-2）

ワクチン投与歴：ワクチン投与歴のないヒナを用いた。

馴化期間：なし。

検疫：試験施設搬入時に健康状態を確認した。

動物の群分け：無作為抽出法を用いた。

動物の個体識別：個体識別は0～28日齢までは脚帯及び28日齢～56日齢は翼帯により行った。各ケージに試験番号，試験群，個体番号を表示した。

2）飼育条件

（1）飼育環境：開放系畜舎で試験群毎のペン(170×195cm)に収容し，平飼い飼育とした。

（2）飼料

飼料の種類：ブロイラー試験用標準飼料［日本配合飼料㈱製］SDB No.1（0日齢から21日齢まで）及びSDB No.2（22日齢から56日齢まで）を給与した。なお，給与飼料の栄養成分等を付表2-1～2-2に示した。

（3）飲水

給与方法：自家水道水を自動給水装置で自由摂取させた。

水質検査：水道法に基づく指定検査機関の検査結果により，飲水適を確認した自家水道水を給与した。

3）検体の投与（飼料添加）

投与経路：飼料添加による経口投与

投与経路の選択理由：飼料添加は予定経路である。

投与用量：検体を上記飼料に 1×10^7CFU/g(常用量)及び 1×10^8CFU/g(常用量の 10 倍)となるように添加し，不断給餌により摂取させた。また，他に検体無添加飼料を給与する対照群をおいた。

投与用量の決定理由：至適添加量と考えられる量の最高量（常用量）及び常用量の 10 倍とした。

投与期間及びその選択理由：8 週間，飼料添加物の評価基準に定められた事項に準拠した。

検体添加飼料調製時の均一性及び濃度確認：検体添加飼料中の均一性を確認するために，検体添加飼料調製時毎に各ロット(常用量添加飼料及び 10 倍量添加飼料)の 16 分画中のうち 3 カ所より 100g ずつサンプリングし，DB9011 の菌数測定を実施した。また，濃度確認の為，16 分画全てから 50g ずつサンプリング(800g)し，これをよく混合して 100g を採取し,濃度確認用のサンプルとし，菌数測定を実施した。さらに投与状態での安定性を確認するために，投与終了時に濃度測定用の各検体添加飼料について同様に菌数測定を実施した。

4）試験群の設定と供試羽数

試験群	検体添加量	投与期間	供試羽数	動物番号
対照	——	——	(♂10♀10)20 羽	1～20
常用量	1×10^7CFU/g	8 週	(♂10♀10)20 羽	21～40
10 倍量	1×10^8CFU/g	8 週	(♂10♀10)20 羽	41～60

5）試験日程

経過週齢(週)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
群分け	○								
投与	○	←	―	―	―	―	―	―	○
一般状態の観察	○	←	―	―	―	―	―	―	○
体重測定	○		○		○		○		○
飼料摂取量測定	○	←→	○	←→	○	←→	○	←→	○

○：実施

異常が認められた場合には，その時点で剖検，血液学的検査，血液生化学的検査及び病理組織学的検査を実施することとした。

6）飼育期間中の観察事項

（1）一般状態：元気，食欲，糞便性状（下痢の発現）等について毎日観察した。

（2）体重：投与開始時，投与開始後 2,4,6,8 週に個体毎に測定した。

（3）飼料摂取量：試験期間中，体重測定時に各群毎に測定した。

（4）(1)～(3)に異常を認めた場合及び死亡動物については，(1)～(3)の検査データを検討し，試験責任者の判断により，血液学的検査，血液生化学的検査，病理学的検査及び病理組織学的検査を実施することとしたが，異常及び死亡は認められなかったので実施しなかった。

7）鶏の処置

試験終了時に体重測定後，屠殺焼却処分した。

3．統計処理

体重及び増体量について，Bartlett の等分散性の検定を行ったところ，いずれも等分散であったので一元配置分散分析を行った。

4．データの信頼性に及ぼしたと思われる環境要因

本試験に関し，試験成績に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

5．記録及び資料等の保存

試験計画書，生データ，記録文書及び試験報告書など試験に関する一連の資料は，試験終了後７年間，株式会社　京都動物検査センターにおいて保存する。

試 験 結 果

1．一般状態

試験期間を通じて，元気，食欲，糞便性状等の一般状態に異常は見られず，死亡例も認められなかった。

2．体重及び増体量

各試験群の平均体重及び平均増体量を表1に，個体別体重及び増体量を付表 1-1～1-3 に示した。

平均体重は，投与開始時（以下0週）では，対照群，常用量群及び10倍量群で43g，投与開始後2週（以下2週）では，対照群で340g，常用量群で361g，10倍量群で350g，投与開始後4週(以下4週)では，対照群で1235g，常用量群で1275g，10倍量群で1255g，投与開始後6週(以下6週)では，対照群で2566g，常用量群で2686g，10倍量群で2635g，投与開始後8週（以下8週）では，対照群で3949g，常用量群で4124g，10倍量群で4105gであった。

各時点の対照群の体重を100とした場合の指数では，常用量群で100～106，10倍量群で100～104と検体投与各群で増体率が高くなる傾向がみられたが，統計学的解析の結果，いずれの測定時点でも対照群と投与群との間に有意差は認められなかった。

平均増体量は0～2週では，対照群で298g，常用量群で318g，10倍量群で307g，2～4週では，対照群で895g，常用量群で914g，10倍量群で906g，4～6週では，対照群で1331g，常用量群で1410g，10倍量群で1379g，6～8週では，対照群で1383g，常用量群で1438g，10倍量群で1470g，全期間（0～8週）では，対照群で3906g，常用量群で4081g，10倍量群で4062gであった。また，全期間で対照群の増体量を100とすると，常用量群及び10倍量群は104と，検体投与各群で大きくなる傾向がみられたが，統計学的解析の結果，いずれの期間とも有意差は認められなかった。

3．飼料摂取量及び飼料要求率

各群の飼料摂取量及び飼料要求率を表2に示した。

各群20羽当たりの総飼料摂取量は0～2週では，対照群で8.55kg，常用量群で8.36kg，

10倍量群で8.68kg，2～4週では，対照群で26.87kg，常用量群で27.14kg，10倍量群で24.69kg，4～6週では，対照群で48.16kg，常用量群で47.45kg，10倍量群で50.00kg，6～8週では，対照群で61.16kg，常用量群で61.57kg，10倍量群で60.58kg，全期間では，対照群で144.74kg，常用量群で144.52kg，10倍量群で143.95kgであった。

