

## 麴酸のラットにおける甲状腺発癌メカニズムについて

三森国敏、小野寺博志、広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

はじめに

麴酸 (KA) は *Aspergillus* 属のカビから産生される抗菌物質で、メラニン生合成関連酵素、チロシナーゼの阻害作用を有し、カニやエビの変色を防ぐ食品添加物として、またその美白作用から化粧品成分としても用いられている。この KA のマウスにおける 18 ヶ月発癌性試験では、1.5 及び 3% の混餌投与により甲状腺腫瘍が誘発されることが報告されている (1)。一方、KA は、Ames test (*S. typhimurium* TA98, 100)、Rec-assay (*Bacillus subtilis*) ならびに染色体異常試験 (Chinese hamster ovary cell) 等の *in vitro* の変異原性試験では、いくつかの陽性結果 (2-4) 報告されており、KA の甲状腺に対するイニシエーション作用の可能性が懸念されることから、KA による甲状腺発癌機序を更に明らかにするため、以下の実験を行った。

## 実験 1: 麴酸による甲状腺発癌のラットでの再現性実験 (5)

雄 F344 ラットにイニシエーション処置として diisopropanolnitrosamine (DHPN) 2800mg/kg を一回皮下投与した。その一週間後に第 1 群には 4%、2 群には 2% および第 3 群には 0% のコウジ酸含有粉末飼料を自由に与えた。コウジ酸投与開始後 1、2、4、8 および 12 週目に各群 5 匹ずつ経時的に屠殺した。第 4 群は無処置対照群とし同様に経時的に 4 匹ずつ屠殺した。各解剖時に体重、甲状腺、下垂体、肝臓の重量、血中甲状腺ホルモン (T3, T4, TSH) や肝の UDP-GT 活性 (2 および 4 週目のみ) を測定すると共に病理組織学的検索を実施した (5)。KA 投与群では投与初期から体重の増加抑制が用量相関性に実験終了時まで見られた。甲状腺重量は KA 投与 1 週目で増加し、その傾向は投与期間の延長と共に増大したが、1 群と 2 群の間に差はなかった。相対肝重量はいずれの時期においても各投与群で増加する傾向が認められた。T3/T4 値は投与全期間の KA 投与群で有意に減少した。肝 T4 UDP-GT 値はコウジ酸投与群において有意な変動は見られなかった。甲状腺腫瘍は KA 投与群で誘発された。

コウジ酸はラットに対し甲状腺プロモーション作用を有することが示され、その腫瘍誘発には甲状腺-下垂体軸のネガティブフィードバック系を介した TSH の持続的刺激が関与していることが示唆された。なお、その血清 TSH の上昇には、肝 T4 UDP-GT の誘導は関与しないことが明らかとなった。

## 実験 2: 麴酸の甲状腺発癌プロモーション作用メカニズムの解析 (6)

KA の甲状腺腫瘍プロモーション発現機序として、ヨードの取り込み及び有機化阻害が関与するか否かを明らかにするため、雄ラットに 2, 0.5, 0.125, 0.03, 0.008 ないし 0% の KA 含有飼料を 4 週間与えた (6)。甲状腺濾胞上皮肥大とコロイドの減少は 0.03% 以上の投与群で観察された。血清 T4 と T3 は 2% 群で有意に減少し、TSH は同群で有意に増加した。ヨードの取り込みは 0.03% 群から用量依存性に有意に減少し、ヨードの有機化量は 2% 群で有意に減少した。

従って、KA の甲状腺腫瘍誘発は、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起因するネガティブフィードバック系を介した TSH の増加によるプロモーション作用であることが明らかとなった。

