

Table 1. DNA damage detected with the comet assay in human lymphoblastoid cells treated with Kojic acid.

Cell line	Chemical	(µg/ml)	DNA Migration (µm, Mean ± SEM of 50 cells)			
			4 h <sup>a</sup>		20 h <sup>a</sup>	
TK6	Kojic acid	0	23.1 ± 0.51	(100) <sup>b</sup>	22.9 ± 0.44	(100)
		313	22.9 ± 0.66	(108)	23.2 ± 0.41	(95.3)
		625	24.4 ± 1.04	(84.1)	26.4 ± 0.53	(81.3)
		1250	29.3 ± 1.51	(88.1)	33.1 ± 1.47*	(77.2)
		2500	34.3 ± 1.81*	(71.2)	34.1 ± 1.57*	(74.5)
		5000	33.2 ± 1.53*	(73.7)	- <sup>c</sup>	(22.3)
	4NQO	0.4	63.4 ± 3.16*	(75.2)	-	(10.4)
WTK1	Kojic acid	0	22.7 ± 0.61	(100)	22.1 ± 0.52	(100)
		313	24.9 ± 1.19	(95.8)	21.4 ± 0.49	(85.3)
		625	23.6 ± 0.95	(89.1)	24.3 ± 1.25	(95.0)
		1250	29.9 ± 1.86	(105)	35.7 ± 1.67*	(88.1)
		2500	32.1 ± 1.81*	(91.2)	35.9 ± 1.59*	(73.1)
		5000	34.3 ± 1.72*	(81.3)	-	(39.1)
	4NQO	0.4	57.7 ± 1.99*	(78.3)	-	(11.2)

<sup>a</sup>, Exposure period

<sup>b</sup>, Numbers in parenthesis show relative viability (%) measured using Trypan blue dye exclusion.

<sup>c</sup>, not evaluated because of excessive toxicity.

Significant difference from untreated control: \* p<0.05.

Table 2. Chromosome aberrations in human lymphoblastoid cells treated with Kojic acid.

Cell line	Chemical	Treatment (µg/ml)	Treatment period (h)	Aberrant cells (%)		No. of chromosome aberrations / 100 cells							Polyploidy (%)	Mitotic index (%)	
				+ gap	- gap	ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	Others			
TK6	Kojic acid	0	4-16a	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	3.5	
		156	4-16	3	3	1	3	0	0	0	0	0	0	2	3.1
		313	4-16	7	6	5	13	2	0	0	0	0	0	4	3.2
		625	4-16	6	5	4	12	1	0	0	0	0	0	3	2.3
		1250	4-16	9	7	2	13	0	0	0	0	0	1	5	2.1
		2500	4-16	13*	12*	1	18	1	0	0	0	0	0	1	1.2
		5000	4-16	12*	11*	2	31	1	0	0	0	0	0	2	0.4
		0.4	4-16	22*	19*	4	10	29	1	0	1	0	3	2	2.1
		0	20-0	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	2	3.6
		156	20-0	2	2	0	3	0	0	0	0	0	0	2	3.9
WTK1	Kojic acid	313	20-0	9	7	2	11	1	1	0	0	1	5	3.1	
		625	20-0	8	8	0	13	2	0	0	0	1	5	1.9	
		1250	20-0	16*	16*	5	27	3	0	1	0	0	4	1.8	
		2500	20-0	29*	29*	6	65	2	0	0	1	0	3	0.3	
		5000	20-0	<sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
		0.1	20-0	43*	38*	12	28	63	0	5	1	1	1	1.1	
		0	4-16	3	2	3	2	0	0	0	0	0	0	2	3.8
		156	4-16	4	4	0	10	0	0	0	0	0	0	5	4.1
		313	4-16	6	5	5	9	1	0	0	0	0	1	3	4.2
		625	4-16	5	5	0	5	3	0	0	0	0	0	3	3.3
4NQO	Kojic acid	1250	4-16	7	4	7	4	1	0	0	0	0	4	3.1	
		2500	4-16	11*	11*	1	14	2	0	0	0	0	3	2.2	
		5000	4-16	4	3	1	3	0	0	0	0	0	4	0.8	
		0.4	4-16	29*	25*	7	13	28	4	2	2	2	4	1.9	

Cell line	Chemical (µg/ml)	Treatment period (h)	Aberrant cells (%)		No. of chromosome aberrations / 100 cells							Polyploidy (%)	Mitotic index (%)	
			+ gap	- gap	Chromosome type									Others
					ctg	ctb	cte	csg	csb	cse				
	0	20-0	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	3	3.1
	156	20-0	5	5	1	5	1	0	0	0	0	0	5	2.9
	313	20-0	6	6	1	5	2	0	0	0	0	0	6	3.4
	625	20-0	7	6	3	7	1	0	0	0	0	0	3	2.3
	1250	20-0	15*	14*	6	19	2	0	0	1	0	0	7	1.9
	2500	20-0	33*	30*	6	55	1	0	0	0	0	0	6	1.2
	5000	20-0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
4NQO	0.1	20-0	51*	46*	10	33	71	2	4	5	0	0	12	0.9

<sup>a</sup>, Exposure period – recovery period

<sup>b</sup>, not evaluated due to lack of mitoses.

Significant difference from untreated control: \* p<0.05.

ctg, chromatid gaps; ctb, chromatid breaks and fragments; cte, interchange and intrachange between chromatids; csg, chromosome gaps; csb, chromosome breaks and fragments; cse, interchange and intrachange between chromosomes.

Table 3. Toxicity and TK Mutant frequency in human lymphoblastoid cells treated with Kojic acid.

