

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

既存添加物の遺伝毒性検出の戦略に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 林 真

平成16(2004)年4月

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

既存添加物の遺伝毒性検出の戦略に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 林 真

平成16(2004)年4月

目 次

I	総括研究報告書	
	既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究	- 1
	林 真	
II	分担研究報告	
	1 DNA 付加体形成に関する検討	-10
	長尾 美奈子	
	2 DNA の酸化的損傷に関する研究	-16
	葛西 宏	
	3 In vitro DNA 損傷性に関する検討	-20
	佐々木 有	
	4 細菌を用いたコウシ酸の変異原性試験と変異スペクトル解析	-25
	太田 敏博	
	5 光遺伝毒性に関する検討	-32
	田中 憲穂	
	6 ほ乳類培養細胞を用いた遺伝毒性誘発性に関する検討	-39
	本間 正充	
	7 In vivo 遺伝毒性試験の検討	-46
	中嶋 圓	
III	参考資料	
	1 班会議議事録	-50
	2 第 32 回日本環境変異原学会 (2003 11, 津) 発表スライド原稿	-81
	3 拡大班会議 (2004 2, 鎌倉) まとめスライド原稿	-88
	4 国際シンポジウム要旨集	-93

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
総括研究報告書

既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

- 主任研究者 林 真 (国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長)
- 分担研究者 長尾 美奈子 (共立薬科大学 客員教授)
- 葛西 宏 (産業医科大学・産業生態科学研究所 教授)
- 佐々木 有 (八戸工業高等専門学校・物質工学科 教授)
- 太田 敏博 (東京薬科大学・生命科学部 助教授)
- 田中 憲穂 ((財)食品薬品安全センター・秦野研究所 副部長)
- 本間 正充 (国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 室長)
- 中嶋 圓 ((財)食品農医薬品安全性評価センター・遺伝毒性グループ
グループリーダー)
- 協力研究者 森田 健 (国立医薬品食品研究所・安全情報部 主任研究官)
- 能美 健彦 (国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 室長)
- 布柴 達男 (東北大学大学院・理学研究科 助教授)
- 祖父尼 俊雄 ((株)ノハスシーン 代表取締役社長)
- 宇野 芳文 ((株)三菱ウェルファーマ・安全性研究所 グループマネージャー)

研究要旨

赤色2号をはじめとするタール系食用色素、既存添加物「コウシ酸」、アクリルアミド等、食品添加物を始めとする食品関連物質に関する安全、安心が国民の関心を集めている。特に発がん性の問題はがんが死亡原因の第一位であるように、国民の健康にとって重大な問題であり、また既存添加物の安全性に関し、最大の懸念はやはり発がん性である。発がん性が認められた場合、その発生機序に遺伝毒性が関与するか否かが重要な問題になる。遺伝毒性の有無の評価が大きな意味を持つのか現状である。遺伝毒性試験の結果を正しく「評価する基準」および「発がん性に繋がる事象か否かを判定するための戦略」の確立のため、専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て作業を進めた。

また、この戦略が国際的に通用するよう、海外の専門家を招聘し、我々が作成した戦略の原案に対する評価、提案を行ってもらおうと共に、「食品関連物質等のリスクアセスメント戦略」に関する国際シンポジウムを開催した。

なお、戦略を構築するために不可欠なデータでありながら試験が実施されていないか、試験はされているか試験結果の入手が困難なものに関しては実際に試験を実施した。ここではコウシ酸をモデルとして選択し、これまでのデータを総括すると共に、不足分のデータを補うための実験を行った。コウシ酸は多くの *in vitro* 遺伝毒性試験において陽性を示したことから、遺伝毒性物質であることか明らかとなったか、*in vivo* での遺伝毒性は陰性であり、肝臓での腫瘍の誘発を、遺伝毒性によって説明することは困難であった。

A 研究目的

食品添加物をはじめとする食品関連物質の遺伝毒性試験結果を評価し、解釈するための統一的な戦略を構築することを目的とし、戦略構築のために不可欠なデータを新たな試験を実施することにより入手する。なお、構築された戦略を国際的なものとするため、海外の専門家を含めて議論し、最終結果を国際誌に発表する。

遺伝毒性に関する試験法は数多く開発されており、手法の技術的な面に関しては国際的なガイドライン等により標準的なものが存在する。しかし、結果の評価、解釈に関しては国際的に合意されたものは

もとより、国内で検討されたものも含め、標準となる戦略は確立されていない。従って、本研究において、国内の専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て、戦略を構築することは非常にタイムリーで、かつ重要であると考えられる。既存添加物の発がん性に関し、新たに構築された戦略をもとに検証等を行うことは、既存添加物の安全性の見直しに大いに貢献することが期待される。さらに、その戦略に関し、国際的にコンセンサスを得たものとするにより、食品添加物等をはじめとする化学物質の遺伝毒性を評価、解釈するため

の国際調和のためにも中心的な役割を果たすことが期待されると共に、試験の重複軽減にも繋がることも期待される

また、具体的な戦略の構築のため、かつて保存料として使用経験があり、天然由来であるため、日常の多くの食品に含まれている「コウシ酸」をモデル化合物として試験を実施した。コウシ酸は、麹菌（*Aspergillus* 属）に由来する天然成分であり、抗菌、抗酸化、抗変色作用を有する添加物として食品に用いられてきた。また、メラニン色素形成を抑制する作用があることから、化粧品や医薬部外品にも用いられてきた