## 実験3: 甲状腺腫瘍プロモーション作用の閾値の検討(7)

KA のラットにおける甲状腺腫瘍プロモーション作用の閾値をあきらかにするため、雄 F344 ラットに DHPN2000mg/kg を1回皮下投与しイニシエーション処置とした。その1週間後から、第1群から第6群まで2, 0.5, 0.125, 0.03, 0.008, 0.002%の KA 含有飼料を、7群には基礎飼料を自由に与えた。2, 0.5 及び 0.125%投与群は12週目に各群5匹づつを途中解剖し、残りの動物(各群10匹)は20週目に解剖した。また DHPN 無処置で KA 2, 0.5 及び 0%含有飼料を20週間自由摂取させては20週目に解剖した。また DHPN 無処置で KA 2, 0.5 及び 0%含有飼料を20週間自由摂取させては20週目に解剖した。解剖時に血清を採取し甲状腺関連ホルモン(T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH)を測定した。甲状腺解剖する群も設けた。解剖時に血清を採取し甲状腺関連ホルモン(T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH)を測定した。甲状腺は重量を測定後、病理組織標本を作製し検索を行った(7)。12週途中解剖動物では濾胞上皮限局性過形成が DHPN+0.125%から発現し(2/5例)、DHPN+0.5%及び2%では全例に認められた。腺腫は DHPN+0.5%で3/5例、2%では全例に発現し、腺癌は DHPN+2%で1/5例に認められた。T<sub>4</sub> は DHPN+0.125%から有意に減少し、TSH は DHPN+2%で有意に増加した。20週解剖動物では濾胞上皮の限局性過形成が DHPN+0.125%から発現(5/10例)し、DHPN+0.5%以上で全例に認められた。腺腫は DHPN+0.5%で7/10例、DHPN+2%で全例に認められた。腺癌は DHPN+0.5%で1/10例、DHPN+2%で8/10例に認められた。DHPN 無処置の KA 投与群では2%投与群で1/9例に限局性過形成が認められた。T<sub>4</sub> は DHPN+2%、0.5%単独投与群で有意に減少した。TSH は DHPN+2%で有意に増加し、2%単独投与群でも増加傾向を示した。

前腫瘍性病変である濾胞上皮の限局性過形成は DHPN+0.125%から発現していることから KA の甲状腺腫瘍プロモーション作用の閾値は 0.125%(66mg/kg/day)と考えられた。

## 実験4: 麩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(8)

KA は Ames 試験や染色体異常試験等の *in vitro* の変異原性試験でいくつかの陽性結果が報告されている。そこで、ラット甲状腺二段階発癌モデルを用いて KA の甲状腺腫瘍誘発におけるイニシエーション作用の有無を検討した。雄 F344 ラット、110匹を7群に分けた。第1群(15匹)を無処置対照群として、第2群から第4群(各15匹)には700mg/kg 体重の DHPN を週1回の割合で5回投与してイニシエーション処置とした。DHPN イニシエーション処置終了後から、第2群には基礎飼料を、第3群には2%KA 含有飼料を自由摂取させた。また第4群には0.1%の sulfadimethoxine (SDM)を飲水投与した。第5群(20匹)は DHPN イニシエーション処置のかわりに、2%KA 含有飼料を4週間自由摂取させた後、基礎飼料を自由摂取させた。第6群(15匹)は DHPN 無処置で4週間後から0.1%SDMを飲水投与した。第7群(15匹)は2%KA 含有飼料を4週間自由摂取させた後、基礎飼料にきりかえて自由摂取させるとともに0.1%SDMを飲水投与した。DHPN 5回投与終了時(0日)に第2群、第5群ならびに無処置対照群から各5匹づつを剖検、さらに4週間後に全群を5匹づつ、20週間後に全生存動物を剖検し、甲状腺について病理組織学的検索を行った(8)。DHPN イニシエーション処置(700mg/kg/週×5回)後にプロモーション処置として2%KA(混餌)もしくは0.1%SDM(飲水)を投与した群では、4週間後から甲状腺に増殖性病変が観察され、20週後には腺腫、腺癌の誘発が認められた。DHPN 処置のみの群では、20週間後に1/5例に限局性過形成が観察されたが腫瘍の発現は認められなかった。2%KAを4週間投与した後、基礎飼料を20週間与えた群ならびに0.1%SDMのみを20週間投与した群では、増殖性病変の発現は認められなかった。一方、2%KAを4週間投与後、さらに0.1%SDMを20週間投与した群では、10例中4例に前腫瘍性