Cell line	Chemical	S9 mix	Concentration (µg/ml)	Treatment period (h)	RS0a (%)	RTG <sup>b</sup> (%)	NMF <sup>c</sup> / 10 <sup>6</sup> cells	RNMF <sup>d</sup> (%)	SMF <sup>e</sup> / 10 <sup>6</sup> cells	RSMF <sup>f</sup> (%)
TK6	Kojic acid	-	0	4	100	100	4.48	100	2.61	100
		-	625	4	92.0	99.3	3.66	81.6	1.71	65.3
		-	1250	4	81.1	46.5	13.4	299	4.60	176
		-	2500	4	40.6	26.7	23.5	523	5.04	193
		-	5000	4	23.1	14.2	27.5	614	4.85	185
	-	4NQO	-	0.2	4	34.6	21.4	51.8	35.0	1341
	Kojic acid	-	0	20	100	100	4.18	100	2.37	100
		-	313	20	97.0	85.1	7.90	189	1.84	77.3
		-	625	20	76.7	37.2	16.7	399	3.11	131
		-	1250	20	79.0	26.7	28.3	677	4.75	200
-		2500	20	24.4	12.1	32.8	784	4.12	173	
-		5000	20	0	0	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	
Kojic acid	+	0	4	100	100	3.64	100	2.14	100	
	+	625	4	114.9	85.1	3.79	104	1.67	77.9	
	+	1250	4	56.3	49.7	8.45	232	1.83	85.6	
	+	2500	4	42.3	20.5	19.9	546	3.11	145	
	+	5000	4	20.1	9.34	25.6	705	3.39	158	
	+	8	4							
	+		4							
WTK1	Kojic acid	-	0	4	100	100	82.8	100	50.8	100
		-	625	4	89.4	93.1	73.2	77.5	53.8	106
		-	1250	4	76.6	45.7	289	349	74.8	147
	-	2500	4	39.3	29.3	427	516	82.0	161	
	-	5000	4	26.9	16.0	477	576	75.1	148	
	-	4NQO	-	0.2	4	36.5	16.2	503	314	450

Table 3. 続き

Cell line	Chemical	S9 mix	Concentration (µg/ml)	Treatment period (h)	RS0a (%)	RTG <sup>b</sup> (%)	NMF <sup>c</sup> / 10 <sup>6</sup> cells	RNMFD (%)	SMF <sup>e</sup> / 10 <sup>6</sup> cells	RSMF <sup>f</sup> (%)
Kojic acid		-	0	20	100	100	111	100	69.8	100
		-	313	20	139	134	193	174	126	180
		-	625	20	72.9	66.6	300	270	106	152
		-	1250	20	84.8	28.6	536	482	98.3	141
		-	2500	20	22.6	11.4	567	510	126	179
		-	5000	20	0	0	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic
Kojic acid		+	0	4						
		+	625	4						
		+	1250	4						
		+	2500	4						
		+	5000	4						
		+	0.2	4						
2NA										

a, Relative survival at day 0; b, Relative total growth during the 72 h expression period; c, Frequency of normally growing mutant colonies; d, Relative normally growing colony mutant frequency; e, Frequency of slowly growing mutant colonies; f, Relative slowly growing colony mutant frequency; Toxic, not assayed due to toxicity.

Table 4. DNA damage measured with the comet assay in organs from rodents treated by single gavage with Kojic acid.