飼料要求率は0～2週では，対照群で1.44，常用量群で1.31，10倍量群で1.41，2～4週では，対照群で1.50，常用量群で1.48，10倍量群で1.36，4～6週では，対照群で1.81，常用量群で1.68，10倍量群で1.81，6～8週では，対照群で2.21，常用量群で2.14，10倍量群で2.06，全期間では，対照群で1.85，常用量群及び10倍量群で1.77であった。全期間では，対照群の飼料要求率を100とすると，常用量群及び10倍量群で96であった。

4．検体添加飼料調製時の均一性，濃度及び安定性の確認

検体添加飼料調製時に各ロットより均一性確認のために3サンプル，濃度確認のために1サンプル採取し，飼料中の検体濃度及び均一性を菌数測定により確認した。検体添加飼料中の検体含有量の測定結果を表3に示した。その結果，本検体の理論含有量が常用量で1×10^7CFU/g，10倍量で1×10^8CFU/gであるのに対し，測定値は常用量の平均で9.5×10^6～9.8×10^6CFU/gの範囲，10倍量の平均で9.7×10^7～1.0×10^8CFU/gの範囲にあり，また，C.V.（変動係数）も常用量で2.4～3.5%，10倍量で2.0～5.3%の範囲にあることより，規定量の検体が含有されていることが確認された。また，飼料中における検体の安定性についても表3に示した通り，投与終了時でも97%～101%の残存率を示し，安定であった。

5．検体摂取量

検体摂取量は常用量群で6.19×10^8CFU/g/日，10倍量群で6.20×10^9CFU/g/日となり，10倍量群は常用量群のほぼ10倍量の検体を摂取していた。

総括及び考察

DB9011(*Bacillus subtilis* DB9011)を飼料添加により鶏(ブロイラー)に8週間連続投与し，鶏に及ぼす影響を検討した。

試験は0日齢，体重40～45gのブロイラー専用種チャンキー60羽（雄30羽，雌30羽）を用い，対照群，DB9011 1×10^7CFU/g添加群（常用量）及び1×10^8CFU/g添加群（10倍量）の3群を設け，各群に20羽（雄10羽，雌10羽）ずつ割り当てた。

試験期間中は毎日，一般状態を観察し，投与開始時，投与開始後2,4,6及び8週に体重，飼料摂取量を測定した。各群とも死亡動物はなく一般状態には異常は認められなかった。増体量においては有意差は認められなかったものの増加傾向を示した。また，飼料飼料要求率においても改善傾向が認められた。

以上の結果から，DB9011の予定常用量である1×10^7CFU/gとその10倍量である1×10^8CFU/gを飼料添加により鶏に8週間連続経口投与しても一般状態，飼料摂取量において検体投与によると思われる異常は認められなかった。

なお，本試験においては上記の臨床観察項目に異常が認められなかったので，血液学的検査，血液生化学的検査，病理学的検査及び病理組織学的検査は実施しなかった。

陳　述　書

試験の表題：*Bacillus subtilis* DB9011の対象家畜等を用いた飼養試験（鶏）

試験番号　：ＳＹ０１１０７４，京動検１９２１号

この試験は，「飼料添加物の動物試験の実施に関する基準」（昭和63年７月29日・63畜Ａ第3039号，改正平成４年３月16日・４畜Ａ第201号「飼料添加物の評価基準の制定について」農林水産省畜産局長　水産庁長官通達）に従って実施した。

試験担当責任者：塚原隆充　　塚原隆充　2002年２月28日

試験担当者　　：林　純子　　林　純子　2002年２月28日
（被験物質管理責任者）

試験責任者　　：中西信夫　　中西信夫　2002年２月28日
（試験設備管理責任者）

運営管理者　　：山田耕司　　山田耕司　2002年２月28日

信頼性保証部門陳述書

試験の表題：*Bacillus subtilis* DB9011の対象家畜等を用いた飼養試験（鶏）

試験番号　：ＳＹ０１１０７４，京動検１９２１号

信頼性保証部門によって本試験の定期的な検閲及び報告書の検閲を下記の日時に行い，運営管理者及び試験責任者に報告した。

試験中の検閲日	報　告　日
2001 年 12 月 26 日	2001 年 12 月 27 日

報告書の検閲日

報告書原案

2002 年 2 月 26 日	2002 年 2 月 27 日

最終報告書

2002 年 2 月 28 日	2002 年 2 月 28 日

本最終報告書は試験の方法が正確に記載され，報告の内容が生データを正確に反映している。

信頼性保証部門責任者

長屋 稔 (長屋) 2002年 2月28日

表1　平均体重及び増体量

試験群	平均体重					平均増体量				
	0	2	4	6	8（週）	0-2	2-4	4-6	6-8	0-8（週）
1群	43	340	1235	2566	3949	298	895	1331	1383	3906
無添加対照群	2	57	148	322	578	55	108	205	295	578
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2群	43	361	1275	2686	4124	318	914	1410	1438	4081
常用量群	2	57	163	318	493	55	122	186	204	493
	100	106	103	105	104	107	102	106	104	104
3群	43	350	1255	2635	4105	307	906	1379	1470	4062
10倍量群	2	53	127	261	370	51	90	177	147	370
	100	103	102	103	104	103	101	104	106	104

注）表中の数値：上段＝平均体重(g)，平均増体量(g)　中段：標準偏差　下段：1群を100とした場合の指数

表2 飼料摂取量及び飼料要求率

試験群	飼料摂取量					飼料要求率				
	0-2	2-4	4-6	6-8	0-8（週）	0-2	2-4	4-6	6-8	0-8（週）
1群	8.55	26.87	48.16	61.16	144.74	1.44	1.50	1.81	2.21	1.85
無添加対照群	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2群	8.36	27.14	47.45	61.57	144.52	1.31	1.48	1.68	2.14	1.77
常用量群	98	101	99	101	100	91	99	93	97	96
3群	8.68	24.69	50.00	60.58	143.95	1.41	1.36	1.81	2.06	1.77
10倍量群	102	92	104	99	99	98	91	100	93	96

