

## コウジ酸の幼若ラットを用いる小核試験

林 真

国立医薬品食品衛生研究所・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。大腸菌を用いた SOS 試験では陰性であったが、Rec-assay および細菌を用いる復帰突然変異試験では高用量で陽性の結果が報告されている。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）で陰性であり、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。しかし、チャイニーズハムスター細胞株 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。また、チャイニーズハムスター培養細胞 CHL/IU および V79 を用いた染色体異常試験では陽性結果が得られている試験もあるが、染色体異常誘発性の強さ、再現性等に問題を残している。

一方、ラット肝臓を用いた *in vitro/in vivo* 不定期 DNA 合成試験で陰性の結果が報告されている。マウスを用いた単細胞ゲル電気泳動試験（コメット試験）において、骨髄では陰性であったが、肝臓は陰性と陽性との相反する結果が報告されている。ラットにおいては、肝臓、骨髄とも陽性であった（1施設での結果）。また、最大耐量まで試験したマウス小核試験において陰性の結果が複数報告されている。これら、小核試験の陰性結果は、*in vitro* で認められた染色体異常誘発性が生体内で発現する可能性は低いことを示していた。

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 GSTP 陽性巢の増加傾向が認められていることから、発がん性が示唆されている。さらに p53 ノックアウトマウスを用いた試験で肝細胞腺腫が発生したため、発がんに関与している可能性も考えられている。そこで、*in vitro* で認められた染色体異常誘発性が実際に生体の肝臓でも発現するかを調べるため、幼若ラットを用いる小核試験を行った。本法は肝臓で染色体異常誘発性を検討するための新しい方法として目下バリデーション中であるが、十分信頼のおける系であると考えられる。

日本チャルスリバーより F344 雄ラットを 3 週齢で購入し、一群 4~5 匹を用いコウジ酸 1000 および 2000mg/kg を胃ゾンデを用い強制経口投与した。投与 3, 4, 5 日後（4 週齢）に動物を安楽死させ、肝細胞を用いて小核観察用の標本作製した。末梢血小核試験は、投与後 48 時間に微量の末梢血を尾部より採血し、アクリジンオレンジ超生体染色法により観察した。また、ラット骨髄を用いる小核試験は、別途同週齢のラットを用い、コウジ酸 500, 1000, 2000mg/kg を 24 時間間隔で 2 回腹腔内および経口投与し、最終投与 24 時間後に情報に従って標本作製した。

試験の結果、コウジ酸は一般毒性試験においても限界用量と考えられている 2000 mg/kg まで投与しても幼若ラット肝細胞に小核を誘発することはなかった（表 1）。従って、コウジ酸が肝臓において染色体異常を誘発することはなく、肝臓で遺伝毒性物質として働く可能性は低いものと考えられた。一方、末梢血および骨髄では小核の誘

発が観察された (表 2, 3). これまでにマウスの造血系において小核の誘発は認められていないが, 今回の試験結果よりラットの造血系においては染色体異常誘発性があるものと考えられる. この相矛盾する結果が, 実験動物の種差に基づくものか, 週齢の差に基づくものかは不明であり, さらに詳細な検討が必要であろう.

表1 Kojic acid の幼若ラット肝細胞を用いた小核試験の結果

試験1						
処理群	用量 (mg/kg)	投与後 日数	観察 細胞数	肝小核		M期細胞
				出現数	出現頻度 (%) (Mean ± SD)	出現頻度 (%) (Mean ± SD)
陰性対照 (1%CMC)	0	5	2000	0	0.00	0.30
			2000	1	0.05	0.55
			2000	1	0.05	0.70
			2000	3	0.15	0.60
			2000	2	0.10 (0.07 ± 0.06)	0.90 (0.61 ± 0.22)
Kojic acid	1000	3	2000	1	0.05	0.60
			2000	1	0.05	0.30
			2000	1	0.05	0.85
			2000	0	0.00	0.35
			2000	1	0.05 (0.04 ± 0.02)	0.40 (0.50 ± 0.23)
Kojic acid	1000	4	2000	4	0.20	0.70
			2000	2	0.10	0.60
			2000	2	0.10	0.35
			2000	1	0.05	0.80
			2000	1	0.05 (0.10 ± 0.06)	0.70 (0.63 ± 0.17)
Kojic acid	1000	5	2000	3	0.15	0.95
			2000	4	0.20	1.00
			2000	2	0.10	0.85
			2000	0	0.00	0.95
			2000	2	0.10 (0.11 ± 0.07)	0.90 (0.93 ± 0.06)
Kojic acid	2000	3	2000	0	0.00	0.30
			2000	2	0.10	0.45
			2000	2	0.10	0.75
			2000	4	0.20	0.80
			2000	0	0.00 (0.08 ± 0.08)	0.55 (0.57 ± 0.21)
Kojic acid	2000	4	2000	2	0.10	0.60
			2000	1	0.05	0.60
			2000	2	0.10	0.55
			2000	1	0.05	0.65
			2000	1	0.05 (0.07 ± 0.03)	0.45 (0.57 ± 0.08)
Kojic acid	2000	5	2000	2	0.10	0.70
			2000	0	0.00	0.65
			2000	1	0.05	0.45
			2000	1	0.05	0.50
			2000	1	0.05 (0.05 ± 0.04)	0.70 (0.60 ± 0.12)
陽性対照 DEN	40	5	2000	18	0.90	1.00
			2000	25	1.25	0.90
			2000	23	1.15	0.95
			2000	18	0.90	1.05
			2000	20	1.00 (1.04 ± 0.16)*	0.85 (0.95 ± 0.08)