Species	Chemical	Sampling time (h)	(mg/kg)	DNA Migration ( $\mu\text{m}$ , Mean $\pm$ SEM of 4 animals)								
				Stomach	Colon	Liver	Kidney	Urinary bladder	Lung	Brain	Bone marrow	
Mouse	Kojic acid	3	0	6.01 $\pm$ 1.09	6.27 $\pm$ 1.27	2.17 $\pm$ 0.93	2.40 $\pm$ 0.30	5.11 $\pm$ 0.77	2.58 $\pm$ 0.47	1.34 $\pm$ 0.55	1.96 $\pm$ 0.61	
		3	125	5.63 $\pm$ 0.46	4.83 $\pm$ 0.07	1.50 $\pm$ 0.67	1.81 $\pm$ 0.51	3.82 $\pm$ 0.46	1.94 $\pm$ 0.72	2.17 $\pm$ 0.21	0.65 $\pm$ 0.23	
		3	250	4.21 $\pm$ 0.73	3.23 $\pm$ 0.53	2.40 $\pm$ 0.40	0.90 $\pm$ 0.15	3.92 $\pm$ 0.59	1.37 $\pm$ 0.28	0.70 $\pm$ 0.51	0.70 $\pm$ 0.41	
	DEN	3	500	8.00 $\pm$ 0.76	5.83 $\pm$ 0.64	4.00 $\pm$ 1.32	1.71 $\pm$ 0.33	4.29 $\pm$ 0.28	1.09 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.33	0.60 $\pm$ 0.34	
		3	1000	14.6 $\pm$ 2.89*	8.15 $\pm$ 0.56	16.3 $\pm$ 1.55*	1.50 $\pm$ 0.39	6.22 $\pm$ 0.94	2.68 $\pm$ 0.64	2.20 $\pm$ 0.43	1.29 $\pm$ 0.90	
		3	160	62.3 $\pm$ 9.66*	60.2 $\pm$ 2.20*	89.8 $\pm$ 3.06*	17.6 $\pm$ 4.01*	38.1 $\pm$ 3.86*	38.9 $\pm$ 1.49*	2.11 $\pm$ 1.09	0.77 $\pm$ 0.49	
	Rat	Kojic acid	24	0	5.60 $\pm$ 1.42	4.73 $\pm$ 1.40	1.20 $\pm$ 0.54	1.47 $\pm$ 0.15	5.37 $\pm$ 0.55	1.37 $\pm$ 0.60	0.88 $\pm$ 0.55	1.34 $\pm$ 0.86
			24	125	5.37 $\pm$ 1.27	3.74 $\pm$ 0.59	2.15 $\pm$ 0.84	1.71 $\pm$ 0.62	4.72 $\pm$ 0.69	3.10 $\pm$ 0.35	0.96 $\pm$ 0.37	0.65 $\pm$ 0.39
			24	250	4.85 $\pm$ 0.38	4.08 $\pm$ 0.49	2.32 $\pm$ 0.62	1.91 $\pm$ 1.12	3.82 $\pm$ 0.40	1.86 $\pm$ 0.69	1.32 $\pm$ 0.47	1.14 $\pm$ 0.44
DEN		24	500	9.47 $\pm$ 0.68	4.44 $\pm$ 0.78	5.65 $\pm$ 1.84*	1.50 $\pm$ 0.56	4.96 $\pm$ 0.97	2.89 $\pm$ 0.56	1.55 $\pm$ 0.68	0.72 $\pm$ 0.42	
		24	1000	12.3 $\pm$ 1.83*	7.87 $\pm$ 0.75	15.8 $\pm$ 2.03*	0.93 $\pm$ 0.38	5.91 $\pm$ 1.21	1.73 $\pm$ 0.69	1.19 $\pm$ 0.25	0.85 $\pm$ 0.50	
		24	160	12.4 $\pm$ 2.16	9.81 $\pm$ 0.92	34.0 $\pm$ 3.04*	5.99 $\pm$ 0.89	9.29 $\pm$ 1.31	9.95 $\pm$ 1.89*	1.99 $\pm$ 0.90	1.40 $\pm$ 0.81	
Rat		Kojic acid	3	0	7.57 $\pm$ 0.32	3.82 $\pm$ 0.19	0.69 $\pm$ 0.26	1.14 $\pm$ 0.15	7.16 $\pm$ 0.67	1.38 $\pm$ 0.34	0.93 $\pm$ 0.38	0.42 $\pm$ 0.28
			3	500	22.0 $\pm$ 4.07	7.92 $\pm$ 1.43	3.59 $\pm$ 0.27	3.95 $\pm$ 1.14	8.98 $\pm$ 2.10	6.48 $\pm$ 0.59	1.29 $\pm$ 0.43	4.31 $\pm$ 0.86
			3	1000	28.7 $\pm$ 1.55*	5.73 $\pm$ 0.37	2.87 $\pm$ 0.97	1.70 $\pm$ 0.21	7.15 $\pm$ 1.62	6.30 $\pm$ 0.47*	1.78 $\pm$ 0.41	6.74 $\pm$ 0.27*
	DEN	3	160	48.8 $\pm$ 3.37*	40.5 $\pm$ 4.92*	51.5 $\pm$ 3.89*	21.0 $\pm$ 3.73*	29.5 $\pm$ 3.68*	32.9 $\pm$ 3.56*	0.39 $\pm$ 0.39	1.03 $\pm$ 0.61	
		24	0	8.33 $\pm$ 0.55	4.18 $\pm$ 0.37	1.03 $\pm$ 0.43	2.37 $\pm$ 0.56	5.45 $\pm$ 0.60	2.06 $\pm$ 0.31	2.40 $\pm$ 0.50	1.19 $\pm$ 0.48	
		24	500	9.42 $\pm$ 1.56	3.92 $\pm$ 0.77	1.60 $\pm$ 0.71	1.42 $\pm$ 0.52	7.10 $\pm$ 0.41	2.76 $\pm$ 0.16	0.72 $\pm$ 0.43	2.12 $\pm$ 1.28	
	DEN	24	1000	10.7 $\pm$ 1.12	4.62 $\pm$ 0.43	5.16 $\pm$ 0.86*	2.89 $\pm$ 0.45	6.27 $\pm$ 0.33	2.19 $\pm$ 1.29	1.55 $\pm$ 0.53	5.32 $\pm$ 0.72*	
		24	160	41.0 $\pm$ 3.24*	19.1 $\pm$ 1.14*	30.7 $\pm$ 2.14*	3.93 $\pm$ 0.87	17.6 $\pm$ 3.58*	3.46 $\pm$ 0.71	2.50 $\pm$ 0.55	0.47 $\pm$ 0.47	

Significant difference from untreated control: \* p<0.05.

Table 5. DNA damage measured with the comet assay in organs from mice fed Kojic acid.