病変である限局性過形成の発現が認められた。

以上の結果から、KA は甲状腺腫瘍プロモーション作用のほかに、軽微ではあるが、甲状腺に対してイニシエーション作用を有している可能性が示唆されたが、そのイニシエーション活性はDHPNと比較すると著しく弱いものと考えられた。

#### 実験5: 麩酸の甲状腺における DNA 付加体形成能に関する検討(9)

KA は Ames 試験においてサルモネラ菌 TA98 及び TA100 に対して変異原性を示すことが報告されており、甲状腺腫瘍誘発においてイニシエーターとしても作用する可能性が考えられることから、KA の DNA 付加体形成能について  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法を用いて検討した。5 週齢の雄 F344 ラット 20 匹を 10 匹ずつ 2 群に分け、それぞれを基礎飼料のみ、もしくは 2%KA 含有飼料で 2 週間飼育した後、甲状腺を摘出、DNA を抽出、分解した。さらに  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の付加物増感法を用いてその 5' -末端を標識した。DNA 付加体を正常ヌクレオチドから分離した後、2 次元薄層クロマトグラフィーを行いバイオイメージアナライザーで解析した(9)。その結果、KA 投与ラットの甲状腺 DNA 中に付加体のスポットは検出されなかった。さらに、1-2 環性の化合物が DNA に付加した化合物と正常ヌクレオチドとの分離に使用される ODS プレートを用いて、DNA 付加体形成の有無を調べた場合にも KA-DNA 付加体スポットは検出されなかった。

以上の結果から、KA はラット甲状腺に付加体を形成しないか、形成してもその付加体量は検出限界以下であることが示唆された。

#### 実験6: 麩酸の甲状腺における 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) 形成能に関する検討(10)

DNA の酸化的損傷の指標の一つである 8-OH-dG 形成の有無を、KA を投与したラット甲状腺について検索した。5 週齢の雄 F344 ラット 40 匹を 20 匹ずつ 2 群に分け、それぞれを基礎飼料のみ、もしくは 2%KA 含有飼料で飼育した。両群とも投与開始後 1 週及び 2 週目に 10 匹を剖検し、甲状腺を摘出して、ホモジナイズを作製した。このホモジナイズから DNA を抽出し、ヌクレアーゼ P1 および酸性ホスファターゼにより分解後、HPLC-EDC 法により 8-OH-dG を測定した(10)。KA の 1 週間投与群の 8-OH-dG 値 ( $0.186 \pm 0.061/10^5 \text{dG}$ ) は対照群 ( $0.260 \pm 0.066/10^5 \text{dG}$ ) と比較して低い傾向を示し、KA の 2 週間投与群の 8-OH-dG 値 ( $0.102 \pm 0.016/10^5 \text{dG}$ ) は対照群 ( $0.246 \pm 0.062/10^5 \text{dG}$ ) と比較して有意に低値を示した。

以上の結果から、KA は甲状腺 DNA に対して酸化的損傷を引き起こさないことが示唆された。

#### 実験7: 麩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(11)

実験4においてKAが甲状腺に対してイニシエーション作用を有している可能性が示唆されたが、明確な作用とはみなされなかったことから、KAの甲状腺に対するイニシエーション作用の有無をさらに明らかにするため、雄ラットに対して、1群には8週間無処置飼育後、0.1%のSDMを飲水投与し、2群には700mg/kgのDHPNを2週に1回、計4回皮下投与後、0.1%SDMを投与した。3群には2%KA含有飼料を自由摂取させ、4群は2%KA含有飼料を8週間自由摂取させた後、基礎飼料を摂取させた。5群から7群にはそれぞれ0.02%KA、0.2%KAならびに2%KA含有飼料をイニシエーション処置として8週間自由摂取させた後、0.1%SDMを飲水投与した。実験開始31週後に各群半数のラットを屠殺し、残りの半数はすべての投与を中止して無処置のまま更に13週間飼育した(11)。DHPN+SDM

