

平成13年度

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

最終報告書

平成14年7月3日

機関名 東京農工大学 農学部 獣医学科 家畜病理学講座

三森国敏

【 要 約 】

コウジ酸 (KA) の反復投与による肝傷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、1% 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発癌性を示す可能性が再確認された。今後、その発癌メカニズムについては、イニシエーション作用の可能性を含めたさらなる研究が必要である。

【 緒 言 】

コウジ酸 (Kojic acid: KA) は、酒や味噌、醤油などの発酵食品に欠がせない麹菌から発見された物質で、メラニン生成のキー酵素であるチロシナーゼの活性を抑制することから、美白剤としての注目度が高く、化粧品や外用剤の成分として、またカニやエビ、カット野菜の変色防止を目的とした食品添加物として、広く用いられている。我々はこれまでに KA がマウスの発癌性実験において2%以上の用量で甲状腺腫瘍を誘発することを報告した (1)。この発癌メカニズムについて、ラット甲状腺に段階発癌モデルを用いて検討した結果、KA が甲状腺でのヨードの取り込みと有機化を阻害することで甲状腺ホルモン合成を阻害し、血中甲状腺ホルモンの減少から甲状腺-下垂体軸のネガティブフィードバック系を介して上昇した TSH 刺激によって甲状腺に増殖性病変を誘発することが明らかとなり、KA が甲状腺プロモーション作用を有することが示唆された (2)。一方、甲状腺発癌のみならず、肝発癌を示唆する報告もある。伊藤らは雌雄の B6C3F1 マウスを用いた長期投与実験において、甲状腺腫瘍の他 1.5% 投与の雄で肝腫瘍の増加傾向が、3% 投与の雌で肝腫瘍の有意な増加を認めたと報告している (3)。また、我々はヘテロ欠損 *p53* ノックアウトマウス (*p53*(+/-)マウス) を用いた6ヶ月反復投与実験を実施し、KA の 1.5% 以上の投与で *p53*(+/-)マウス及びその野生型マウスにイニシエーション処置なしでも肝腫瘍が誘発されることを報告した (4)。しかしながら、この実験では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 KA によって誘発されたものか否かを明らかにすることができなかった。KA の遺伝毒性については、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* 変異原性試験において幾つかの陽性結果が報告されている (5-7)。また、マウス骨髄小核試験では陰性であるが、*in vivo* 肝 UDS 試験等は実施されておらず、肝臓に対する *in vivo* における遺伝毒性の有無は不明であり、肝腫瘍発現に KA の遺伝毒性が関与している可能性も否定できない。そこで、今回 KA の反復投与による肝傷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 26 週間反復投与毒性実験を実施した。

【 実験方法 】

1. 被験物質及び投与量：

KA は、アルプス薬品 (株) (岐阜) より入手した。性状は淡黄色の粉末で、含量は 100.6% である。遮光、気密及び室温保存で製造後 2 年間安定であることが保証されている。投与量は、既に実施された *p53* ノックアウトマウスを用いた 6 ヶ月反復投与実験において 1.5% 以上の投与群で肝腫瘍が誘発されたことから、2% を高用量群として設定し、以下公比 2 で減じ、1%、0.5% を中間用量群及び低用量群にそれぞれ設定した。

2. 動物及び投与方法、検査：

4週齢のCBA(SPF)マウス雄100匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、約2週間の馴化飼育後、各群20匹ずつ(対照群と2%投与群については、途中屠殺動物としてさらに10匹)、4群に分けて実験を行った。1群には基礎飼料を、2群、3群及び4群には、それぞれ0.5%、1%及び2%KA含有飼料を自由摂取させた。動物の飼育はバリアシステムの動物飼育室で行い、室内環境条件は、温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数18回/時間、蛍光照明12時間(7-19時)とした。動物をマウス用ポリカーボネートケージに5匹/ケージ収容し、粉末飼料(CR-2, オリエンタル酵母㈱)に被験物質を混ぜ、自由に摂取させた。床敷は日本チャールス・リバー㈱製の木製床敷(ホワイトフレック)を用い、週2回の頻度でケージとともに交換した。被験物質の調製は、原粉末を 4°C で遮光保存し、週1回調製した。飼育期間中は毎日、動物の一般状態及び死亡の有無を観察し、体重及び摂餌量を毎週1回測定した。なお、摂餌量は、給餌量から残餌量を差し引いた量として算出した。投与開始26週後に全生存動物についてエーテル麻酔下で腹大動脈を切断し、放血殺した後、剖検し、肝臓、甲状腺及び下垂体を摘出した。肝臓重量測定後、摘出した臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本作製後、病理組織学的検索に供した。