注）表中の数値：上段＝総飼料摂取量(kg)，飼料要求率　下段：1群を100とした場合の指数

表3 *Bacillus subtilis* DB9011の飼料中の均一性，濃度及び安定性

飼料名	飼料調製日	検体添加量 (CFU/g)	lot No.		菌数(CFU/g) 飼料調製時	菌数(CFU/g) 投与終了時
SDB No.1	2001.12.10	常用量 1×10^7	Batch1	濃度確認	9.3×10^6	1.0×10^7
				均一性1	9.4×10^6	9.3×10^6
				均一性2	9.3×10^6	9.3×10^6
				均一性3	1.0×10^7	9.6×10^7
				平均*	9.5×10^6	9.6×10^6
				C.V.(%)	3.5	3.5
				残存率(%)**	—	101
SDB No.1	2001.12.10	10倍量 1×10^8	Batch2	濃度確認	9.7×10^7	9.8×10^7
				均一性1	9.3×10^7	9.3×10^7
				均一性2	9.9×10^7	1.0×10^8
				均一性3	1.0×10^8	9.2×10^7
				平均	9.7×10^7	9.6×10^7
				C.V.(%)	3.2	4.0
				残存率(%)	—	99
SDB No.2	2001.12.26	常用量 1×10^7	Batch3	濃度確認	9.9×10^6	9.4×10^6
				均一性1	9.6×10^6	9.7×10^6
				均一性2	9.5×10^6	1.0×10^7
				均一性3	1.0×10^7	9.3×10^6
				平均	9.8×10^6	9.6×10^6
				C.V.(%)	2.4	3.3
				残存率(%)	—	98
SDB No.2	2001.12.26	10倍量 1×10^8	Batch4	濃度確認	1.0×10^8	9.4×10^7
				均一性1	9.6×10^7	1.0×10^8
				均一性2	9.6×10^7	9.6×10^7
				均一性3	9.8×10^7	9.8×10^7
				平均	9.8×10^7	9.7×10^7
				C.V.(%)	2.0	2.7
				残存率(%)	—	99
SDB No.2	2002.1.24	常用量 1×10^7	Batch5	濃度確認	9.5×10^6	9.6×10^6
				均一性1	9.4×10^6	9.9×10^6
				均一性2	1.0×10^7	9.6×10^7
				均一性3	9.8×10^6	1.0×10^7
				平均	9.7×10^6	9.8×10^6
				C.V.(%)	2.8	2.1
				残存率(%)	—	101
SDB No.2	2002.1.24	10倍量 1×10^8	Batch6	濃度確認	1.1×10^8	1.0×10^8
				均一性1	1.0×10^8	1.0×10^8
				均一性2	9.8×10^7	9.4×10^7
				均一性3	1.0×10^8	9.5×10^7
				平均	1.0×10^8	9.7×10^7
				C.V.(%)	5.3	3.3
				残存率(%)	—	97

＊：濃度確認，均一性1，2及び3の測定値の平均
＊＊：飼料調製時の測定値に対する残存率

付表1－1　個体別体重及び増体量

1群：無添加対照群

動物	体重(g)					増体量(g)				
番号	0	2	4	6	8（週）	0-2	2-4	4-6	6-8	0-8（週）
1	40	269	1078	2310	3870	229	809	1232	1560	3830
2	40	227	1062	2520	4220	187	835	1458	1700	4180
3	41	317	1300	2830	4610	276	983	1530	1780	4569
4	41	322	1262	2530	4110	281	940	1268	1580	4069
5	42	364	1454	2990	4580	322	1090	1536	1590	4538
6	42	350	1380	2840	4220	308	1030	1460	1380	4178
7	42	326	1082	2220	3260	284	756	1138	1040	3218
8	44	381	1222	2300	3400	337	841	1078	1100	3356
9	44	365	1316	2570	3610	321	951	1254	1040	3566
10	45	428	1392	2930	4550	383	964	1538	1620	4505
11	40	203	876	2020	3020	163	673	1144	1000	2980
12	41	311	1084	2120	3200	270	773	1036	1080	3159
13	41	322	1248	2770	4280	281	926	1522	1510	4239
14	43	360	1184	2590	4300	317	824	1406	1710	4257
15	43	350	1292	2740	4240	307	942	1448	1500	4197
16	43	346	1126	2100	2920	303	780	974	820	2877
17	44	359	1236	2430	3610	315	877	1194	1180	3566
18	45	412	1430	3070	4730	367	1018	1640	1660	4685
19	45	398	1282	2440	3620	353	884	1158	1180	3575
20	45	392	1394	2990	4620	347	1002	1596	1630	4575
SUM	851	6802	24700	51310	78970	5951	17898	26610	27660	78119
AVE	43	340	1235	2566	3949	298	895	1331	1383	3906
S D	2	57	148	322	578	55	108	205	295	578

付表1－2 個体別体重及び増体量

2群:常用量群

動物	体重(g)					増体量(g)				
番号	0	2	4	6	8 (週)	0-2	2-4	4-6	6-8	0-8 (週)
21	40	278	946	2120	3320	238	668	1174	1200	3280
22	40	306	1312	2990	4780	266	1006	1678	1790	4740
23	41	323	1244	2530	3840	282	921	1286	1310	3799
24	41	290	978	2010	3160	249	688	1032	1150	3119
25	42	372	1256	2560	3920	330	884	1304	1360	3878
26	42	338	1310	2830	4020	296	972	1520	1190	3978
27	43	400	1267	2580	3960	357	867	1313	1380	3917
28	43	398	1302	2720	4240	355	904	1418	1520	4197
29	45	445	1406	2820	4340	400	961	1414	1520	4295
30	45	436	1480	2980	4470	391	1044	1500	1490	4425
31	40	288	1136	2720	4280	248	848	1584	1560	4240
32	41	302	1314	2960	4810	261	1012	1646	1850	4769
33	41	286	1050	2180	3420	245	764	1130	1240	3379
34	42	335	1154	2480	3860	293	819	1326	1380	3818
35	43	378	1242	2520	3720	335	864	1278	1200	3677
36	43	375	1354	3050	4740	332	979	1696	1690	4697
37	44	410	1370	2960	4450	366	960	1590	1490	4406
38	45	435	1610	3130	4820	390	1175	1520	1690	4775
39	45	410	1446	2930	4360	365	1036	1484	1430	4315
40	45	410	1326	2640	3960	365	916	1314	1320	3915
SUM	851	7215	25503	53710	82470	6364	18288	28207	28760	81619
AVE	43	361	1275	2686	4124	318	914	1410	1438	4081
S D	2	57	163	318	493	55	122	186	204	493