群では、反復投与および休薬群共に限局性過形成、腺腫、癌が高率かつ多数認められた。0.02%KA+SDM、0.2%KA+SDM、2%KA+SDMとSDM単独群では、1-4例に限局性過形成が観察されたが、これらの群間で発生頻度や発生個数に有意差はみられなかった。また、それぞれの休薬群においても発生頻度と平均発生個数やPCNA標識率に顕著な増加はみられなかった。2%KA31週間投与群では、限局性過形成が6/9例に、その休薬群で5/8例に認められ、さらに1/8例に腺腫が認められたが、発生個数やPCNA標識率に顕著な増加はみられなかった。2%KA8週間投与群では増殖性病変の発現は認められなかった。

今回のKA+SDM群にそれぞれ認められた限局性過形成は、発生頻度や平均発生個数に0.1%SDM単独群と統計学的有意差が認められず、PCNAの標識率や面積にも顕著な差がみられなかったことから、KAとそれに続くSDMのTSHを介したプロモーション作用によって自然発生性の変異巣が限局性過形成として発現したものと推察され、KAがイニシエーション作用を有するとは考えられなかった。

#### 総合考察

KAの*in vitro*変異原性試験においていくつかの陽性結果が報告されている。しかし、今回の実験5-7の成績より、KA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殆どないことが確認された。一方、実験1-3の成績から、本物質の甲状腺発癌が、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。しかし、KA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は正常値に復帰することが報告されており(12)、KAを含有したエビなどの魚介類を持続的に摂取することは通常の食生活ではあり得ないことから、このような甲状腺への影響はヒトにおいては起こり得ないものと考えられる。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のないラットで引き起こされるKAによる甲状腺発癌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。

従って、以上の実験成績を総合的に評価すると、麴酸は非遺伝毒性の甲状腺発がんプロモーターであると結論され、そのプロモーション作用閾値は、1250ppm(66mg/kg/day)と判定された。

#### 引用文献

- 1) Fujimoto *et al.* (1998) Induction of thyroid tumors in C57BL/6N×C3H/N. F1 mice by oral administration kojic acid. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 697-703
- 2) Wei, C. I. *et al.* (1991) Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol. Lett.*, 59, 213-220
- 3) Manabe *et al.* (1981) The capabilities of *Aspergillus flavus* group to produce aflatoxins and kojic acid. 食総研報, 38, 115-120

- 4) Lee *et al.* (1992) Chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary cells induced by kojic acid. *J. Korean Society of Food and Nutrition*, 29, 264-265
- 5) 平成 8 年度 食品添加物規格基準設定試験検査(第一次)最終報告書 (1997) 麴酸のプロモーター試験:甲状腺二段階発がんモデルを用いた麴酸の甲状腺腫瘍プロモーション作用の検討
- 6) 平成 8 年度 食品添加物規格基準設定試験検査(第二次)最終報告書 (1997) 麴酸の甲状腺腫瘍発生メカニズムの解明
- 7) 平成 9 年度 食品添加物規格基準設定試験検査 最終報告書 (1998) 麴酸の甲状腺腫瘍プロモーション作用閾値の検討
- 8) 平成 10 年度 食品添加物安全性再評価 最終報告書 (1999) 麴酸の甲状腺発癌メカニズムの検討:ラット甲状腺二段階発癌モデルにおける麴酸のイニシエーション期投与の影響
- 9) 平成 11 年度 食品添加物安全性再評価 最終報告書 (2000) 麴酸の甲状腺発癌メカニズムの検討:麴酸のラット甲状腺における DNA 付加体形成能に関する研究
- 10) 平成 11 年度 食品添加物規格基準設定試験検査 最終報告書 (2000) 麴酸に関する安全性試験:麴酸のラット甲状腺における 8-hydroxy-deoxyguanosine 形成能に関する研究
- 11) 平成 11 年度 食品添加物安全性再評価 最終報告書 (2000) 麴酸の甲状腺発癌メカニズムの検討:ラット甲状腺二段階発癌モデルにおける麴酸のイニシエーション期投与の影響
- 12) Fujimoto, N. *et al.* (1999) Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by kojic acid in F344 rats. *Carcinogenesis* 20, 1567-1571

