

## 2. 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回日本トキシコロジー学会, 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).
- 7) M. Hayashi: Newly development of in vivo micronucleus assay. ASIATOX III, Chiang Mai (2004).
- 8) 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).
- 9) M. Hayashi: Regulatory perspective on data gaps in Japan, HESI Workshop on DNA Adducts: Biological Consequences and Application to Risk Assessment, Washington DC (2004).
- 10) 林 真: げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用, 第33回日本環境変異原学会, 長崎 (2004).
- 11) M. Hayashi: Strategy for evaluation and interpretation of genotoxicity for food and related chemicals, The Int Conf Environ & Genet Damage, The 12th Congress of the CEMS (Chongqing, People’s republic of China), 中国重慶 (2005).
- 12) 林 真: Ames試験の結果をin silicoでいかに予測出来るか, またその精度は?, MMS研究会セミナー, 東京 (2005).
- 13) 林 真, 鎌田栄一: 化学物質安全性評価の為のカテゴリーアプローチ, 第一回カテゴリーシンポジウム, 東京 (2005).
- 14) 林 真: 毒性病理学に期待する- 遺伝毒性の立場から -, 第21回毒性病理学会, 浜松 (2005).
- 15) 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞, 林 真: In silico評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略, 第34回日本環境変異原学

- 会, 東京 (2005).
- 16) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充: ヒト細胞におけるDNA二本鎖切断修復の細胞周期依存性, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 17) 木本崇文, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 小林恒文, 笠原義典, 林 真, 本間正充: ヒトリンパ芽球細胞TK6を用いたフラボノイド系サプリメント化合物の*in vivo*遺伝毒, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 18) 真田尚和, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 林 真, 本間正充: P53に依存したスピンドルポインズの*in vitro*遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 19) 本間正充, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真: DNA2本鎖切断によって誘発される相同染色体間組み換え, および遺伝子ターゲティング, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 20) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充: ヒト細胞におけるDNA2本鎖切断の細胞周期依存性, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 21) 鈴木洋, 小川いずみ, 寺島ゆかり, 島田康, 齋藤由希子, 田中仁, 林真: 幼若ラット肝細胞小核試験: 系統差の検討, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 22) 浅野哲秀, D. Torous, S. Dertinger, C. Tometsko, 森田 健, 林 真: AOおよびフローサイトメトリーを用いた低用量域での小核誘発について, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 23) 森田 健, 祖父尼俊雄, 林 真, 田中憲穂, 中嶋 圓, 中西良文, 樋口政純, 石光 進, 小嶋 靖, 佐々木史歩, 森川 馨: GHSにおける生殖細胞変異原性物質の分類, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 24) 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田 健, 林 真: *In silico*評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 25) 松藤 寛, 井上真由美, 千野 誠, 本間正充, 林 真, 山形一雄: ヒトリンパ芽球細胞TK6を用いた抗酸化フラボノイド及びその酸化生成物の遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京 (2005).
- 26) 林 真, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞: 化学物質の安全性評価における(Q)SARの利用, 日本動物実験代替法学会第19回大会 (2005).
- 27) Norihide Asano, Dorothea Torous, Carol R. Tometsko, Stephen D. Dertinger, Takeshi Morita, and Makoto Hayashi: Low dose effects in the MNRet staining and flow cytometric methods, 9th International Congress on Environmental Mutagens, San Francisco (2005).
- 28) Dorothea Torous, Norihide Asano,

Makoto Hayashi, Stephen Dertinger, Takeshi Morita, Carol Tomesko, and Siva Sugunan: Performance and power of flow cytometric micronucleus scoring, 9th International Congress on Environmental Mutagens, San Francisco (2005).

- 29) 林 真：遺伝毒性の閾値を考える，国際シンポジウム「環境因子，遺伝毒性発がん物質の閾値：安全と安心の接点をめざして」，神戸（2006）。
- 30) Makoto Hayashi: The in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay (Automated scoring), The British Toxicology Society & The United Kingdom Envi-

ronmental Mutagen Society Joint Congress, Warwick (2006).

Ⅱ. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

——既存添加物の遺伝毒性検出における諸問題——

分担研究者 長尾 美奈子 共立薬科大学客員教授

現在既存添加物の成分規格および使用基準の設定が順次行われている。その中でコウジ酸が遺伝毒性発がん物質である可能性が示唆されたが、成分規格が設定されていなかった為、Lot 間の差、夾雑物の影響を先ず検討した。サルモネラ菌に対し変異原性に Lot 間の差は無く、また、S9 mix の有無に関わらず検出される変異原性は全てコウジ酸自身に由来することを明らかにした。しかし、*in vivo* における遺伝毒性については毒性評価上問題があったので、DNA 付加体検出をマウス発がん臓器、肝臓で検討した。結果は陰性であった一方、部分肝切除を行ったマウス肝臓における 2 段階発がん試験の結果も陰性であり、コウジ酸が遺伝毒性発がん物質で有ることは明確でないことが結論された。既存添加物の多くは植物由来であり、有効成分あるいは共存する成分が配糖体として存在する。生体では配糖体はアグリコンに加水分解されて吸収されるので、*in vitro* 遺伝毒性試験系には、配糖体をアグリコンに変換する操作を組み入れることにより、遺伝毒性はより正確に測定できることが期待される。市販されている Hesperidinase を用いて、glycosidase 処理の方法および有効性について検討した。Hesperidinase 10mg/mL 中 40℃、2 時間の処理が変異原性検出に相当であることが判った。この方法は、哺乳細胞を用いた *in vitro* 試験にも応用可能であり、既存添加物遺伝毒性評価への取り入れを検討する必要があると思われる。

