

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、コウジ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。

2. アカネ色素の遺伝毒性

F-344 系雄性ラット (F-344:DuCrj, 厚木生産センター) 15 匹を 6 週齢で購入し、6 日間の検疫・馴化の後、1 群 3 匹からなる 5 群に分けた。第 1 群は対照群、第 2 群～第 4 群はアカネ色素投与群、第 5 群は陽性対照群とした。

群構成

群	投与群	動物番号
第 1 群	対照群	1-3
第 2 群	アカネ色素投与 3 時間群	4-6
第 3 群	アカネ色素投与 6 時間群	7-9
第 4 群	アカネ色素投与 24 時間群	10-12
第 4 群	陽性対照群	13-15

第 1 群の対照群は溶媒である蒸留水を、第 2 群～第 4 群はアカネ色素 2000 mg/kg を、第 5 群の陽性対照群は Dimethylnitrosamine (DMN) 400 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、第 1, 2 および 5 群は投与 3 時間後に、第 3 群は投与 6 時間後に、第 4 群は投与 24 時間後に屠殺剖検した。屠殺 30 分前に 18.5 MBq の ³H-thymidine ([methyl-³H]-thymidine, PerkinElmer, Inc., specific activity: 2841 GBq/mmol, concentration 37.0 MBq/mL を尾静脈内投与し、ペン

トバルビタール全身麻酔下で肝臓および腎臓を採取して 2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド固定液で固定した。組織片を電子顕微鏡用 Quetol-651 樹脂に包埋後、約 1.5 μm の厚切り切片を作製し、マイクロオートラジオグラフィー標本を作製した。

肝臓では小葉中間帯肝細胞、腎臓では近位尿細管上皮細胞および遠位尿細管上皮細胞の核内グレインをそれぞれ 1 切片あたり 100 細胞、動物あたり 300 細胞カウントし、UDS 誘発細胞 (バックグラウンドグレイン + 2SD 以上の核グレインを有する細胞) を計数した。

C. 研究結果

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

非照射群では、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、光照射群では最低濃度の 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 切断率を示したが、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、コウジ酸のロット間で品質に差は無いと考えられた。

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

非照射群では、用量依存的にコメットおよび小核が誘発され、コメットアッ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。しかしなが

ら、コメットアッセイ、小核試験ともに陽性細胞の頻度は低く、コウジ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、コメットアッセイの 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 傷害が生じていることが示されたが、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、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、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、コウジ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、コウジ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) ラジカルスカベンジャーを併用した光プラスミド切断法

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、コウジ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、コウジ酸の光プラスミド切断性は、酸化傷害によるものと考えられたので、ヒドロキシラジカルスカベンジャーの D-Mannitol (d), スーパーオキシドスカベンジャーの SOD (e), 過酸化水素スカ

ベンジャーの Catalase (f) の併用試験を行い、産生ラジカル種の特定を試みたところ、SOD および Catalase でコウジ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、スカベンジャー単独による DNA 切断はいずれの化学物質でも認められなかった。

2. アカネ色素の遺伝毒性

アカネ色素投与群では、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 (5%および 1%水準)。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 倍強の出現があった。一方、投与 6 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有意な差は認められず、経時的に減少した。

陽性対照の DMN 投与群では、肝臓および腎臓のいずれも UDS 誘発細胞の有意な増加が認められた (5%および 1%水準)。以上の結果から、アカネ色素の高濃度単回投与によりラット腎尿細管上皮細胞および肝細胞において、UDS 誘発細胞の有意な増加が認められ、DNA の断片化が引き起こされることが明らかとなった。

D. 考 察

3 ロットのコウジ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、

品質的には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、コウジ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 を用いた光コメット法および光 *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が示された。また、強い毒性を示す濃度域では、コメッ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が示唆された。ま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、ラジ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ジ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、コウジ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事が示唆された。

アカネ色素に関しては、昨年度の本研究においてアカネ色素単回投与により、腎近位尿管上皮細胞の核の大小不同および肝臓では肝細胞のアポトーシスがいずれも投与後 2~3 時間の早期に認められ、今回の実験では投与後 6 時間で UDS 誘発細胞の減少、投与 24 時間後には溶媒対照群と同程度となったことから、断片化された DNA は速やかに修復され、その後修復できない細胞はアポトーシスとして淘汰されるものと考えられた。アカネ色素のラットにおける発がんには、酸化的ストレスが要因の 1 つとして関与していることが示されていることから、尿管上皮細胞あるいは肝細胞の DNA の断片化が引き起こされた後の組織内環境も重要な要因である考えられる。

E. 結 論

コウジ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ット法および小核試験を実施した。その結果、コウジ酸には 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。

アカネ色素に関しては、高濃度の単回投与によりラット尿管上皮細胞および肝細胞において、UDS 誘発細胞

の有意な増加が認められ、この DNA の直接的傷害が腎臓における発がんの誘発要因となっている事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, Noriho Tanaka, Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells), Mutation Res., 588: 7-21 (2005)
2. Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, ATLA 33, 619-639 (2005)
3. Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho Tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastals Japanese waters, Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 1984-1993 (2005)
4. Agneta Rosengren, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten, Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 75A Issue 1, 115-122 (2005)
5. Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Noriho Tanaka and Makoto Umeda: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, Mutation Res., 557, 191-202 (2004)
6. 田中憲穂：医療用具の製品化を目的とした前臨床試験，バイオマテリアル-生体材料- 22:320-327(2004)
7. 田中憲穂：照射食品の遺伝的安全性試験，食品照射 39:13-27(2004)
8. 田中憲穂：照射食品の生物学的安全性，Food and Food ingredients Journal of Japan 209 (2004)
9. L. Muller, D. Blakey, K. L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. Macregor, J. M.

