

- Lim CH, Kim KJ, Kim SJ, Ootsuyama Y, Kasai H Changes of 8-OH-dG levels in DNA and its base excision repair activity in rat lungs after inhalation exposure to hexavalent chromium *Mutat Res* , 539 109-16 (2003)
- 5) Hirano T, Kudo H, Doi Y, Nishino T, Fujimoto S, Tsurudome Y, Ootsuyama Y, Kasai H Detection of a smaller, 32-kDa 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene-treated mouse liver *Cancer Sci* , 95 118-22 (2004)
- G** 知的所有権の取得状況
特になし

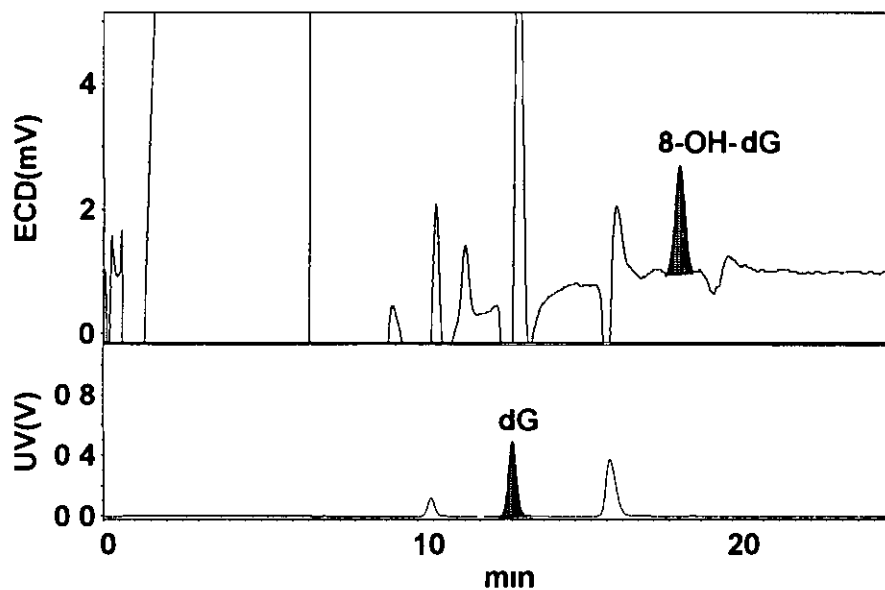


図1 HPLC-ECDによるコウジ酸投与マウス肝臓 DNAの8-OH-dG分析

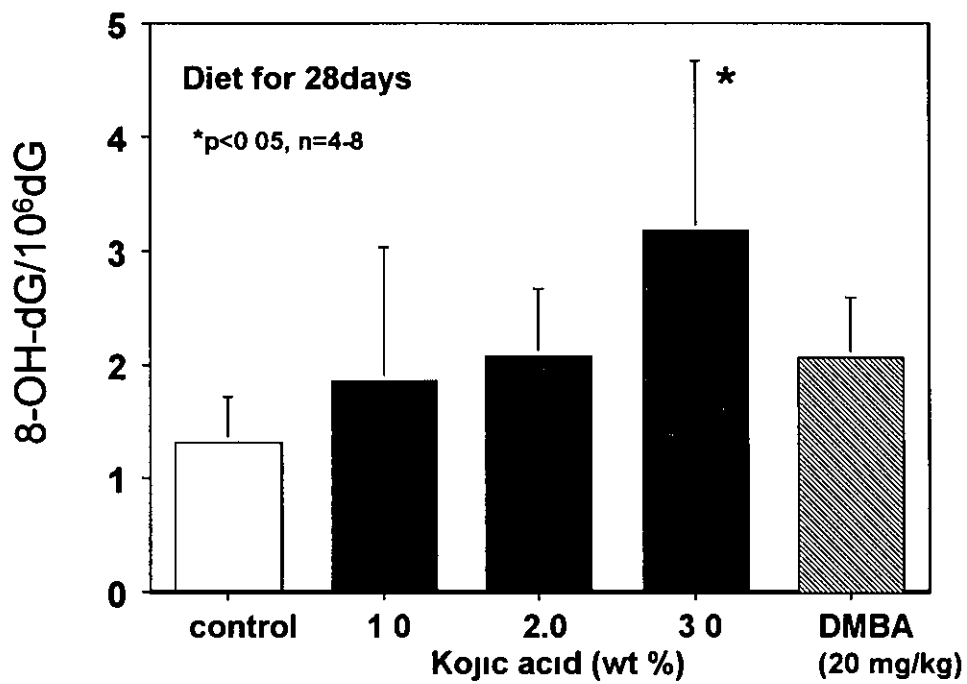


図2 コウジ酸投与マウス肝臓 DNAの8-OH-dGレベル

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

—In vitro DNA 損傷性に関する検討—

分担研究者 佐々木 有（八戸工業高等専門学校・物質工学科 教授）

研究要旨

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損傷性をコメント法で検討した。コウシ酸の最高濃度は5000 $\mu\text{g/mL}$ とし、代謝活性化系を用いない場合は4、8時間の処理、代謝活性化系を用いる場合は8時間の処理とした。用いたコウシ酸の3つのロットとも、代謝活性化系の有無にかかわらず、統計的に有意な泳動長の増大を示した。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 $\mu\text{g/mL}$ 以上という高濃度域に限られるものであった。以上の結果から、本研究に用いたコウシ酸は3つのロットのいずれもWTK1細胞、TK6細胞に対するDNA損傷性があるものと考えられた。

