

コウジ酸の遺伝毒性

林 真

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
変異遺伝部

コウジ酸の遺伝毒性に関しては、多くの試験がなされており、かなり錯綜した結果が得られている。最近 IARC でコウジ酸の評価が行われ、直接作用性の遺伝毒性物質であると結論している。ここでは、食品添加物安全性再評価等の試験検査—変異原性試験報告書をはじめ、新しく入手した未公開のデータを含めて、コウジ酸の遺伝毒性に関して再評価を行った。

コウジ酸の *in vitro* における遺伝毒性試験結果を表 1 に示す。DNA に傷が付つと SOS 修復系が誘導される現象を利用した大腸菌 SOS 試験では陰性であった (Auffray and Boutibonnes, 1986)。一方、同様に DNA 損傷性をみる Rec-assay では 1000 μ g/disk で陽性の結果が得られている (真鍋ら, 1981)。細菌を用いる復帰突然変異試験 (Appendix 参照) では、ネズミチフス菌 TA100, TA1535, TA98 において、代謝活性化系の存否にかかわらず、ほとんどの試験で陽性の結果が報告されている (Shibuya et al., 1982; Wei et al., 1991; Wehner et al., 1978; Bjeldanes and Chew, 1979) が、TA1537, TA1538 においては陰性の結果が主であった (Shibuya et al., 1982; Wehner et al., 1978; 宮部, 1996)。ただし、陽性となるのはほとんどの試験において 1000 μ g/plate を超える用量であり、特に代謝活性化系の存在下では 2000 μ g/plate 以上の用量で処理しないと陽性にはならなかった。一部で非常に低い用量から陽性の結果を与えるものもあったが、陰性対照の値に問題があり、信頼性に欠けるものであった。

ほ乳類培養細胞を用いる試験系では、チャイニーズハムスター細胞株 V79 を用いた遺伝子突然変異試験 (代謝活性化系非存在下) で陰性であった (Shibuya et al., 1982)。マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いる *hprt* 試験においても、特に問題となるような所見は得られていない (Covance Laboratories, 2002)。V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験および染色体異常試験では代謝活性化系の存否にかかわらず陽性の結果が報告されている (Wei et al., 1991)。チャイニーズハムスター培養細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験では、代謝活性化系非存在下の 1000 μ g/ml において陽性結果が得られている (石館, 1987)。しかし、祖父尼による確認試験においては、細胞毒性が現れる用量まで検討された代謝活性化系非存在下の連続処理試験で染色体異常誘発性は認められなかった。短時間処理法の代謝活性化系非存在下において、用量限界である 5000 μ g/ml で疑陽性となったのみで、石館らの陽性結果の再現性は確認されなかった (祖父尼, 1996)。また、V79 細胞を用いる染色体異常試験において統計学的には有意な陽性の反応も観察されているが、背景データを少し上回る程度の反応であり、用量反応関係も明確ではなかった (RCC/CCR, 2002)。ほ乳類培養細胞を用

いる試験系の結果を総合的に評価すると、遺伝子突然変異誘発性は認められなかったが、染色体異常誘発性に関しては相反する結果が得られており、異常誘発性の可能性を残す結果であった。