Parry, L. Schechtman, A. Smith, N., Tanaka and H. Yamasaki: Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results-report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutation Research* 540: 165-176 (2003)

10. 渡辺美香, 小林美和子, 佐々木澄志, 田中憲穂: V79 細胞を用いたコロニー形成試験における低 pH による重金属の細胞毒性作用の変化, 秦野研究所年報 26: 14-18 (2003)

学会発表

1. Noriho Tanaka: Current activities of alternative research in Japan, 1st International Forum on Laboratory Animal Science and Technology, Beijing (China), November 2006
2. 田中憲穂, 板垣宏, 若栗忍, 北垣雅人, 中川ゆづき: 単回投与毒性試験代替法の開発研究および皮膚モデルを用いる遺伝毒性試験法の開発研究, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原
3. 浅田晋, 佐々木澄志, 田中憲穂, 梅田誠: Bhas 42 細胞を用いるイニシエーター/プロモーターの検出, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原
4. 梅田誠, 佐々木澄志, 田中憲穂: 発ガン性試験の代替法: ECVAM で Prevalidation Study の現状, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原
5. 大森清美, 梅田誠, 田中憲穂, 高木

弘毅, 吉村功, 佐々木澄志, 浅田晋, 酒井綾子, 浅倉真澄, 馬場博, 伏脇裕一, 浜田修一, 鬼頭暢子, 中村哲, 中村好志, 大石英俊, 佐々木聡, 嶋田佐和子, 土屋敏行, 宇野芳文, 鷺塚昌隆, 矢嶋聡, 山下康人, 山村英二, 八城友子: 発ガン性プロモーター検出のための Bhas 42 細胞を用いた細胞形質転換試験に関する共同研究結果のついて, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原

6. 中川ゆづき, 田中憲穂: ラット FRSK 細胞を用いた in vitro 小核試験法, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月 伊勢原
7. 和田昌憲, 本郷有克, 若栗忍, 石川陽一, 梅田誠, 田中憲穂: 培地中グルコースの消費を指標とする毒性評価法の応用, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原
8. 山影康次, 高橋俊孝, 浅田晋, 田中憲穂: In vitro 光染色体異常試験における各種照射条件とその影響, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原
9. 北垣雅人, 若栗忍, 田中憲穂, 板垣宏: 急性毒性試験代替法の検討 (3): 2 施設間における Collagen Gel Assay を用いた急性毒性試験予測性の評価, 日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原
10. 若栗忍, 大野泰雄, 田中憲穂: 細胞毒性による in vivo 全身毒性の予測について-代謝活性化の導入および処理条件の検討-日本動物実験代替法学会, 2005 年 12 月, 伊勢原

11. Noriho Tanaka: The Activity of JSAAE -past,present and future, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
12. Isao Yoshimura, Takashi Omori, Yasuo Ohno, Masatoshi Hoya, Masaki Mori, Takaaki Doi, Yuriko Fujita, Hiroshi Itagaki, Rumi Kawabata, Hajime Kojima, Seiji Hasegawa, Yuko Okamoto, Noriho Tanaka, Kouko Tanigawa and Shinobu Wakuri: Validation study on the battery system for prediction of phototoxicity in Japan: The overview of the results, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
13. Shinobu Wakuri, Yutaka Matsumoto, Makoto Hayashi and Noriho Tanaka: Application of in vitro alternative methods to ecotoxicology, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
14. Kiyomi Omori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumori Asakura, Hiroshi Baba, Yuichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuko Kitou, Tetsu Nakamura Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Shimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamamura and Tomoko Yatsushiro: Inter-laboratory collaborative study of cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells by non-genotoxic carcinogen study group in Japan, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
15. Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Shin Asada, Kiyoshi Sasaki and Kumiko Hayashi: Detection of non-genotoxic carcinogens using ras-transfected Bhas 42 cells, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
16. 田中憲穂：生殖細胞および培養細胞を用いた遺伝毒性試験法の開発と国際標準化への貢献，（学会賞講演）日本環境変異原学会，2004年11月，長崎
17. 浅田晋，佐々木澄志，山陰康次，田中憲穂，梅田誠：Bhas42細胞を用いた抗形質転換作用検出系の確立とその応用，日本環境変異原学会，2004年11月，長崎
18. 中川ゆづき，田中憲穂：In vitro 小核試験およびプラスミド DNA 切断性試験を用いたコウジ酸の光遺伝作用の検討，日本環境変異原学会，2004年11月，長崎
19. 田中憲穂，板垣宏，今井弘一，大野泰雄，大森崇，岡本裕子，川端留美，小島肇夫，土肥孝彰，藤田百合子，畑尾正人，笛木修，若栗忍，吉村功：酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光阻害試験：バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告，日本動物実験代替法学

