

食品添加物「コウジ酸」について

平成14年12月6日

食品添加物「コウジ酸」について

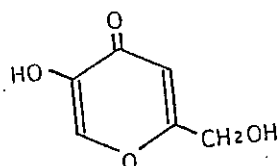
食品添加物安全性等評価検討会
座長 戸部 満寿夫

1. コウジ酸について

コウジ酸(Kojic acid)は、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。コウジ酸は、メラニン生合成関連酵素「チロシナーゼ」を阻害する作用により、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。

コウジ酸は、平成7年の食品衛生法改正に伴う既存添加物として現在食品添加物としての使用が認められている。

なお、コウジ酸については、食品衛生法上の食品添加物としての使用基準が設定されておらず、対象食品等の制限は規定されていない。



コウジ酸(Kojic acid)

注) 既存添加物とは、いわゆる天然添加物の使用を原則として禁止した平成7年の食品衛生法改正に伴い、改正時に使用されていた天然添加物を個別に列記し、特例的にその使用を認めたもの。

2. 安全性についての検討

(1) 一般毒性等の検討(平成8年度まで)

既存添加物の安全性確認作業の一環として実施または情報収集された安全性試験(亜急性、慢性毒性試験、遺伝毒性試験)において、以下のような知見が得られた。

① 亜急性、慢性毒性試験について(別添1、2)

B6C3F1マウスを用い、コウジ酸の経口投与による亜急性、慢性毒性

試験を行った。

コウジ酸の混餌投与(0、0.15、0.3、0.6、1.25、2.5%)によるマウス3ヶ月の亜急性毒性試験では、生存率、摂餌量、体重、臓器重量に有意な変化はなかった。

コウジ酸の混餌投与(0、1.5%、3%)によるマウス20ヶ月間慢性毒性試験においては、以下の変化が認められた。

ア. 雌雄で体重増加率の用量相関的な低下および甲状腺重量の増加。

イ. コウジ酸の投与量に相関して甲状腺の過形成及び腺腫の発生増加が見られた。発生率は雄で1.5%群及び3%群、雌では3%群で有意に増加した。甲状腺がんの発生は認められていない。

肝腫瘍の発生頻度は、雄では対照群と投与群との間に有意差は認められなかったが、雌の3%群で有意に高い結果が得られた。

その他の腫瘍発生は、散発的でありコウジ酸投与との相関は認められなかった。

ウ. 雄の血清の甲状腺ホルモン値は、3%群における投与開始6、12ヶ月目及び屠殺時においてコウジ酸投与群で有意に低値であった。雌については、1.5%群及び3%における投与開始6ヶ月目及び屠殺時に有意に低値を示した。

TSH値は、雌、雄ともに6ヶ月目でのみコウジ酸投与群で上昇を示した。

②遺伝毒性について(別添3)

In vitro 遺伝毒性試験としては、Rec-assay、細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター培養細胞(V79)を用いた遺伝子突然変異試験、チャイニーズハムスター培養細胞(CHL)を用いた染色体異常試験が報告されている。

Rec-assayでは1000 μ g/diskで陽性を示した。細菌を用いた復帰突然変異試験では、TA100、TA1535、TA98において、代謝活性化の有無にかかわらず2000 μ g/plate以上という高濃度で陽性を示したが、TA1537、TA1538では陰性の結果であった。

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培養細胞(V79)を用いた遺伝子突然変異試験では陰性の結果であった。

チャイニーズハムスター培養細胞(CHL)を用いた染色体異常試験においては代謝活性化系非存在下において、1000 μ g/mlで陽性結果が得られた。また、短時間処理法の代謝活性化系非存在下では、最高用量の5000 μ g/mlで異常頻度の上昇が見られたが、再現性および用量相関性が明確でなく、疑

陽性と判断された。

In vivo 遺伝毒性試験としては、マウスを用いた小核試験と優性致死試験の結果が報告されている。

マウスを用いた小核試験では、2回経口投与(最大耐量である 1000mg/kg まで)および5回腹腔内投与(500mg/kg)においていずれも陰性の結果が得られた。