A 研究目的

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* コメント法で検討する

B 研究方法

1 研究材料 本研究に用いたコウシ酸のロット番号は2Y181, K-3125, 5312であり、いずれもNメチルスルホキシドに溶解して用いた。本研究にはヒトリンパ球由来の株細胞 WTK1 と TK6 を用いた。この細胞は国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部の本間正充博士より分与されたものである。両細胞ともRPMI1640（日水製薬株式会社）に牛胎仔血清を10%、ピルヒ

ン酸ナトリウムを200 $\mu\text{g/mL}$ 、硫酸ストレプトマイシンを200 $\mu\text{g/mL}$ で添加した培地を用いて37°C、5%二酸化炭素下で培養した。代謝活性化系としてフェノールヒタールと5,6-ヘンゾフラボンで誘導したラット肝S9（オリエンタル酵母工業株式会社）を用いた。

2 細胞の処理方法 WTK1 と TK6 細胞を、それぞれ 5×10^5 cell/mL の濃度で6 cm シャーレに播いた。その24時間後にコウシ酸を5000 $\mu\text{g/mL}$ 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シ酸を添加した4、8時間後に細胞を回収してコメント法のための標本作製した。代謝活性化系を用いる場合は、コウ

シ酸と同時に S9 mix を添加し、4 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。このときの処理培地の組成は 4 mM MgCl₂·6H₂O, 16.5 mM KCl, 2.5 mM glucose-6-phosphate, 2 mM NADPH, 2mM NADH, 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 5% S9 である。

- 3 コメント法 回収した細胞は約 100 μ L の生理食塩水に再懸濁した。スライドガラス上に生理食塩水に 1%で溶解した GP42 アガロース (ナカライテスク) 75 μ L をのせ、直ちにマツナミガラス製のスーパーフロストスライドガラスを被せて板状に広げて第 1 層ゲルとした。回収した細胞の再懸濁液の 100 μ L を 2%で溶解した低融点アガロース (ナカライテスク) 100 μ L と混ぜ、その 75 μ L を第 1 層ゲルに重層して広げ、第 2 層ゲルとした。さらに、GP42 アガロース 75 μ L を重層して広げ、第 2 層ゲルとした。このようにして作製した標本を細胞溶解液 (2.5 M NaCl, 100 mM Na₄EDTA, 10 mM Trizma, 1% sarkosyl, 10% DMSO, 1% Triton X-100) に漬けた。遮光、0°C で 1 晩静置した後、サブマリン型電気泳動槽に移し、予め 0°C に水冷しておいた電気泳動液 (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH>13) に沈めて遮光で 20 分間静置し、DNA をアルカリ変性させた後、1 v/cm, 300 mA, 遮光で 20 分間電気泳動した。電気泳動の後、中和液 (400 mM Trizma, pH7.5) に漬けて、メタノールで脱水し、乾燥させた。20 μ g/mL のエチジウムブロマイドで染色し、G 励起フ

ィルターを装着した蛍光顕微鏡を用いてコメント像の写真を撮影した。用いたフィルムはフシ写真工業株式会社製のネオパンプレスト ASA400 である。規定の方法により現像したネガを写真用引き延ばし機に装着してコメント像を拡大投影し、コメント像の全長 (ヘッドからテール端まで) を泳動長 (Migration) として測定した。50 核のコメント像の全長の平均と標準偏差を求め、一元配置分散分析と Dunnett の多重比較によってコウシ酸で処理した細胞と対照の細胞の差の有意性を検定した。

(倫理面への配慮)

本研究は既に樹立されている培養細胞を用いたものである。そのため、倫理面への問題はないものと判断される。

C 研究結果

WTK1 細胞, TK6 細胞を用いて行った実験結果を、それぞれ、表 1, 表 2 に示した。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。3 つのロットの間で、コメント法陽性の程度に顕著な差はみられなかった。代謝活性化系を用いた場合も、TK6 細胞に対する K-3125 の場合を除いて、統計的に有意な泳動長の増大がみられたが、その増大は代謝活性化系を用いない場合よりも低い傾向にあった。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 μ g/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。以上の結果から、本研究に用いたコウシ酸の3つのロットのいずれも WTK1 細胞、TK6 細胞に対する DNA 損傷性があるものと考えられた。

D 考察

コメント法は DNA 初期損傷を DNA の低分子下として検出する試験系である。顕著な細胞毒性みられる場合には、細胞毒性に起因する DNA の分解がコメント法陽性の原因ともなる。しかし、コウシ酸は 5000 µg/mL 以下の濃度で細胞毒性を示さなかった。そのため、ここで示されたコメント法陽性の結果は、細胞死に起因するものとは考えられない。すなわち、ここで示された結果はコウシ酸がその規格にかかわらず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すものである。

E 結論

本研究に用いたコウシ酸の3つのロットのいずれも WTK1 細胞、TK6 細胞に対する DNA 損傷性があるものと考えられた。

F 研究発表

論文発表

- 1) Sasaki, YF, K Sekihashi, H Saitoh, S Hori, M Nakagawa and M Miyagawa (2003) Effect of in vitro exposure time on comet assay results, Environ Mutagen Res, 25, 83-86

- 2) Ohsawa, K S Nakagawa, M Kimura, C Shimada, S Tsuda, K Kabasawa, S Kawaguchi, YF Sasaki (2003) Detection of in vivo genotoxicity of endogenously formed *N*-nitrosocompounds and its suppression by ascorbic acid, teas and fruit juices, Mutat Res, 539, 65-76