付表1－3. 個体別体重及び増体量

3群:10倍量群

動物	体重(g)						増体量(g)					
番号	0	2	4	6	8	(週)	0-2	2-4	4-6	6-8	0-8	(週)
41	40	275	1068	2120	3320		235	793	1052	1200	3280	
42	40	281	1162	2660	4230		241	881	1498	1570	4190	
43	41	318	1244	2760	4350		277	926	1516	1590	4309	
44	42	336	1230	2430	3820		294	894	1200	1390	3778	
45	42	301	1054	2200	3460		259	753	1146	1260	3418	
46	42	346	1208	2500	4050		304	862	1292	1550	4008	
47	43	357	1242	2620	4030		314	885	1378	1410	3987	
48	43	382	1352	2690	4120		339	970	1338	1430	4077	
49	44	403	1322	2720	4140		359	919	1398	1420	4096	
50	45	426	1512	2960	4360		381	1086	1448	1400	4315	
51	40	264	1210	2820	4520		224	946	1610	1700	4480	
52	41	313	1226	2460	3910		272	913	1234	1450	3869	
53	42	310	1052	2520	3820		268	742	1468	1300	3778	
54	42	299	1214	2820	4480		257	915	1606	1660	4438	
55	43	352	1198	2430	3990		309	846	1232	1560	3947	
56	44	409	1490	3220	4720		365	1081	1730	1500	4676	
57	44	405	1380	2920	4630		361	975	1540	1710	4586	
58	44	401	1282	2490	3860		357	881	1208	1370	3816	
59	45	416	1274	2530	3840		371	858	1256	1310	3795	
60	45	400	1384	2820	4440		355	984	1436	1620	4395	
SUM	852	6994	25104	52690	82090		6142	18110	27586	29400	81238	
AVE	43	350	1255	2635	4105		307	906	1379	1470	4062	
S D	2	53	127	261	370		51	90	177	147	370	

付表 2-1

鶏の給与飼料栄養成分表

1. 飼料の名称　　ブロイラー試験用標準飼料 SDB No.1
（日本配合飼料株式会社製造）

2. 飼料の種類　　ブロイラー肥育前期用標準飼料

3. 一般成分（平均分析値）

粗蛋白質	(%)	23.8
粗脂肪	(%)	5.8
粗繊維	(%)	2.5
粗灰分	(%)	5.2
カルシウム	(%)	1.04
リン	(%)	0.73
GE (Cal / 100 g)		414
ME (Cal / 100 g)		307

※GE および ME は計算値

4. 含有する飼料添加物の名称
ビタミン A、ビタミン D_3、ビタミン E、ビタミン B_1、ビタミン B_2、ビタミン B_6、ニコチン酸、パントテン酸、ビオチン、葉酸、ビタミン B_{12}、ビタミン K_3、コリン、メチオニン、炭酸亜鉛、ヨウ素酸カルシウム、硫酸コバルト、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸マンガン

5. 使用原料
とうもろこし、北洋ミール、大豆油粕、粉末精製牛脂、小麦粉、アルファルファミール

付表 2-2

鶏の給与飼料栄養成分表

1. 飼料の名称　　ブロイラー試験用標準飼料 SDB No.2
（日本配合飼料株式会社製造）

2. 飼料の種類　　ブロイラー肥育後期用標準飼料

3. 一般成分（平均分析値）

粗蛋白質	(%)	20.0
粗脂肪	(%)	6.8
粗繊維	(%)	2.6
粗灰分	(%)	5.0
カルシウム	(%)	1.02
リン	(%)	0.73
GE (Cal / 100 g)		413
ME (Cal / 100 g)		316

※GE および ME は計算値

4. 含有する飼料添加物の名称
ビタミンA、ビタミンD_3、ビタミンE、ビタミンB_1、ビタミンB_2、ビタミンB_6、ニコチン酸、パントテン酸、ビオチン、葉酸、ビタミンB_{12}、ビタミンK_3、コリン、メチオニン、炭酸亜鉛、ヨウ素酸カルシウム、硫酸コバルト、硫酸鉄、硫酸銅、硫酸マンガン

5. 使用原料
とうもろこし、北洋ミール、大豆油粕、粉末精製牛脂、小麦粉、アルファルファミール、ビタミン、ミネラル、アミノ酸

Attachment M

Material No. 8

Feeding Study Using Target Livestock (Chickens)

Study Report

Feeding study of *Bacillus subtilis* DB9011 using target livestock (chickens)
(Study No.: SY011074, Kyodoken No. 1921)

February, 2002
Kyodokoen Institute

1. Title

Feeding study of *Bacillus subtilis* DB9011 using target livestock (chickens)

2. Study number

SY011074, Kyodoken No. 1921

3. Compliance with Good Laboratory Practice for Feed Additives (GLP)

The present study was conduc ted in accordance with Notification No. 63-Chiku-A-3039, dated July 29, 1988, "Good Laboratory Practice for Feed Additives" (amended by Notification No. 4-Chiku-A-201, dated March 16, 1992, "Establishment of the evaluation standards for feed additives" issued by Director-General, Livestock Industry Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, and Director-General, Fisheries Agency).

4. Sponsor

[redacted]

5. Testing facility

Name:	Kyodoken Institute
Address:	585 Shimoitabashi-cho, Fushimi-ku, Kyoto
Representative:	Shigeyoshi Ura, President
Administrator:	Koji Yamada, Senior Executive Director

6. Testing field

Name:	Miwa Farm, Kyodoken Institute
Address:	991 Koaza-nabezaka, Aza-nakade, Miwa-cho, Amata-gun, Kyoto

7. Study director and staff members engaged in study

Study director

Name:	Nobuo Nakanishi
Affiliation:	Kyodoken Institute

Staff members engaged in study

Name:	Takamitsu Tsukahara, Junko Hayashi, Sachio Chomei, Kyota Uchiumi, Terumi Matsui, Norio Muramatsu, Ke iichi Oya
Affiliation:	Kyodoken Institute

8. Study period

Start of study:	November 28, 2001
Start of administration:	December 13, 2001
End of administration:	February 7, 2002
Submission of final report:	February 28, 2002

Feeding study of *Bacillus subtilis* DB9011 using target livestock (chickens)

Nobuo Nakanishi, Takamitsu Tsukahara,
Junko Hayashi
Kyodoken Institute

Abstract

Bacillus subtilis DB9011 was admixed with feed for chickens and repeatedly administered for 8 weeks to investigate its effect. Control, DB9011 1×10^7 cfu/g (proposed dose), and DB9011 1×10^8 cfu/g (10-fold the proposed dose) groups were established. No animal deaths occurred in any group, and there were no abnormal changes in clinical conditions, body weight, and feed consumption attributable to DB9011.

Although no statistical difference in body weight gain was detected, body weight gain tended to increase (4 %) in the proposed dose and 10-fold proposed dose groups.

Study objectives

Effect of feed additive *Bacillus subtilis* DB9011 on chickens in repeated-dose administration was investigated, taking into consideration usage status of feed additives by livestock breeders.