- 会，2004年11月，長崎
20. 吉村功，板垣宏，大野泰雄，大森崇，岡本裕子，川端留美，小島肇夫，田中憲穂，谷川浩子，土肥孝彰，長谷川靖司，藤田百合子，穂谷昌利，森真輝，若栗忍，：酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究，日本動物実験代替法学会，2004年11月，長崎
21. 本郷有克，若栗忍，石川陽一，梅田誠，田中憲穂：基礎代謝としてのグルコース取り込みを指標とする細胞毒性試験，日本動物実験代替法学会，2004年11月，長崎
22. 渡辺美香，小林美和子，若栗忍，佐々木澄志，山影康次，倉田信弘，田中憲穂：試験法および細胞種の違いによる細胞毒性試験結果の検討，日本動物実験代替法学会，2004年11月，長崎
23. 北垣雅人，若栗忍，板垣宏，田中憲穂，豊田英一：急性毒性試験代替法の検討（2）II. 2施設間における急性毒性試験を予測するための2種の細胞毒性試験の評価，日本動物実験代替法学会，2004年11月，長崎
24. 若栗忍，北垣雅人，板垣宏，田中憲穂，豊田英一：急性毒性試験代替法の検討（2）I. 2施設間における2種の細胞毒性試験の安定性，日本動物実験代替法学会，2004年11月，長崎
25. 山影康次，高橋俊孝，浅田晋，田中憲穂：In vitro 光染色体異常試験の光照射条件の検討，日本環境変異原学会，2003年11月，津
26. 川上久美子，原巧，須井哉，大山徳子，田中憲穂：微生物を用いる光遺伝毒性試験法の改良日本環境変異原学会，2003年11月，津
27. 大森清美，梅田誠，（田中憲穂）外：発がんプロモーター簡易検出法 Bhas assay の研究室間バリデーション・スタディ（その2），日本環境変異原学会，2003年11月，津
28. 浅田晋，大森清美，佐々木澄志，田中憲穂，梅田誠：Bhas 42 細胞を用いた短期形質転換試験によるプロモーター検出系の確立と発がん物質の評価，日本環境変異原学会，2003年11月，津
29. 田中憲穂，山影康次，高橋俊孝，浅田晋，津田弘久：アクリルアミドのヒトリンパ球を用いる染色体異常試験，日本環境変異原学会，2003年11月，津
- Noriho Tanaka: Detection of photogenotoxic substances in our environment, Workshop on comet assay: Applications in toxicology and molecular epidemiology, February 2003, Lucknow(India)

—ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異誘発に関する検討—

分担研究者 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

発がん性が指摘されているため、安全性が問題となっている既存添加物の「コウジ酸」と「アカネ色素」について、ヒト培養細胞を用いた遺伝毒性試験を実施し、その遺伝毒性の程度と、特徴を明らかにした。また、それらのヒトへの発がん性、遺伝毒性のリスク評価を行った。コウジ酸は突然変異、小核とも用量依存的に誘発することから *in vitro* においては遺伝毒性を持つことが明らかとなった。しかしながら、これら誘発は 10mM 以上の高濃度で認められることから、遺伝毒性の程度は低いものと考えられた。アカネ色素も同様に 4.0 mg/ml の高用量で、突然変異、小核誘発とも陽性を示し、その遺伝毒性の程度は低いものと判断された。生活関連化学物質の遺伝毒性のリスク評価のために有用な指標として、Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP) を考案した。その化学物質の予想される 1 日摂取量 (/kg/day) を、特定の遺伝毒性試験において、ある一定の遺伝毒性を発現する用量で除したものである。ここでの数値は遺伝毒性試験系によって異なり、絶対値は生物学的に意味のあるものではないが、それぞれの化学物質の相対的遺伝毒性リスクを評価することには役立つ。TK 遺伝子突然変異試験において、突然変異を 2 倍増加させる濃度によって HEGEP を算出したところ、コウジ酸は 0.00008, 0.034 であった。これは、同じく食生活において摂取する可能性のある発がん物質であるアクリルアミド (0.4)、ジメチルニトロサミン (9.2)、アフラトキシン (2.4) に比較しても十分に低い。従って、日常生活において、これまでのようなアカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。

A. 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全

性が問題となっている。特にその問題となる化学物質が発がん性を示す場合は、その評価が困難であることが多い。多くの発がん性化学物質に関しては、健康リ

スクを評価する場合、理論的、実証的理由から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値のない線形の用量反応モデルが用いられてきた。しかしながら、近年、がんの発生メカニズムに関する理解から、発がん物質のなかでも、遺伝子に直接損傷を与えない非遺伝毒性発がん物質に関しては、他の毒性同様に閾値を設定することができるとの考えが定着し、ある一定レベル以下の非遺伝毒性発がん物質に関しては、実質的に発がんリスクはないものと考えられている。一方、遺伝毒性を持つ発がん物質に関しては、「暴露量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならない」という建前上、規制するならば使用を禁止するほかはないため、発がん性を認めることができず、逆に化学物質の規制が進まないといった矛盾が生じている。

米国においても 1958 年に提出されたデラニー条項によって、動物に対して発がん性を示す農薬が残留する加工食品の販売が禁止され、その後、適用範囲が着色料、動物用薬品、飼料に拡大された。しかしながら、このゼロリスクの思想は現実的には多くの矛盾点をかかえていた。主な矛盾点としては①分析技術の進歩により、微量な化学物質も検出可能となり、検出限界である安全レベルがどんどん低くなってしまふこと。②発がん性の有無だけが強調されているため、他の毒性の低くて、安全性の高い化合物ができて、わずかの発がん性のため代替できないこと。③人工化学物質のみを対象としているため、天然由来の発がん物質は無視されていること。④動物実験の発がん性試

験は、必ずしも人に対する発がん性と一致しないこと。である。これらのことから、1996 年「食品品質保護法」の制定とともにデラニー条項は廃止された。現在、米国では発がん化学物質は、遺伝毒性の有無にかかわらず、100 万分の 1 の生涯発がんリスクレベル以下の濃度であれば使用、残留が認められている。