G. 知的所有権の取得状況

特になし

表1 WTK1細胞を用いたコウシ酸に関する in vitro コメント法の結果

Lot No of Kojic acid	Dose (μg/mL)	Migration (μm)		
		- S9 mix		+ S9 mix
		4 h	8 h	4 h
2Y181	0	22.3	21.8	23.8
	312.5	23.2	25.8	24.1
	625	21.9	22.7	23.1
	1250	26.7	24.5	27.6
	2500	26.7	27.0	25.1
	5000	46.3*	38.5*	33.4*
K-3125	0	22.3	21.8	23.8
	312.5	20.2	20.9	22.5
	625	22.9	22.3	24.3
	1250	24.9	21.5	24.9
	2500	38.7*	27.7	31.2*
	5000	37.2*	40.1*	34.6*
5312	0	22.3	21.8	23.8
	312.5	21.9	22.3	25.7
	625	21.8	23.1	25.4
	1250	27.7	24.7	27.7
	2500	39.9*	31.6*	30.2
	5000	38.5*	38.5*	32.3*

*P<0.05

表2 TK6細胞を用いたコウシ酸に関する in vitro コメント法の結果

Lot No of Kojic acid	Dose (µg/mL)	Migration (µm)		
		- S9 mix		+ S9 mix
		4 h	8 h	4 h
2Y181	0	23.1	22.5	24.6
	312.5	23.5	24.7	24.6
	625	22.0	25.3	24.6
	1250	23.9	30.0	26.4
	2500	27.5	27.4	26.5
	5000	40.0*	37.8*	32.7*
K-3125	0	23.1	22.5	24.6
	312.5	21.3	22.2	24.9
	625	22.9	24.8	22.5
	1250	22.2	24.2	27.3
	2500	34.0*	31.9*	29.7
	5000	36.8*	37.1*	29.2
5312	0	23.1	22.5	24.6
	312.5	23.3	24.2	26.5
	625	21.7	24.3	23.6
	1250	24.8	25.8	28.4
	2500	41.7*	29.6	28.4
	5000	41.5*	36.0*	33.4*

*P<0.05

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
—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—

分担研究者 太田 敏博（東京薬科大学・生命科学部 助教授）

研究要旨

純度の異なるコウシ酸の3ロットについて、細菌を用いた復帰突然変異試験を行ったか、変異原性の強さに差は認められなかった。コウシ酸の変異原性はサルモネラ菌 TA100, TA98, TA102 株と大腸菌 WP2*uvrA*/pKM101 株で認められた。S9 mix の存在下では変異原性が弱くなる傾向が見られた。

コウシ酸は300–320 nm に吸収があるのでUVA照射による変異原性の増強についても4菌株で調べたが、変化は認められなかった。

さらに、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。GC→AT 変異が最も多く誘発されたか、活性酸素による突然変異に特徴的な GC→TA, AT→TA 変異の誘発は顕著ではなかった。

A 研究目的

コウシ酸の微生物を用いた変異原性試験に関しては、いくつかの論文が報告されているが、陽性を示した菌株の種類や変異原性が検出される用量、変異原性の強さが大きく異なっており、その変異原性の一部が不純物に起因している可能性も否定できない。また、試験に用いた手法（プレート法とプレインキュベーション法）の違いで菌株に対するコウシ酸の生育阻害作用が大きく異なることも試験結果に影響を及ぼしていると考えられる。そこで本研究ではコウシ酸の変異原性を詳細に検討することを目的として以下の実験を実施した。(1) 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する。(2) 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、活性酸素の関与について考察する。(3) コウシ酸の光活性化の可能性について調べるため、UVA照射による変異原性の増強の有無を試験する。(4) 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、既存の変異原のスペクトルと比較することで、誘発変異の特徴を見出す。

B 研究方法

- 1 コウジ酸。国立医薬品食品衛生研究所より配布された3種類のコウジ酸(ロット番号 2Y181, K-3125, 5312)を試験に用いた。コウジ酸は100 mg/mLの濃度でDMSOに溶解させて用いた。ロット5312のサンプルはDMSO溶液が淡黄色を示したが、他の2種は無色透明であった。
- 2 試験菌株。コウジ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。これらの菌株では Lac⁺ 復帰変異を指標として各々、AT→CG, GC→AT, GC→CG, GC→TA, AT→TA, AT→GC 変異の誘発を定量することができる。
- 3 S9 mix。フェノールヒターール及び5, 6-ヘンゾフラボンで酵素誘導したSDラットの肝臓より調製されたS9分画とコファクターは市販品(オリエンタル酵母工業株式会社製造)を購入して用いた。S9 mixの組成は、4 mM NADPH, 4 mM NADH, 5 mM G-6-P, 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 100 mM ナトリウムリン酸緩衝液(pH7.4), 10% S9分画である。
- 4 復帰突然変異試験。保存菌液を解凍し、5~6 mLのニュートリエントブロスに5 µLの接種量で植え、37°Cで15~16時間振盪培養した菌液を用いた。
被験物質溶液 0.1 mL と S9 mix あるいは 0.1 M Na-リン酸緩衝液 0.5 mL とテスト菌株の培養液 0.1 mL を試験管に入れ、良く混合し 37°Cで 20 分間プレインキュベーションした 2 mL のトノプアガーを
- 加え、直ちに最少グルコース寒天プレート上に広げて固めた。プレートを 37°Cで 48 時間培養した後、His⁺ または Trp⁺ 復帰変異コロニー数を測定した。
- 5 UVA 照射。24-well プレートの各 well に Na-リン酸緩衝液 0.5 mL, 菌培養液 0.1 mL とコウジ酸溶液 0.05 mL を加え混合した 15W ブラックライト (300-400 nm, National FL15BL-B, 250 µW/cm²) を用い、320 nm 以下の UVB 波長をカットするために 5 mm 厚の軟質ガラスを通して UVA を 10 分間照射した。なお UVA 照射のみではいずれの菌株にも変異原性は示さない。照射後 well 内の混合液を 2 mL トノプアガーに加えて最少グルコース寒天プレート上に広げ、37°Cで2日間培養後、復帰変異コロニーを計数した。
- 6 Lac⁺ 復帰突然変異による突然変異スペクトル解析。保存菌液を解凍し、5~6 mLのMGT最少培地に5 µLの接種量で植え、37°Cで16~18時間振盪培養した菌液を用いた。
被験物質溶液 0.1 mL と 0.1 M Na-リン酸緩衝液 0.5 mL とテスト菌株の培養液 0.1 mL を試験管に入れ、良く混合し 37°Cで 20 分間プレインキュベーションした 2 mL のトノプアガーを加え、直ちに最少グルコース寒天プレート上に広げて固めた。プレートを 37°Cで 48 時間培養した後、Lac⁺ 復帰変異コロニー数を測定した。