Chemical	Dose (%)	Feeding period (day)	DNA Migration ( $\mu\text{m}$ , Mean $\pm$ SEM of 4 animals)							
			Stomach	Colon	Liver	Kidney	Urinary bladder	Lung	Brain	Bone marrow
Kojic acid	0	1	5.63 $\pm$ 0.61	4.03 $\pm$ 0.91	1.47 $\pm$ 0.40	1.27 $\pm$ 0.49	3.57 $\pm$ 0.49	1.73 $\pm$ 0.21	0.83 $\pm$ 0.48	0.77 $\pm$ 0.45
	1.5	1	6.09 $\pm$ 1.00	5.86 $\pm$ 1.12	1.94 $\pm$ 0.43	0.88 $\pm$ 0.53	5.01 $\pm$ 0.47	1.83 $\pm$ 0.72	1.45 $\pm$ 0.61	0.98 $\pm$ 0.20
	3	1	10.1 $\pm$ 1.04	6.66 $\pm$ 0.93	3.51 $\pm$ 1.48	1.60 $\pm$ 0.42	4.42 $\pm$ 0.64	2.22 $\pm$ 0.38	1.34 $\pm$ 0.63	0.47 $\pm$ 0.27
DEN	0.01	1	6.17 $\pm$ 0.77	5.86 $\pm$ 0.29	12.1 $\pm$ 3.36*	2.60 $\pm$ 0.88	7.77 $\pm$ 0.65	1.21 $\pm$ 0.41	0.88 $\pm$ 0.36	2.04 $\pm$ 0.88
	0.01	1	10.7 $\pm$ 3.01	5.55 $\pm$ 0.54	27.0 $\pm$ 3.23*	2.53 $\pm$ 0.76	9.35 $\pm$ 2.76	2.01 $\pm$ 0.41	2.04 $\pm$ 0.93	0.47 $\pm$ 0.27
Kojic acid	0	2	6.12 $\pm$ 1.08	5.14 $\pm$ 0.92	1.73 $\pm$ 0.23	0.93 $\pm$ 0.38	4.13 $\pm$ 0.84	1.73 $\pm$ 0.47	1.57 $\pm$ 0.48	2.33 $\pm$ 0.83
	1.5	2	7.12 $\pm$ 1.01	9.60 $\pm$ 2.82	5.32 $\pm$ 2.02	1.86 $\pm$ 0.77	5.11 $\pm$ 0.88	1.58 $\pm$ 0.81	1.27 $\pm$ 0.49	0.88 $\pm$ 0.59
	3	2	8.47 $\pm$ 1.61	3.87 $\pm$ 0.48	1.63 $\pm$ 0.45	3.02 $\pm$ 1.25	4.00 $\pm$ 0.87	2.45 $\pm$ 0.66	1.24 $\pm$ 0.44	0.88 $\pm$ 0.51
DEN	0.01	2	8.10 $\pm$ 0.80	6.04 $\pm$ 0.71	12.7 $\pm$ 1.84*	0.88 $\pm$ 0.32	5.58 $\pm$ 0.42	2.43 $\pm$ 0.41	1.64 $\pm$ 0.32	1.16 $\pm$ 1.16
	0.01	2	22.9 $\pm$ 2.83*	14.9 $\pm$ 1.40*	15.6 $\pm$ 2.79*	1.71 $\pm$ 0.26	20.0 $\pm$ 2.80	3.25 $\pm$ 0.35	2.76 $\pm$ 0.86	4.31 $\pm$ 2.23
Kojic acid	0	4	5.58 $\pm$ 1.01	4.49 $\pm$ 1.12	1.01 $\pm$ 0.35	1.53 $\pm$ 0.45	4.67 $\pm$ 0.63	1.50 $\pm$ 0.16	0.67 $\pm$ 0.23	0.80 $\pm$ 0.50
	1.5	4	6.09 $\pm$ 0.42	3.69 $\pm$ 0.27	4.91 $\pm$ 1.64	0.85 $\pm$ 0.36	3.00 $\pm$ 0.68	1.76 $\pm$ 0.70	0.75 $\pm$ 0.46	0.54 $\pm$ 0.32
	3	4	9.65 $\pm$ 1.90	9.73 $\pm$ 2.92	8.96 $\pm$ 2.36*	1.08 $\pm$ 0.44	3.67 $\pm$ 0.41	2.61 $\pm$ 1.62	0.70 $\pm$ 0.49	0.93 $\pm$ 0.56
DEN	0.01	4	12.4 $\pm$ 1.82	8.13 $\pm$ 2.67	15.5 $\pm$ 1.86*	0.41 $\pm$ 0.25	7.33 $\pm$ 1.71	1.73 $\pm$ 0.47	2.12 $\pm$ 0.65	0.44 $\pm$ 0.29
	0.01	4	23.1 $\pm$ 3.25*	16.8 $\pm$ 1.27*	27.4 $\pm$ 1.96*	8.17 $\pm$ 1.25*	4.29 $\pm$ 0.33	3.07 $\pm$ 0.85	2.74 $\pm$ 0.63	0.62 $\pm$ 0.37
Kojic acid	0	6	6.53 $\pm$ 0.80	4.18 $\pm$ 0.44	1.83 $\pm$ 0.89	2.58 $\pm$ 0.53	4.87 $\pm$ 0.28	2.38 $\pm$ 0.60	2.45 $\pm$ 0.99	0.90 $\pm$ 0.55
	1.5	6	6.12 $\pm$ 1.21	4.72 $\pm$ 0.45	5.86 $\pm$ 0.34	1.14 $\pm$ 0.54	4.75 $\pm$ 0.36	1.76 $\pm$ 0.48	1.16 $\pm$ 0.80	0.85 $\pm$ 0.50
	3	6	15.4 $\pm$ 0.58*	12.7 $\pm$ 0.85*	12.8 $\pm$ 2.29*	1.22 $\pm$ 0.13	4.77 $\pm$ 0.87	2.02 $\pm$ 0.92	1.21 $\pm$ 0.53	0.88 $\pm$ 0.51
DEN	0.01	6	9.16 $\pm$ 1.53	6.14 $\pm$ 0.70	14.9 $\pm$ 2.75*	0.80 $\pm$ 0.28	3.85 $\pm$ 0.52	3.25 $\pm$ 0.64	1.22 $\pm$ 0.27	0.80 $\pm$ 0.59
	0.01	6	14.8 $\pm$ 2.09*	8.00 $\pm$ 0.78	31.1 $\pm$ 1.83*	14.6 $\pm$ 0.63*	5.45 $\pm$ 1.44	2.45 $\pm$ 0.56	0.70 $\pm$ 0.41	2.50 $\pm$ 1.46
Kojic acid	0	10	5.19 $\pm$ 0.45	4.31 $\pm$ 0.63	0.80 $\pm$ 0.52	1.01 $\pm$ 0.37	4.31 $\pm$ 0.38	1.24 $\pm$ 0.49	1.19 $\pm$ 0.25	0.98 $\pm$ 0.42
	1.5	10	5.19 $\pm$ 0.88	3.88 $\pm$ 0.37	6.66 $\pm$ 0.40*	3.67 $\pm$ 0.40	4.15 $\pm$ 0.78	1.63 $\pm$ 0.23	0.85 $\pm$ 0.50	0.31 $\pm$ 0.31
	3	10	8.10 $\pm$ 0.80	6.04 $\pm$ 0.71	12.7 $\pm$ 1.84*	0.88 $\pm$ 0.32	5.58 $\pm$ 0.42	2.43 $\pm$ 0.41	1.65 $\pm$ 0.32	1.16 $\pm$ 1.16