A. 研究目的

天然物を主体とする既存添加については、1995 年の法改正に伴い、成分規格および使用基準の設定が順次行われている。既存添加物として登録されているコウジ酸に、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<sup>1)</sup>。その後コウジ酸の *in vivo* 投与により、マウス肝にお

ける小核の誘発が<sup>2)</sup>、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<sup>3)</sup>、コウジ酸が遺伝毒性発がん物質である可能性が示された。コウジ酸の変異原性が製造 Lot により異なるか、変異原性はコウジ酸自身によるのか、混入不純物に起因するかを検討した。

コウジ酸の遺伝毒性発がん標的臓器の

可能性が示されたマウス肝臓に関おいて、小核が誘発されるがマウス肝2段階発がん実験では、コウジ酸はイニシエーション活性を示さないことが報告された<sup>4)</sup>。コウジ酸は発がん標的臓器で DNA 傷害を誘発するが、発がんのメカニズムは DNA 傷害作用以外の作用機構によることが示唆されている。コウジ酸が直接 *in vivo* で DNA 傷害を起こすのか否かを明らかにするべく、DNA 付加体生成の有無を、検出感度の高い <sup>32</sup>P-ポストラベル法を用いて検討した。

既存添加物の多くは植物由来であり、その結果、有効成分あるいは共存する成分が配糖体として存在することが考えられる。配糖体の多くは、ヒトの口中バクテリア<sup>5)</sup>、ヒトやラットの小腸粘膜に存在するラクターゼ・フロリジンヒドロラーゼ<sup>6)</sup> や腸内細菌によりアグリコンとなり生体内に吸収され遺伝毒性をはじめ、種々の生理活性を示す。しかし、*in vitro* における遺伝毒性検出のために現在用いられている方法では、glycosidase 処理が義務付けられていない為、アグリコンにたとえ遺伝毒性が有っても、それが検出されないことが起こりうる。そこで、*in vitro* 遺伝毒性系に glycosidase 処理する過程を組み入れる方法の検討を行った。糖に対する特異性が比較的低いことが知られており<sup>7, 8)</sup>、しかも市販されているため、テスト系に組み入れやすいと考えられる *Penicillium* より得られた Hesperidinase をアッセイ系に組み入れることを検討した。

## B. 研究方法

1. 材料：コウジ酸 Lot 番号 052K2516 (シグマ), 2Y181 (化粧品用), 5312 (食品添加物用)を用いた。Rutin は和光純薬, Isoquercitrin は関東化学より購入した。アカネは国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けた。Hesperidinase (18 unit/g, from *Penicillium* species)は Sigma より購入した。
2. 変異原性試験：サルモネラ菌 TA100 または TA98 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 S9 はオリエンタル酵母社製 [Crj:CD(SD)]を用いた。Hesperidinase は 0.45mL の 10mM クエン酸-20mM 磷酸 2 ナトリウム(pH4.0)に溶解し用いた。試験化合物を 50 $\mu$ L の DMSO に溶解し、0.45mL の Hesperidinase 溶液を加え、40°C で 2 時間インキュベートした後、20 $\mu$ L の 30 mM NaOH で中和し、0.43mL の DMSO を加えて変異原テストのサンプルとした。
3. DNA の調整：マウス[CD2-LacZ80/HazfBR (BALB/C x DBA/2)]に 3% コウジ酸 (アルプス薬品工業)を含む餌を 28 日間投与の後 3 日置いたものの肝臓より、DNA をフェノール法により抽出した。
4. ポストラベル法：Randerath らの変法付加体増感法のうち、ATP deficient 法を用いて検討した<sup>9)</sup>。 $\gamma^{32}$ P-ATP は 7000Ci/mmol (MP Bio Co.)を cold の ATP で希釈せず用いた。TLC の展開：1D, 2.3 M 磷酸ナ

トリウム (pH6.0): 3D, 4.5 M 蟻酸リチウム - 8.5 M 尿素 (pH3.5) : 4D, 1M 塩化リチウム - 0.5 M トリス塩酸 - 8.5 M 尿素 (pH3.5) : 5D, 1.7 M 磷酸ナトリウム (pH 6.0) を適宜希釈して用いた。3D の 30%, 60%, 90% 溶液を, 4D の 30%, 60%, 90% 溶液を組み合わせ, 9通りの条件で解析した。オートラジオグラフィにより付加体を検出した。

### C. 研究結果

1. コウジ酸は TA100 に対し S9 mix の有無に関わらず変異原性を示し, Lot による比活性の差は認められなかった。HPLC による分離により変異原性は 270 nm 吸収の主ピーク分画のみに認められ, HPLC 分離前後で突然変異比活性に差が無かった。NMR により主ピーク分画の物質はコウジ酸であることを確認した。以上の結果より, コウジ酸標品中のサルモネラ菌に対する変異原性はコウジ酸自身によるものであり, 変異原性を持つ夾雑物は含まないことが明らかになった。
2. サルモネラ菌 TA100 をコウジ酸処理した後抽出した DNA には付加体は検出されなかった。また, 3% のコウジ酸を含む餌を 4 週投与したマウス肝臓の DNA におけるコウジ酸付加体を解析した結果, 付加体と思われるスポットは観察されなかった。以上の結果より, 用いた条件下では付加体は検出されなかったと結論し