C 研究結果

- 1 コウジ酸の変異原性。TA100, WP2uvrA/pKM101 株においては 2.5 mg/plate 以上の用量で、また TA98 株では 1.25 mg/plate 以上の用量で菌株の生育阻

害が認められた。一方、S9mix の存在下ではコウシ酸の生育阻害は認められなかった。

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 (Table 1, 2)。また、コウシ酸の 3 種類のロットにおける違いは認められなかった。

2 コウシ酸の変異原性に対する UVA 照射の影響 コウシ酸は 300~320 nm に吸収があるので UVA 照射による変異原性の増強についても 4 菌株で調べたが、変化は認められなかった (Table 2)。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。

3 コウシ酸の突然変異スペクトル 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。GC→AT 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。一方、活性酸素を生成する変異原の Cumene hydroperoxide, Hydrogen peroxide では、特徴的な GC→TA, AT→TA 変異の誘発が顕著に見られた (Fig 1)。

D 考察

4 菌株いずれにおいても 3 種類のコウシ酸の変異原性に差が認められなかったことから、変異原性はサンプル中の不純物によるものではなく、コウシ酸に変異原性があることを示していた。S9mix 非存在下でコウシ酸の強い生育阻害作用が認められた TA98, TA000, WP2uvrA/pKM101

の 3 菌株は、いずれもヌクレオチド除去修復機構の欠損株 (*uvrA*, *uvrB*) であり、ヌクレオチド除去修復機構が野生型の TA102 株では全く認められなかったことは、コウシ酸による DNA 損傷がヌクレオチド除去修復の対象となるような付加体であることを示唆していた。コウシ酸は活性酸素を生成して DNA に酸化的損傷を与えることが報告されているため、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 WP2uvrA/ pKM101 株に対するコウシ酸の変異原性を調べた。コウシ酸は両菌株に対しても変異原性を示したが、TA100 株に較べて強さは同程度であった。一方、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結果からは、GC→AT 変異が最も多く誘発され、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。活性酸素を生成する代表的な変異原の Cumene hydroperoxide, Hydrogen peroxide で見られるような、特徴的な GC→TA, AT→TA 変異の誘発がコウシ酸では低レベルであった。これらの結果を総合して考えると、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か、DNA の酸化的損傷以外にも DNA 付加体が関与していると思われる。

E 結論

細菌に対するコウシ酸の変異原性が確認された。S9mix 存在下では変異原性が弱くなる傾向が見られた。また、変異原性に対する近紫外光の影響は認められなかった。コウシ酸で誘発される塩基対置換変異のス

ペクトル解析からは活性酸素の関与を強く示唆するような結果は得られなかった
DNA 付加体形成も考慮する必要があると
考えられた

G 研究発表

論文発表

- 1) Watanabe-Akanuma, M, T Ohta, and
H Yamagata, (2003) Photomutagenicity

of thiabendazole , a post-harvest
fungicide, in bacterial assays Environ
Mol Mutagen , 41, 92-98

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Table 1 Reverse mutation test with pre-incubation method

Compound	Dose µg/plate	His+ colonies/plate							
		- S9 mix				+ S9 mix			
		TA100	TA98	TA102	WP2uvrA	TA100	TA98	TA102	WP2uvrA
DMSO		97	17	297	93	100	21	425	120
Kojic acid Lot 2Y181	156		20						
	313	100	22	307	104	102	23	429	139
	625	139	50	346	161	137	19	497	172
	1250	253	16*	509	407	188	27	592	255
	2500	185*	*	900	192*	310	47	764	492
	5000	147*	*	1282	192*	486	72	847	795
Kojic acid Lot K-3125	156		21						
	313	109	27	324	122	100	20	408	134
	625	126	46	381	221	124	25	472	145
	1250	293	22*	478	493	178	26	583	238
	2500	216*	*	809	204*	278	44	761	474
	5000	137*	*	1305	193*	463	63	905	855
Kojic acid Lot 5312	156		20						
	313	101	28	305	118	106	22	443	162
	625	136	54	379	226	129	19	474	194
	1250	249	21*	494	512	186	23	580	257
	2500	172*	*	771	198*	330	37	739	481
	5000	125*	*	1247	185*	517	73	831	830
AF-2	0 005				650				
	0 01	337							
	0 1		242						
MMC	0 04			1579					
2-AA	0 5						209		
	1					1469			
	2								818
	4							940	