表1 コウジ酸の *in vitro* 遺伝毒性試験結果

Test system	Spp/met. act.	Concentrations	Result	Remarks
SOS repair	E. coli/with & without		Negative	Auffray & Boutibonnes, 1986
Rec assay	B. subtilis, H17/M45/without	100,1000 µg/disk	Positive	真鍋ら, 1981
Gene mutation	S. typhimurium/TA100,TA98/with & without	1000,2000,3000 µg/plate	Positive (TA100)	Bjeldanes & Chew, 1979
Gene mutation	S. typhimurium/TA100,TA1535,TA98,TA1537/with & without	500,1000,2000,4000 µg/plate	Positive (TA100, TA1535, TA98)	Shibuya et al., 1982
Gene mutation	S. typhimurium/TA100,TA1535,TA98,TA1537/with & without	0.5,5,50,500 µg/plate	Positive (TA98/with)	Wehner et al., 1978
Gene mutation	S. typhimurium/TA100,TA98/with & without	100,250,500,750,1000,2000,4000,6000 µg/plate	Positive	Wei et al., 1991
Gene mutation	S. typhimurium/TA100,TA1535,TA98,TA1537,TA1538/with & without	100,200,500,1000,2000,5000,10000 µg/plate	Positive (except TA1538)	宮部, 1996
Gene mutation	S. typhimurium/TA100,TA1535,TA98,TA1537,TA1538/with & without	-S9mix: 3,10,33,100,333,1000, +S9mix: 33,100,333,1000,2500,5000	Negative	RCC/CCR, 2001
Gene mutation	Chinese hamster, V79/6TG resistant/without	30,100,300,1000,3000 µg/mL	Negative	Shibuya et al., 1982
Gene mutation	Mouse lymphoma L5178Y/hprt /with & without	300 - 1420, µg/mL	Negative	Covance Laboratories, 2002
SCE	Chinese hamster, CHO-K1	3000,4500,6000 µg/mL	Positive	Wei et al., 1991
Chromosome aberration	Chinese hamster, CHO-K1/	3000,4500,6000 µg/mL	Positive	Wei et al., 1991

	with & without			
Chromosome aberration	Chinese hamster, CHL/IU/ Without	500,1000,2000 $\mu\text{g/mL}$	Positive	石館, 1987
Chromosome aberration	Chinese hamster, CHL/IU/ with & without	1250,2500,5000 & 250,500,1000, 2000 $\mu\text{g/mL}$	Negative (5000, -S9mix で±)	祖父尼, 1996
Chromosome aberration	Chinese hamster, V79/with & without	250~1420 $\mu\text{g/mL}$	Positive(細胞毒性によるものとのコメント有り)	RCC/CCR, 2002
Micronucleus	Chinese hamster, CHL/IU/ with & without	125,250,500,1000, 2000 $\mu\text{g/mL}$	Inconclusive	祖父尼, 1996

In vitro でコウジ酸に染色体異常誘発性の危惧が認められたため、生体内で遺伝毒性が発現するか *in vivo* 試験によって検討した。コウジ酸の *in vivo* における遺伝毒性試験結果を表2に示す。ラットにコウジ酸を経口的に 150 または 1500 mg/kg 投与し、2 および 16 時間後に肝細胞を調製した。その後培養系に移し、³HTdR を 4 時間取り込ませ、オートラジオグラフで不定期 DNA 合成(UDS)を測定したが、当該実験条件下では陰性であった (RCC/CCR, 1997)。コウジ酸に染色体異常誘発性があるか否かを検討するため、マウスを用いる小核試験が行われた。その結果、125, 250, 500, 1000 (5/6 匹死亡) mg/kg を 2 回投与、または 500mg/kg を 5 回腹腔内投与されたが小核誘発性は認められなかった (Nonaka et al., 1996)。また、250, 500, 1000mg/kg を 2 回強制経口投与した試験においても同様に陰性の結果であった (栗田, 1996)。さらに、187.5, 375, 750 mg/kg を腹腔内投与した試験の結果も陰性であった (RCC/CCR, 2001)。これら、小核試験の陰性結果は、*in vitro* で染色体異常誘発性があったとしても、それが生体内で発現する可能性は低いことを示していた。

その後、がん原性の検討より、甲状腺 (三森ら, 2001) および肝臓 (三森, 2002; 瀧澤ら, 2002) に催腫瘍性の可能性が明らかになったため、コウジ酸の生体内での遺伝毒性について再検討することとなった。検討項目としては、生体内でコウジ酸が DNA に傷を付ける能力があるかどうか、また、その傷が染色体異常として固定されるものか否かを検討した。DNA 損傷性の検出系として、単細胞ゲル電気泳動法 (コメット法) を、染色体異常誘発性の検討系としては小核試験を用いた。