Study materials and methods

1. Test substance

Test substance code: DB9011

Name of test substance: *Bacillus subtilis* DB9011

Content: containing 5×10^9 cfu *Bacillus subtilis* DB9011 per gram

Lot No.: 451113

Manufacturing date: November 15, 2001

Storage conditions: at room temperature, protected from light

Expiration date: within 2 years of manufacturing date

[redacted]

Receipt date and amount received: December 3, 2001, 10 kg

Treatment of remaining test substance: Unused test substance was returned to the sponsor after completion of the study.

2. Study methods

1) Test animals

Animal species: chicken

Strain: Chunky broiler

Sex, number of animals received: 30 of each sex, total 60 animals

Age and body weight at receipt: day 0, 40 to 45 g

Reasons for selection of species: Chickens meet the criteria for target livestock.

Supplier: Yamamoto Co., Ltd. (66-2 Kami-hinashi, Hozu-cho, Kameoka, Kyoto)

Vaccination history: Chicks with no vaccination history were used.

Acclimatization period: none

Quarantine: Health conditions were checked at the time of transfer to the testing farm.

Group assignment: A random sampling method was used.

Individual identification: Animals were identified with leg bands at the age of 0 to 28 days, and thereafter with wing bands from the age of 28 to 56 days. Study number, group name, and individual number were displayed on each cage.

2) Rearing environment

(1) Rearing environment

Chicks were housed together in open pens (170 × 195 cm) for each group and reared by floor feeding.

(2) Feed

Name of feed: Standard feed for testing in broilers (Nippon Formula Feed Mfg. Co., Ltd.) SDB No. 1 (from day 0 to 21) and SDB No. 2 (from day 22 to 56) were provided. Appendix tables 2-1 to 2-2 show nutritional information for the feed.

(3) Drinking water

Method of water supply: Tap water at the testing facility was provided via automatic suppliers *ad libitum*.

Water quality test: Tap water at the testing facility was provided after confirming that it was drinkable based on results of water quality tests conducted by a designated testing institution, in accordance with Water Supply Law.

3) Administration of test substance (admixed with feed)

Administration route: oral administration by feed admixture

Rationale for selection of administration route: Administration by feed admixture is the

proposed route.

Doses: Test substance was admixed to feed at ratios of 1×10^7 cfu/g (proposed dose) and 1×10^8 cfu/g (10-fold the proposed dose), then provided *ad libitum*. A control group receiving feed without the test substance was established.

Rationale for selection of doses: Maximum suitable dose (proposed dose) and 10-fold proposed dose were selected.

Administration period and rationale for selection: 8 weeks in accordance with the "Evaluation standards for feed additives".

Confirmation of homogeneity and concentration of DB9011 in feed:

In order to confirm homogeneity of DB9011 in feed, 100 g of feed admixture was sampled from 3 of 16 compartments in each lot and DB9011 at the time of preparation of feed admixture, and strain cell number was counted. In addition, in order to confirm concentration, 50 g of feed admixture was sampled from all 16 compartments in each lot (800 g in total). These samples were then mixed well and a 100 g sample was taken for confirmation of concentration, and bacterial cell number was counted. In order to check stability of DB9011 in feed admixture, the bacterial cell number was counted at the end of the administration period using all feed admixture samples for confirmation of concentration.

4) Group composition and number of animals used for study

Group name	Concentration	Administration period	No. of animals	Animal number
Control	–	–	20 (M: 10, F: 10)	1 - 20
Proposed dose	1×10^7 cfu/g	8 weeks	20 (M: 10, F: 10)	21 - 40
10-fold dose	1×10^8 cfu/g	8 weeks	20 (M: 10, F: 10)	41 - 60

5) Study schedule

Age (weeks)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Group assignment	○								○
Administration	○	—	—	—	—	—	—	—	○
Observation of clinical conditions	○	—	—	—	—	—	—	—	○
Measurement of body weight	○		○		○		○		○
Measurement of feed consumption	○	—	○	—	○	—	○	—	○

○: performed

Necropsy, hematology, blood biochemistry, and histopathology were immediately conducted when abnormal changes were observed.

6) Observation items during rearing period

(1) Clinical conditions: Animals were observed everyday for vitality, appetite, and fecal condition (occurrence of diarrhea).

(2) Body weight: Body weight was measured for each animal at the start of administration, and 2, 4, 6, and 8 weeks of administration.

(3) Feed consumption: Feed consumption was measured for each group at the same time as body measurement during the study period.

(4) For animals with abnormal changes in items (1) to (3) and dead animals, data on items (1) to (3) were reviewed. Hematology, blood biochemistry, pathology, and histopathology were to be conducted at the discretion of the Study Director; however, no abnormal findings or animal deaths occurred, thus these examinations were not conducted.

7) Treatment of animals

After measurement of body weight, animals were sacrificed, then disposed of by incineration after completion of the study.

3. Statistical analysis

When Bartlett's test was conducted for body weight and body weight gain, homoscedasticity was established for both parameters, then one-way analysis of variance was conducted.

4. Environmental factors that might have affected reliability of data

There were no environmental factors that might have affected reliability of data in the present study.

5. Archives for records and documents

Documents relevant to the study, including the study protocol, raw data, study records, and study reports, were to be archived for 7 years after completion of the study at Kyodoken Institute.

Study results

1. Clinical conditions

There were no animal deaths or abnormal findings for clinical conditions, including vitality, appetite, and fecal condition.

2. Body weight and body weight gain

Table 1 shows mean body weight and mean body weight gain in each test group. Appendix tables 1-1 to 1-3 show individual data on body weight and body weight gain.

Mean body weight in the control, proposed dose, and 10-fold proposed dose groups were: 43 g each at the start of administration (hereafter referred to as week 0); 340, 361, and 350 g at 2 weeks of administration (week 2); 1235, 1275, and 1255 g at 4 weeks of administration (week 4); 2566, 2686, and 2635 g at 6 weeks of administration (week 6); and 3949, 4124, and 4105 g at 8 weeks of administration (week 8).

Relative body weight compared to the control group (set at 100) at each time point was 100 to 106, and 100 to 104 in the proposed dose and 10-fold proposed dose groups, respectively, showing a tendency towards an increase in relative body weight in both test substance groups. However, statistical analysis revealed no significant differences between the control and either of the test substance groups at any time point.