3. 統計学的解析：

体重、摂餌量及び臓器重量の各測定値について群毎に平均値及び標準偏差を求め、多重比較検定を行った。すなわち、Bartlett法により分散の均一性を調べ、均一な場合はDunnnettの検定を行い、不均一な場合はDunnnett型の順位和検定を行った。一方、病理組織病変の発現頻度についてはFisherの直接確立検定を、病変の発生個数についてはStudentのt検定を実施した。有意水準は危険率5%以下とした。

【 実験成績 】

0.5%KA投与群で投与開始11週目に2例が、また2%KA投与群で投与開始20週目に1例が、それぞれ死亡した(表1)。2%KA投与群では有意な体重増加抑制を示した。摂餌量は対照群との間に顕著な差は認められなかった。肝臓重量については、実重量及び相対重量で用量依存性の有意な増加が認められた。組織学的に、肝臓で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、その発現率は対照群(3/20例)に比し、2%KA投与群において統計学的に有意($p < 0.05$)であった(表2)。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、1%KA投与群で統計学的に有意($p < 0.05$)であった(表3)。肝細胞腺腫は0.5%KA投与群で0.2/マウス、1%KA投与群で0.2/マウス、2%KA投与群で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。また、これら増殖性病変以外にも肝細胞巣状壊死の発現が認められ、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。

甲状腺では、1%KA以上の投与群において全例に顕著な甲状腺濾胞上皮の肥大及び慢性の甲状腺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(表4)。また、下垂体には特に変化は認められなかった(表4)。

【 考 察 】

我々は、これまでに $p53(+/-)$ マウスを用いた26週間発癌実験を実施し、KA投与群により肝細胞小増殖巣及び肝細胞腺腫の効率的な発現を認めたことを既に報告した。さらに野生型の $p53(+/+)$ マウスにおいても少数ではあるが、同様の増殖性病変の発現を認めている(4)。一方、無処置対照群ではこれらの増殖性病変の発現は全く認められておらず、同系統マウスのバックグランドデータからも同様の増殖性病変の発現は認められていない(8)ことから、これらの増殖性病変の発現がKA投与に起因したものであると考えられた。しかしながら、この実験では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KAによって誘発されたものか否かを明らかにすることができなかった。そこで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今回の実験を実施した。

その結果、KA投与により、先の実験成績と同様に、肝細胞腺腫、肝細胞小増殖巣などの増殖性病変とともに、肝細胞の巣状壊死の発現が認められた。肝細胞小増殖巣の発生率は用量依存的な増加を示し、0.5%KA投与群では対照群との間に有意な差はなかったものの、発生率及び平均発生個数が対照群の2倍以上の値を示した。肝細胞腺腫の発生率及び平均発生個数もKA投与群で対照群に比し、高値を示した。今回の0.5%KA投与群での成績は、前回の実験の野生型マウスにおける1.5%KA投与群とほぼ同等であり、前回の実験成績よりもやや強めに病変の発現が認められた。前回の実験では肝細胞腺腫の発生率及び平均発生個数が用量依存的で有意な増加を示したものの、肝細胞小増殖巣の発現に用量相関がみられず、KA投与との関連については不明瞭であったが、今回の実験成績より、KA投与との関連性が強く示唆された。一方、前回と同様、肝細胞の巣状壊死と増殖性病変の相関性は必ずしも認められているわけではなく、発生も少数であったことから、KA投与との関連については不明ではあるが、壊死が増殖性病変の発生に関与している可能性は低いと考えられた。今回の実験では、対照群においてもわずかではあるが、KA投与群で認められたものと同様の病変(肝細胞腺腫、肝細胞小増