表2 コウジ酸の *in vivo*(*in vivo/in vitro* 法を含む)試験結果

Test system	動物種/ 組織	Route/Dose (mg/kg)	Result	Remarks
UDS <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Rat/ 肝臓	po/150,1500×1	Negative	RCC/CCR, 1997
Micronucleus	mouse/ 骨髄	ip/125,250,500,1000×2; 125,250,500×5	Negative	Nonaka et al. 1996
Micronucleus	mouse/ 骨髄	po/250,500,1000×2	Negative	栗田, 1996
Micronucleus	young rat/ 骨髄	po/1000, 2000×1	Positive	林, 2002
Micronucleus	young rat/ 末梢血	po/1000, 2000×1	Positive	林, 2002(独立して 2カ所で実施)
Micronucleus	young rat/ 肝臓	po(3,4,5days)/1000, 2000×1	Negative	林, 2002(独立して 2カ所で実施)
Micronucleus	mouse/ 再生肝	po/500,1000×1	Positive	佐々木, 2002
Micronucleus	mouse/ 骨髄	ip/187.5,375,750×1 (24h) ; 750×1(48h)	Negative	RCC/CCR, 2001
Comet	mouse/ 甲状腺	po(3,24h)/250, 500, 1000×1	Negative	望月, 2001
Comet	mouse/ 肝臓	po(3,24h)/250, 500, 1000×1	Negative	望月, 2001
Comet	mouse/ 肝臓	po(3,24h)/125,250,500,1 000×1	Positive	佐々木, 2002
Comet	rat/ 肝臓	po(3,24h)/500,1000×1	Positive	佐々木, 2002
Comet	mouse/ 肝臓	feeding(1,2,4,6,10days)/ 1.5, 3%	Positive(1.5% 4,6,10days)	佐々木, 2002
Dominant lethal	Mouse	po/350,700×5	Negative	Shibuya et al., 1982
Gene mutation	Muta TM Mouse/ 肝臓, 甲状腺	po/800,1600×28days	肝臓: Negative	Covance Laboratories (interim)

林 (2002) の結果は独立した2機関で行われた結果のまとめ
佐々木 (2002) では、肝臓のほかに胃、結腸、腎臓、膀胱、肺、脳、骨髄についてコメット試験を実施

マウスにコウジ酸を最大耐量である 1000mg/kg を最高に、500 および 250mg/kg を単回腹腔内投与し、投与後3時間ならびに24時間後に肝臓、甲状腺(1000mg/kg のみ)等の標本作製し、DNA 損傷性についてコメット法で検討した。その結果、陽性対照として用いた EMS は期待どおりの陽性反応をしたが、コウジ酸は陰性の結果であった(望月, 2001)。他方、別の機関でも同様な検討が行われ、

単回強制経口投与試験（マウス：500, 1000 mg/kg；ラット：1000 mg/kg）では、マウス肝臓で用量依存的に、またラットの肝臓で統計学的に有意な陽性結果が得られている（佐々木, 2002）。さらに、1.5%、3%のコウジ酸をマウスに1~10日間混餌投与したところ、肝臓では4日目以降3%群で異常細胞の有意な増加が観察され、10日後には1.5%群においても有意となった。

コメット法では強アルカリ下でDNAの切断を観察するものであり、ほとんどの傷は修復されるものと考えられる。そこで、コメット法で観察された肝臓でのDNA損傷が、遺伝毒性として重要な遺伝子突然変異や染色体異常として固定されるものであるかどうかを小核試験にて検討した。成熟個体での肝臓ではほとんど分裂細胞が観察されないため、造血作用のある幼若ラット肝および部分肝切除後の再生肝を用いる小核試験を適用した。その結果、幼若ラットを用いる試験系（1000, 2000 mg/kg）では独立した2機関で、充分高用量まで行われたが小核の誘発は観察されなかった（林, 2002）。しかし、一方でマウスの再生肝を用いた試験（500, 1000）において1000 mg/kg群で小核の有意な誘発が観察された（佐々木, 2002）。また、幼若ラットを用いる試験において、骨髄および末梢血における小核誘発を同時に検討した結果、弱いものの再現性のある陽性結果が得られた（林, 2002）。このように、小核の誘発性に関しても、造血系ではマウスで陰性、ラットで陽性、また、肝細胞ではマウスで陽性、ラットで陰性といった、実験動物の種および臓器が異なるものの相矛盾する結果となった（Appendix 参照）。