Significant difference from untreated control: \* p<0.05.

Table 6. Micronucleus induction in re-generating liver from mice and rats treated by single gavage with Kojic acid.

Species	Chemical	(mg/kg)	MNHPCs / 1000 HPCs (Mean $\pm$ SEM of 3 or 4 animals)
Mouse	Kojic acid	0	2.33 $\pm$ 0.33
		500	5.00 $\pm$ 1.00
		1000	10.3 $\pm$ 1.45*
	DEN <sup>a</sup>	160	15.7 $\pm$ 1.20*
Rat		0	1.67 $\pm$ 0.33
		500	2.00 $\pm$ 0.58
		1000	1.33 $\pm$ 0.33
	DEN <sup>a</sup>	160	17.3 $\pm$ 2.01*

<sup>a</sup>, Three animals were used.

Significant difference from control: \*  $p < 0.05$ .

MNHPCs, micronucleated hepatocytes; HPCs, hepatocytes.



Table 7. Micronucleus induction in peripheral blood cells from mice and rats treated by single gavage with Kojic acid

Species	Chemical	(mg/kg)	MNPCEs / 1000 PCEs (Mean $\pm$ SEM of 4 animals)			
			0 h <sup>a</sup>	24 h	48 h	72 h
Mouse	Kojic acid	250	1.50 $\pm$ 0.29	1.00 $\pm$ 0.58	1.75 $\pm$ 0.48	1.50 $\pm$ 0.29
		500	1.00 $\pm$ 0.58	1.67 $\pm$ 0.88	2.00 $\pm$ 1.00	1.33 $\pm$ 0.33
		1000	1.25 $\pm$ 0.48	1.50 $\pm$ 0.50	0.75 $\pm$ 0.48	1.75 $\pm$ 0.48
	MMC	1.5	2.80 $\pm$ 0.33	10.6 $\pm$ 2.25*	34.2 $\pm$ 2.51*	7.01 $\pm$ 1.31*
Rat		250	0.75 $\pm$ 0.25	0.50 $\pm$ 0.50	0.75 $\pm$ 0.48	1.00 $\pm$ 0.41
		500	0.67 $\pm$ 0.33	1.33 $\pm$ 0.33	3.33 $\pm$ 0.67	1.67 $\pm$ 0.67
		1000	1.00 $\pm$ 0.41	3.50 $\pm$ 0.65	7.25 $\pm$ 0.48*	3.00 $\pm$ 0.41
	MMC	1.5	1.20 $\pm$ 0.81	9.80 $\pm$ 1.66*	13.8 $\pm$ 2.34*	5.20 $\pm$ 1.43

<sup>a</sup>, time following treatment.

Significant difference from 0 h control: \* p<0.05.

MNPCEs, micronucleated polychromatic erythrocytes; PCEs, polychromatic erythrocytes

Table 8. Micronucleus induction in mucosa cells of stomach and colon from mice and rats treated by single gavage with Kojic acid.

Species	Organ	Chemical	(mg/kg)	Cells with MN/1000 cell (Mean $\pm$ SEM of 4 animals)		
				72 h <sup>a</sup>	96 h	120 h
Mouse	Stomach	Kojic acid	0	2.00 $\pm$ 0.71	3.25 $\pm$ 0.48	3.25 $\pm$ 0.85
			500	4.50 $\pm$ 0.29	1.50 $\pm$ 0.65	2.25 $\pm$ 0.82
			1000	1.50 $\pm$ 0.65	2.50 $\pm$ 0.29	2.25 $\pm$ 0.48
	Colon	1,2-DMH	30		10.3 $\pm$ 1.25*	
			0	0.75 $\pm$ 0.48	1.50 $\pm$ 0.29	1.00 $\pm$ 0.41
			500	2.00 $\pm$ 0.82	3.50 $\pm$ 1.19	1.25 $\pm$ 0.48
Rat	Stomach	1,2-DMH	0	1.25 $\pm$ 0.48	1.75 $\pm$ 0.25	1.75 $\pm$ 1.11
			500	1.50 $\pm$ 0.96	1.75 $\pm$ 0.25	2.25 $\pm$ 0.58
			1000	3.00 $\pm$ 0.82	1.50 $\pm$ 0.96	1.00 $\pm$ 0.41
Colon	1,2-DMH	100		10.3 $\pm$ 1.38*		
		0	3.00 $\pm$ 0.41	1.00 $\pm$ 0.41	2.25 $\pm$ 0.48	
		500	0.50 $\pm$ 0.50	0.75 $\pm$ 0.48	2.00 $\pm$ 0.41	
Rat	Colon	1,2-DMH	1000	2.50 $\pm$ 0.29	2.25 $\pm$ 0.48	1.50 $\pm$ 0.29
			100		10.3 $\pm$ 0.75*	

<sup>a</sup>, time following treatment

Significant difference from 0 h control: \* p<0.05.