た。

3. Rutin および Isoquercitrin の変異原性はいずれも Hesperidinase 処理によりはじめて検出され, Hesperidinase の濃度依存的に活性は増加した。Hesperidinase の濃度は 10 mg/mL で 40°C, 2h 処理が, 活性発現の点からも, 実験操作上の点からも適切であることが判った。既存添加物であるアカネ色素の変異原性も Hesperidinase 処理により顕著に増加した。植物由来の添加物の *in vitro* 遺伝毒性テストには, 哺乳動物細胞系を含めて, Hesperidinase 処理を行うことが望ましいことが示めされた。

### D. 考察

コウジ酸のサルモネラ菌に対する変異原性に係る詳細な研究から, コウジ酸自身に変異原性が存在することは事実となった。しかし, サルモネラ菌 TA100 に対する用量相関関係から, 閾値の存在が示唆されている。現在 DNA にどのような機構で作用するか不明であるが, Indirect な遺伝毒性発がん物質の可能性も考えられる。コウジ酸をマウスに強制経口投与した 24 時間後に部分肝切除を行うと小核が誘発される。一方マウス 2 段階発がんイニシエーション活性のテストの際には, イニシエーター (コウジ酸) を投与後プロモーターを投与し, プロモーター投与開始 2 週間後に部分肝切除を行う方法が用いられている。この部分肝切除を行う時期の違いが, 小核陽性, イニシエーション活性陰性の結果になったことの原因の可能性はある。いずれにしても, 遺伝毒性も, 肝発がん性も極め

て弱く、また、発がん機構として遺伝毒性が関与していることは証明されなかった。現在、化粧品に使用されているが、生体にとって問題となる毒性はないと考えられる。

配糖体である Rutin および Isoquercitrin の変異原性は、Hesperidinase 処理によりはじめて検出され、Hesperidinase 処理は配糖体をアグリコンに変換するのに有用であることが確認された。さらに、平成 16 年まで既存添加物名簿に記載されていたアカネ色素についても、Hesperidinase 処理により顕著な遺伝毒性の増加が確認された。アカネ色素の場合、アグリコンであるルシジンおよびアリザリンも含まれており、それらに遺伝毒性があるため<sup>10,11)</sup>、Hesperidinase 処理を行わなくてもある程度の遺伝毒性が検出されたと考えられる。植物由来のサンプルではアグリコンあるいは配糖体で存在する割合はいろいろ異なることが考えられ、またその割合は抽出等精製濃縮過程で変化することが考えられる。実験過程もサンプルを Hesperidinase で前処理するのみであり、極めて簡単な手法であり、哺乳類細胞を用いたテスト系への応用もできる。従って、植物由来サンプルについては、Hesperidinase 処理による遺伝毒性の検出を追加するべきであると考えられる。

#### E. 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. Ishikawa S, Sasaki YF, Kawaguchi S, Michizuki M, Nagao M. Characterization of genotoxicity of kojic acid by mutagenicity in *Salmonella* and micronuclei induction in rodent liver. *Genes and Environ.* 2006, 28: 31-7.
3. Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Suzuki T, Hagiwara T, Hatakeyama S, Nagaoka K, Yoshida J, Saito Y, Tanaka J, Hayashi M. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res*, 2005; 583: 133-45.
4. Moto M, Mori T, Okamura M, Kashida Y, Mitumori K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. *Arch Toxicol.* 2005; Oct 18, 1-6, Epub ahead of print.
5. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Wall UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr*, 2005, 135: 48-52.
6. Wilkinson AP, Gee JM, Dupont MS, Needs PW, Mellon FA, Williamson G, Johnson IT. Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daizein glucosides by rat

- small intestine in vitro. *Xenobiotica*, 2003, 33: 255-64.
7. Nagao M, Morita N, Yahagi T, Shimizu M, Kuroyanagi M, Fukuoka M, Yoshihira K, Natori S, Fujino T, Sugimura T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mutagenesis*, 1981; 3: 401-19.
  8. Tamura G, Gold C, Ferro-Luzzi A, Ames BN. Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 4961-65.
  9. Schurdak ME, Stong DB, Warshawsky D, Randerath K. 32P-postlabeling analysis of DNA adduction in mice by synthetic metabolites of the environmental carcinogen, 7H-dibenzo[c,g]carbazole: chromatographic evidence for 3-hydroxy-7H-dibenzo[c,g]carbazole being a proximate genotoxicant in liver but not skin. *Carcinogenesis*. 1987; 8 :591-7.
  10. Brown JP, Dietrich PS. Mutagenicity of anthraquinone derivatives in the Salmonella/microsome test: activation of anthraquinone glycosides by enzymic extracts of rat cecal bacteria. *Mutat Res*, 1979, 66: 9-24.
  11. Tikanen L, Matsushima M, Natori S. Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test. *Mutat Res*. 1983, 116: 297-304.
- F. 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., Ushijima 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 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 induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]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., Kagairi M. Destruction of quadruplex by proteins, and its biological implications in replication and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res suppl* 2003, (3), 231-2.
  8. Tsuchiya N, Fukuda H, Nakashima K, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H. LRP130, a single-stranded DNA/RNA-binding protein, localizes at the outer nuclear and endoplasmic reticulum membrane, and interacts with mRNA in vivo., *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, 317: 736-743.
  9. Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci*. 2004, 95:290-9. Review.
  10. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis*. 2004:1495-505.
  11. 長尾美奈子, 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—*環境変異原研究* 2004, 26: 193-198
  12. Ochiai M, Sugimura T, Nagao M. Modification of the <sup>32</sup>P-postlabeling method to detect a single adduct species as a single spot. *Methods Mol Biol*. 2005, 291:13-19.
  13. Kitamura K, Nagao M, Hayatsu H, Morita M. Effect of chlorophyllin-chitosan on excretion of dioxins in a healthy man. *Environ Sci Technol*. 2005; 39 :1084-91.
  14. Ishikawa S, Sasaki YF, Kawaguchi S, Michizuki M, Nagao M. Characterization of genotoxicity of kojic acid by mutagenicity in *Salmonella* and micronuclei induction in rodent liver. *Genes and Environ*. 2006, 28: 31-7.
  15. Fukuda H, Katahira M, Tanaka E, Enokizono Y, Tsuchiya N, Higuchi K, Nagao M, Nakagama H.. Unfolding of higher DNA structures formed by the d(CGG) triplet repeat by UP1 protein. *Genes Cells*. 2005; 10: 953-62.
- 学会発表
1. Minako Nagao. Direct Genotoxic Carcinogen の閾値をリスク評価にどう取り入れるか International Symposium-Threshold of carcinogenicity and genotoxicity (2006, March 15-16, Kobe)
  2. 長尾美奈子 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—*環境変異原学会臨時委員会* (2004 Nov. )