しかしながら、既存添加物の安全性確認作業の一環として実施されてきた安全性試験によって、マウス及びラットにおいて肝臓に対する発がん性が示唆されたことから、その遺伝毒性を否定できないとされ、食品添加物としての使用は禁止されることとなった

このような状況の下、コウシ酸に関する遺伝毒性試験データの収集を目的として、以下の試験研究を行った。

- 1 DNA 付加体解析に先立って、コウシ酸の変異原性が製造ロットにより異なるか、変異原性はコウシ酸自身によるのか、混入不純物に起因するかを検討した
- 2 肝臓に対する発がん性メカニズムを探る目的で、コウシ酸によるマウス肝臓の酸化的 DNA 損傷性について検討した
- 3 ヒトリンパ球由来の株細胞 WTK1 と TK6 を用いて、3つのロットのコウシ酸の DNA 損傷性を *in vitro* コメント法

で検討した

- 4 サルモネラ菌 TA100 および TA98 株に対するコウシ酸の変異原性を 3 種類のサンプルについて比較し、不純物の関与について考察した。活性酸素を生成する変異原に感受性を示すサルモネラ菌 TA102 株と大腸菌 WP2*uvrA*/pKM101 株を用いてコウシ酸の変異原性を調べた。コウシ酸の光活性化の可能性について調べた。コウシ酸によって誘発される塩基対置換変異のスペクトルを調べた
- 5 コウシ酸は UV-B 領域 (> 320 nm) に吸収を示し、皮膚に塗布される可能性があることから、光遺伝毒性作用の有無と、その作用機序の解明を目的として *in vitro* 実験系であるプラスミド切断法、培養細胞を用いたコメント法および小核試験を実施した
- 6 コウシ酸について、ほ乳類培養細胞を用いた遺伝毒性を実施し、その遺伝毒性の有無と、程度の評価、さらには遺伝毒性の特徴を明らかにした
- 7 コウシ酸のマウス肝臓における遺伝子突然変異誘発性の有無を検索した

B 研究方法

日本環境変異原学会に「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」臨時委員会と協力し、本研究と合同の定例検討会議を毎月開催した。定例会の課題に応じ、その分野での専門家を招聘し、戦略構築に必要な基礎知識等の蓄積に努めた

本研究班の考えをまとめるためのたたき台を作成し、その原稿を基に議論を重

ねた また、本たたき台の内容が国際的に認められるものとするため、海外で当該分野において指導的立場にある研究者を招聘し、意見交換を行うと共に今後の検討課題ならびにまとめるに当たっての提言をもらった

具体的な試験研究方法は以下の通りである。

- 1 コウン酸 Lot 番号 052K2516 (シグマ), 2Y181 (化粧品用), 5312 (食品添加物用)を用い, サルモネラ菌 TA100 を用い preincubation 法により, S9 mix 存在下および非存在下で, 変異原性の有無を検討した HPLC 解析は, Shiseido Capcell Pack C18 UG120 を用いた UV-VIS 吸収 Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer を用い, NMR 解析は, 日本電子社製 JEOL ECP-600 を用いた
- 2 肝臓の一部 (それぞれ約 0.3 g) を, 細胞溶解液中でホモシナイスし, 細胞核を遠心分離した タンパク分解酵素で核膜および核タンパクを破壊した後, ヨウ化ナトリウム法により DNA を抽出 ヌクレアーゼ P₁ 及びアルカリフォスファターゼによりヌクレオシトに分解し, HPLC-電気化学検出器を用いて DNA 中の 8-OH-dG を検出定量した 同時に UV 検出器で試料中の dG 量を定量し, DNA 中の 8-OH-dG 量を, 10⁶ dG あたりの値として算出した
- 3 WTK1 と TK6 細胞を, それぞれ 5 × 10⁵ cell/mL の濃度で 6 cm シャーレに播いた その 24 時間後にコウン酸を 5000 μg/mL を最高濃度として添加した 代謝活性化系を用いない場合はコウン酸

- を添加した 4, 8 時間後に細胞を回収してコメント法のための標本を作製した
- 4 コウン酸の変異原性の検出には *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, 及び *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 の 4 菌株を用いた また, 突然変異スペクトル解析には *E. coli* WP3101P, WP3102P, WP3103P, WP3104P, WP3105P, WP3106P の 6 菌株を用いた
 - 5 20 ng/μL のプラスミドを含む 2 倍濃度リン酸緩衝液を調製し, 被験物質および陽性対照物質調製液に等量 (30 μL) 加えて混合した (コウン酸の最終濃度は 2.2, 4.4, 8.8, 17.6, 35.2 mM, CPZ の最終濃度は 10 μg/mL, プラスミドの最終濃度は 10 ng/μL) 調製直後に, U 底の 96 well プレートに 20 μL ずつ分注し, 光照射を開始した 光源には, キセノンアークランプ式ソーラーシミュレーターを用い, UVA 放射照度 0.35 mW/cm² の条件で 1 時間照射した 照射終了直後に 2 μL のグリセロール色素液を加えた 10 μL を取り, 1% アガロースゲルを用いて電気泳動した 泳動終了後, 20 μg/mL 臭化エチシウム水溶液で 10 分間染色した トランスイルミネータ上でチルド CCD カメラを用いてコンピュータにゲル画像を取り込み, 各バンドの蛍光強度を定量化した
 - 6 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 および, WTK-1 を用いた 対数増殖期にある細胞を, コウン酸で 4 時間処理し, 細胞毒性(Relative Survival, RS)を評価した その 48 時間後に, 小核試験による染色体異常誘発性を, 72 時間後に TK 試験