MMC mitomycin C
2-AA 2-aminoanthracene

WP2uvrA WP2uvrA /pKM101
* Growth inhibition

Average of triplicate plates

Table 2 Effect of UVA-irradiation on mutagenicity induced by kojic acid

Strain	Compound	Dose µg/plate	His ⁺ (Trp ⁺)/plate	
			- UVA	+ UVA
TA100	Kojic acid Lot. 2Y181	0	83	84
		500	111	107
		1000	137	129
		1500	187	172
		2000	222	217
		2500	250*	228*
	AF-2	0.01	378	378
TA102	Kojic acid Lot. 2Y181	0	303	306
		500	366	323
		1000	502	423
		1500	549	518
		2000	728	687
		2500	840	873
	Mitomycin C	0.01	983	983
TA98	Kojic acid Lot. 2Y181	0	13	18
		500	37	46
		1000	37	25
		1500	24*	3*
		2000	8*	*
		2500	*	*
	AF-2	0.1	261	261
WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	Kojic acid Lot. 2Y181	0	74	69
		500	124	129
		1000	284	280
		1500	507	477
		2000	570	493
		2500	475*	281*
	AF-2	0.005	632	632

* Growth inhibition

- S9mix

UVA (300-400 nm) 10 min
National FL15BL-B
250 µW/cm²

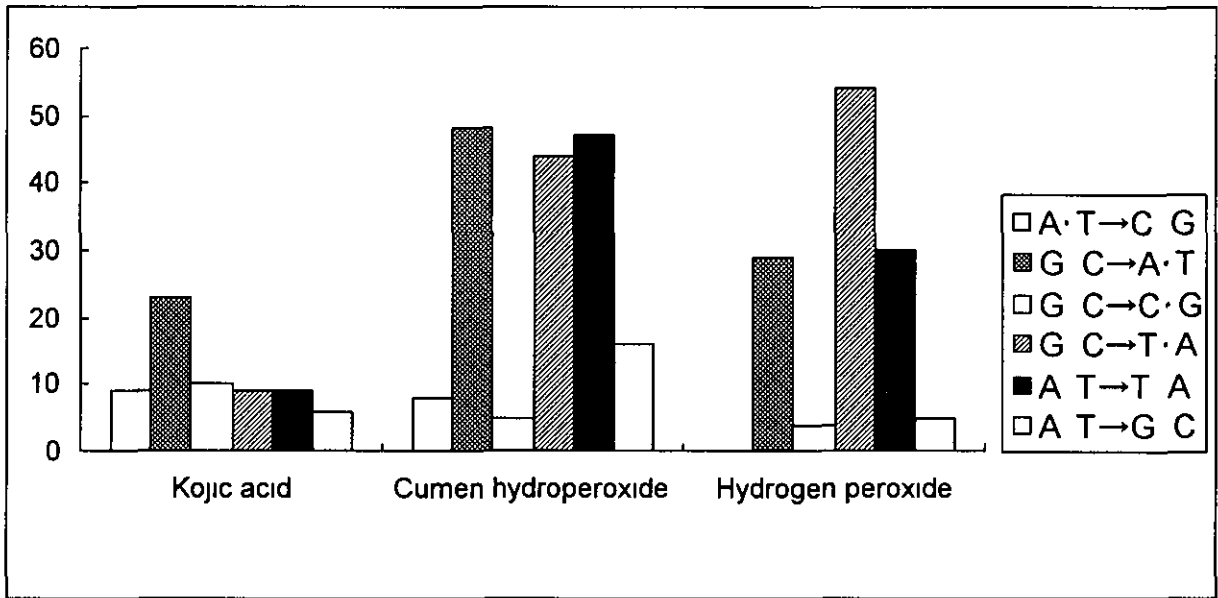


Fig 1 Mutational spectrum of kojic acid determined by Lac⁺ reversion in WP3101P-WP3106P. Numbers of induced revertants by kojic acid (2500 µg/plate), cumene hydroperoxide (40 µg/plate), and hydrogen peroxide (10 µg/plate) were plotted.

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

—光遺伝毒性に関する検討—

分担研究者 田中 壽穂 ((財)食品薬品安全センター・秦野研究所 副部長)

研究要旨

化学物質には、光照射によって遺伝毒性が増強される物があり、近年、光発かんと関連性が注目されるようになってきた。本研究では、既存の食品添加物であるコウシ酸の光遺伝毒性を評価し、そのメカニズムを解明することを目的とし、*in vitro* の光遺伝毒性評価系である光プラスミト切断法、培養細胞を用いた光 *in vitro* 小核試験およびコメットアッセイを実施した。

A 研究目的

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。

近年、化学物質の光遺伝毒性作用と皮膚がんの関連が疑われるようになってきており、FDA や EU の EHEA/CPMP からは構造活性相関や UV 吸収データより光毒性が示唆されるような物質については光遺伝毒性

の有無を確認することが推奨され^{1), 2)}、また、OECD ガイドラインにも光毒性試験法が定められた。

コウシ酸は UV-B 領域 (> 320 nm) に吸収を示し (図 1)、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ト切断法、培養細胞を用いたコメット法および小核試験を実施した。

B 研究方法

1) プラスミト切断法による DNA 切断性の検討 被験物質には、国立医薬品食品衛生研究所より提供された 3 ロットのコウシ酸 [Kojic Acid, 5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one, CAS 501-30-4, MW 142.1, lot 5312 (食品添加物), lot 2Y181 (医薬部外品), lot