——DNA の酸化的損傷に関する検討——

分担研究者 葛西宏 産業医大・産生研・教授

コウジ酸を投与したマウスの肝 DNA 及びアカネ色素を投与したラットの腎臓 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、いずれにおいても投与量に依存した増加が見られた。また、不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生成する新規変異原物質 4-oxo-2-hexenal (4-OHE) を加熱調理食品中から新たに検出した。可食部 1 グラムあたり数十マイクログラムの 4-OHE を含む食品もあり、ヒト発がんへの関与が注目される。

A. 研究目的

コウジ酸は、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、コウジ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。また、アカネ色素は、アカネ科セイヨウアカネの根から得られる着色料で、食品添加物として使用されてきた。しかし、遺伝子突然変異に関する多くの陽性結果が報告され、実験動物の腎臓に対する発がん性も

示されている。本研究では、腎臓に対する発がん性メカニズムを探る目的で、アカネ色素によるラット腎臓の酸化的

DNA 損傷性について検討した。また、食事は発癌の主な原因の一つであるとされており、食品中の変異原物質を同定し除去する事は有効な癌予防につながると期待できる。脂肪の摂り過ぎは、がん・成人病の危険因子であるが、なかでも、不飽和度の高い脂質は過酸化を起こしやすく、過酸化脂質の多い食品の多量摂取は有害である。この脂質過酸化にする起因する DNA 損傷も広い意味での酸化的損傷と見ることができる。我々は最近、食品中に含まれる多価不飽和脂肪酸の酸化に伴って生じる新規変異原物質 4-oxo-2-hexenal (4-OHE)を見出した。4-OHE をマウスに経口投与すると、消化管の組織を中心に DNA 付加体を生じる。4-OHE の摂取がヒトの健康に与える影響は大きいと考えられ、食品中の 4-OHE 含量を調べることを目的とした。

## 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，コウジ酸またはアカネ色素投与により生じる生体内酸化ストレスを検討評価した．コウジ酸の実験は，遺伝子突然変異試験に用いた Muta™ Mouse から肝臓を摘出して行った．コウジ酸は，混餌法により，1.0, 2.0, 3.0 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ジナイズし，細胞核を遠心分離した．また，アカネ色素の実験は，遺伝子突然変異試験に用いた TG ラット から腎臓を摘出して行った．アカネ色素は，混餌法により，1.0, 5.0 wt% の濃度で 28 日間投与した後，3 日間基礎飼料を与えた．腎臓の一部（それぞれ約 0.3 g）を，細胞溶解液中でホモジナイズし，細胞核を遠心分離した．コウジ酸あるいはアカネ色素の実験で得られた細胞核を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 P<sub>1</sub> 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，10<sup>6</sup> 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 I.D. 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

一，UV-8020, 290 nm, 2.56 full scale で行った．

脂質過酸化物質分離・同定の実験は，食品 1 g を密栓できるガラス容器中で，2 ml の酢酸エチルエステルと混合し，4℃で 16 時間抽出した．抽出液を酢酸エチルエステルで 5 倍希釈した後，GC-MSにより 4-OHE を定量した．GC-MS装置は，Hewlett-Packard HP 6890 ガスクロマトグラフィと JEOL JMS-BU 20 質量分析計を用いた．ガスクロマトグラフィのカラムには，CP-CIL5CB (Chromopack) を使用し，サンプル注入後，60℃に 1 分保った後，150℃まで 1 分間に 10℃，270℃まで 1 分間に 40℃昇温した．4-OHE の定量は selected ion monitoring 法により，定量には分子イオン m/z 112，確認にはフラグメントイオン m/z 83 を用いた．

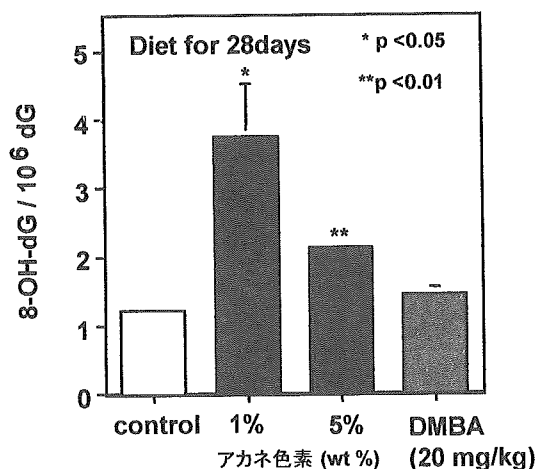


図2 アカネ色素投与ラット腎臓 DNA の 8-OH-dG レベル

## C. 研究結果

コウジ酸投与マウス肝臓 DNA 中の 8-OH-dG 量は，10<sup>6</sup> dG あたり次のようになった．陰性対照 1.32 ± 0.18，コウジ酸 1.0(wt%)投与群 1.86 ± 0.48，2.0(wt%)投

与群  $2.08 \pm 0.25$ , 3.0(wt%)  
 投与群  $3.18 \pm 0.53$ . いずれも, 平均値 $\pm$   
 標準誤差,  $n=5-8$ . コウジ酸 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).