による遺伝子突然変異誘発性を評価した。小核観察用に作成したスライドの一部を、動原体近傍にのみ局在する染色体特異的配列である alpha satellite DNA をプローブを用いて FISH を行った。

- 7 コウシ酸 1, 2 および 3% の 3 用量について 1 群 5 匹のトランスジェニックウスを用い 28 日間の混餌投与を行った。最終投与 3 日後に各個体から肝臓を摘出し、速やかに液体窒素で凍結した後、 -80°C で保存した。ゲノム DNA を抽出後、Transpack (Stratagene) を用いて *in vitro* パンケージング反応を行い、lacZ 遺伝子での遺伝子突然変異頻度を求めた。

C 研究結果

これまでに行ってきた検討会の議事録を参考資料 1 として添付する。ただし、第 3 回までは日本環境変異原学会の臨時委員会として行った。また、第 12 回は拡大班会議として、海外からのコンサルタント 9 名を含め、2 月 12, 13 日の 2 日間にわたって行った。コウシ酸のデータをたたき台とし、総合的評価に何が必要かを含め、本研究班の考え方について議論、提言がなされた。

- 1 コウシ酸はいずれのロットも-S9 mix で TA100 に変異原性を示し、また Lot による差は認められなかった。HPLC により分離し、270nm の吸収でモニターした結果、一つの溶出ピークを示し、いずれのサンプルも 270 nm の吸収を持つ分画のみが変異原性を示した。NMR 解析の結果、ピークはコウシ酸

であることを確認した。

- 2 DNA 中の 8-OH-dG 量は、 10^6 dG あたり次のようになった。陰性対照 132 ± 0.18 , コウシ酸 1.0(wt%) 投与群 186 ± 0.48 , 2.0(wt%) 投与群 208 ± 0.25 , 3.0(wt%) 投与群 318 ± 0.53 。いずれも、平均値 \pm 標準誤差, $n=5-8$ 。コウシ酸 3.0(wt%) 投与群の値は、陰性対照に比べ有意に高かった。
- 3 TK6, WTK-1 細胞を用いた *in vitro* コメント試験では、用いたコウシ酸の 3 つのロットとも、代謝活性化系を用いない場合に統計的に有意な泳動長の増大を示した。代謝活性化系の有無にかかわらず、コメント法の結果が陽性となったコウシ酸の用量域は 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上という高濃度域に限られるものであった。なお、いずれの細胞に対しても、コウシ酸は顕著な細胞毒性を示さなかった。
- 4 コウシ酸の変異原性はいずれの菌株においても認められたが、変異原性を示す用量は 0.5-1 mg/plate 以上であった。S9mix の存在下ではやや変異原性が弱くなる傾向が見られた。また、コウシ酸の変異原性に対して光の影響はないものと考えられた。大腸菌 WP3101P-WP3106P 株を用いて、コウシ酸で誘発される塩基対置換変異のスペクトルを調べた。G C \rightarrow A T 変異が最も多く誘発されたが、その他の 5 種類の塩基対置換がほぼ同程度に誘発されていた。
- 5 プラスミド切断法では、3 ロットとも最高濃度の 35.2 mM でも DNA 切断は誘発されなかったが、光照射群は最低濃度の 2.2 mM から最高濃度までの全

ての濃度で用量依存的な DNA の切断が認められた。培養細胞を用いた光 *in vitro* 小核試験およびコメントアノセイでは非照射群において、用量依存的にコメントおよび小核が誘発されたか、程度は低く、非照射条件下では遺伝毒性を示さないと結論した。光照射群では、コメントアノセイ、小核試験とも同し濃度域で有意な陽性反応が認められたことから、コウシ酸は光照射条件下において、強い光毒性を示す濃度範囲で遺伝毒性作用を有することが示唆された。

6 ヒト培養細胞を用いた *In vitro* 遺伝毒性については、TK6, WTK-1 細胞とも、遺伝子突然変異頻度、小核誘発頻度の増加が認められた。自然小核の約 50% は動原体陽性小核であり、この割合は、アクリルアミド誘発小核でも大きく変わらなかった。

7 トランスジェニックマウスを用いた肝臓での *in vivo* 遺伝子突然変異を検討した結果、陰性対照群の突然変異頻度は 42.5×10^{-6} 、各個体の平均値では 44.0×10^{-6} であった。コウシ酸処理群での突然変異頻度は 10% 群で 42.8×10^{-6} 、20% 群で 43.8×10^{-6} 、30% 群で 39.2×10^{-6} であり、陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。

D 考察

化学物質の安全性評価において遺伝毒性に関する情報は、がん原性および次世代への遺伝的影響の予測において重要な役割を果たしている。遺伝毒性において最も重要な特徴は閾値がないとされてい