また、マウスを用いた優性致死試験においても 700mg/kg までの経口投与において陰性の結果が得られた。

③まとめ

コウジ酸の経口投与慢性毒性試験において、甲状腺の過形成及び腺腫が見られた。遺伝毒性については、in vitro 試験では陽性結果が得られているもののいずれも高用量での反応であり、in vivo の小核試験の結果が陰性であったことから、生体内において遺伝毒性が発現することは考えがたいと判断された。これらのことから甲状腺の腺腫は血清甲状腺ホルモンの低下と甲状腺刺激ホルモンの上昇が関係しているものと考えられたが、コウジ酸のラット甲状腺に対する影響及び甲状腺に対するイニシエーション作用の有無を含めた発がんメカニズムを解明するための追加試験が必要であると判断された。

(2) 甲状腺に対する検討(平成8年度～12年度)(別添4)

コウジ酸のラット甲状腺に対する影響及び発がんメカニズムを検討するため、以下のような試験が実施された。

- ・コウジ酸による甲状腺発癌ラットでの再現性実験(平成8年度)
- ・コウジ酸の甲状腺発がんプロモーション作用メカニズムの解析(平成8年度)
- ・甲状腺腫瘍プロモーション作用の閾値の検討(平成9年度)
- ・コウジ酸の甲状腺に対するイニシエーション作用に関する検討(平成10年度)
- ・コウジ酸の甲状腺におけるDNA付加体形成能に関する検討(平成11年度)
- ・コウジ酸の甲状腺における8-hydroxy-deoxyguanosine(8-OH-dG)形成能に関する検討(平成11年度)
- ・コウジ酸の甲状腺に対するイニシエーション作用に関する追加検討(平成11年度)

これらの試験結果を踏まえ、コウジ酸の甲状腺に対する作用については次のように報告されている。

In vitro 遺伝毒性試験において、上記(1)②のとおり、いくつかの陽性結果が示されているが、平成11年度に実施された追加試験結果により、コウジ酸が甲状腺濾胞上皮細胞に対してイニシエーション作用を有する可能性はほとんどないことが確認された。一方、平成8～9年度に実施された試験結果より、甲状腺における発がんの作用メカニズムは、ヨードの取り込みと有機化の阻害による甲状腺ホルモン合成阻害に続く下垂体－甲状腺軸のネガティブフィードバック機構を介した非遺伝毒性メカニズムに起因するものであることが強く示唆された。以上の実験成績を総合的に評価するとコウジ酸は非遺伝毒性の甲状腺発がん物質であると推定され、作用閾値は1250ppm(66mg/kg/day)と考えられた。

なお、コウジ酸による甲状腺ホルモン合成阻害は休薬することによって48時間以内に血清T3、T4やTSHが正常に復帰することが報告されていること、また、ヒトにおいては甲状腺ホルモンに結合する甲状腺ホルモン結合グロブリン(TBG)が血液中に存在し、その生物学的半減期が長いこと、抗甲状腺物質に暴露されても血液中のT4は減少し難いことが知られていることから、TBGのないマウスやラットで引き起こされるコウジ酸による甲状腺腫瘍がヒトにおいて発現する可能性は非常に低いと推察される。

(3) 肝臓に対する検討(平成12～14年度)(別添5)

甲状腺に対する影響を検討する過程において、

- ① 遺伝毒性発がん物質に感受性が高いとされているp53遺伝子をノックアウトしたCBA雄マウスに対し、0、1.5%、3%の用量でコウジ酸を26週間混餌投与したところ、肝臓に小増殖巣が1.5%投与群で5/10例、3%投与群で8/10例、さらに肝細胞腺腫が1.5%投与群で7/10例、3%投与群で5/10例と有意に増加した。
- ② 野生型マウスにおいても肝細胞腺腫の増加が認められたが、その発生頻度はノックアウトマウスよりもやや低かった。
- ③ これらの試験に用いられた動物数が少ないことや肝臓に炎症性変化が見られたことから、この肝腫瘍の増加は炎症によって修飾された可能性を否定できない

との報告(平成12年度)を受けたことから、コウジ酸の肝発がん性について検討するため、平成13年度に以下のような検討が行われた。

- ・ コウジ酸のCBA [p53(+)] マウスにおける6ヶ月反復投与実験(追試)