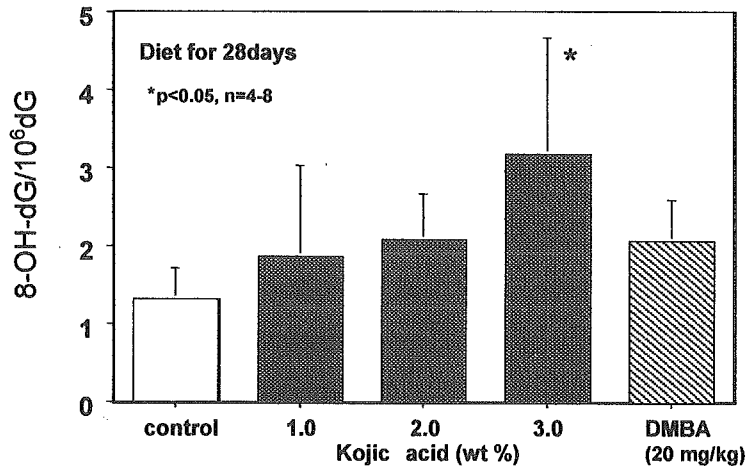


図1 コウジ酸投与マウス肝臓 DNA の8-OH- dGレベル

また, アカネ色素投与ラット腎臓 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  $1.22 \pm 0.06$ , ア  
 カネ色素 1.0(wt%)投与群  $3.74 \pm 0.76$ ,  
 5.0(wt%)投与群  $2.14 \pm 0.08$ . いずれも,  
 平均値 $\pm$ 標準誤差,  $n=6$ . アカネ色素投  
 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 2)

脂質過酸化反応由来の新規変異原物質  
 4-OHE の食品中含量分析結果を表 1 に  
 まとめた. 加熱調理した魚 (イワシ, サ  
 ンマ, サバ, サケ) から多量の 4-OHE  
 が検出された. また, 油炒めした野菜か  
 らも比較的少量の 4-OHE が検出された.  
 これに対して, 調理した牛, 豚, 鶏肉か  
 らは 4-OHE は検出されなかった. サン  
 マ 1 匹を焼いたときに発生する煙を集め  
 て分析したところ,  $31 \mu\text{g}$  の 4-OHE が  
 検出された. 4-OHE に関しては, 魚,

野菜の加熱調理品から若干検出されたが,  
 その量は 4-OHE に比べて少量であった.

#### D. 考 察

コウジ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, コウジ酸の 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 に酸化的傷害が起  
 こったと考えられる. コウジ酸がマウス  
 の肝臓に対して発がん性を示す可能性が  
 確認され, その肝発がん性にコウジ酸の肝  
 傷害性やイニシエーション作用も関与し  
 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. コウジ酸によるマウ  
 ス肝臓の酸化的 DNA 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 Muta™ 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。また、アカネ色素の投与によって腎臓 DNA 中の 8-OH-dG 量が陰性対照に比べて有意に増えていることから、アカネ色素の 28 日間経口摂取により、生体内酸化ストレスが亢進し、腎臓 DNA に酸化損傷が起ったと考えられる。アカネ色素がラットの腎臓に対して発がん性を示すことが報告され、その腎臓発がんにはアカネ色素の腎臓傷害性やイニシエーション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、腎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。アカネ色素によるラット腎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 TG ラットの腎臓 DNA 中の 8-OH-dG 量（陰性対照群で  $10^6$  dG あたり 1.22）は、実験動物としてよく用いられる他系統のラット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。

本研究で初めて、脂質過酸化反応に伴って生じる変異原物質 4-OHE が食品中に含まれることを示した。4-OHE は、 $\omega$ -3 不飽和脂肪酸のモデル過酸化反応によって見出され、*Salmonella thphimurium* に対する変異原性や DNA に対する付加体生成が認められている。さらに、動物実験においてマウス消化管組織に DNA 付加体を形成することも分かっており、今回、ヒトが日常口にする食品中に検出されたことから、ヒト発がんへの関与が懸念される。4-OHE は  $\omega$ -3 不飽和脂肪酸の酸化によって生成すると考えられ、事実  $\omega$ -3 不飽和脂肪酸を多く含む魚、野菜の加熱調理食品から多く検出された。その量は、加熱調理食品の代表的変異・発がん物質とされているヘテロサイクリックアミン類の 1000 倍近い。また、これまで脂質過酸化に伴って生成するアルデヒドとして、4-hydroxy-2-nonenal や 4-ONE が広く研究されてきた。しかし、これらは  $\omega$ -6 不飽和脂肪酸から生成すると考えられ、食品中には少量しか存在しなかった。近年、 $\omega$ -3 不飽和脂肪酸は、その抗酸化作用等から摂取が推奨されているが、一方では非常に酸化されやすい脂質でもある。今後 4-OHE について、発がん性を含めヒトの健康への影響を慎重に調査する必要があると考える。