平成 14 年 9 月 26 日

## コウジ酸のラット及びマウスにおける肝発癌性について

三森国敏<sup>1</sup>、広瀬雅雄<sup>2</sup><sup>1</sup> 東京農工大学農学部 獣医学科 家畜病理学講座、<sup>2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

要旨：コウジ酸 (KA) の雌雄 B6C3F<sub>1</sub> マウスを用いた長期混餌投与発癌性試験 (1.5%及び 3%) において、甲状腺腫瘍の他、雄の 1.5%投与群で肝腫瘍の増加傾向、雌の 3%投与群で肝腫瘍の有意な増加が認められたことが報告されている。また、遺伝毒性発癌物質に高感受性を示す *p53* ヘテロ欠損マウス (*p53 (+/-)*マウス) 及びその野生型マウスに 1.5 及び 3% の KA を 26 週間混餌投与した結果、KA の 1.5%以上の投与群で *p53 (+/-)*マウス及びその野生型マウスにおいてイニシエーション処置なしでも肝細胞腫瘍が誘発されることが見出されている。しかしながら、この実験では肝障害が多く認められ、これが発癌に何らかの影響を与えている可能性が否定できなかった。従って、今回 KA の反復投与による肝障害性及び肝発癌性の再現性を明らかにする目的で、*p53* ノックアウトマウスの野生型マウスである CBA 雄マウスを用いた 26 週間混餌投与実験を実施した。その結果、肝増殖性病変の発現率及び平均肝細胞小増殖巣発生個数が 2%KA 投与群で増加する傾向が認められ、2%群では肝細胞巣状壊死の増加傾向も認められた。さらに、KA について F344 雄ラットを用いて DHPN による肝二段階発癌実験を実施した結果、DHPN+2%KA 群において単位面積あたりの GST-P 陽性巣の個数及び面積が有意に増加し、また、DHPN のイニシエーション処置なしの KA 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。KA の肝プロモーション作用を明確にするため、F344 雄ラットを用いて DEN による肝二段階発癌実験 (伊東モデル) を実施した。その結果、2%KA 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、KA が肝発癌プロモーション作用を有することが明らかとなった。また、ラットでは 2%KA で肝障害が認められた。以上の成績から、KA がマウスおよびラットの肝臓に対して発癌性を示す可能性が再確認され、今までの結果を総合的に判断すると、その肝発癌に KA の肝障害性やイニシエーション作用が関与している可能性が示唆された。

## はじめに

麹酸 (KA) は味噌、醤油などの製造に用いられる麹菌、特に *Aspergillus* 属のカビから産生される抗菌物質で、メラニン生合成関連酵素であるチロシナーゼの阻害作用を有していることから、カニやエビの黒変防止を目的とした食品添加物として、またその美白作用から化粧品成分としても用いられている。KA は *in vitro* 変異原性試験において幾つかの陽性結果が既に報告されており<sup>1,3)</sup>、また、藤本らは、コウジ酸 (KA) の雌雄 B6C3F<sub>1</sub> マウスに対する長期混餌投与発癌性試験 (1.5%及び 3%) において、甲状腺腫瘍の他に、雄の 1.5%投与群で肝腫瘍の増加傾向 (発生率 69%、対照群 48%)、雌の 3%投与群で肝腫瘍の有意な