MN, micronuclei

—コウジ酸の変異原性と変異スペクトル解析, および  
化学物質の遺伝毒性における生物学的閾値に関する研究—

分担研究者 太田 敏博 東京薬科大学・生命科学部・助教授

純度の異なるコウジ酸の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が、変異原性の強さに差は認められなかった。コウジ酸の変異原性は不純物に起因するものではなく、コウジ酸に変異原性があることが確認された。UVA 照射によるコウジ酸の光変異原性は認められなかった。コウジ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、G:C→A:T 変異が最も多く誘発されたが、活性酸素による突然変異に特徴的な G:C→T:A, A:T→T:A 変異の誘発は顕著ではなかった。変異原性における生物学的な閾値について検討するため、DNA 修復欠損株とその野生株で変異原性が認められる最低用量を復帰突然変異試験法で比較した。(1) TA1975, TA1535 (uvrB) YG7104 (uvrB, ogt) を用い、アルキル化剤 ENNG の突然変異誘発用量を比較した。(2)ヌクレオチド除去修復欠損株の TA1535 (uvrB) および WP2uvrA (uvrA) とそれらの野生株である TA1975 および WP2 株を用いて、塩基置換変異を誘発する変異原 MX, アジ化ナトリウムの突然変異誘発用量を比較した。(3) TA1538 (uvrB) 株とその野生株である TA1978 株用い、フレームシフトを誘発する変異原の 2-NF, 4-NQO, NPD の突然変異誘発用量を比較した。(4)ヌクレオチド除去修復欠損株の TA98 (uvrB) とその野生株である TA1978/pKM101 株を用いて、代謝活性化を必要とする変異原の Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ の突然変異の誘発用量を比較した。

いずれの場合も DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA 損傷（付加体形成）により突然変異が生じうる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、変異原性が認められる最低用量には 20~3000 倍の開きがあった。この結果は変異原性においても、生物学的な閾値が存在することを示唆している。

## A. 研究目的

コウジ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。そこでコウジ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 株に対するコウジ酸の変異原性を 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 WP2uvrA/pKM101 株を用いてコウジ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) コウジ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) コウジ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、誘発変異の特徴を見いだす。

一方、遺伝毒性には閾値が存在しないという考え方がこれまで一般的に受け入れられてきたが、近年 DNA を直接標的としない物質、例えば細胞分裂阻害剤や DNA 合成阻害剤など、DNA 以外の酵素や蛋白などへの影響によってもたらされる遺伝毒性には閾値が存在するとの考え方が国際的にも急速に受け入れられてきている。しかし DNA を

直接標的とする物質には閾値が存在しないという考え方は依然として広く浸透しており、化学物質の安全性評価においてもこの考え方が支配的な状態にあるといえる。閾値という概念にはいくつかの定義付けがなされているが、最近生物学的な閾値(biological threshold)という考え方が提唱されている。これは DNA を直接標的とする物質が DNA と直接作用する場がありながら、突然変異の発現に必要な全ての生物学的なプロセスが DNA 修復メカニズムなどにより完遂できない低用量域が存在する、という考え方である。本研究では細菌を用いる復帰突然変異試験法で、野生株と DNA 修復欠損変異株との間での突然変異誘発の用量を比較した。

## B. 研究方法

### 1. 変異原と代謝活性化系

3 種類のコウジ酸 (ロット番号: 2Y181, K-3125, 5312) は国立医薬品食品衛生研究所より配布されたものを用いた。コウジ酸は 100 mg/mL の濃度で dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させて用いた。

*N*-Ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) は Sigma-Aldrich より購入した。2-Nitrofluorene (2-NF), Sodium azide, 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2-(5*H*)-furanone (MX), *p*-Nitro-*o*-phenylenediamine (NPD), Trp-P-1, Trp-P-2, MeIQ は和光純薬工業より購入した。4-

Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) は東京化成工業より購入した。Sodium azide は滅菌水に、他の変異原は DMSO に溶解させて用いた。代謝活性化系 S9mix 調製のための S9 分画とコファクター混合液は和光純薬工業より購入した。S9 mix の組成は、4 mM NADPH, 4 mM NADH, 5 mM G-6-P, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 100 mM Na-リン酸緩衝液 (pH7.4), 10% S9 分画である。

## 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<sup>+</sup> 復帰変異を指標として各々, A:T→C:G, G:C→A:T, G:C→C:G, G:C→T:A, A:T→T:A, A:T→G:C 変異の誘発を定量することができる。

閾値の検討に際しては、DNA 修復遺伝子の欠損以外については isogenic な菌株セットを用いた。下記にこれらの菌株の特性を示した。

### (1) *S. typhimurium*

TA1975: *hisG46, rfa*

TA1535: *hisG46, rfa, uvrB*

YG7104: *hisG46, rfa, uvrB, ogt*

### (2) *S. typhimurium*

TA1978: *hisD3052, rfa*

TA1538: *hisD3052, rfa, uvrB*

### (3) *E. coli*

WP2: *trpE65*

WP2uvrA: *trpE65, uvrA*

### (4) *S. typhimurium*

TA1978 /pKM101: *hisD3052, rfa*

TA98 (pKM101): *hisD3052, rfa, uvrB*

## 3. 復帰突然変異試験

被験物質溶液 0.01~0.1 mL, 0.1M Na-リン酸緩衝液 (または S9mix) 0.5 mL, テスト菌株の培養液 0.1 mL を試験管に入れ、混合し 37°C で 20 分間プレインキュベーションした。2 mL のトップアガーを加え、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<sup>+</sup> または Trp<sup>+</sup> 復帰変異コロニー数を測定した。試験には各用量に 2~3 枚のプレート (対照群は 6 枚) を用い、2~3 回の実験の平均値を求めた。