## E. 結論

コウジ酸を 3.0(wt%)含む餌 28 日間投与によりマウス肝臓 DNA に酸化損傷がみられた。また、アカネ色素を含む餌 28 日間投与によりラット腎臓 DNA に酸化損傷がみられた。脂質過酸化によ

って生成する新規変異原物質 4-OHE を加熱食品中に見出した。いずれも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

### 1. 論文発表

- 1) Sato Y, Nanri H, Ohta M, Kasai H, Ikeda M. Increase of human MTH1 and decrease of 8-hydroxy-deoxyguanosine 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, 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)
- 6) Hirano, T., Kawai, K., Ootsuyama, Y., Orimo, H., Kasai, H. Detection of a mouse OGG1 fragment during caspase-dependent apoptosis: Oxidative DNA damage and apoptosis. Cancer Sci.; 95:634-638 (2004)
- 7) Orimo H, Mei N, Boiteux S, Tokura Y, Kasai H. Analysis of 8-Hydroxyguanine (8-OH-Gua) Released from DNA by the Formamidopyrimidine DNA Glycosylase (Fpg) Protein: A Reliable Method to Estimate Cellular Oxidative Stress. J. Radiat. Res. (Tokyo).;45:455-60 (2004)
- 8) Svoboda, P. and Kasai, H., Simultaneous HPLC analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and 7-methylguanine in urine from humans and rodents, Anal. Biochem., 334, 239-250 (2004)
- 9) Hori M, Fujikawa K, Kasai H, Harashima H, Kamiya H. Dual hydrolysis of diphosphate and triphosphate derivatives of oxidized deoxyadenosine by Orf17 (NtpA), a MutT-type enzyme. DNA Repair (Amst).;4:33-9 (2005)
- 10) Kasai H., Maekawa M., Kawai K., Hachisuka K., Takahashi Y., Nakamura H., Sawa R., Matsui S. and Matsuda T.: 4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by  $\omega$ -3 fat peroxidation, causes DNA adduct formation in mouse organs. Industrial Health, 43, 699-701, 2005

- 11) Maekawa M., Kawai K., Takahashi Y., Nakamura H., Watanabe T., Sawa R., Hachisuka K., and Kasai H.: Identification of 4-Oxo-2-hexenal and Other Direct Mutagens Formed in Model Lipid Peroxidation Reactions as dGuo Adducts. Chemical Research in Toxicology, 19, 130-138, 2006
- 12) Kawai K., Matsuno K. and Kasai H.: Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor. Mutation Research, 603(2), 186-192, 2006

## 2. 学会発表

- 1) Kawai K., Maekawa M., Hachisuka K., Matsui M., Matsuda T. and Kasai H.: 4-Oxo-2-Hexenal In Cooked Foods And DNA Adduct Formation In Mouse Organs After Oral Administration  
9<sup>th</sup> ICEM (San Francisco, U.S.A.) 平成 17 年 9 月
- 2) Maekawa M., Kawai K., Hachisuka K., Takahashi Y., Nakamura H., Sawa R. and Kasai H.: Identification Of 4-Oxo-2-Hexenal As A dG Adduct In A Model Lipid Peroxidation Reaction And Its Mutagenicity To TA 100 And 104. 9<sup>th</sup> ICEM (San Francisco, U.S.A.) 平成 17 年 9 月
- 3) 河井一明, 前川宗之, 松田知成, 松井三郎, 葛西宏: 過酸化脂質由来変異原によるマウス臓器 DNA 付加体の形

成 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌) 平成 17 年 9 月

- 4) 前川宗之, 河井一明, 葛西宏: 過酸化脂質モデル反応により生成する変異原・dG 付加体の構造 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌) 平成 17 年 9 月
- 5) 河井一明, 前川宗之, 松井三郎, 松田知成, 高橋良和, 中村光, 澤竜一, 葛西宏: 4-Oxo-2-hexenal as a novel lipid peroxide product: mutagenicity, DNA adduct formation and presence in human diet 日本環境変異原学会第 34 回大会 (東京) 平成 17 年 11 月

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

## H. 知的所有権の取得状況

4. 特許取得  
なし
5. 実用新案登録  
なし
6. その他  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
総合分担研究報告書

—コウジ酸の *in vitro* および *in vivo* の遺伝毒性の再検討—

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

コウジ酸の遺伝毒性をエンドポイントの異なる複数の *in vivo*, *in vitro* の遺伝毒性検索法で再検討した。コウジ酸はヒト由来培養細胞に対して DNA 損傷性を示すことは明らかであったが、その作用は高濃度域に限られることから、コウジ酸の DNA 損傷性の程度は低い。コメットアッセイで検出されたようなコウジ酸による DNA 損傷の一部は染色体の異常および DNA レベルの点突然変異として固定されると考えられる。コウジ酸は 1 回強制経口投与によってマウスの胃と肝、肺、骨髄でコメットアッセイ陽性を、マウス再生肝小核試験で陽性を、ラット末梢血小核試験で陽性を示した。コウジ酸は混餌投与によって雌ラットの肝に腫瘍を誘発することが報告されているが、コメットアッセイで検出された肝における DNA 損傷の染色体異常等への固定を示唆する明確な証拠は得られなかった。コウジ酸の *in vivo* 遺伝毒性の結果は錯綜した状態にあることなどを勘案すると、コウジ酸の雌ラットの肝で報告された腫瘍の誘発を *in vivo* 遺伝毒性と結びつける根拠は薄弱であると考えられる。