殖巣、肝細胞巣状壊死)が認められている。この原因については現在のところ不明であるが、我々がこれまでにこの系統のマウスを用いて実施した26週間投与実験の対照群の肝臓には同様の病変の発生は認められていない(8)。

先に述べたようにKAは*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おり(5-7)、さらに雌雄B6C3F1マウスを用いた長期投与実験において雄の1.5%KA投与群で肝腫瘍の増加傾向、雌の3%KA投与群で肝腫瘍の有意な増加が認められている(3)。また、これまでの報告では*p53*(+/-)マウスを用いた26週間投与実験において、非遺伝毒性発癌物質や肝発癌プロモーターであるフェノバルビタールを用いても腫瘍性病変の誘発は認められていない(9,10)。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今回の実験においてもみられたことから、KAのマウス肝に対する発癌性は否定できないものと思われる。さらに、KAの肝腫瘍病変誘発の要因としては、肝細胞傷害による肝細胞の壊死と再生の繰り返しによる発癌の可能性も考えられるが、肝細胞壊死と肝増殖性病変との相関性は認められなかったことから、その発癌メカニズムについてはイニシエーション作用の可能性を含めたさらなる研究が必要であろう。今後、この点を明らかにするため、肝細胞を標的とした検討、すなわち*in vivo*での肝UDS試験、肝細胞におけるDNA付加体の形成、DNAの酸化的傷害を示唆する8-OHdG形成に関する検討、あるいは*in vivo* コメットアッセイなどを用いて肝細胞に対するDNA損傷性を検討していく必要がある。

【 参考文献 】

1. 平成 8 年度 食品添加物規格基準設定試験検査 (第一次)
麴酸のプロモーター試験: 甲状腺に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 (最終報告書)
2. 平成 8 年度 食品添加物規格基準設定試験検査 (第二次)
麴酸の甲状腺腫瘍発生メカニズムの解明 (最終報告書)
3. 平成 8 年度 食品添加物規格基準設定試験検査
食品添加物安全性再評価試験: コウジ酸慢性毒性試験
4. 平成 12 年度 食品添加物規格基準設定試験検査
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
5. Wei, C.I. et al. (1991) Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol. Lett.*, 59, 213-220.
6. Manabe et al. (1981) The capabilities of *Aspergillus flavus* group to produce aflatoxins and kojic acid. *食総研報*, 38, 115-120.
7. 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
8. Mitsumori, K. et al. (2000) Rapid induction of uterine tumors with *p53* point mutations in heterozygous *p53* deficient CBA mice given a single intraperitoneal administration of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Carcinogenesis* 21, 1039-1042.
9. Sagartz, J.E. et al. (1998) Phenobarbital does not promote hepatic tumorigenesis in a twenty-six-week bioassay in *p53* heterozygous mice. *Toxicologic Pathol.*, 26, 492-500.
10. Spalding, J.W. et al. (2000) Responses of transgenic mouse lines *p53* +/- and Tg · AC to agents tested in conventional carcinogenicity bioassays. *Toxicol. Sci.*, 53, 213-223.