ることであろう。この考えに基づき、我々は遺伝毒性物質、とりわけ意識的にさけることの出来るものおよび有用性が危険性を大きく上回らないものを排除すべきとの立場をとってきた。基本的には、医薬品のように有用性が認められる物質についても同様の考えに基づき安全性を評価してきた。かん原性物質であっても遺伝毒性が認められない場合には閾値を仮定することが出来、一日摂取許容量 (ADI) が設定可能であると考えてきた。一方、遺伝毒性メカニズムが原因であるかん原性物質に関しては閾値および ADI を設定することは出来ない、すなわち暴露が非常に低くても依然としてリスクを考えなければならないと考えてきた。

理論的に遺伝毒性は遺伝物質と被験物質が衝突する確率論に基づいている。従ってそれは暴露量に関連することになる。すなわち、暴露量が高いときには高い確率で起こり、暴露量が低い時には低い確率で起こる。実際の遺伝毒性試験のデータを見ると、例えば、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において 20% の分裂細胞に染色体異常を誘発する被験物質の濃度は大きくばらつくことが知られている。また、弱い染色体異常誘発物質では低い頻度でしか染色体異常を誘発しないが、強いものでは、ほぼ 100% の細胞に染色体異常を誘発する。これまでは、強さに大きな差があるにもかかわらず、定量的な情報を無視した形で単に染色体異常誘発性物質として扱ってきた。これは、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験のみならず細菌を用いる復帰突然変異試験、げっ歯類を用いる小核試験結果

についても同様の取り扱いがなされてきた。しかし、下等なものから高等なものまで全ての生物は、遺伝毒性の最初のステップである DNA 損傷を修復する機能を備えている。この機能により、特に低レベルの損傷は効率よく修復される。従って、遺伝毒性に関しても、少なくとも実質的には、閾値の存在を期待することかできると考える。この考えに基づく遺伝毒性評価のための戦略を構築する必要はあるものとする。

我々は日本環境変異原学会の臨時作業委員会「食品および関連物質の遺伝毒性に関する試験データに基づく安全性評価のための戦略」と共同し、本研究班との共同作業を行っている。食品および関連物質に関する戦略が構築されれば、医薬品、農薬、工業化学物質のような他の化学物質の評価にも用いることができるものと考えている。

コウシ酸の遺伝毒性に関しては以下のことが考えられた。

- 1 コウシ酸はサルモネラ菌に対し直接変異原性を示し、S9 により僅かに抑制されることが明らかになった。
- 2 コウシ酸の投与濃度増加に伴って肝臓 DNA 中の 8-OH-dG 量が増えていること、投与濃度 30(wt%)の値が陰性対照に比べ有意に高いことから、コウシ酸の 28 日間経口摂取により、生体内酸化ストレスが亢進し、肝臓 DNA に酸化傷害が起こったと考えられた。
- 3 コメント法による DNA 初期損傷試験から、コウシ酸はヒトリンパ腫由来の培養細胞に対して DNA 損傷性をもつことを示された。

4 バクテリアによる突然変異スペクトルの結果からは、コウシ酸の変異原性において活性酸素の関与を否定するものではないが、DNA の酸化的損傷以外にも DNA 付加体が関与していることが示唆された。

5 光プラスミド切断法、および光照射による小核試験から、コウシ酸は光遺伝毒性作用を有することが示唆されたが、プラスミド切断法、培養細胞を用いた試験ともに、数ミリモルといった非常に高い濃度でのみ観察された現象であり、ヒトに対して光発がん作用を示す可能性は低いと考えられた。

6 コウシ酸は TK6, WTK-1 の両細胞において用量依存的に遺伝子突然変異と、小核の誘発を示したことから、*in vitro* において明らかに遺伝毒性を有するか、試験濃度を考慮すると、コウシ酸による遺伝毒性の程度は極めて弱いものと判断された。また、小核の誘発は染色体の不分離によるものではないことが明らかとなった。

7 コウシ酸は靨餌投与において雌の肝臓に腫瘍を誘発することが確認されているが、本結果から肝臓での遺伝子突然変異頻度の増加はみられなかった。したがって、コウシ酸が *in vivo* において遺伝毒性を示す可能性は低いものと推察された。

E 結論

食品関連物質の遺伝毒性の評価、解釈をするための戦略を構築するため、日本環境変異原学会の臨時作業委員会と共同し、定例の班会議を毎月開催し、等研究班の

統一的な考えについて検討を続けた。また、本戦略を国際的なものとするため、海外から指導的立場にある研究者をコンサルタントとして招聘し、議論、提言を受けた。

本戦略を構築するためのモデルとして、コウシ酸を選択し、評価に必要と考えられる試験を実施し、データの蓄積に努めた。

コウシ酸は多くの *in vitro* 遺伝毒性試験において陽性を示したことから、遺伝毒性物質であることが明らかとなったか、試験濃度を考慮するとその程度は弱いものと考えられた。一方、肝臓においてはわずかな 8-OH-dG 量の増加が見られたが、突然変異の増加は観察されず、肝臓での腫瘍の誘発を、コウシ酸による遺伝毒性によって合理的に説明することはできなかった。

F 研究発表

論文発表

- 1) Saotome, K, and M Hayashi (2003) Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution influence of sample osmolality, *Mutagenesis*, 18, 73-76
- 2) Hamada, S, K Nakajima, T Serikawa and M Hayashi (2003) The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay, *Mutagenesis*, 18, 273-275
- 3) Hamada, S, K Nakajima, C Namiki, T Serikawa, and M Hayashi (2003) Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat, *Environ Mutagen Res*, 25, 33-37
- 4) Kirkland, D J, M Hayashi, J T