A. 研究目的

コウジ酸は、1900年代初頭に米麴の中から発見された物質で、抗菌作用、酸化を促進する重金属イオンの封鎖作用、メラニン色素形成の抑制作用、食品の劣化を招く酵素を阻害する作用などが知られ、食品添加物や化粧品の成分として用いられてきた。しかしながら、コウジ酸を 1.5, 3%で20ヶ月B6C3F1マウスに混餌投与したところ甲状腺小細胞腺腫の発生が認められ(Fujimoto et al., 1998)。さら

に、コウジ酸を26週混餌投与した実験では、*p53*(+/-)および*p53*(+/+) CBAマウスにおいて各々1.5と3%で7/10と 5/10, 2/10 と 5/10の割合で肝細胞腺腫の誘発がみられた(Takizawa et al., 2003)。以上のことから、コウジ酸には癌原性が疑われるに至った。肝癌原性が肝遺伝毒性に起因するか否かの検討は、コウジ酸の安全性評価上、きわめて重要であると考えられる。コウジ酸の遺伝毒性は*in vitro*, *in vivo*の両方で評価されてきているが、



*in vitro*, *in vivo*のいずれにおいても陽性と陰性の結果が錯綜した状態にある。そのため、本研究ではコウジ酸の遺伝毒性をエンドポイントの異なる複数の*in vivo*, *in vitro*の遺伝毒性検索法で再検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### B-1 *In vitro*遺伝毒性

ヒト・リンパ腫由来のWTK1tk<sup>+/+</sup>細胞およびTK6tk<sup>+/+</sup>細胞をコウジ酸で4ないし20時間処理した後、コメットアッセイ、染色体異常試験、tk突然変異試験に供した。

#### (1) *In vitro*コメットアッセイ

コウジ酸の4, 20時間の処理の直後にコメットアッセイの標本作製した。

#### (2) *In vitro*染色体異常試験

コウジ酸の4時間処理の場合は処理後の16時間の回復時間の後、染色体標本作製した。20時間処理の場合は、処理後直ちには染色体標本作製した。

#### (3) tk突然変異試験

コウジ酸の4, 20時間の処理後72時間の培養の後、マイクロプレート法によってtk突然変異細胞頻度を求めた。

### B-2 *In vivo*遺伝毒性

#### (1) *In vivo*コメットアッセイ

##### (1-1) 強制経口投与

雄のddYマウスおよびWistarラットにコウジ酸を最大用量1000 mg/kgで1回強制経口投与し、3および24時間後に屠殺し、腺胃、結腸、肝、腎、膀胱、肺、大脳、骨髄においてコメットアッセイを実施した。

##### (1-2) 混餌投与

雄のddYマウスに10日間、癌原性試験で

用いられた濃度である1.5および3%でコウジ酸を混餌投与した。投与開始の1, 2, 4, 6, 10日目に動物を順次屠殺し、腺胃、結腸、肝、腎、膀胱、肺、大脳、骨髄においてコメットアッセイを実施した。

#### (2) 小核試験

##### (2-1) マウス再生肝

雄のddYマウスにコウジ酸を最大用量1000 mg/kgで強制経口投与した。投与24時間後に肝の2/3を切除、その4日後にコラゲナーゼ灌流によって再生肝の細胞を分散した。ホルマリンで固定、アクリジンオレンジで染色により小核を有する肝細胞(MNHPC)の頻度を求めた。

##### (2-2) ラット末梢血

雄のWistarラットにコウジ酸を最大用量1000 mg/kgで強制経口投与した。投与0, 24, 48, 72時間後に尾静脈から10μLの末梢血を採取、アクリジンオレンジ超生体染色により小核を有する網赤血球(MNPCE)の頻度を求めた。

## C. 研究結果

### C-1 *In vitro*遺伝毒性

#### (1) *In vitro*コメットアッセイ (Table 1)

WTK1とTK6のいずれの細胞でも、4時間処理では2500 μg/ml以上、24時間以上では1250 μg/ml以上という高い濃度域においてMigrationの有意な増大がみられた。本実験条件下では細胞生存率が70%を下回らなかったことから、Migrationの有意な増大は細胞死に起因するものとは考えられなかった。

#### (2) *In vitro*染色体異常試験 (Table 2)

WTK1とTK6のいずれの細胞でも、4時間処理では2500 μg/ml以上、24時間以上

では1250 µg/ml以上という高い濃度域において染色体異常を有する細胞の頻度の有意な増大がみられた。染色分体型の切断 (ctb) は顕著に増大したものの、染色分体型の交換 (cte) には変化は見られなかった。

### (3) tk突然変異試験 (Table 3)

WTK1とTK6のいずれの細胞でも、2500 µg/ml以上で生存コロニー数 (RS0) の50%以上の抑制がみられ、突然変異コロニー数 (MF) の増大がみられた。Small mutant colony (SF)の頻度には顕著な変化は見られなかった。

## C-2 *In vivo* 遺伝毒性

### (1) *In vivo* コメットアッセイ

コウジ酸の1回強制経口投与では、マウスの胃と肝でMigrationの有意な増大がみられた (Table 4)。ラットでは胃、肝、肺、骨髄でMigrationの有意な増大がみられたが、その程度は胃を除いて弱いものであった (Table 4)。肝のコメットアッセイではテールが極めて短いコメット像が高頻度で見られるという特徴がみられた。Migrationの有意な増大がみられた臓器では病理学的な壊死の兆候はみられなかったことから、Migrationの有意な増大は細胞死に起因するものとは考えられなかった。