Mean body weight gain in the control, proposed dose, and 10-fold proposed dose groups were: 298, 318, and 307 g from weeks 0 to 2; 895, 914, and 906 g from weeks 2 to 4; 1331, 1410, and 1379 g from weeks 4 to 6; 1383, 1438, and 1470 g from weeks 6 to 8; and 3906, 4081, and 4062 g from weeks 0 to 8. Relative overall body weight gain throughout the study period was 104 in both the proposed dose and 10-fold proposed groups when the control group was assigned the base index value of 100. There was a tendency towards increase in the test substance groups; however, statistical analysis revealed no significant differences between the control and either of the test substance groups at any administration interval.

3. Feed consumption and feed conversion rates

Table 2 indicates feed consumption and feed conversion rates.

Feed consumption per group comprising 20 chicks were: 8.55, 8.36, and 8.68 kg from weeks 0 to 2; 26.87, 27.14, and 24.69 kg from weeks 2 to 4; 48.16, 47.45, and 50.00 kg from weeks 4 to 6; 61.16, 61.57, and 60.58 kg from weeks 6 to 8; and 144.74, 144.52, and 143.95 kg throughout the study period in the control, proposed dose and 10-fold proposed dose groups, respectively.

Feed conversion rates were: 1.44, 1.31, and 1.41 from weeks 0 to 2; 1.50, 1.48, and 1.36 from weeks 2 to 4; 1.81, 1.68, and 1.81 from weeks 4 to 6; 2.21, 2.14, and 2.06 from weeks 6 to 8; and 1.85, 1.77, and 1.77 throughout the study period in the control, proposed dose and 10-fold

proposed dose groups, respectively. Relative feed conversion rate in both the proposed dose and 10-fold proposed dose groups was 96 when the control group was assigned the base index value of 100.

4. Confirmation of homogeneity and concentration of DB9011 in feed:

To confirm homogeneity and concentration 3 samples and 1 sample, respectively, were taken from each lot of DB9011 in feed at the time of preparation of feed admixture. Concentration and homogeneity of DB9011 in feed admixture were confirmed by bacteria cell number counts in samples. Table 3 indicates results of measurement of DB9011 concentrations in feed admixture samples. Theoretical concentrations were 1×10^7 cfu/g and 1×10^8 cfu/g, while mean values were 9.5×10^6 to 9.8×10^6 cfu/g and 9.7×10^7 to 1.0×10^8 cfu/g, for the proposed dose and 10-fold proposed dose groups, respectively. Coefficient of variance (C.V.) was also 2.4 to 3.5% and 2.0 to 5.3%, respectively. These results demonstrated that feed admixtures contained DB9011 at specified concentrations. As shown in Table 3, 97 to 101% of DB9011 remained in feed admixture after completion of the administration period, demonstrating the stability of DB9011 in feed admixture.

5. Consumption of DB9011

Animals in the proposed dose and 10-fold proposed dose groups consumed 6.19×10^8 cfu/g/day and 6.20×10^9 cfu/g/day of DB9011, respectively, indicating that the 10-fold proposed dose group relatively consumed almost 10-fold the amount of DB9011 compared to the proposed dose group.

Conclusion and discussion

DB9011 (*Bacillus subtilis* DB9011) was repeatedly administered by feed admixture to broilers for 8 weeks to investigate the effects on chicks.

Sixty Chunky broiler chicks (30 of each sex; body weight: 40 to 45 g; age: 0 days) were used for the study. Control, 1×10^7 cfu DB9011/g (proposed dose), and 1×10^8 cfu DB9011/g (10-fold proposed dose) groups were established, with 20 animals (10 of each sex) allocated to each group.

Clinical conditions were observed every day throughout the study period. Body weight and feed consumption were measured at the start of administration, plus weeks 2, 4, 6, and 8 of administration. There were no animal deaths or abnormal findings for clinical conditions in any group. Although there were no statistical differences, body weight gain showed a tendency towards an increase. Feed conversion rates also showed a tendency towards improvement.

These results demonstrate that 8-week repeated oral administration of DB9011 to chickens at 1×10^7 cfu/g (proposed dose) and 1×10^8 cfu/g (10-fold proposed dose) caused no abnormal change in clinical conditions or feed consumption attributable to DB9011.

As no abnormal changes were observed for clinical observation items in the study, hematological, blood biochemistry, pathological, and histopathological tests were not performed.

Statement

Study title: Feeding study of *Bacillus subtilis* DB9011 using target livestock (chickens)
Study No.: SY011074, Kyodoken No. 1921

The present study was conducted in accordance with Notification No. 63-Chiku-A-3039, dated July 29, 1988, "Good Laboratory Practice for Feed Additives" (amended by Notification No. 4-Chiku-A-201, dated March 16, 1992, "Establishment of the evaluation standards for feed additives" issued by Director-General, Livestock Industry Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, and Director-General, Fisheries Agency).

Study leader: Takamitsu Tsukahara Date: February 28, 2002

Staff member: Junko Hayashi Date: February 28, 2002
(Person responsible for control of test substance)

Study director: Nobuo Nakanishi Date: February 28, 2002
(Person responsible for testing equipment)

Administrator: Koji Yamada Date: February 28, 2002

Certificate by Quality Assurance Unit

Study title: Feeding study of *Bacillus subtilis* DB9011 using target livestock (chickens)
Study No.: SY011074, Kyodoken No. 1921

The Quality Assurance Unit periodically inspected performance of the study and the study report on the date described below, and reported findings to the Administrator and Study Director.

Date of inspection during study period: December 26, 2001
Report date: December 27, 2001

Date of inspection of study report
Draft study report: February 26, 2002
Report date: February 27, 2002

Final study report: February 28, 2002
Report date: February 28, 2002

The person undersigned assures that this final report properly describes the study method and correctly reflects raw data.

Director of Quality Assurance Unit:
Minoru Nagao Date: February 28, 2002

Table 1. Mean body weight and body weight gain

Study group	Mean body weight					Mean body weight gain				
	0	2	4	6	8 (weeks)	0–2	2–4	4–6	6–8	0–8 (weeks)
Group 1	43	340	1235	2566	3949	298	895	1331	1383	3906
Control group	2	57	148	322	578	55	108	205	295	578
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Group 2	43	361	1275	2686	4124	318	914	1410	1438	4081
Proposed dose group	2	57	163	318	493	55	122	186	204	493
	100	106	103	105	104	107	102	106	104	104
Group 3	43	350	1255	2635	4105	307	906	1379	1470	4062
10-fold proposed	2	53	127	261	370	51	90	177	147	370
dose group	100	103	102	103	104	103	101	104	106	104

Note) Figures in the table are: mean body weight (g) and mean body weight gain on the upper line; standard deviation on the middle line; and indexed values relative to Group 1 (set as 100) on the lower line.