(別添6：平成14年7月報告)

・コウジ酸のF344ラットにおけるN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を用いた肝二段階発がん実験の再検討

(別添7：平成14年2月報告)

・コウジ酸のF344ラットにおける肝発がん修飾作用(伊東モデルを用いた検討)
(別添8：平成14年2月報告)

CBAマウスを用いた6ヶ月混餌投与実験の結果では、肝増殖性病変の発現率及び平均発生個数がコウジ酸投与群で増加する傾向が認められ、2%投与群の小増殖巣では有意差が見られた。また、2%投与群では肝細胞巣状壊死の増加傾向も認められた。また、DHPNによる肝二段階発がん実験を実施した結果では、DHPN+2%コウジ酸群において単位面積あたりの前がん病変である胎盤性グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(以下GST-P)陽性巣の個数及び面積が有意に増加し、また、DHPNのイニシエーション処置なしのコウジ酸2%単独投与群においてもGST-P陽性巣が無処置群に比較して増加した。さらにDENによる肝二段階発がん実験(伊東モデル)を実施した結果では、2%コウジ酸投与群で単位面積あたりのGST-P陽性巣の個数及び面積が有意に増加した。

これらの試験結果から、コウジ酸がマウス及びラットの肝臓に対して発がん性を示す可能性が確認され、その肝発がんにはコウジ酸の肝障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た。

(4)コウジ酸の遺伝毒性(平成8年度～14年10月)

コウジ酸の遺伝毒性については、上記(1)②のとおり、種々の試験が実施されてきたが、肝臓での発がん性と遺伝毒性を再検討するため、DNA損傷性の検出法として単細胞ゲル電気泳動法(コメット法)が、染色体異常誘発性の検討系としては小核試験が実施された。(別添9：平成14年11月報告、別添10-1、10-2：平成14年9～11月公表)

また、平成14年10月末に、マウスリンフォーマL5178Y細胞を用いる*hprt*試験、V79細胞を用いる染色体異常試験等、およびトランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験結果がすべて陰性であったとする資料を入手した。

これら試験結果をこれまでの報告も含めとりまとめた(別添3)。そのうち肝臓及び造血組織における遺伝毒性試験結果は次のとおりである。

	マウス		ラット		
	肝臓	造血組織	肝臓	造血組織	
In vivo/ in vitro 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	—	Negative	—	—	RCC/CCR, 2001
小核試験	—	—	Negative	Positive	林, 2002
小核試験	Positive	—	—	—	佐々木, 2002
MutaMouse	Negative	—	—	—	Covance

総体的にみると、コウジ酸による遺伝毒性については、否定的なデータもあるものの、in vitro では遺伝子突然変異誘発性、染色体異常誘発性が共にあるものと考えられる。また、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がみられた。

これらの反応が生体内で発現するか否かについては、相矛盾する結果が得られており明確な結論を得ることは困難である。

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義を低くしたが、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こと、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こと、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ことを考慮すれば、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。総合的に見ると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られない。

その他、生体内で遺伝毒性が発現するか検討した *in vivo* 試験として、ラットにおける不定期 DNA 合成試験 (UDS) とトランスジェニックマウス (MutaTMMouse) を用いた試験 (中間報告) が報告されているが、その結果は陰性を示している。

現段階で総括すると、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低いものの否定できないと考えられる。

(5) 安全性の総括

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、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。また、p53 ノックアウトマウスを用いた検討でも、肝細胞腺腫が発生し、その感受性は野生型マウスよりやや高かった。さらに、遺伝毒性についても上述のとおり、生体内で遺伝毒性が発現する可能性が低いものの否定できないことなどから、総括すると、肝臓に対する発がん性は、閾値を設定できる非遺伝的機序によるものであるとする根拠は得られていない。

ただし、コウジ酸の発がん性の強度としては、比較的弱いものと考えられる。また、コウジ酸の肝細胞腫瘍やその前がん性病変が誘発される用量は、ラットで 2% 以上、マウスで 1% 以上であり、食品中に含まれるような低用量暴露ではそのような腫瘍誘発の可能性は非常に低いと考えられる。