MacGregor,

L Muller, L M Schechtman, and T Sofuni (2003) Summary of major conclusions—the 3rd International Workshop on Genotoxicity Testing—, *Mutat Res*, 540, 123-125

- 5) Muller, L, D Blakey, K L Dearfield, S Galloway, P Guzzie, M Hayashi, P Kasper, D Kirkland, J T MacGregor, J M Parry, L Schechtman, A Smith, N Tanaka, D Tweats, and H Yamasaki (2003) Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat Res*, 540, 177-181

学会発表

- 1) M Honma, M Izumi, M Sakuraba, S Tadokoro, H Sakamoto, W Wang, F Yatagai, and M Hayashi Deletion, rearrangement, and gene conversion, the genetic consequences of chromosomal double strand breaks in human cells EEMS, Aberdeen, 2003
- 2) M Hayashi Advantages and limitations of micronucleus assay- validation studies on *in vivo* micronucleus assay using other than haemopoietic cells- 5th International Symposium on Chromosomal aberrations, Essen, 2003
- 3) M Hayashi Plenary lecture—*In vivo* micronucleus assay historical review and current improvement JEMS-KEMS Joint Symposium, Seoul, 2003
- 4) M Hayashi Some topics on risk assessment of carcinogenic chemicals-

Mutagenicity testing- 第 30 回日本ト
キシコロンー学会, 神奈川, 2003

5) 林 真 小核試験 第 17 回日本動物
実験代替法学会, 神奈川, 2003

6) M Hayashi Strategy for safety
assessment of food and related
chemicals based on genotoxicity assay
data International Symposium on “Risk
Assessment Strategy in Genotoxicity of
Food and Related Substances”, Tokyo,
2004

G. 知的所有権の取得状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究
—DNA 付加体形成に関する検討—

分担研究者 長尾 美奈子（共立薬科大学 客員教授）

研究要旨

コウシ酸はサルモネラ菌に対し変異原性を示すことを認した。そのコウシ酸を HPLC で分離し、変異原性がコウシ酸自身に由来するのか、夾雑物に由来するのかを検討した。□S9 mix および+S9 mix で検出される変異原性は全てコウシ酸自身に由来することを明らかにした。

A. 研究目的

既存添加物として登録されているコウシ酸に、マウスにおいて甲状腺および肝臓における腫瘍誘発活性があることが 1998 年に報告された¹⁾。その後コウシ酸の *m vivo* 投与により、マウス肝における小核の誘発が²⁾、さらにラット骨髄および抹消血における小核誘発活性が示され³⁾、コウシ酸が遺伝毒性発がん物質である可能性が示された。一方、フランスからの報告では、サルモネラ菌を用いた変異原性試験、チャイニーズハムスター V79 や HepG2 ヒト肝がん培養細胞を用いた変異原性試験で陰性であったとの報告がある⁴⁾。本研究では、DNA 付加体解析に先立って、コウシ酸の変異原性が製造 Lot により異なるか、変異原性はコウシ酸自身によるのか、混入不純物に起因するかを検討した。

B. 研究方法

- 1 試料に供したコウシ酸 コウシ酸 Lot 番号 052K2516 (シグマ), 2Y181 (化粧品用), 5312 (食品添加物用)を用いた
- 2 変異原性試験 サルモネラ菌 TA100 を用い *preincubation* 法により、S9 mix 存在下および非存在下で、変異原性の有無を検討した。ラット S 9 はオリエンタル酵母社製 [C₇] CD(SD), 7 週齢, オス, フェノルヒタールおよび 5, 6-ナフトフラボンにより誘導]を用いた。S 9 mix 500 μ l 中の S9 含量は 50 μ l であるように調整した。
- 3 HPLC 解析 Shuseido Capcell Pack C18 UG120 (粒径 5 μ m, 4.6 mm i.d. x 250 mm), 分離カラム温度, 40 °C, 移動相, メタノール—0.05%トリフルオロ酢酸 (3—97), 移動相流速, 1.0 ml/min, 測定波長, 270 nm を用いた。

4 UV-VIS 吸収 Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer を用いた

5 NMR 解析 日本電子社製 JEOL ECP-600 を用いた 溶媒に DMSO-d₆ を用い、¹H-NMR および ¹³C-NMR により解析した

C 研究結果

1 変異原性 コウシ酸 052K2516, 2Y181, 5312 いずれの Lot も -S9 mix で TA100 に変異原性を示した その活性は各々 103, 116, 146/mg で Lot による差は認められなかった

2 HPLC による分離 コウシ酸サンプル 052K2516, 2Y181 および 5312 を 25 mg/ml の濃度に水に溶解し、20 μl を HPLC にて分離した 図-1 に 5312 について示すようにいずれのサンプルも 270nm の吸収でモニターした結果、一つの溶出ピークを示した