052K2516 (試薬)] を用いて光プラスミド切断性試験を実施し、光照射条件下における DNA 切断性を評価した。陽性対照物質には、クロロプロマンン塩酸塩 (CPZ, 和光純薬工業, lot PAP7535) を用いた。

コウシ酸は局方注射用水に溶解して 10 mg/mL (70.4 mM) とした。同じ溶媒を用いて 30 μ L スケールで段階希釈して被験物質調製液とした。CPZ は局方注射用水 (lot K3D76, 大塚製薬工場) に溶解して 20 μ g/mL とした。

20 ng/ μ L のプラスミド(pUCSV-BSD, 約 4.1 kb, フナコシ株式会社)を含む 2 倍濃度リン酸緩衝液 (ダルヘンコ PBS(-)「ニノスイ」) を調製し、被験物質および陽性対照物質調製液に等量 (30 μ L) 加えて混合した (コウシ酸の最終濃度は 2.2, 4.4, 8.8, 17.6, 35.2 mM, CPZ の最終濃度は 10 μ g/mL, プラスミドの最終濃度は 10 ng/ μ L)。

調製直後に、U 底の 96 well プレートに 20 μ L ずつ分注し、光照射を開始した。1 濃度群につき、1 ウェルずつ用いた。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 (Suntest CPS, Atlas 社製, 特殊 UV フィルターを装着) を用い、UVA 放射照度 0.35 mW/cm² (トプコン UVR-3036/S にて測定) の条件で 1 時間照射した (UVA irradiance 1260 mJ/cm²)。同じ位置の UVB 放射照度は 0.068 mW/cm² (トプコン UVR-3036/S にて測定)、可視光の照度は 10040 lux (日置 3423 で測定) であった。

照射終了直後に 2 μ L のグリセロール色素液を加えた。10 μ L を取り、1% アガロ

ースゲルを用いて 100V 定電圧で 1 時間電気泳動した。泳動終了後、20 μ g/mL 臭化エチシウム水溶液で 10 分間した。

トランスイルミネータ上でチルト CCD カメラを用いてコンピュータにゲル画像を取り込み、画像解析ソフトウェア ImageJ (NIH) のゲル解析マクロを用いて各バンドの蛍光強度を定量化した。

2) 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。被験物質には、1) で用いた 3 ロットのコウシ酸のうち、lot 52K2516 (試薬) を用いた。陽性対照物質には、オフロキサシン (OFLX, lot 46H0747, Sigma) を用いた。培養細胞には、ヒト由来の TK6 細胞を用い、ウシ胎児血清を 5 vol% 含む RPMI 1640 培地を用いて培養した。

コウシ酸及び OFLX は局方注射用水に溶解して、それぞれ 50 mM (7.1 mg/mL) 及び 100 μ g/mL の 10 倍濃原液とした。コウシ酸原液は、溶媒で段階希釈して希釈系列を作製した。

細胞は 1500 rpm 5 分遠心し、PBS(+) に懸濁した。これを 2 回繰り返して、 1×10^6 細胞/0.45 mL に調整した。24 ウェルプレートに 0.45 mL ずつ分注し、被験物質及び陽性対照物質調製液を 0.5 mL/well 添加した。CO₂ インキュベータ中で 1 時間静置後、メタルハライドランプ式ソーラーシミュレーター (SOL500, Dr Honle 社, B1 フィルタを装備) を用いて UVA 放射照度 0.67 mW/cm² (トプコン UVR-3036/S で測定) にて 50 分間照射を行った (照射線量は 2 J/cm²)。同じ位置の UVB 放射照度は 0.067 mW/cm² (トプコン UVR-3036/S で測定)、ルクス強度は 18500 lux (日置 3423

で測定)であった

照射終了後、細胞懸濁液を 4.5 mL の PBS(+)で希釈し、1500 rpm 5 分遠心して 2.5 mL の培養液に懸濁したうち、0.5 mL はエノペントルフチューブに移し、コメントアノセイ用標本の作製まで水上に静置した。残りの 2.0 mL は 6 well プレートに分注し、CO₂インキュベータ中で約 22 時間培養して細胞増殖率測定と小核標本作製に用いた

コメントアノセイは、定法に従い実施した。泳動開始時の液温は 7℃、泳動終了時の液温は 13.5℃であった。電流量はそれぞれ 890 mA、910 mA であった (25V 定電圧)。一群あたり 1 枚の標本作製し、500 細胞について DNA 移動の認められる細胞の頻度を計測した。小核試験は、定法に従い標本作製した。標本はアクリシンオレンシン染色し、1 群あたり 1000 細胞を観察した。細胞増殖率測定は、トリパンブルー染色した細胞懸濁液を血球計算板で観察し、生細胞数を数えた

- 3) ラシカルスカヘンシャーを併用した光プラスミト切断法 被験物質には、1) で用いた 3 ロットのコウシ酸のうち、lot 52K2516 (試薬)を用いた。ラシカルスカヘンシャーには、L-Ascorbic acid (Sigma, lot 35H0768) , 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA, 東京化成, lot AU01), Dimethylsulfoxide (和光純薬工業, lot ELG6758), Superoxide dismutase (和光純薬工業, lot WTN7778), Catalase (和光純薬工業, lot SKE7249), D-Mannitol (和光純薬工業, lot SKN0868)を用いた。コウシ酸の濃度は 7 mM の 1 濃度のみ用い、1)の処理系に 3 濃度のラシカルス