コウジ酸の混餌投与 (マウスのみの実験) では、マウス肝で投与期間の延長に伴うMigrationの増大がみられた (Table 5)。強制経口投与のときと同様に、肝のコメットアッセイではテールが極めて短いコメット像が高頻度で見られるという特徴がみられた。胃と結腸では投与期間が6

日間のときに有意なMigrationの増大がみられたが、投与期間をさらに延長して10日間としたときには有意な増大はみられなかった。Migrationの有意な増大がみられた臓器では病理学的な壊死の兆候はみられなかったことから、Migrationの有意な増大は細胞死に起因するものとは考えられなかった。

### (2) 小核試験

コウジ酸の1回強制経口投与によってマウスの再生肝で小核を有する細胞の頻度の有意な増大がみられた (Table 6)。ラットでは骨髄 (末梢血) で小核を有する網赤血球の有意な増大がみられた (Table 7)。その他の臓器 (胃と結腸) では小核を有する細胞の頻度に変化はみられなかった (Table 8)。

## D. 考察

コウジ酸の遺伝毒性は*in vitro*と*in vivo*の種々の試験系によって検索されてきている。バクテリアの遺伝子損傷性を検出するSOS chromo testでは陰性、rec assayでは陽性と結果が食い違い、Amesテストでは概ね高用量域で陽性と報告されている。哺乳動物培養細胞を用いる系では、染色体異常とSCEの誘発が報告されているが、hprt突然変異試験は陰性とされている。*In vivo*ではマウスを用いた優性致死試験、小核試験 (骨髄細胞) では陰性、ラットの小核試験 (末梢血) で陽性とされている。このようにコウジ酸の遺伝毒性試験の結果は*in vitro*と*in vivo*のいずれにおいても錯綜した状態である。

ここでは*in vitro*試験の試験条件の差による結果の違いを排除すべく、同一処理

条件下の*in vitro*の試験でDNA損傷，染色体異常，遺伝子突然変異を検討した．コメットアッセイ，染色体異常試験，遺伝子突然変異試験のいずれもほぼ同一の濃度域（概ね1250 µg/mL以上の高濃度域）で陽性の結果が得られた．陽性の結果が高濃度域に限られることから，浸透圧の上昇による非生理的条件による偽陽性も疑われる．しかし，中島によるとコウジ酸による浸透圧の上昇はこの20 mMという高濃度域でも見られなかったため，高濃度域に限られた陽性の結果であっても浸透圧の上昇が原因とは考えられなかった．そのため，コウジ酸はDNA損傷性を有し，コメットアッセイで検出されたDNA損傷は染色体異常と遺伝子突然変異の原因となると考えられる．また，WTK1細胞とTK6細胞の間で結果に大きな差がなかったこと，遺伝子突然変異試験でsmall mutant colonyの頻度に大きな変化がみられなかったことから，遺伝子突然変異はclastogenicな要因によるものではないと考えられる．

コウジ酸は*in vivo*においてもマウスの胃と肝，ラットの胃，肝，肺，骨髄でDNA損傷を誘発することがコメットアッセイで示唆された．このコメットアッセイで陽性となった臓器のうち，マウスでは肝，ラットでは骨髄で小核が誘発された．このことから，*in vitro*におけるのと同様に，マウスの肝，ラットの骨髄ではコメットアッセイで検出されたDNA損傷が染色体の異常として固定されていると考えられる．コウジ酸は混餌投与によって雌ラットの肝に腫瘍を誘発することが報告されているが，コメットアッセ

イで検出されたラット肝におけるDNA損傷の染色体異常等への固定を示唆する明確な証拠は得られなかった．さらに，肝ではコメットアッセイと小核試験ではその増殖性に大きな差があるなど，その生理的状态は大きく異なり，簡単に結論を出すことは難しい．また，肝のコメットアッセイではテールが極めて短いコメット像が高頻度でみられるという特徴がみられたが，このようなテールが極めて短い特異なコメット像が真に遺伝毒性を意味するのかを解明することも今後の課題である．

以上のことから，コウジ酸は*in vitro*では遺伝毒性を示すと考えられるが，*in vivo*の遺伝毒性については，今回の報告例も含めて，非常に錯綜した状態にあり，未だ明確な結論を出すことは難しいものと考えられる．

## E. 結 論

コウジ酸はヒト由来培養細胞に対してDNA損傷性を示すことは明らかであるが，その作用は高濃度域に限られることから，コウジ酸のDNA損傷性の程度は低い．コメットアッセイで検出されたようなコウジ酸によるDNA損傷の一部は染色体の異常およびDNAレベルの点突然変異として固定されると考えられる．コウジ酸は混餌投与によって雌ラットの肝に腫瘍を誘発することが報告されているが，コメットアッセイで検出された肝におけるDNA損傷の染色体異常等への固定を示唆する明確な証拠は得られなかった．コウジ酸の*in vivo*遺伝毒性の結果は錯綜した状態にあることなどを勘案

すると、コウジ酸の雌ラットの肝で報告された腫瘍の誘発を *in vivo* 遺伝毒性と結びつける根拠は薄弱であると考えられる。

#### 参考文献

Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A. 1998. Induction of thyroid tumors in (C57BL/6N x C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid. *Fd Chem Toxicol* 36: 697-703.

Takizawa T, Mitsumori K, Tamura T, Imai T, Ueda M, Hirose M. Hepatocellular

tumor induction by 26-week dietary administration of Kojic acid in heterozygous p53 deficient CBA mice. *Toxicol Sci*: in press.

#### F. 健康危険情報

「なし」

#### G. 研究発表

「なし」

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

「なし」