コウジ酸の遺伝子突然変異誘発性を *in vivo* で検討するために、トランスジェニックマウス（MutaTMMouse）を用いる試験が行われた。800 および 1600 mg/kg を28日間強制経口投与し、最終投与7日後の肝臓および甲状腺を摘出して検討した。最終的な結論は得られていないが、中間報告では、コウジ酸は肝臓において遺伝子突然変異誘発性を示さなかった、と結論している（Covance Laboratories, 2002）。

コウジ酸の生殖細胞に対する影響を検討するため、マウスを用いる優性致死試験が行われているが、その結果は陰性であった（Shibuya et al., 1982）。

IARCでの評価の通り、*in vitro* では一部否定的なデータが在るものの、コウジ酸には遺伝子突然変異、染色体異常誘発性が共にあるものと考えられる。特に、代謝活性化系の非存在下で遺伝毒性が認められ、代謝系の存在で遺伝毒性が弱まる傾向であった。次にこれらの反応が生体内で発現するか否かが重要な点となる。ここでは、最新の *in vivo* 試験データも含めて評価したが、結果が錯綜しており明確な結論を導くには至らなかった。コメット法では、2機関において同一条件で試験したにもかかわらず相反した結果が得られている。この原因は不明であるが、可能性の一つとしてマウスの系統の違い（CBA/JNCrj と ddY）が考えられるが、これまでコメット法におけるマウスの系統差の報告はない。ラット肝でみられたコメット陽性の反応は、幼若ラット肝小核試験の陰性結果で生物学的意味合いを低くしたが、マウスでの反応は再生肝小核試験で確認されたことになる。コウジ酸の造血系における染色体異常誘発性の強さに関しては、野中らの報告にあるように、5/6の動物が死亡する用量まで検討した小核試験の

結果が陰性であった点、ラットの末梢血で小核誘発性が認められたが、主に 2000 mg/kg と非常に高用量のみでの反応である点、また、マウス再生肝での小核誘発性も 1000 mg/kg のみで有意となっている点を考慮すれば、生体内でコウジ酸の染色体異常誘発性が認められるとしても弱いものであると考えられる。これらの相矛盾する小核試験結果を説明する一つとして種差が考えられるが、造血系ではラットで陽性であり、肝細胞ではマウスが陽性となり、一方の種で染色体異常誘発性における感受性が高いとは考え難い。生殖細胞に対する影響に関しては優性致死試験が実施されており、陰性の結果が報告されている。また最近提供を受けた in vivo/in vitro 不定期 DNA 合成試験、マウス骨髄小核試験、トランスジェニックマウスの肝臓を用いた遺伝子突然変異試験がすべて陰性であったことを考え合わせると、コウジ酸の遺伝毒性が生体内で発現する可能性は著しく高いものとは思われない。

甲状腺における催腫瘍性に関しては詳細なメカニズム試験が実施されており（三森ら、2001）、甲状腺において DNA 付加体の形成や酸化的 DNA 損傷性（8-OH-dG の形成）も認められなかったことから、遺伝毒性的メカニズムではなく、ホルモンを介した発がんプロモーション作用である可能性が強く示唆された、としている。一方、肝臓に関しては F344 ラットを用いた二段階発がん試験においてプロモーション作用のみならず、コウジ酸のみを投与した群において GST-P 陽性巢の増加傾向が認められていることから、発がん性が強く示唆されている。さらに p53 ノックアウトマウスを用いた検討では、肝細胞腺腫が発生したため、発がんにイニシエーション作用が関与している可能性も考えられている（三森、2002；瀧澤ら、2002）。遺伝毒性に関しては試験結果が錯綜し、明確な結論を導くに至らなかったが、コウジ酸が肝臓において遺伝毒性メカニズムに基づく発がん作用を示す可能性は著しく高いものとは思われない。なお、生殖細胞に対する影響を検討した報告（Shibuya et al., 1982）は一報のみであるが、優性致死試験の結果が陰性であり、問題となる所見は得られていない。