増加（発生率 10%、対照群 0%）が認められたことを報告している<sup>4)</sup>。以上のことから、KA に肝発癌性の可能性が考えられたことから、以下の実験を行った。

#### 実験 1：超酸の 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<sup>5)</sup>

遺伝毒性発癌物質に感受性が高いとされている p53 の片側アレルをノックアウトした p53 (+/-) CBA 雄マウスおよび同腹子の野生型 (p53 (+/+)) 雄マウスに 1.5%KA あるいは 3%KA 含有飼料を 26 週間自由摂取させた。血中 T4 値は p53 (+/-) 及び p53 (+/+) マウスともに KA 投与群において用量依存性の有意な低下もしくは低下傾向が認められた。血中 TSH は p53 (+/-) マウスの 1.5%KA 投与群において有意に増加し、3%KA 投与群で増加傾向が認められた。組織学的には、甲状腺では p53 (+/-) 及び p53 (+/+) マウスともに KA 投与群において全例に顕著な甲状腺濾胞上皮の肥大とび慢性の濾胞上皮過形成が観察されたが、腫瘍の形成は認められなかった。肝臓では p53 (+/-) 及び p53 (+/+) マウスともに対照群に増殖性病変の発現は認められなかったが、KA 投与群では、p53 (+/-) マウスにおいて変異細胞巣発現が 1.5%KA 投与群で 5/10 例、3%KA 投与群で 8/10 例、さらに肝細胞腺腫の発現が短期間の投与にもかかわらず、それぞれ 7/10 例、5/10 例と有意な増加が認められた。これら増殖性病変の発現は p53 (+/+) マウスでも認められ、変異細胞巣は 1.5%KA 投与群で 5/12 例、3%KA 投与群で 2/12 例、肝細胞腺腫が 1.5%KA 投与群で 2/12 例、3%KA 投与群で 5/12 例に発現した。なお、1.5% 投与群では肝細胞腺腫の発生頻度は、p53 (+/-) マウスの方が p53 (+/+) マウスよりも有意に高かった。肝細胞の巣状壊死や炎症性細胞浸潤は、対照群を含め各群 0~3 例に認められた。本実験の成績から、KA がホルモンを介した非遺伝毒性甲状腺発癌プロモーターであることがさらに強く支持された。一方、肝臓で観察された変異細胞巣及び肝細胞腺腫は KA 投与によって誘発された可能性が高いと推察され、KA が直接的または間接的にマウス肝細胞に対し、何らかの遺伝子損傷を与えるイニシエーション作用を有している可能性も否定できなかった。

#### 実験 2：コウジ酸の CBA [p53 (+/+)] マウスにおける 6 ヶ月間反復投与実験<sup>6)</sup>

実験 1 において用いた動物数が少ないことや肝臓に炎症性変化がみられたことから、この肝腫瘍の増加が炎症によって修飾された可能性を否定できなかつたため、KA の反復投与による肝障害性及び肝発癌性の再現性を明らかにする目的で、p53 ノックアウトマウスの野生型マウスである CBA 雄マウスを用いて KA の 0.5%、1% 及び 2% を 26 週間反復混餌投与した。最終剖検時での肝臓重量は、実重量及び相対重量が用量依存性に有意な増加を示した。組織学的には、肝細胞小増殖巣及び肝細胞腺腫の発現が認められた。肝細胞小増殖巣の発現は 0.5%KA 投与群で 7/18 例、1%KA 投与群で 9/20 例、2%KA 投与群で 9/19 例にそれぞれ認められ、対照群(3/20 例)に比し、2%KA 投与群で統計学的に有意 ( $p < 0.05$ ) に増加を示した。肝細胞腺腫の発現は 0.5%KA 投与群で 3/18 例、1%KA 投与群で 2/20 例、2%KA 投与群で 4/19 例にそれぞれ認められたが、対照群(1/20 例)との間に統計学的有意差はな