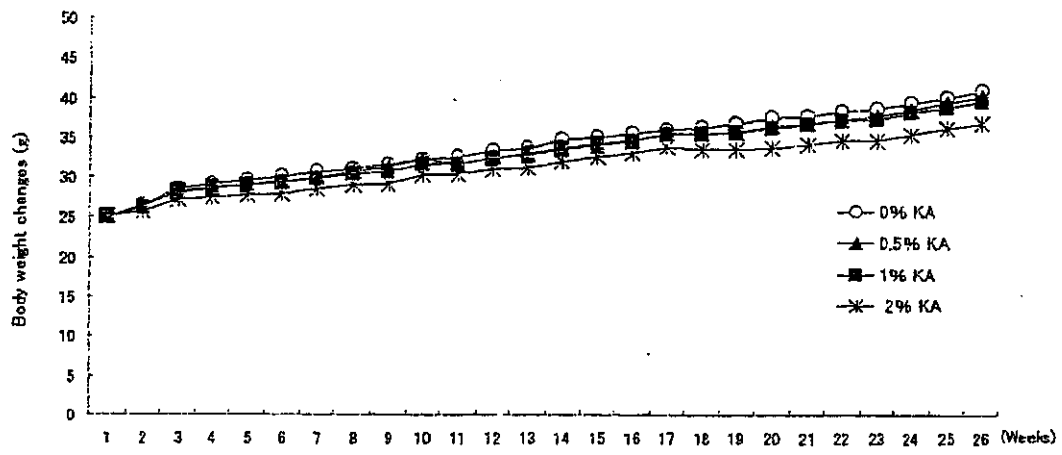


Fig. 1 体重の推移

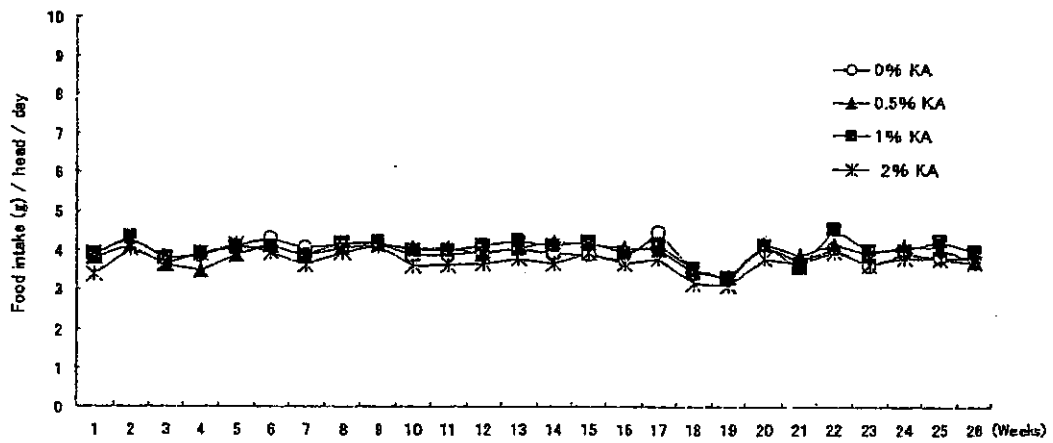


Fig. 2 摂餌量の推移

Table 1 最終屠殺時の最終体重および肝臓重量

被験物質	死亡動物数	最終体重 (g)	肝臓		
			実重量 (g)	相対重量 (%)	
0% KA	0/20	40.8±2.8	1.67±0.18	4.09±0.26	
0.5% KA	2/20	40.1±1.8	1.74±0.16	4.51±0.37	*
1% KA	0/20	39.5±3.5	1.94±0.37	4.88±0.59	***
2% KA	1/20	36.7±3.0	2.13±0.28	5.80±0.65	***

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

対照群(0% KA)に比し、統計学的に有意 (Dunnett test)

Table 2 肝臓の病理組織所見発生頻度

臓器	所見	0% KA n=20	0.5%KA n=18	1%KA n=20	2%KA n=19
肝臓	肝細胞腺腫	1 (5%)	3 (17%)	2 (10%)	4 (21%)
	肝細胞小増殖巣	3 (15%)	7 (39%)	9 (45%)	9 (47%) *
	肝細胞巣状壊死	2 (10%)	1 (6%)	1 (5%)	6 (32%)

*: $p < 0.05$ 対照群(0%KA)に比し統計学的に有意 (Fisher's exact test)

Table 3 肝臓の病理組織所見平均発生個数

臓器	所見	0% KA n=20	0.5%KA n=18	1%KA n=20	2%KA n=19
肝臓	肝細胞腺腫	0.05±0.2	0.2±0.4	0.2±0.7	0.2±0.4
	肝細胞小増殖巣	0.2±0.5	0.6±0.9	0.8±1.1 #	0.6±0.8

#: $p < 0.05$ 対照群(0%KA)に比し統計学的に有意 (Student's t-test)

Table 4 甲状腺および下垂体の病理組織所見

臓器	所見	0% KA n=20	0.5%KA n=18	1%KA n=20	2%KA n=19
甲状腺	濾胞上皮過形成	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%) ***	19 (100%) ***
下垂体		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

***: $p < 0.01$ 対照群(0%KA)に比し統計学的に有意 (Fisher's exact test)