なお、コウジ酸は、平成 12 年 10 月に実施された IARC (国際がん研究機構) の評価会議において、提出されたデータは今回の検討に比べ極めて限られているが、*in vitro* では直接作用性の遺伝毒性物質であると認められているものの結論としては、Group 3 (ヒトに対する発がん性については分類できない) に分類されている。

3. 食品添加物としてのコウジ酸の使用

日本食品添加物協会は、現在、国内においてコウジ酸を食品添加物として使用している実態はないと報告している。

また、輸入食品の届出を見ると、平成12年1月から平成14年8月まで辛子明太子 388件、たらこ 51件、穀物酢 1件の合計 440件の輸入実績がある。このうち、辛子明太子及びたらこは特定の企業によるものであって、当該企業に照会したところ、現在、コウジ酸は使用していない旨の回答を得た。念のため、当該辛子明太子及びたらこ各2検体を収去し、検査したところコウジ酸は検出されなかった(検出限界 0.4ppm、平成14年10月報告)。

4. 総括

食品添加物としてのコウジ酸は、

- ① マウスで肝細胞腫瘍の発生が認められ、ラットでも肝発がん性の可能性が示唆され、かつ、遺伝毒性については試験結果が錯綜し、明確ではないが、遺伝毒性を有する可能性は低いながらも否定できないこと、
 - ② 食品添加物としてのコウジ酸は、味噌、しょう油等のように製造に当たり麹菌を用いることに由来するものではなく、意図的に添加するものであること、
 - ③ 食品添加物としてのコウジ酸は、国内において現在使用されていないと報告されており、輸入食品についても届け出をみるとほとんど使用されておらず、食品添加物として使用する必要性は低いと考えられること、
- などから、食品添加物としてのコウジ酸については、今後とも使用しないように必要な措置を講じることが望ましいと考える。

(参考)食品中のコウジ酸について

麹菌を用いて製造される、味噌、しょうゆ、酒等の食品について文献収集および実際市販されている製品の分析を行った。(別添 11-1:平成14年10月報告、別添 11-1(追加)、11-2:平成14年11月報告)

文献によると、進士、真鍋らは、製麹時にコウジ酸が産生されたとしても醸造中に微生物、酵素などの影響により分解されるため、最終製品中にコウジ酸が残存する可能性は少ないと報告している。

食品中に含有されるコウジ酸含有量の調査として、味噌 30 検体、しょう油 30 検体、酒 29 検体について調査したところ、味噌 1 検体からは 0.5ppm 検出されたものの、その他の検体からはコウジ酸は検出されなかった(検出限界:味噌、しょう油 0.5ppm、日本酒 0.2ppm)。

なお、平成8年12月に、味噌 11 検体、しょう油 2 検体を分析した結果では、味噌 1 検体及びしょう油 1 検体からコウジ酸 1.0ppm それぞれ検出され、味噌 4 検体からは検出されず(検出限界 0.1ppm)、味噌 6 検体及びしょう油 1 検体からは妨害ピークが認められたが、妨害ピークがコウジ酸であると仮定しても、その濃度は 1ppm 未満と報告されている。

これら麹菌を用いて製造される食品は我が国の伝統食品として長い歴史を有するものであること、麹菌を製造に用いる食品においてはコウジ酸も産生されるが、食品中のコウジ酸は微生物、酵素等によって分解されると報告されていること、動物試験で腫瘍の発生が見られた濃度に比べ、製品中のコウジ酸濃度は現時点においては極めて限られたものであること、味噌により癌の発生が抑制されるという動物試験結果(参考資料)があるなど、味噌、しょう油等のリスクは食品全体として評価する必要があることなどから、直ちに何らかの措置を講じる必要はないと考えられるものの、念のため引き続き食品中のコウジ酸についてモニタリングをしてゆくことが望ましいと考えられる。

委員一覧

	井上 達	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長
	棚元 憲一	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
○	戸部 満寿夫	元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長
	長尾 美奈子	東京農業大学客員教授
	林 眞	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長
	廣瀬 雅雄	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病理部長
	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
	三森 国敏	東京農工大学農学部獣医学科家畜病理学講座教授

○座長

(五十音順)