カヘンシャーを加えた Catalase 以外のラシカルスカヘンシャーは、コウシ酸およびプラスミドと共存させ、1)と同じ条件で光照射を行った。Catalase を添加する系では、コウシ酸のみを緩衝液に溶解して光照射後、暗所に移して Catalase, プラスミドと酸化第二鉄 (10 μM) を加えて 60 分間処理を行った

C 研究結果

- 1) プラスミト切断法による DNA 切断性の検討 図 2 にプラスミト切断法の結果を示した。非照射群 (○, □, ◇) 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。3 ロット中で、lot 2Y181 (●, 医薬部外品) が光照射条件下でやや高い DNA 切断率を示したか、他の 2 ロットとの差は 10%以下であり、誤差範囲内であったことから、コウシ酸のロット間で品質に差は無いと考えられた

なお、光照射は、コウシ酸のロットごとに別の 96 well プレートで行ったが、それぞれのプレートに設けた陽性対照物質 (CPZ) の DNA 切断率は、49.2% (lot 2Y181), 52.6% (lot 5312), 51.5% (lot 052K2516) と、ほぼ同一であったことから、均等な条件で光照射が行われたことが示された

- 2) 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 表 1 に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の結果を示した。非照射群で

は、用量依存的にコメントおよび小核が誘発され（コ克蘭-アーミテソンの傾向性検定）、コメントアノセイでは最高濃度の 5 mM で差の検定で有意差が認められた（フィンシャーの正確確率検定）しかしながら、コメントアノセイ、*in vitro* 小核ともに陽性細胞の頻度は低く、陰性対照背景データのばらつきの範囲を出ない程度と考えられたので、コウシ酸は非照射条件下では遺伝毒性を示さないと結論した。細胞毒性作用については、最高濃度の 5 mM のみ、細胞増殖率が 70.8% と弱いながらも細胞毒性作用があるものと考えられた。

光照射群では、コメントアノセイの 2.5 および 5 mM において、それぞれ 84.8、97.0% の細胞に DNA 移動が認められ、高頻度に DNA 傷害が生していることが示されたか、これらの濃度では強い細胞増殖抑制が認められたことから（それぞれ 15.7 および 7.9%）、光細胞毒性によって二次的に誘発された DNA 傷害である可能性も考えられた。しかしながら、*in vitro* 小核試験でも同じ濃度域で有意な小核の誘発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。

以上の結果から、コウシ酸は光細胞毒性作用を有し、高濃度域では光遺伝毒性作用も示すと考えられた。

3) ラシカルスカヘンシャーを併用した光プラスミド切断法 図 3 にラシカルスカヘンシャーを併用した光プラスミド切断法の結果を示した。●はコウシ酸とラシカルスカヘンシャーの併用、○はラシカルス

カヘンシャーのみを光照射したものである（非照射群は設けていない）。

水溶性抗酸化剤として L-Ascorbic acid (a)、非水溶性抗酸化剤として BHA (b) および DMSO (c) を用いたところ、コウシ酸による光プラスミド切断は 25 vol% 以上の DMSO 共存下で、ほぼ完全に抑制された。このことから、コウシ酸の光プラスミド切断性は、酸化的傷害によるものと考えられたので、ヒドロキノンラシカルスカヘンシャーの D-Mannitol (d)、スーパーオキシドスカヘンシャーの SOD (e)、過酸化水素スカヘンシャーの Catalase (f) の併用試験を行い、産生ラシカル種の特異性を試みたところ、SOD および Catalase でコウシ酸による光プラスミド切断が用量依存的に抑制された。

なお、スカヘンシャー単独による DNA 切断 (o) はいずれの化学物質でも認められなかった。

D 考察

3 ロットのコウシ酸の光プラスミド切断性を検討した結果、いずれのロットでも、光照射条件下では、非照射条件下と比べて DNA 切断性が増強されることが示された。また、ロット間で光照射条件下での DNA 切断性に差はなく、品質的にほぼ同等であることが示された。光プラスミド切断法は、*in vivo* の光毒性・光遺伝毒性試験の結果と良く相関することから³⁾、コウシ酸は光遺伝毒性作用を有することが示唆された。

そこで、3 ロット中のうちの 1 ロットについて、培養細胞 TK6 を用いた光コメント法および光 *in vitro* 小核試験を実施したところ、光照射条件下における細胞毒性作用が、

非照射条件下と比較して強かったことから、光細胞毒性作用を有することか示された。また、強い毒性を示す濃度域では、コメントと小核を誘発したことから、DNA 傷害性、染色体構造異常誘発性などの光遺伝毒性作用もあることか示唆された。

これらの光遺伝毒性作用の機序を明らかにすることを目的とし、ラシカルスカベンジャーを併用した光プラスミド切断法を実施したところ、DMSO, SOD, Catalase が光照射条件下におけるプラスミド切断を抑制した。このことから、SOD が特異的に消去するスーパーオキシドや、カタラーゼが特異的に消去する過酸化水素を産生することによって、プラスミド、細胞に酸化的傷害を誘発し、光遺伝毒性を示すことが示唆された。

スーパーオキシドや過酸化水素といったフリーラシカルを介した光遺伝毒性作用は、キノロン系抗菌剤を始めとした既知の光発がん物質の作用機序と同一であり、コウシ酸も同様な作用を有する可能性は否定できないが、プラスミド切断法、培養細胞を用いた試験とともに、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、培養細胞では強い光細胞毒性を伴うことから、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。