参考文献

- Auffray, Y. and Boutibonnes, P. (1986) Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using *Escherichia coli* in the SOS spot test, *Mutat. Res.*, 171, 79-82.
- Bjeldanes, L.F. and Chew, H. (1979) Mutagenicity of 1,2-dicarbonyl compounds: Maltol, kojic acid, diacetyl and related substances, *Mutat. Res.*, 67, 367-371.
- 林 真(2002) Genotoxicity of kojic acid (投稿準備中)
- 石館基 (1987) 染色体異常試験データ集 (株式会社リアライズ社) .
- IARC (2001) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 79, 607-618.
- 栗田年代 (1996) 平成7年度 食品添加物安全性再評価等の試験検査—変異原性試験；マウス小核試験報告書.
- 真鍋勝, 後藤哲久, 田中健治, 松浦慎治 (1981) *Aspergillus flavus* group の aflatoxin および kojic acid の産生について, *Rept. Natl. Food Res. Inst.*, 38, 115-120.
- 三森国敏 (2002) 食品添加物規格基準作成等の試験検査—コウジ酸の

- CBA[p53(+/+)]マウスにおける6ヶ月間反復投与実験報告書
三森国敏, 小野寺博志, 田村啓, 広瀬雅雄 (2001) 麴酸のp53ノックアウト
[p53(+/-)]マウスの甲状腺および肝臓に対する影響報告書
宮部正樹 (1996) 平成7年度 食品添加物安全性再評価等の試験検査—変異原性
試験 (Ames 法) 報告書.
望月信彦 (2001) 食品添加物規格基準作成等の試験検査—コウジ酸のマウスを
用いる単一細胞 DNA 鎖切断 (SCG, コメット) 試験報告書.
Nonaka, M., Omura, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (1996) Kojic acid did not induce
micronuclei in mouse bone marrow hematopoietic cells, *MMS Commun.*, 4,
109-112.
佐々木有 (2002) コウジ酸の in vivo コメットアッセイおよび再生肝小核試験(私
信: 日本環境変異原学会第31回大会で発表予定)
Shibuya, T., Murota, T., Sakamoto, K., Iwahara, S. and Ikeno, M. (1982) Mutagenicity
and dominant lethal test of kojic acid, *J. Toxicol. Sci.*, 7, 255-262.
祖父尼俊雄 (1996) 平成7年度 食品添加物安全性再評価等の試験検査—天然添
加物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験報告書.
瀧澤保, 上田誠, 小野寺博志, 今井俊夫, 広瀬雅雄 (2002) 麴酸のF344ラット
における肝発がん修飾作用報告書
Wehner, F.C., Thiel, P.G., van Rensburg, S.J. and Demasius, I.P.C. (1978)
Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some aspergillus and penicillium
mycotoxins, *Mutat. Res.*, 58, 193-203.
Wei, C.I., Huang, T.S., Fernando, S.Y. and Chung (1991) Mutagenicity studies of kojic
acid, *Toxicol. Let.*, 59, 213-220.

Appendix

Ames 試験結果のまとめ

TA100		TA1535		TA98		TA1537		TA1538		
-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
1000	?			10000	?					Bieldanes & Chew, 1979
4000	2000	4000	2000	4000	4000	4000	4000			Shibuva et al., 1982
(-)	(-)	-		-		-				Wehner et al., 1978
500	500	500	500	500	0.5	500	500			
a	1000 2000			100	2000					Wei et al.,
b	1000 2000			100	2000					
	1000 2000	500 2000	1000 2000	1000 5000	2000 10000	10000 10000	10000 10000			宮部, 1996
c	1000 2000									
c	1000 2000									

Minimum effective concentration for POSITIVE and maximum concentration tested for NEGATIVE

(-): Too low control values in the negative control.

a: Plate-incorporation assay, b: Preincubation assay, c: different lot.

肝臓と造血組織における遺伝毒性試験結果のまとめ

	マウス		ラット		
	肝臓	造血組織	肝臓	造血組織	
<i>In vivo/ in vitro</i> UDS			Negative		RCC/CCR, 1997
コメット試験	Negative				望月, 2002
コメット試験	Positive	Negative	Positive	Positive	佐々木, 2002
小核試験		Negative			Nonaka et al., 1996
小核試験		Negative			栗田, 1996
小核試験		Positive			RCC/CCR, 2001
小核試験			Negative	Positive	林, 2002
小核試験				Positive	林, 2002
小核試験	Positive				佐々木, 2002
MutaMouse	Negative				Covance