次に各サンプルを 200 μl ロードし、2 回 HPLC 分画を行い、270 nm の吸収物質を含む分画および吸収物質を含まない分画をプールし、TA100, -S9 mix で変異原性を調べた結果、いずれのサンプルも 270 nm の吸収を持つ分画のみが変異原性を示した 052K2516 について 50 mg のコウシ酸を HPLC で分画し、-S9 mix で調べた変異原性の溶出パターンを図-2 に示す この結果から、270 nm の吸収を持つ物質以外に変異原性を示す物質は、カラムから溶出されないことが明らかになった さらに、変異原物質がカラムに吸着され、実験条件下で溶出されない可能

性も考えられたので、052K2516 について、オリジナルサンプル、およびカラム溶出分画の mg 当たりの変異原活性を調べた その結果を図-3 に示す カラム溶出分画 3 および 4 は + および -S9 mix 条件下で、オリジナルサンプルと同等の比活性を示した

3 UV 吸収パターン 052K2516 の HPLC の分画 3 および 4 の 0.025mg/ml 溶液を調整し、UV-VIS の吸収を測定した いずれも 216 および 268.8 に吸収極大を示した

4 NMR 解析 052K2516 の HPLC 分画 3 および 4 について、のプロトノ解析により、図-4 に示す Ha, Hb, Hc, Hd, He をそれぞれ 8.02, 6.33, 4.29(doublet), 9.05(doublet), 5.65(triplet) ppm のピークとして検出した また、D₂O の添加により、9.05 および 5.65 ppm のピークの消失を確認した さらに ¹³C-NMR により、C₃(C=O) を 176.09 ppm, C₆(CH₂) を 61.68 ppm のピークとして確認した C₁, C₂, C₄ および C₅ を、176.09, 112.04, 147.91, 141.44 ppm のピークとして確認した NMR により、分画 3 および 4 はコウシ酸であることを確認した さらに、NMR で検出できる夾雑物の混入は無いことを明らかにした

D 考察

コウシ酸はサルモネラ菌に対し直接変異原性を示し、S9 により僅かに抑制されることか明らかになった さらに、052K2516 サンプルには変異原性を示す

夾雑物の混入が無いことを明らかにした食添（5312）および化粧品（2Y181）に使用されているサンプルの変異比活性はほぼ同じであることから，変異原性夾雑物の混入は無いと考えられるが，この点については，確認の必要がある

E 結論

コウシ酸はサルモネラ菌に対し変異原性を示すことを認めた。そのコウシ酸をHPLCで分離，解析した結果，変異原性は全てコウシ酸自身に由来することを明らかにした

F 参考文献

- 1) Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, and Ito A Induction of thyroid tumors in (c57BL/6N x C3H/N) F1 mice by oral administration of Kojic acid Food Chem Toxicol 36, 697-703, 1998
- 2) 佐々木 有コウシ酸の in vivo コメント アノセイおよび再生肝小核試験 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会資料
- 3) 林 真 コウシ酸の幼若ラットを用いる小核試験 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会毒性・添加物合同部会資料
- 4) Nohynek GJ, Kirkland D, Marzin D, Toutain H, Leclerc-C, Jinnai H An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of Kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one] Food Chem Toxicol 42, 93-105,

2004

G. 研究発表

発表論文

- 1) Yonezawa K, Nakagama H, Tajima R, Ushigome M, Ogra Y, Suzuki KT, Yoshikawa K, Nagao M Effects of soy protein isolate on LEC rats, a model of Wilson Disease mechanisms underlying enhancement of liver cell damage Biochem Biophys Res Commun 2003, 302, 271-4
- 2) Yonezawa K, Nunomiya S, Daigo M, Ogra Y, Suzuki KT, Enomoto K, Nakagama H, Yoshikawa K, Nagao M Soy protein isolate enhances hepatic copper accumulation and cell damage in LEC rats J Nutr 2003, 133, 1250-4
- 3) Kitamura K, Nagao M, Choi JW, Hashimoto S, Ito H, Morita M Effective pretreatment of human serum samples for dioxin analysis by solid phase extraction and blue-chitin column cleanup Analyst 2003, 128, 986-93
- 4) Huang H, Usujima T, Nagao M, Sugimura T, Ohgaki H Beta-catenin mutations in liver tumors induced by 2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoline in CDF1 mice Cancer Lett 2003, 198, 29-35
- 5) Fujiwara K, Ochiai M, Ubagai T, Ohki M, Ohta T, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H Differential gene expression profiles in colon epithelium of two rat strains

- profiles in colon epithelium of two rat strains with distinct susceptibility to colon carcinogenesis after exposure to PhIP in combination with dietary high fat *Cancer Sci* 2003, 94, 672-8
- 6) Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induce by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-pyridine *Am J Pathol* 2003 163, 1607-14
- 7) Enokizono Y, Matsugami A, Uesugi S, Fukuda H, Tsuchiya N, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H, Kagami M Destruction of quadruplex by proteins, and its biological implications in replication and telomere maintenance *Nucleic Acids Res suppl* 2003, (3), 231-2
- 8) Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M Heterocyclic amines Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish *Cancer Sci* in press
- 2) 長尾美奈子 大豆食品のLECラットに及ぼす影響 LECラット研究会特別講演 第13回大会(さいたま市) 2002, 5, 28
- 3) 長尾美奈子, 杉村 隆 アクリルアミトおよびヘテロサイクリンクアミンのリスク評価 第18回発がん病理研究会 2003, 8, 26~28