かった。一方、各増殖性病変の個体あたりの平均発生個数においては、肝細胞小増殖巣は0.5%KA投与群で0.6/マウス、1%KA投与群で0.8/マウス、2%KA投与群で0.6/マウスであり、対照群(0.2/マウス)に比し、KA投与群で統計学的に有意( $p < 0.05$ )であった。肝細胞腺腫はいずれの投与群も0.2/マウスであったが、対照群(0.05/マウス)との間に有意差はなかった。これら増殖性病変以外に、肝細胞巣状壊死が、0.5%KA投与群で1/18例、1%KA投与群で1/20例、2%KA投与群で6/19例にそれぞれ認められたが、対照群(2/20例)との間に有意差はなかった。以上のように、肝増殖性病変の発現率及び平均肝細胞小増殖巣発生個数において高用量群で増加する傾向が本実験においてもみられたことから、KAがマウスの肝に対して障害性と発癌性を示す可能性が再確認された。

#### 実験3：コウジ酸のF344ラットにおけるDHPNを用いた肝二段階発癌実験<sup>7)</sup>

KAのマウス肝に対する発癌性が示唆されたため、ラットにおける肝発癌の可能性を検討する目的で、甲状腺発癌の用量相関性を検討した際の肝臓を病理組織学的に再検討した。1群10匹のF344雄ラットに、2000mg/kgのN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN)を1回皮下投与し、その1週間後より0, 0.125, 0.5及び2%のKAを20週間混餌投与した。なお、0, 0.5及び2%群ではイニシエーションを行わない対照も設定した。その結果、肝細胞の前癌病変の指標として知られている胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-P)陽性細胞の数及び面積はイニシエーション後の0, 0.125, 0.5, 2%群それぞれ8.5, 9.8, 10.4, 22.3個/cm<sup>2</sup>: 531, 705, 836, 3745µm<sup>2</sup>/mm<sup>2</sup>と、いずれも2%で有意( $p < 0.01$ )に増加した。イニシエーションを行わない群でも、数が1.55, 面積が147.7と対照の0.40, 9.7に比較して増加した。また、2%群では肝細胞の空胞変性や小肉芽腫の有意な増加も認められた。本実験により、KA(2%)のラット肝発癌に対するプロモーション作用が認められ、発癌性も強く示唆された。

#### 実験4：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)<sup>8)</sup>

KAのラット肝発癌プロモーション作用を再確認し、その強度を既知の発がん物質と比較する目的で、ジエチルニトロソアミン(DEN)と部分肝切除による二段階モデル(伊東モデル)を用いKAの影響を検討した。1群25匹のF344雄性ラットに200mg/kgのDENを単回腹腔内投与し、2週間後からKAを0, 0.125, 0.5あるいは2%の濃度で飼料に混じて6週間投与した。また、DEN処置3週後に2/3部分肝切除を実施した。その結果、実験期間中に被験物質投与に起因した死亡は認められなかった。2%投与群では摂餌量の減少を伴う軽度な体重増加の抑制がみられ、肝相対重量の増加が認められた。GST-P陽性細胞巣は2%群で単位面積あたりの個数(16.9個/cm<sup>2</sup>)及び面積(1.62mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>)が対照のそれぞれ8.4, 0.77に比較して有意( $p < 0.01$ )に増加した。また、2%群では肝細胞の空胞変性も認められた。以上の結果から、本実験条件下では、KAはF344ラットに対して2%の濃度で肝発癌プロモーション作用を示し、0.5%以下では同作用を示さないことが明らかとなった。本法では、強



力な遺伝毒性肝発癌物質（カビ毒の aflatoxin B1、加熱した魚肉類に含まれるヘテロサイクリックアミンの一種である Glu-P-1 や MeIQx）の場合、文献的に個数で対照の 7-10 倍、面積で 10-60 倍の値を示すが、KA の場合はそれぞれ対照の 2 倍程度であり、既知の発がん物質では 500ppm Trp-P-2（ヘテロサイクリックアミン）や 3000ppm Captafol（農薬）に相当することから、発癌の強度は比較的弱いものと考えられる。なお、雄の F344 ラットを用い Trp-P-2 は 100ppm、Captafol は 1500ppm で 2 年間飼育するとそれぞれ 37%、42% に肝細胞腺腫が発生することが知られている<sup>9,10)</sup>。