## 4. 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 0.1mL 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/cm<sup>2</sup>) 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 トッ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。

#### 5. Lac<sup>+</sup> 復帰突然変異による突然変異スペクトル解析

被験物質溶液 0.1 mL と 0.1M 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、混合し 37°Cで20分間プレインキュベーションした。2 mL のトップアガーを加え、直ちに最少ラクト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<sup>+</sup> 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

変異原性は TA100, TA98, TA102, WP2*uvrA*/pKM101 の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 以上であり、コウジ酸の3種類のロットにおける違いは認められなかった。

#### 2. コウジ酸の変異原性に対する UVA 照射の影響

コウジ酸は 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。コウジ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. コウジ酸の突然変異スペクトル

大腸菌 WP3101P~WP3106P 株を用いて、コウジ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→A:T 変異が最も多く誘発された。

#### 4. ENNG の変異原性と DNA 修復

アルキル化剤 ENNG では、O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase (MGMT)を欠損した菌株 YG7104 が TA1535 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発がみられた。ENNG では、YG7104 が 0.0001~0.03 µg/plate の用量で陰性対照の2~170倍の変異コロニーを誘発したが、TA1535 ではそれらの用量では変異コロニーの誘発はみられず、0.3 µg/plate 以上の用量から対照の2倍以上の誘発が認められた。変異原性が認められた最低用量に3000倍の差があった。一方、ENNG では TA1535 と TA1975 との間の変異コロニーの誘発に大きな差異はみられなかった。

#### 5. MX の変異原性と DNA 修復

MX は塩基に付加体を生じる変異原であるが、WP2*uvrA* では 0.03~1 µg/plate で陰性対照の4~40倍の変異コロニーを誘発したが、野生株 WP2 では 1 µg/plate 以上の用量から変異コロニーの誘発が認められた。変異原性が認められた最低用量におよそ30倍の差があっ

た。

#### 6. Sodium azide の変異原性と DNA 修復

菌体内での代謝で DNA に付加体を生じると考えられている Sodium azide においても, TA1535 が TA1975 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。TA1535 株では 0.003  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で対照の 2 倍以上の変異コロニーを誘発したが, 野生株 TA1975 株では 0.3  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量から変異コロニーの誘発が認められ, およそ 100 倍の差が認められた。

#### 7. 2-NF の変異原性と DNA 修復

フレームシフト変異を誘発する 2-NF について, ヌクレオチド除去修復欠損株 TA1538 と野生株 TA1978 で比較した。TA1538 株では 0.03  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で変異コロニーを誘発したが, 野生株 TA1978 株では 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量から変異コロニーの誘発が認められ, およそ 30 倍の差が認められた。

#### 8. 4-NQO の変異原性と DNA 修復

4-NQO によって誘発されるフレームシフト変異についても, TA1538 が TA1978 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。TA1538 株では 0.03  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で変異コロニーを誘発したが, TA1978 株では 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で変異コロニーの誘発が認められ, およそ 60 倍の差が認められた。

#### 9. NPD の変異原性と DNA 修復

NPD も同様に, TA1538 が TA1978 よりもより低い用量で変異コロニーの誘発が認められた。TA1538 株では 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で変異コロニーを誘発したが, 野生株 TA1978 株では 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で変異コロニーの誘発が認められ, およそ 100 倍の差が認められた。

#### 10. Trp-P-1 の変異原性と DNA 修復

TA98 株に対しては 0.00005~0.0005  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量では変異原性は検出されず, 0.001  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で陰性対照値よりも変異コロニーの増加が認められた。一方, TA1978/pKM101 株に対しては 0.05  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以下の用量では変異原性はみられず, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量から変異コロニーの増加が認められた。変異原性が認められる最低用量に 100 倍の差があった。

#### 11. Trp-P-2 の変異原性と DNA 修復

TA98 株に対しては 0.00005~0.0002  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量では変異原性は検出されず, 0.0005  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で陰性対照値よりも変異コロニーの増加が認められた。一方, TA1978/pKM101 株に対しては 0.02  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以下の用量では変異原性はみられず, 0.05  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量から変異コロニーの増加が認められた。変異原性が認められる最低用量に

100 倍の差があった。

## 12. MeIQ の変異原性と DNA 修復

TA98 株に対しては 0.00001~0.0001  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の用量では変異原性は検出されず、0.0002 $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量で陰性対照値よりも変異コロニーの増加が認められた。一方、TA1978/pKM101 株に対しては 0.005  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以下の用量では変異原性はみられず、0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上の用量から変異コロニーの増加が認められた。変異原性が認められる最低用量に 50 倍の差があった。

## D. 考 察

3 種類のコウジ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、コウジ酸に変異原性があると考えられた。コウジ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が、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、G:C→A:T 変異が最も多く誘発され、活性酸素を生成する代表的な変異原で見られるような、特徴的な G:C→T:A, A:T→T:A 変異の誘発がコウジ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、コウジ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 の酸化的損傷よりも DNA 付加体が大きく関与していると思われる。

一方、変異原性の閾値については、いずれの変異原の場合にも DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA の障害により突然変異が生じる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、生物学的な閾値が存在することを示唆している。今後、このような考え方が細菌のみならず、他の生物種に拡大できる可能性について検討する必要があると考えられる。

## E. 結 論

細菌に対するコウジ酸の変異原性が確認された。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。コウジ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ず、DNA 付加体形成が要因として考えられた。