E 結論

コウシ酸の光遺伝毒性作用の有無と、その作用機序を調べることを目的とし、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。

その結果、コウシ酸には DNA 傷害性、染色体構造異常誘発性などの光遺伝毒性作用

があり、その作用機序はスーパーオキシド・過酸化水素産生による酸化的傷害によるものと考えられた。

F 参考文献

- 1) EMEA Note for Guidance on Photosafety Testing (2002)
- 2) FDA Guidance for industry, photosafety testing (2003)

G. 研究発表

論文発表

- 1) Nakagawa, Y, Takigawa, Y, Tanaka, N , The rapid screening of photo-genotoxic compounds using photo plasmid-relaxation assay , Environ Mutagen Res , vol 23, 107-118 (2001)

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

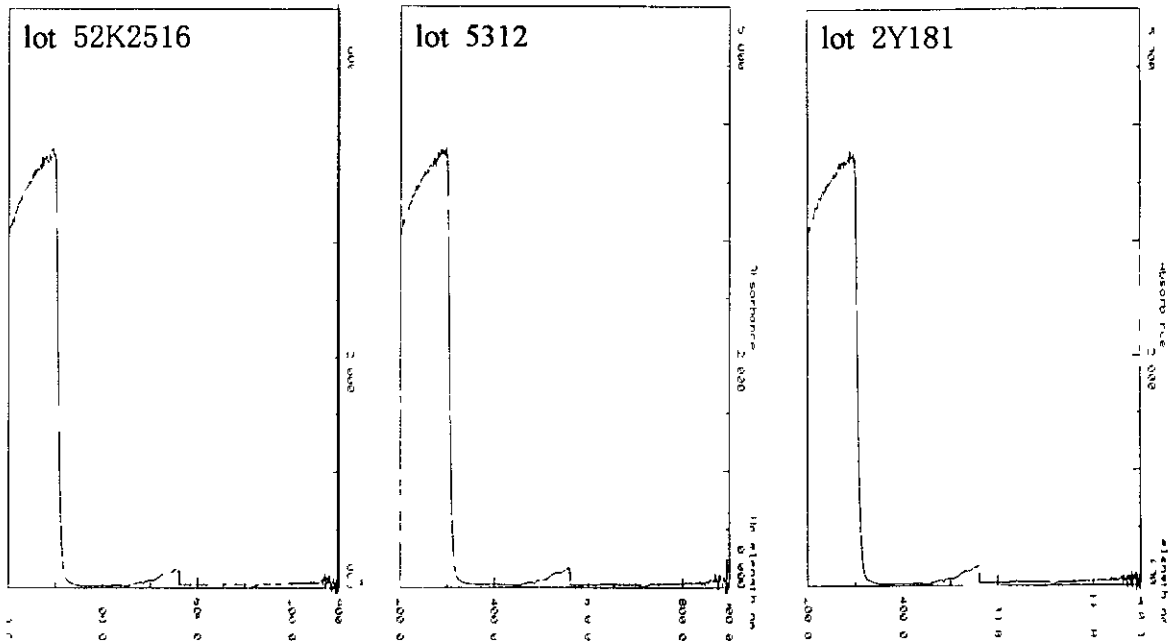


図1 コウシ酸の吸光スペクトル

1 mg/mL の水溶液を吸光高度計 (Ubest-50, 日本分光) を用いて測定した

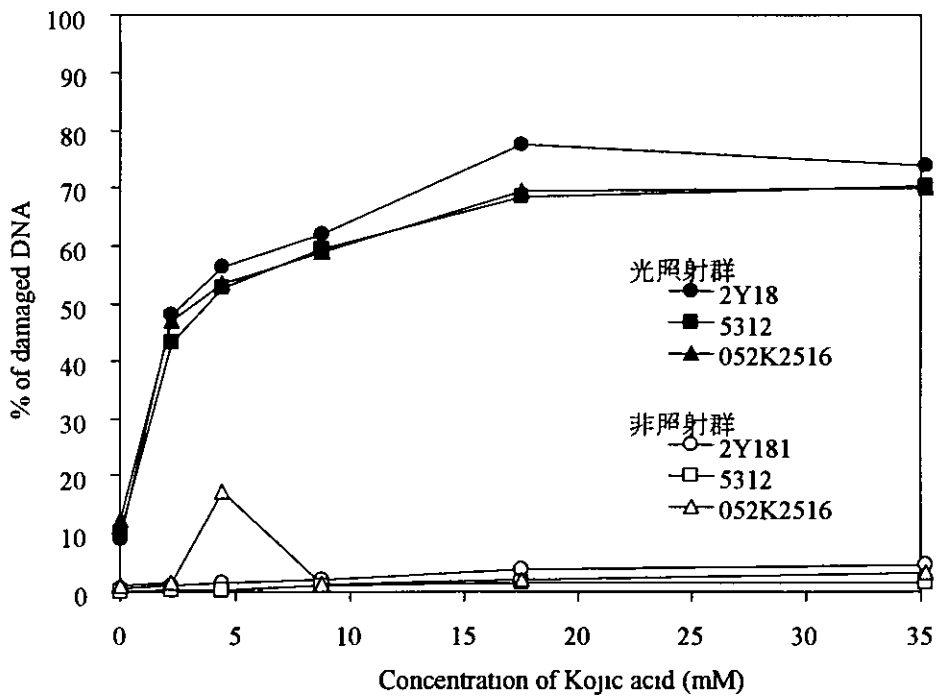


図2 プラスミド切断法による DNA 切断性の検討