このような発がん化学物質を生涯発がんリスクレベルで評価し、管理に用いる手法は、我が国においても水道水や大気の新しい環境基準値の設定にも用いられている。一方、食品中に残存する発がん化学物質の評価については未だ、基準値の設定はなされておらず、そのための戦略も明確になっていない。

これまでに戦略が構築されなかった理由の一つとして、ハザードがそのままリスクとして考えられ、その程度の評価にあまり注意が払われなかったことがあげられる。さらに、その化学物質の実際の暴露量を考慮したリスク評価は全く行われていない。このような状況の下、遺伝毒性の専門家集団である日本環境変異原学会の協力を得て、食品中の発がん化学物質の遺伝毒性評価法について戦略の構築を図ることが行われた。

遺伝毒性化学物質のリスク評価のため、既存添加物である「コウジ酸」と「アカネ色素」を例にとり、文献的調査および、実際の試験を行った。この中で、遺伝毒性のリスク評価（比較）の手段として Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)を提唱した。これは、発がん性評価のための Human Exposure Rodent Potency (HERP)を応用したものであり、

多くに遺伝毒性物質の生活中でのリスクを相対的に知ることができる。

B. 研究方法

1) 被験物質

コウジ酸は、ナガセ生化学工業株式会社から提供を受け（含量：98%以上，残りは糖質および無機塩類），試験に用いた。提供されたコウジ酸は使用時まで室温で保管した。アカネ色素は，西洋アカネ粉粉末から 50%エタノールで抽出，濾過，濃縮し，デキストリン添加度，スプレードライ，混合，粉碎の過程を経て調整された，褐色の粉末である。色素成分は，主成分として Ruberythric acid，Lucidin-3-O-primerveroside，および Alzarin をそれぞれ，34.4%，53.0%，12.7%を含む。色素含量は Ruberythric acid 換算で 16.1%である。本品は生理食塩水に溶解後，速やかに試験に供した。

2) In Vitro 遺伝毒性試験

ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 または WTK-1 を用いた。対数増殖期にある細胞を，試験検体で 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，72 時間後にチミジンキナーゼ(TK)遺伝子をターゲットした遺伝子突然変異試験を定法に従って行った。

（倫理面への配慮）

本研究で用いたヒトリンパ芽球細胞株TK6, WTK-1はATCCにも登録されている使用制限のない細胞株であり，倫理上問題はない。また，全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) コウジ酸の *in vitro* 遺伝毒性

TK6, WTK-1 細胞とも，5mg/ml まで試験を行った。最高用量の 3mg/ml 程度から濃度依存的に細胞毒性が認められ，それに伴い，遺伝子突然変異頻度，小核誘発頻度の増加が認められた。両細胞とも，最高突然変異頻度は 4mg/ml で観察され，その後 5mg/ml ではわずかに減少したが，これは強い細胞毒性によるものと考えられる。強い細胞毒性による遺伝毒性低下は小核試験でも見られた。突然変異頻度を 2 倍増加させる用量(Double Mutation Frequency Dose; DMFD)は TK6, WTK-1 細胞とも約 2.5mg/ml と計算された。

2) アカネ色素の *in vitro* 遺伝毒性

アカネ色素は 2mg/ml から強い細胞毒性を示し，同時に小核の誘発が観察された。TK 遺伝子突然変異も用量依存的に増加し，統計学的にも，試験は陽性と判定された。最高用量で自然突然変異頻度の 2.7 倍であり，DMFD は回帰により 2.88mg/ml と計算された。

D. 考察

コウジ酸は 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。TK6 細胞における突然変異頻度を 2 倍増加させる濃度は 2.5 mg/ml と計算され，これは強変異原物質である MNNG の 2 万倍，MMS の 800 倍に相当する。現在，食品

中のモノクロタリン（コンフリーに含まれるアルカロイドの一種）、アクリルアミド（ポテトチップスなどに含まれるアミノ酸変化体）になどについても遺伝毒性や、発がん性が懸念されているが、それらの値はそれぞれ、2.5 mg/ml, 0.1 mg/ml と計算され、分子量を考慮すると、ほぼ同程度の遺伝毒性物質と考えることができる。また、遺伝毒性試験は通常 5 mg/ml もしくは 10 mM の低い方を最高濃度にする事となっているが、この場合コウジ酸の最高試験の濃度は 1.4 mg/ml (10 mM) となるが、この濃度までの遺伝子突然変異、小核誘発率を見ると、遺伝毒性は認められないか、極めて低い。以上のことを考慮すると、コウジ酸による遺伝毒性の程度は極めて弱いものと判断される。

同様にアカネ色素も 4.0 mg/ml の高用量でのみ、突然変異、小核誘発とも陽性を示し、その遺伝毒性の程度は低いものと判断された。アカネ色素の DMFD は 2.88 mg/ml である。

食品中に含まれる化学物質のリスクを比較する場合、絶対値として表すより、他の化学物質と比較することにより、相対的リスクを把握することができる。Ames らは、齧歯類発がん性試験で得られた、動物の半数にがんを引き起こす化学物質の濃度 (TD50) で、その物質の 1 日推定摂取量を割った値を Human Exposure Rodent Carcinogenic Potency (HERP) として、発がんリスクを評価している。この値により、生活関連化学物質の相対的な発がんの危険性を推測できるほか、絶対値としての数字は、1 が動物