Table 2. Feed consumption and feed conversion rates

Study group	Mean feed consumption					Mean feed conversion rates				
	0–2	2–4	4–6	6–8	0–8 (weeks)	0–2	2–4	4–6	6–8	0–8 (weeks)
Group 1	8.55	26.87	48.16	61.16	144.74	1.44	1.50	1.81	2.21	1.85
Control group	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Group 2	8.36	27.14	47.45	61.57	144.52	1.31	1.48	1.68	2.14	1.77
Proposed dose group	98	101	99	101	100	91	99	93	97	96
Group 3	8.68	24.69	50.00	60.58	143.95	1.41	1.36	1.81	2.06	1.77
10-fold proposed dose group	102	92	104	99	99	98	91	100	93	96

Note) Figures in the table are: total feed consumption (kg) on the upper line; and indexed values relative to Group 1 (set as 100) on the lower line.

Table 3. Homogeneity, concentration and stability of *Bacillus subtilis* DB9011 in feed admixture

Feed name	Date of preparation of feed admixture	Dose of DB9011 (cfu/g)	lot No.		Number of bacteria (cfu/g)	
					At preparation of feed admixture	At completion of study
SDB No.1	2001.12.10	Proposed dose 1×10^7	Batch1	Confirmation of concentrations	9.3×10^6	1.0×10^7
				Homogeneity 1	9.4×10^6	9.3×10^6
				Homogeneity 2	9.3×10^6	9.3×10^6
				Homogeneity 3	1.0×10^7	9.6×10^7
				Mean*	9.5×10^6	9.6×10^6
				C.V. (%)	3.5	3.5
				Residual rate (%)**	—	101
SDB No.1	2001.12.10	10-fold proposed dose 1×10^8	Batch2	Confirmation of concentrations	9.7×10^7	9.8×10^7
				Homogeneity 1	9.3×10^7	9.3×10^7
				Homogeneity 2	9.9×10^7	1.0×10^8
				Homogeneity 3	1.0×10^8	9.2×10^7
				Mean*	9.7×10^7	9.6×10^7
				C.V. (%)	3.2	4.0
				Residual rate (%)	—	99
SDB No.2	2001.12.26	Proposed dose 1×10^7	Batch3	Confirmation of concentrations	9.9×10^6	9.4×10^6
				Homogeneity 1	9.6×10^6	9.7×10^6
				Homogeneity 2	9.5×10^6	1.0×10^7
				Homogeneity 3	1.0×10^7	9.3×10^6
				Mean*	9.8×10^6	9.6×10^6
				C.V. (%)	2.4	3.3
				Residual rate (%)	—	98
SDB No.2	2001.12.26	10-fold proposed dose 1×10^8	Batch4	Confirmation of concentrations	1.0×10^8	9.4×10^7
				Homogeneity 1	9.6×10^7	1.0×10^8
				Homogeneity 2	9.6×10^7	9.6×10^7
				Homogeneity 3	9.8×10^7	9.8×10^7
				Mean*	9.8×10^7	9.7×10^7
				C.V. (%)	2.0	2.7
				Residual rate (%)	—	99
SDB No.2	2002.1.24	Proposed dose 1×10^7	Batch5	Confirmation of concentrations	9.5×10^6	9.6×10^6
				Homogeneity 1	9.4×10^6	9.9×10^6
				Homogeneity 2	1.0×10^7	9.6×10^7
				Homogeneity 3	9.8×10^6	1.0×10^7
				Mean*	9.7×10^6	9.8×10^6
				C.V. (%)	2.8	2.1
				Residual rate (%)	—	101
SDB No.2	2002.1.24	10-fold proposed dose 1×10^8	Batch6	Confirmation of concentrations	1.1×10^8	1.0×10^8
				Homogeneity 1	1.0×10^8	1.0×10^8
				Homogeneity 2	9.8×10^7	9.4×10^7
				Homogeneity 3	1.0×10^8	9.5×10^7
				Mean*	1.0×10^8	9.7×10^7
				C.V. (%)	5.3	3.3
				Residual rate (%)	—	97

*: Mean values of measurement from confirmation of concentration, homogeneity 1, 2, and 3.

**: Residual rates based on measurement at preparation of feed admixture

Appendix table 1-1 Individual body weight and body weight gain

Group 1: Control group (not receivingDB9011)

Animal number	Body weight (g)					Body weight gain (g)				
	0	2	4	6	8 (weeks)	0–2	2–4	4–6	6–8	0–8(weeks)
1	40	269	1078	2310	3870	229	809	1232	1560	3830
2	40	227	1062	2520	4220	187	835	1458	1700	4180
3	41	317	1300	2830	4610	276	983	1530	1780	4569
4	41	322	1262	2530	4110	281	940	1268	1580	4069
5	42	364	1454	2990	4580	322	1090	1536	1590	4538
6	42	350	1380	2840	4220	308	1030	1460	1380	4178
7	42	326	1082	2220	3260	284	756	1138	1040	3218
8	44	381	1222	2300	3400	337	841	1078	1100	3356
9	44	365	1316	2570	3610	321	951	1254	1040	3566
10	45	428	1392	2930	4550	383	964	1538	1620	4505
11	40	203	876	2020	3020	163	673	1144	1000	2980
12	41	311	1084	2120	3200	270	773	1036	1080	3159
13	41	322	1248	2770	4280	281	926	1522	1510	4239
14	43	360	1184	2590	4300	317	824	1406	1710	4257
15	43	350	1292	2740	4240	307	942	1448	1500	4197
16	43	346	1126	2100	2920	303	780	974	820	2877
17	44	359	1236	2430	3610	315	877	1194	1180	3566
18	45	412	1430	3070	4730	367	1018	1640	1660	4685
19	45	398	1282	2440	3620	353	884	1158	1180	3575
20	45	392	1394	2990	4620	347	1002	1596	1630	4575
SUM	851	6802	24700	51310	78970	5951	17898	26610	27660	78119
AVE	43	340	1235	2566	3949	298	895	1331	1383	3906
S D	2	57	148	322	578	55	108	205	295	578