#### 総合考察

今回の肝発がん性に関する実験から、マウス及びラットに対する KA の肝発癌性が強く示唆され、発癌に肝障害性が関与している可能性も疑われた。KA は、Ames test (*S. typhimurium* TA98, 100)、Rec-assay (*Bacillus subtilis*) ならびに染色体異常試験 (Chinese hamster ovary cell) 等の *in vitro* の変異原性試験において、いくつかの陽性結果が報告されている<sup>3-5)</sup>。一方、今回の肝発癌性に関連する実験からは、KA が遺伝毒性発癌物質であると断定できる明らかな成績は得られていないものの、p53 ノックアウト CBA マウスおよびその野生型マウスにおける KA の 26 週間反復投与実験で肝細胞腺腫の発現が認められ、その発生頻度がノックアウトマウスの方が高率であったことから KA が肝臓に対してイニシエーション作用を有する可能性は否定できない。さらに、KA について新たに得られた知見（別添 3）として、ラットおよびマウスの単回強制経口投与の *in vivo* コメットアッセイ、マウスの 4-10 日間混餌投与の *in vivo* コメットアッセイおよびマウスの再生肝小核試験において肝で陽性結果が得られており、また、幼若ラット末梢血を用いた小核試験においても陽性結果が得られたことを総合的に考慮すると、KA の肝発癌メカニズムの一つとして、肝障害以外にイニシエーション作用も関与している可能性がある。しかし、KA の肝細胞腫瘍やその前癌性病変が誘発される用量は、ラットで 2% (20,000 ppm) 以上、マウスで 1% (10,000 ppm) 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。また、今回までの発癌性についての検索では、その発癌メカニズムについては十分な解析は行われていないので、今後、遺伝毒性のメカニズムについて更なる検討が必要である。

#### 引用文献

- 1) Manabe *et al.* (1981) The capabilities of *Aspergillus flavus* group to produce aflatoxins and kojic acid. 食総研報, 38, 115-120
- 2) Wei, C.I. *et al.* (1991) Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol. Lett.*, 59, 213-220.
- 3) Lee *et al.* (1992) Chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary cells induced by kojic acid. *J. Korean Society of Food and Nutrition*, 29, 264-265.
- 4) Fujimoto *et al.* (1998) Induction of thyroid tumors in C57BL/6N×C3H/N.F1 mice by oral

administration kojic acid. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 697-703.

- 5) 三森国敏、小野寺博志、田村啓、広瀬雅雄 (2001) 糞酸の p53 ノックアウトマウスの甲状腺および肝臓に対する影響 国立医薬品食品衛生研究所病理部からの私信
- 6) 平成 13 年度 食品添加物規格基準作成等の試験検査 最終報告書 (2002) コウジ酸の CBA[p53(+/+)]マウスにおける 6 ヶ月間反復投与実験
- 7) 瀧澤保、今井俊夫、田村啓、上田誠、小野寺博志、安原加壽雄、高木久宣、三森国敏、広瀬雅雄 (2002) 麴酸によるラット肝発癌修飾作用 第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集 84.
- 8) 平成 13 年度食品添加物安全性評価費 最終報告書 (2002) 麴酸の F344 ラットにおける肝発癌発がん修飾作用(伊東モデルを用いた検討)
- 9) Takahashi et al. (1993) The rat urinary bladder as a new target of heterocyclic amine carcinogenicity: tumor induction by 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole acetate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 852-858.
- 10) Tamano et al. (1990) Carcinogenicity of captafol in F344/DuCrj rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 1222-1231.