H 知的所有権の取得状況

特になし

学会発表

- 1) 長尾美奈子, 日本環境変異原学会臨時委員会 リスクアセスメントの現状と展望 食品添加物の立場からー遺伝毒性発がん物質であるコウシ酸を例にー日本環境変異原学会 第32回大会, 津市, 2003 11

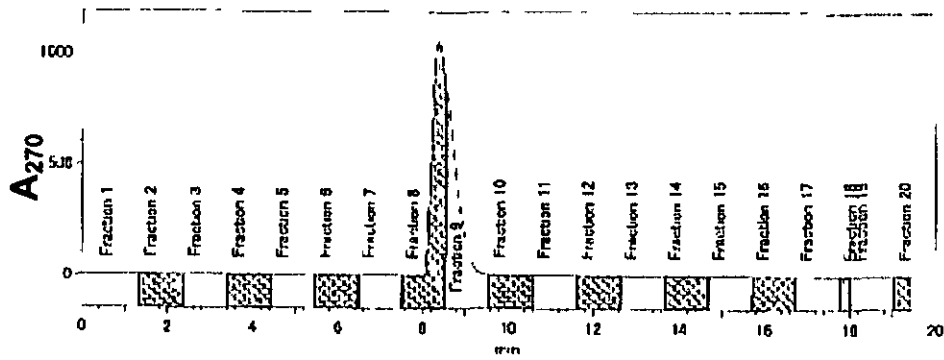


図-1 コウシ酸 5312 の溶出パターン

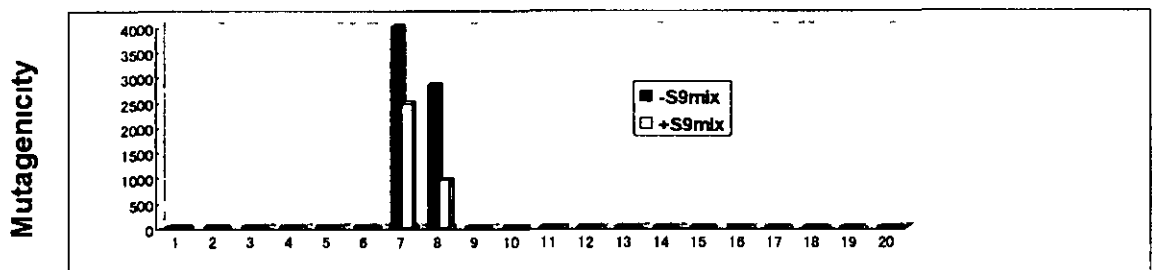
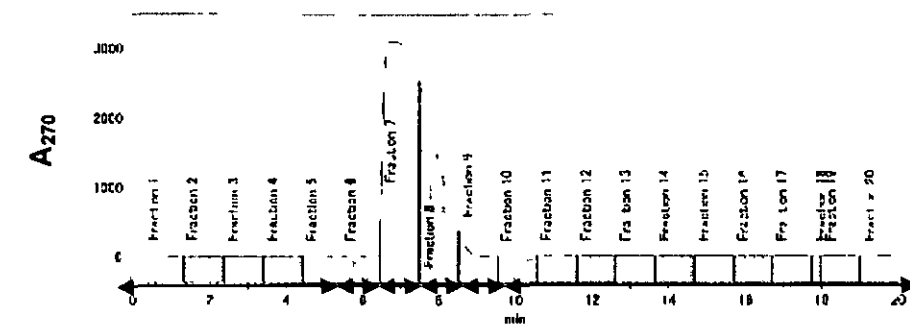
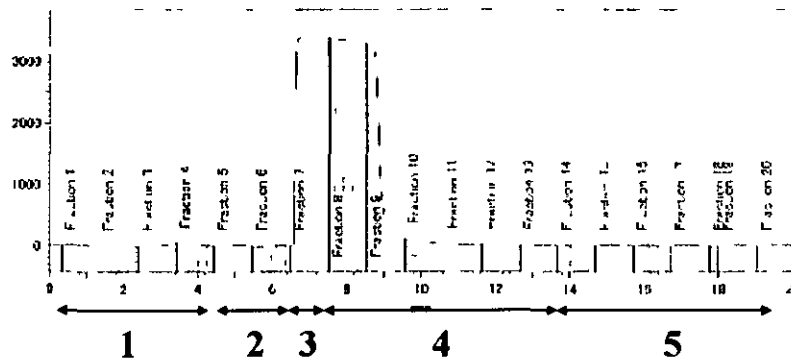


図-2 コウシ酸のHPLC分離による270nm吸収と変異原性の溶出パターン

052K2516



Solvent: DMSO	Mutagenicity (revertants/mg)	
	-S9mix	+S9mix
Original	89	41
Fraction 1	0	0
2	0	0
3	95	44
4	83	45
5	0	0