Appendix table 1-2 Individual body weight and body weight gain

Group 2: proposed dose group

Animal number	Body weight (g)						Body weight gain (g)					
	0	2	4	6	8	(weeks)	0-2	2-4	4-6	6-8	0-8	(weeks)
21	40	278	946	2120	3320		238	668	1174	1200	3280	
22	40	306	1312	2990	4780		266	1006	1678	1790	4740	
23	41	323	1244	2530	3840		282	921	1286	1310	3799	
24	41	290	978	2010	3160		249	688	1032	1150	3119	
25	42	372	1256	2560	3920		330	884	1304	1360	3878	
26	42	338	1310	2830	4020		296	972	1520	1190	3978	
27	43	400	1267	2580	3960		357	867	1313	1380	3917	
28	43	398	1302	2720	4240		355	904	1418	1520	4197	
29	45	445	1406	2820	4340		400	961	1414	1520	4295	
30	45	436	1480	2980	4470		391	1044	1500	1490	4425	
31	40	288	1136	2720	4280		248	848	1584	1560	4240	
32	41	302	1314	2960	4810		261	1012	1646	1850	4769	
33	41	286	1050	2180	3420		245	764	1130	1240	3379	
34	42	335	1154	2480	3860		293	819	1326	1380	3818	
35	43	378	1242	2520	3720		335	864	1278	1200	3677	
36	43	375	1354	3050	4740		332	979	1696	1690	4697	
37	44	410	1370	2960	4450		366	960	1590	1490	4406	
38	45	435	1610	3130	4820		390	1175	1520	1690	4775	
39	45	410	1446	2930	4360		365	1036	1484	1430	4315	
40	45	410	1326	2640	3960		365	916	1314	1320	3915	
SUM	851	7215	25503	53710	82470		6364	18288	28207	28760	81619	
AVE	43	361	1275	2686	4124		318	914	1410	1438	4081	
S D	2	57	163	318	493		55	122	186	204	493	

Appendix table 1-3 Individual body weight and body weight gain

Group 3: 10-fold proposed dose group

Animal number	Body weight (g)						Body weight gain (g)					
	0	2	4	6	8	(weeks)	0–2	2–4	4–6	6–8	0–8	(weeks)
41	40	275	1068	2120	3320		235	793	1052	1200	3280	
42	40	281	1162	2660	4230		241	881	1498	1570	4190	
43	41	318	1244	2760	4350		277	926	1516	1590	4309	
44	42	336	1230	2430	3820		294	894	1200	1390	3778	
45	42	301	1054	2200	3460		259	753	1146	1260	3418	
46	42	346	1208	2500	4050		304	862	1292	1550	4008	
47	43	357	1242	2620	4030		314	885	1378	1410	3987	
48	43	382	1352	2690	4120		339	970	1338	1430	4077	
49	44	403	1322	2720	4140		359	919	1398	1420	4096	
50	45	426	1512	2960	4360		381	1086	1448	1400	4315	
51	40	264	1210	2820	4520		224	946	1610	1700	4480	
52	41	313	1226	2460	3910		272	913	1234	1450	3869	
53	42	310	1052	2520	3820		268	742	1468	1300	3778	
54	42	299	1214	2820	4480		257	915	1606	1660	4438	
55	43	352	1198	2430	3990		309	846	1232	1560	3947	
56	44	409	1490	3220	4720		365	1081	1730	1500	4676	
57	44	405	1380	2920	4630		361	975	1540	1710	4586	
58	44	401	1282	2490	3860		357	881	1208	1370	3816	
59	45	416	1274	2530	3840		371	858	1256	1310	3795	
60	45	400	1384	2820	4440		355	984	1436	1620	4395	
SUM	852	6994	25104	52690	82090		6142	18110	27586	29400	81238	
AVE	43	350	1255	2635	4105		307	906	1379	1470	4062	
S D	2	53	127	261	370		51	90	177	147	370	

Appendix table 2-1 Nutrition facts for feed provided to chickens

1. Name of feed

Standard feed for testing in broilers SDB No. 1

(Nippon Formula Feed Mfg. Co., Ltd.)

2. Types of feed

Standard feed for rearing broilers at an early age

3. General ingredients (mean analytical values)

Crude protein	(%)	23.8
Crude fat	(%)	5.8
Crude fiber	(%)	2.5
Crude ash	(%)	5.2
Calcium	(%)	1.04
Phosphorus	(%)	0.73
GE (Cal/100 g)		414
ME (Cal/100 g)		307

* GE and ME are estimated values.

4. Feed additives contained

Vitamins A, D_3, E, B_1, B_2, and B_6, nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, folic acid, vitamins B_{12} and K_3, choline, methionine, smithsonite, calcium iodate, cobalt sulfate, ferrous sulfate, copper sulfate, manganese sulfate

5. Raw materials

Corn, white fish meal, soybean oil cake, powder beef tallow, wheat flour, alfalfa meal

Appendix table 2-2 Nutrition facts for feed provided to chickens

1. Name of feed

Standard feed for testing in broilers SDB No. 2

(Nippon Formula Feed Mfg. Co., Ltd.)

2. Types of feed

Standard feed for rearing broilers at a late age

3. General ingredients (mean analytical values)

Crude protein	(%)	20.0
Crude fat	(%)	6.8
Crude fiber	(%)	2.6
Crude ash	(%)	5.0
Calcium	(%)	1.02
Phosphorus	(%)	0.73
GE (Cal/100 g)		413
ME (Cal/100 g)		316

* GE and ME are estimated values.

4. Feed additives contained

Vitamins A, D_3, E, B_1, B_2, and B_6, nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, folic acid, vitamins B_{12} and K_3, choline, methionine, smithsonite, calcium iodate, cobalt sulfate, ferrous sulfate, copper sulfate, manganese sulfate

5. Raw materials

Corn, white fish meal, soybean oil cake, powder beef tallow, wheat flour, alfalfa meal, vitamins, minerals, amino acids

ASCA CORPORATION

Hiranomachi Yachiyo Bldg. 1-8-13 Hiranomachi, Chuo-ku, Osaka 541-0046, Japan
Tel: 06-6202-6272, Fax: 06-6202-6271

証明書番号：No. 050876-7
October 28, 2005

株式会社バイオ医療情報
新事業開発部
残間 雅秋　様

株式会社アスカコ-ポレ-ション
541-0046 大阪市中央区平野町 1-8-13
平野町八千代ビル

翻訳証明書
Certificate of Translation

貴社から依頼のあった以下の文書を、原文にもとづき、知り得る知識の範囲で、忠実かつ正確に翻訳したことを証明します。

This is to certify that the following document has been translated faithfully and accurately to the best of our knowledge and ability.

依頼文書タイトル: 対象家畜を用いた飼養試験（鶏）
Translated title: Feeding Study Using Target Livestock (Chickens)

翻訳完了日：2005 年 10 月 5 日
Date: October 5, 2005

責任者:

Signature

Eiko Ishioka
President