実験と同程度の暴露で半数にがんを引き起こす濃度と同等であるため、数値からその発がんの程度を推測することができることが特徴である。

これまで遺伝毒性試験においては、試験結果を単に陽性、陰性と判定するのみの hazard identification が中心であった。しかしながら、発がん物質が遺伝毒性を持つことが明らかとなった場合、遺伝毒性物質には閾値がないという考えから、「暴露量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならない」という理由で、規制が進まないという事態が生じている。従って、遺伝毒性物質に対する閾値の考え方や、何らかの量的な評価の導入が検討されている。しかしながら、現実的にはその評価法および、リスク評価への適用については困難であるとの認識が強い。その理由の一つとして、試験方法の多様性と、定量的評価法の問題点がある。発がん性試験は、基本的には、ラット、マウスの試験しかなく、その試験プロトコールが確立されているが、遺伝毒性試験では *in vitro*, *in vivo* に数多くの試験系があり、どれを評価に使うかが問題である。また、エームス試験や、染色体異常試験を取ってみても、菌株、細胞、プロトコールが異なるため簡単に試験を比較することもできない。

試験系が単一で、プロトコールも統一されている試験であれば、各試験結果を定量的に評価できる可能性がある。*In vitro* 試験では、MLA などの遺伝子突然変異試験がこれに相当する。また、遺伝子突然変異は、濃度依存的な定量性にも優れているため、暴露量を基にした評価

法にも適する。本試験系の TK 突然変異試験は MLA と同様、試験系、およびプロトコールが単一であるため、各試験系を定量的に評価することが可能である。本試験系により突然変異を 2 倍増加させる濃度(DMFD)を計算し、その相対的遺伝毒性の強さを比較することができる。また、HERP と同様、DMFD をその物質の 1 日推定摂取量を割った値を Human Exposure Genotoxic Potency (HEGEP)とし、遺伝毒性のリスクの指標とすることができる。コウジ酸、アカネ色素の HEGEP はそれぞれ、0.00008, 0.034 と計算された。

HEGEP の値は、HERP と異なりその絶対値は試験系において異なるため意味を持たないが、他の化合物との相対的リスクを知る上では有用と考えられる。

コウジ酸とアカネ色素の HERP と HEGEP はアクリルアミド、AF-2、ジメチルニトロサミンと比較してもかなり低いことから、日常的にみそや醤油から摂取しうるコウジ酸、および食品添加物として摂取するアカネ色素の遺伝毒性リスクは、ポテトチップス等からのアクリルアミド、ビール等からのジメチルニトロサミンよりずっと低いものと考えられる。

現時点では、発がん物質が遺伝毒性を持つことが明らかとなった場合、遺伝毒性物質には閾値がないという考えから、「暴露量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロのならない」という理由で、使用を一切認めないという方策がとられてきた。遺伝毒性物質の閾値の有無に関しては議論のあるところであるが、その有無にこだわらず、発がん性、遺伝毒性を

定量的にとらえ、他の化学物質のリスクと比較し、ランキング化することの方がリスク評価としては現実的であると考えられる。

我々の生活中には微量ではあるが多くの発がん物質が存在し、その多くは自然の食品中に存在するため避けることは困難である。食品添加物のように避けることが可能である物質が、発がん可能性を持つことが明らかとなった場合、その使用を禁止することはヒトの健康を守る政策上重要であるが、その程度を考慮しないと科学的バランスを欠くことになる。また、禁止することによる 2 次的影響も考慮する必要がある。

E. 結 論

・コウジ酸はヒト培養細胞 TK6, WTK-1 において、遺伝子突然変異、小核試験で陽性反応を示した。突然変異を 2 倍増加させる濃度 (DMFD) 2.5 mg/ml であり、HEGEP は、0.00008 であった。この値を考慮すると、日常生活において、食品からのコウジ酸の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。

・アカネ色素はヒト培養細胞 TK6 において、遺伝子突然変異、小核試験で陽性反応を示した。突然変異を 2 倍増加させる濃度 (DMFD) 2.88mg/ml であり、HEGEP は、0.034 であった。この値を考慮すると、日常生活において、これまでのようなアカネ色素の摂取がヒトの遺伝毒性、発がんリスクを特に増加させることはないと考えられる。

・遺伝毒性のリスクを絶対的数値化によって評価することは困難であるが、他の化学物質との相対リスクを評価することは可能である。日常的に避けられない発がん物質とのリスクの比較は、新たな発がん危険因子を許容できるか、否かを判断する上で、わかりやすい指標になるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Moore, M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., DeLongchamp, R., Fellow, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myher, B., O'Donovan, M., Oliver, J., Omori, T., Oudelhkim, M., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, F. Thakur, A., Wakuri, S., and Yoshimura, I. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International workgroup report-Plymoth, UK 2002. *Mutat. Res.*, 540, 127-140 (2003)
2. Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F., and Hayashi, M. Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 288-298 (2003)
3. Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M. and Enomoto, T. The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochem. Biophys. Acta* 168, 137-144 (2004)
4. Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu de S, Zhang LS, Suzuki T, Hayashi M, Honma M., Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res.*, 557, 1-6. (2004)
5. Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)
6. Matura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. and Honma, M. In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake. *Environ. Mutat. Res.*, 27, 153-160 (2005)
7. Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinase, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, 603, 151-158 (2006)

2. 学会発表

1. M. Honma, T. Kato, F. Yatagai, M. Hayashi, Characterization of the genomic instability in mismatch repair deficient human lymphoblastoid cell lines. The Environmental Mutagen Society 34th Annual Meeting (2003.5)
2. MM. Moore, M. Honma, Measures of cytotoxicity in the mouse lymphoma assay (MLA): Implication for data comparison with in vitro cytogenetic