図-3 コウシ酸のHPLC分離による270nm吸収と各フラクションの変異原性

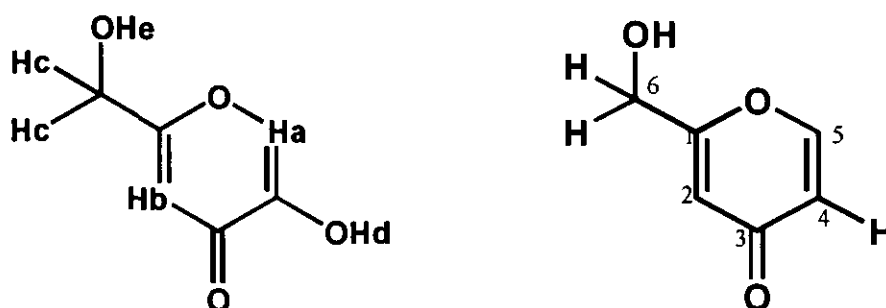


図-4 プロトンおよび炭素の同定

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

—DNA の酸化的損傷に関する研究—

分担研究者 葛西 宏 （産業医科大学・産業生態科学研究所 教授）

研究要旨

コウシ酸を投与したマウス肝 DNA を分離し、酸化的 DNA 損傷の一種 8-ヒドロキシデオキシグアノシンを測定したところ、投与量に依存した増加が見られた

A 研究目的

コウシ酸は、化粧品などの医薬部外品等や食品に添加物として使用されている。しかし、遺伝毒性に対して明確な結論が出ておらず、実験動物の肝臓に対する発がん性が示されていること等から安全性について見直しがされている。本研究では、肝臓に対する発がん性メカニズムを探る目的で、コウシ酸によるマウス肝臓の酸化的 DNA 損傷性について検討した。

B 研究方法

生体内酸化ストレスマーカーである DNA 中の 8-OH-dG を測定することにより、コウシ酸投与により生じる生体内酸化ストレスを検討評価した。実験は、遺伝子突然変異試験に用いた MutaTM Mouse から肝臓を摘出して行った。コウシ酸は、混餌法により、10、20、30 wt% の濃度で 28 日

間投与した。肝臓の一部（それぞれ約 0.3 g）を、細胞溶解液中でホモシナイスし、細胞核を遠心分離した。タンパク分解酵素で核膜および核タンパクを破壊した後、ヨウ化ナトリウム法により DNA を抽出。ヌクレアーゼ P₁ 及びアルカリフォスファターゼによりヌクレオシドに分解し、HPLC-電気化学検出器を用いて DNA 中の 8-OH-dG を検出定量した。同時に UV 検出器で試料中の dG 量を定量し、DNA 中の 8-OH-dG 量を、10⁶ dG あたりの値として算出した。HPLC 分析条件は、カラム、Shiseido CAPCELL PAK C18 MG 4.6 mm ID x 150 mm、溶出液、10 mM sodium phosphate (pH 6.7)、8% MeOH、流速、1.0 ml/min、ECD、ESA Coulochem II, guard cell, +0.35V, detector 1, +0.15V, detector 2, +0.30V、UV、東ソー、UV-8020、290 nm、2.56 full scale で行った。

C 研究結果

DNA 中の 8-OH-dG 量は、 10^6 dG あたり次のようになった 陰性対照 1.32 ± 0.18 , コウシ酸 1.0(wt%) 投与群 1.86 ± 0.48 , 2.0(wt%) 投与群 2.08 ± 0.25 , 3.0(wt%) 投与群 3.18 ± 0.53 いずれも、平均値 \pm 標準誤差、 $n=5-8$ コウシ酸 3.0(wt%) 投与群の値は、陰性対照に比べ有意に高かった (t 検定、 $p<0.05$) (図 1, 2)

D 考察

コウシ酸の投与濃度増加に伴って肝臓 DNA 中の 8-OH-dG 量が増えていること、投与濃度 3.0(wt%) の値が陰性対照に比べ有意に高いことから、コウシ酸の 2.8 日間経口摂取により、生体内酸化ストレスが亢進し、肝臓 DNA に酸化損傷が起これたと考えられる。コウシ酸がマウスの肝臓に対して発がん性を示す可能性が確認され、その肝発がんにはコウシ酸の肝傷害性やイオン交換作用も関与している可能性が示唆されているが、今回の結果を合わせて考えると、肝臓での酸化ストレス亢進が、その一要因となっている可能性がある。コウシ酸によるマウス肝臓の酸化損傷の機構解明を含め、今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。また、実験動物を用いた結果を評価する際、系統差が議論されることがあるが、今回用いた MutaTM Mouse の肝臓 DNA 中の 8-OH-dG 量 (陰性対照群で 10^6 dG あたり 1.32) は、実験動物としてよく用いられる BALB/c 系統マウスと比較して同程度であり、DNA 中の 8-OH-dG を

指標とした生体内酸化ストレス実験に用いる動物として、系統上の問題はないと思われる。

E 結論

コウシ酸を 3.0(wt%) 含む餌 2.8 日間投与によりマウス肝臓 DNA に酸化損傷がみられた。発がん性との関連が示唆され、さらに詳細な検討が必要である。

F 研究発表

論文発表

- 1) Sato Y, Nanri H, Ohta M, Kasai H, Ikeda M. Increase of human MTH1 and decrease of 8-hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA by acute and chronic exercise in healthy male subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 305:333-8(2003)
- 2) Mei N, Tamae K, Kunugita N, Hirano T, Kasai H. Analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine 5'-monophosphate (8-OH-dGMP) as a reliable marker of cellular oxidative DNA damage after gamma-irradiation. *Environ Mol Mutagen* 41:332-8(2003)
- 3) Kasai H. A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system. *J Radiat Res*, 44, 185-189 (2003)
- 4) Maeng SH, Chung HW, Yu IJ, Kim HY,