9 種類の変異原物質について細菌を用いる復帰突然変異試験で、DNA 修復能の有無による突然変異誘発の違いを調べた。いずれの変異原を用いた場合でも DNA 修復欠損株で明らかに変異コロニーを誘発する用量、つまり DNA 損傷（付加体形成）により突然変異が生じる用量においても、正常な DNA 修復能をもつ株では変異コロニーの誘発が認められておらず、変異原性が認められる最低用量には 20~3000 倍の開きがある。



あった。この結果は変異原性においても、生物学的な閾値が存在することを示唆している。

#### F. 研究発表

1. Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, H. Yamagata, Photomutagenicity of thiabendazole, a post-harvest fungicide, in bacterial assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41, 92-98 (2003)
2. Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, Inhibitory effects of NADH/NADPH in S9mix on photo-mutagenicity of thiabendazole following UVA-irradiation in *E. coli*. *Environ. Mutagen Res.*, 27, 7-12 (2005)

3. Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, Y. F. Sasaki, A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells. *Toxicol. Lett.*, 158, 213-219 (2005)
4. 祖父尼俊雄, 能美健彦, 太田敏博, 林真, 遺伝毒性: DNA 直接作用物質に閾値は存在するのか, 環境変異原研究, 27, 61-73 (2005)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

「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

—コウジ酸およびアカネ色素の遺伝毒性に関する研究—

分担研究者 田中 憲穂 (財)食品薬品安全センター秦野研究所遺伝毒性部長

近年発がん性が示唆された食品添加物のうち、既存添加物であるコウジ酸と、天然着色料として使用されていたアカネ色素に関して、そのがん化のメカニズムを解明することを目的として、遺伝毒性を評価するための種々の実験を行った。コウジ酸に関しては、*in vitro* の光遺伝毒性評価系である光プラスミド切断試験、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。また、アカネ色素に関しては、腎臓での発がんの可能性が示唆されていることから、ラットを用いる *in vivo* UDS 試験を実施し、肝臓や腎臓において DNA 傷害が生じているかを調べた。その結果、コウジ酸は太陽類似光線下でプラスミド切断を誘発し、培養細胞においても小核とコメットの誘発を増強することが示されたことから、コウジ酸は光遺伝毒性作用を有するものと結論した。一方、アカネ色素を投与したラットでは、投与 3 時間後の肝細胞および近位尿細管上皮細胞で UDS 誘発細胞の有意な増加が認められた。遠位尿細管では、有意な差はなかったものの、溶媒対照群より 3 倍強の誘発がみられた。投与 6 時間および 24 時間後では、肝細胞、近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞ともに UDS の有意な誘発は認められなかった。以上のことから、アカネ色素投与により肝臓および腎臓組織において DNA に直接傷害を生じ、発がんの要因となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

コウジ酸は、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。コウジ酸は 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ット法および小核試験を実施した。

天然着色料として使用されているアカネ色素は、ラットを用いた発がん試験により腎臓に発がん性を示す事が示唆されている。一方、アカネ色素は細菌を用いた復帰変異試験、枯草菌による DNA 修復試験、ラットおよびマウスの肝細胞を用いた DNA adduct 試験などの遺伝毒性試験において陽性結果を示す事から、発がんのメカニズムとしてアカネ色素による組織の遺伝的傷害に起因する可能性が示唆されている。本実験では、アカネ色素投与によるラットの肝臓および腎臓における DNA 傷害の有無を確認するため、*in vivo* UDS 試験を実施した。

## B. 研究方法

### 1. コウジ酸の光遺伝毒性

#### 1) プラスミド切断法による 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 ロットのコウジ酸 [Kojic Acid, 5-Hydroxy-2-(hydroxy-

methyl)-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、クロルプロマジン塩酸塩 (CPZ, 和光純薬工業, lot.PAP7535) を用いた。

20 ng/μL 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(ダルベッコ PBS(-)「ニッスイ」)を調製し、被験物質および陽性対照物質調製液に等量 (30 μL) 加えて混合した。コウジ酸の最終濃度は 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 とした。

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。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/cm<sup>2</sup> (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/cm<sup>2</sup>)。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 100V 定電圧で 1 時間電気泳動した。泳動終了後、20 μg/mL 臭化エチジウム水溶液で 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、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ットアッセイ

被験物質には、1)で用いた3ロットのコウジ酸のうち、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。

コウジ酸及び 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 µg/mL の10倍濃原液とした。コウジ酸原液は、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、 $1 \times 10^6$  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。CO<sub>2</sub> インキュベータ中で1時間静置後、メタルハイドランプ式ソーラーシミュレータ (SOL500, Dr Hönle 社, B1 フィルタを装備) を用いて UVA 放射照度 0.67 mW/cm<sup>2</sup> (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/cm<sup>2</sup>)。同じ位置の UVB 放射照度は 0.067 mW/cm<sup>2</sup> (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 はエッペンドルフチューブに移し、コメットアッセイ用標本の作製まで氷上に静置した。残りの 2.0 mL は 6 well プレートに分注し、CO<sub>2</sub> 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。

コメットアッセイは、定法に従い実施した。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。標本はアクリジンオレンジ染色し、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) ラジカルスカベンジャーを併用した光プラスミド切断法

被験物質には、1)で用いた3ロットのコウジ酸のうち、lot. 52K2516 (試薬)を用いた。ラジカルスカベンジャーには、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。

コウジ酸の濃度は 7 mM の1濃度のみ用い、1)の処理系に3濃度のラジカルスカベンジャーを加えた。Catalase 以外のラジカルスカベンジャーは、コウジ