- assays. 33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003.8)
3. M. Honma, M. Izumi, M. Sakuraba, S. Tadokoro, H. Sakamoto, W. Wang, F. Yatagai, M. Hayashi, Deletion rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double strand breaks in human cells. 33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003.8)
 4. T. Suzuki, P. Rajaguru, J. Kanno, H. Sakamoto, M. Hayashi, T. Yamaguchi, and M. Honma, GeneChip analysis on transcriptional changes induced in human lymphoblastoid (TK6) cells by six genotoxic chemicals. 33rd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2003.8)
 5. 鈴木孝昌, 小原有弘, 山田勉也, 佐伯憲一, 本間正充, 山口照英, 林 真, ニトロソアミン類がマウスに誘発する突然変異の多様性 第 62 回日本癌学会総会 (2003.9)
 6. M. Honma, DNA double strand break repair and chromosome instability in mammalian cells. 日本放射線学会第 46 回大会(2003.10)
 7. 本間正充, 泉雅子, 桜庭真弓, 田所聡, 坂本浩子, 王文晟, 谷田貝文夫, 林真, Targeted Mutagenesis によるヒトゲノム中の DNA2 本鎖切断修復の解析 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003.11)
 8. 坂本浩子, 本間正充, 羽倉昌志, ヒト細胞を基礎とした新しい *in vitro* 遺伝毒性評価系の構築 : ヒト S9 の適応 (JEMS/MMS 第 2 回ヒト細胞共同研究) 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003.11)
 9. パラニサミー・ラジャグル, 鈴木孝昌, 坂本浩子, 菅野 純, 林 真, 本間正充, ヒトリンパ腫由来 TK6 細胞における遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の解析 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003.11)
 10. 本間正充, ほ乳類細胞における DNA2 本鎖切断修復と遺伝的不安定性 第 26 回日本分子生物学会(2003.12)
 11. 鈴木孝昌, パラニサミー・ラジャグル, 小原有弘, 本間正充, 林 真, 高木篤也, 菅野純, 山口照英, GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か 第 63 回日本癌学会総会 (2004.9)
 12. 小山直己, 坂本浩子, 桜庭真弓, 小泉朋子, 桜庭真弓, 高島良生, 林真, 松藤寛, 山形一雄, 本間正充 ヒトリンパ球芽細胞株 TK6 を用いたアクリルアミドの *in vitro* 遺伝毒性誘発機構の解析 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11)
 13. 夔 洋, パラニサミー・ラジャグル, 本間正充, 林 真, 鈴木孝昌 ヒト細胞における遺伝毒性物質による遺伝子発現変化の解析 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11)
 14. 本間正充, 桜庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真 ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切断の運命 第 47 回日本放射線影響学会

- (2004.11)
- 15.高島良生, 桜庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充 ヒト細胞における DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 第 47 回日本放射線影響学会 (2004.11)
 - 16.桜庭真弓, 本間正充, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真 ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切断の運命 第 27 回日本分子生物学会 (2004.12)
 - 17.Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., and Hayashi, M. The fate of chromosomal double strand break in human cells. Environmental Mutagen Society 35th Annual Meeting (2004.10)
 - 18.Honma, M., Hakura, A., Oka, A., Takasaki, W., Sasaki, YF., Suzuki, S., and Sato, T. Establishment of humanized in vitro genotoxicity system. Society of Toxicology 44th Annual Meeting (2005.3)
 - 19.Hakura A., Oka H., Takasaki W., Sasaki YF., Suzuki S, Satoh T., and Honma M., Establishment of humanized in vitro genotoxicity test system: combined system using human cell lines and human S9. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)
 - 20.Koyama N., Sakamoto H., Sakuraba M., Koizumu T., Takashima Y., Hayashi M., Matsufuji H., Yamagata K., Masuda S., Kinae N. and Honma M., Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)
 - 21.Matsufuji H., Inoue M., Chino M., Honma M., Hayashi M., and Yamagata K., Genotoxicity of quercetin in the presence of oxygen species and human liver S9 in human lymphoblastoid TK6 and WTK-1 cells. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)
 - 22.Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)
 - 23.Neuwirth EAH, Honma M. and Grosovsky AJ., High frequencies of crossing-over associated with long tract gene conversion in human cells. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)
 - 24.Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Honma M., DNA double strand break repair and cells cycle in human lymphoblastoid cell line. 9th International Conference on Environmental Mutagens. (2005.9)
 - 25.Honma M., Genotoxic risk assessment for synthetic and natural chemicals in foods. The 2nd international Conference on the Modernization of Traditional Chinese Medicine. (2005. 9)
 - 26.高島良生, 桜庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林真 本間正充 ヒト細胞における DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 日本環境変異原学会第 34 回大会 (2005.11)
 - 27.巒 洋, 本間正充, スレッシュユテイル

- パッテイー, 小木美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌 CGH および SNP アレイを用いた染色体解析 日本環境変異原学会第34回大会 (2005.11)
28. 真田和尚, 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ズンの *in vitro* 遺伝毒性 日本環境変異原学会第34回大会 (2005.11)
29. 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 vitro* 遺伝毒性 日本環境変異原学会第34回大会 (2005.11)
30. 本間正充, 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 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組換え, および遺伝子ターゲッティング 環境変異原学会第34回大会 (2005.11)
31. 松藤寛, 井上真由美, 千野誠, 本間正充, 林真, 山形一雄 ヒトリンパ球細胞株 TK6 を用いた抗酸化フラボノイドおよびその酸化物の遺伝毒性 環境変異原学会第34回大会 (2005.11)
32. Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H. and Hayashi M., Interallelic homologous recombination and target intergration induced by DNA double strand breaks. The 22nd Radiation Biology Center International Symposium. (2005.9)
33. 本間正充 ヒト型遺伝毒性試験と, ヒト発がん性の予測 日本動物代替法学会第19回大会 (2006.12)
34. 本間正充, 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林真 DNA2 本鎖切断によって誘発されるヒト細胞での相同組換え反応 第28回日本分子生物学会(2005.12)
35. 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林真, 本間正充 ヒト細胞における制限酵素によって切断された DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性 第28回日本分子生物学会(2005.12)

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究年度修了報告書

トランスジェニック動物を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験に関する検討一

分担研究者 中嶋 圓 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 第四試験室長

協力研究者 島田昌也 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 第四試験室

藤城雅子 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 第四試験室

本研究は、既存天然添加物であるコウジ酸のマウス肝臓に対する遺伝子突然変異の検索ならびに天然着色料であるアカネ色素のラット肝臓に対する生体内遺伝毒性の有無を検索することを目的とした。コウジ酸は、発がん性試験において雌マウスの肝臓に腫瘍を誘発すると考えられていることから、トランスジェニック (TG) マウス (MutaTMMouse : 雌) を用いて標的臓器である肝臓での遺伝子突然変異誘発性を検索した。一方、アカネ色素は、多臓器中期発がん性試験において陰性との報告があるが、最近の研究結果から、ラットの腎臓並びに肝臓においては腫瘍を誘発すると考えられている。そこで TG ラット (Big Blue[®] Rat : 雄) を用いて、肝臓、腎臓並びに小腸 (十二指腸) での遺伝子突然変異誘発性を検索した。コウジ酸およびアカネ色素のいずれとも混餌法による 28 日間の反復投与後に、TG マウスでは導入遺伝子の *lacZ* 遺伝子、TG ラットではシャトルベクター上の *cII* 遺伝子の突然変異を解析した。

その結果、コウジ酸による肝臓での遺伝子突然変異頻度の媒体対照に比較し明確な上昇は認められなかった。また、アカネ色素投与による遺伝子突然変異頻度は、肝臓および十二指腸では陰性であったが、腎臓では媒体対照に比較し統計学的に有意な上昇は認められ、陽性結果が得られた。

A. 目的

コウジ酸 (CAS No.: 501-30-4) は、黄褐色の粉末で僅かに特異な臭いを有する。水、エタノール、アセトンには溶けやすく、エーテル、酢酸エチル、クロロホルム、ビリジンは溶けにくい。味噌、し

ょう油等の製造に用いられる麹菌 (*Aspergillus* 属等) を培養して得られる抗菌作用を持った物質である。カニやエビなど甲殻類の黒変防止、抗菌作用等の用途で、甲殻類、生麺、餃子の皮、加工用原料野菜等に添加物として使われていた

実績がある。アカネ色素（Madder color）は、アカネ科の西洋アカネの根から抽出される色素で、性状としては赤褐色粉末で水、アルコールに溶解し、熱、光に対して非常に安定な物質である。

本試験は、コウジ酸およびアカネ色素のいずれもが最近の知見でその発がん性が疑われていることから、メカニズムとして遺伝毒性に起因するかを検討するため、MutaTMMouse あるいは Big Blue[®] Rat を用い標的臓器における遺伝子突然変異誘発性の有無を検索することを目的とした。

B. 方法

1. 被験物質

ナガセ生化学工業株式会社から提供を受けたコウジ酸（含量：98%以上、残りは糖質および無機塩類）を試験に用いた。

国立医薬品食品衛生研究所から提供を受けたアカネ色素（Lot No.：040723、含量：Ruberythric acid 換算で 16.85%）並びにデキストリンを試験に用いた。

提供されたコウジ酸、アカネ色素並びにデキストリンは使用時まで室温で保管した。

2. 使用動物

4～5 週齢の雌の MutaTM Mouse [CD₂-LacZ80/HazfBR (BALB/C × DBA/2)] を Covance Research Products Inc. (Denver, PA：米国) から、また、4 あるいは 6 週齢の雄の Big Blue[®] Rat [F344] を Taconic 社 (Germantown, NY：米国) から購入し、1 週間の検疫・馴化の後、試験に用いた。

3. 飼育条件

動物は温度 24.5±2.5℃、湿度 55±20%、照明 12 時間（7:00 点灯、19:00 消灯）、換気回数 1 時間あたり 8 回に設定した飼育室（組替え DNA 実験指針；昭和 54 年 8 月 27 日内閣総理大臣決定、平成 3 年 9 月 24 日改訂による物理的封じ込めに係わる施設）で飼育した。

Micro-IsolatorTM System (Lab Products Inc.) を使用し、飼育ケージに動物を 1 匹ずつ収容した。MutaTMMouse には粉末飼料（CRF-1：オリエンタル酵母工業株式会社）を、Big Blue[®] Rat には粉末飼料（改良 NIH 公開ラット、マウス飼料：オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させた。また、水道水を自動給水ノズルより自由摂取させた。

4. 被験物質添加飼料の調製

被験物質添加飼料はそれぞれの基礎飼料にコウジ酸あるいはアカネ色素を添加し数分間混和することにより調製した。ただし、アカネ色素は粉末状に保つために 30%の割合でデキストリンが添加されていることから、1%混入試料の調製時には 1.2%のデキストリンを添加した。被験物質添加飼料は週 1 回調製し、室温にて保存した。

5. 投与方法および投与期間

コウジ酸は 88 週間混餌投与試験において 3.0%群の雌に肝腫瘍を誘発することが報告されている¹⁾ ことから、1.0、2.0 および 3.0%の計 3 用量を被験物質処理群として設定した。また、アカネ色素は、2.5 および 5.0%の用量で多臓器中期発がん性試験が実施されていること、さらには本被験物質が食品添加物であることを考慮した結果、5.0%を高用量とし、以下

1.0%の計 2 用量を被験物質処理群として設定した。

また、トランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験での投与期間に関しては Thybaud 等が 28 日間の反復投与を推奨している²⁾ことから、1 群 5 匹の TG 動物を用い、28 日間の混餌投与を行った。最終投与 3 日後に各個体から各器官を摘出し、速やかに液体窒素で凍結した後、 -80°C で保存した。

陽性対照群にはオリブ油に溶解した 7, 12-ジメチルベンズ [a] アントラセン (DMBA) 20 mg/kg を 1 回投与した。投与後 14 日に各器官を摘出した。

6. ゲノム DNA の抽出

ダウンス型ホモジナイザーに凍結組織片および組織破碎用緩衝液を加えホモジナイズした。RNase 含有ダウンス緩衝液および Proteinase K 溶液を加え、3 時間程度 50°C で保温し消化させた。等量のフェノール/クロロホルム混液 (容量比 1 : 1) を加え混和した後、 $1100\times\text{G}$ で 10 分間遠心した。上層の水層を回収し、本操作を 2 回繰り返した。回収した水相と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混液 (容量比 24 : 1) を加え回転混和した後、 $1100\times\text{G}$ で 10 分間遠心した。上層の水層にエタノールを徐々に加えることによりゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA に適量の TE 緩衝液を加え、一晚室温に放置し溶解させた。

7. 試験菌株の準備

lacZ 遺伝子の解析には、大腸菌 C 株 (*gal E*⁻) を *cII* 遺伝子の解析には大腸菌 *hfl*⁻ 株 (G1225) それぞれ使用した。培養方法は定法に従った。

8. ゲノム DNA のパッケージング

6. で調製したゲノム DNA 溶液を Transpack (Stratagene) を用いて *in vitro* パッケージング反応を行った。

あらかじめ準備しておいた大腸菌懸濁液を総プラーク算出用 (タイター用) ならびに突然変異算出用 (セレクション用) に分取した。パッケージング溶液の全量をセレクション用チューブに加え、ファージを大腸菌に感染させた。次いで、LB 寒天培地に全量を重層し、所定の温度で規定時間培養した。培養終了後、出現したプラーク数を計数した。出現した変異プラーク数 (セレクション用プレート) を総プラーク数 (タイター用プレート) で除したものが、当該組織での突然変異頻度となる (Mutant frequency)。

9. 統計方法

各試験群の *cII* 遺伝子の突然変異頻度は条件付き二項検定 (Kastenbaum and Bowman の推計学的方法³⁾ : 有意水準上側 0.05) を用いて有意差を判定した。

10. 判定基準

被験物質処理群において統計学的な有意差が認められた場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

(倫理面の配慮) : 本研究では実験動物としてラットを用いているが、動物の飼育および取り扱い等動物を使用するに際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和48年10月1日法律第105号, 平成11年12月22日改正)」, 「実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和55年3月27日総理府告示第6号, 平成14年5月

28日一部改正) 」および「(財)食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針(平成15年12月1日)」を順守しており、動物愛護上の配慮が十分にされている。また、ヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

C. 結果

コウジ酸処理群における *lacZ* 遺伝子の突然変異頻度について、その総括を Table 1 に、個体別値を Table 2 に示した。

Table 1. Mutant frequency of *lacZ* gene in transgenic rats after Kojic acid treatment

Compound	Dose (%)	Organ	Number of animals	Number of plaques	Number of mutants	Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)	p-value
Kojic acid	0	Liver	5	3670200	156	42.5	-
	1.0		5	2755800	118	42.8	>0.05
	2.0		5	3542400	155	43.8	>0.05
	3.0		5	4207500	165	39.2	>0.05
DMBA ^{a)}	20 (mg/kg)	Liver	5	1938600	563	290.4*	≤ 0.05

* :p<0.05, significant difference from control (Kastenbaum and Bowman method, upper-tailed)

a):Positive control (7,12-dimethylbenz[a]anthracene). A single dose samples were prepared at 14-days after the dose.

Table 2. Induction of mutation by Kojic acid in individual mice

Compound	Dose (%)	Organ	Animal ID-No.	Number of plaque forming units	Number of mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Mean \pm S.D.
Kojic acid	0	Liver	1001	472,500	24	50.8	44.0 \pm 10.2
			1002	871,200	46	52.8	
			1003	556,200	28	50.3	
			1004	779,400	27	34.6	
			1005	990,900	31	31.3	
	1.0	Liver	1101	468,000	23	49.1	42.8 \pm 11.1
			1102	411,300	14	34.0	
			1103	765,000	39	51.0	
			1104	461,700	24	52.0	
			1105	649,800	18	27.7	
	2.0	Liver	1201	987,300	40	40.5	45.5 \pm 7.8
			1202	458,100	19	41.5	
			1203	427,500	19	44.4	
			1204	1,264,500	53	41.9	
			1205	405,000	24	59.3	
3.0	Liver	1001	414,900	9	21.7	36.4 \pm 9.0	
		1002	1,442,700	65	45.1		
		1003	849,600	32	37.7		
		1004	620,100	22	35.5		
		1005	880,200	37	42.0		
DMBA a)	20 (mg/kg)	Liver	1301	662,400	137	206.8	288.0 \pm 73.3
		1302	798,300	279	349.5		
		1303	477,900	147	307.6		

a): Positive control (7,12-Dimethylbenz [a] anthracene); a single dose