試験 2

処理群	用量 (mg/kg)	投与後 日数	観察 細胞数	肝小核		M 期細胞
				出現数	出現頻度 (%) (Mean ± SD)	出現頻度 (%) (Mean ± SD)
陰性対照 (1%CMC)	0	5	2000	1	0.00	0.85
			2000	1	0.05	0.65
			2000	1	0.05	0.30
			2000	2	0.10 (0.06 ± 0.03)	0.85 (0.66 ± 0.26)
Kojic acid	1000	3	2000	1	0.05	0.75
			2000	3	0.15	1.55
			2000	0	0.00	1.05
			2000	1	0.05 (0.06 ± 0.06)	0.55 (0.98 ± 0.43)
Kojic acid	1000	4	2000	1	0.05	0.95
			2000	2	0.10	0.70
			2000	2	0.10	0.60
			2000	0	0.00 (0.06 ± 0.05)	1.15 (0.85 ± 0.25)
Kojic acid	1000	5	2000	1	0.05	1.35
			2000	1	0.05	1.60
			2000	3	0.15	1.65
			2000	1	0.05 (0.08 ± 0.05)	1.65(1.56 ± 0.14 <sup>##</sup> )
Kojic acid	2000	3	2000	2	0.10	0.55
			2000	1	0.05	0.35
			2000	0	0.00	0.30
			2000	0	0.00 (0.04 ± 0.05)	0.55 (0.44 ± 0.13)
Kojic acid	2000	4	2000	3	0.15	0.25
			2000	1	0.05	0.25
			2000	1	0.05	0.45
			2000	1	0.05 (0.08 ± 0.05)	1.00 (0.49 ± 0.35)
Kojic acid	2000	5	2000	1	0.05	1.10
			2000	4	0.20	0.95
			2000	1	0.05	0.70
			2000	1	0.05 (0.09 ± 0.08)	1.40 (1.04 ± 0.29)
陽性対照 DEN	40	5	2000	12	0.60	0.25
			2000	17	0.85	0.60
			2000	12	0.60	0.75
			2000	12	0.60(0.66 ± 0.13) <sup>**</sup>	1.00 (0.65 ± 0.31)

\*\* :  $p \leq 0.01$  (Kastenbaum と Bowman's の表から)

## :  $p \leq 0.01$  (t-test)

表 2 Kojic acid の幼若ラット末梢血を用いた小核試験の結果

試験 1						
処理群	用量 (mg/kg)	投与後 時間	観察 細胞数	MNRET		RET
				出現数	出現頻度 (%) (Mean ± SD)	出現頻度 (%) (Mean ± SD)
陰性対照 (1%CMC)	0	48	4000	1	0.03	11.5
			4000	3	0.08	12.0
			4000	6	0.15	11.7
			4000	2	0.05	11.8
			4000	2	0.05(0.07 ± 0.048)	11.2 (11.6 ± 0.3)
Kojic acid	1000	48	4000	8	0.20	11.2
			4000	6	0.15	12.0
			4000	8	0.20	10.3
			4000	5	0.13	11.6
			4000	5	0.13(0.16 ± 0.038)**	11.1 (11.2 ± 0.6)
Kojic acid	4000	48	4000	17	0.43	11.5
			4000	16	0.40	12.6
			4000	15	0.38	12.2
			4000	13	0.33	10.5
			4000	15	0.38(0.38 ± 0.037)**	11.6 (11.7 ± 0.8)
陽性対照 CP	10	48	4000	37	0.93	9.6
			4000	30	0.75	9.3
			4000	42	1.05	11.2
			4000	41	1.03	11.0
			4000	36	0.90(0.93 ± 0.119)**	10.7 (10.4 ± 0.9)
試験 2						
陰性対照 (1%CMC)	0	48	2000	2	0.10	8.56
			2000	2	0.10	7.01
			2000	4	0.20	9.81
			2000	7	0.35(0.19 ± 0.12)	7.89(8.32 ± 1.18)
Kojic acid	1000	48	2000	4	0.20	6.30
			2000	3	0.15	5.86
			2000	2	0.10	6.80
			2000	3	0.15(0.15 ± 0.04)	5.88 (6.21 ± 0.44)#
Kojic acid	4000	48	2000	13	0.65	7.70
			2000	12	0.60	6.20
			2000	21	1.05	7.35
			2000	10	0.50(0.70 ± 0.24)**	6.94(7.05 ± 0.64)
陽性対照 DEN	40	48	2000	4	0.20	6.52
			2000	4	0.20	8.77
			2000	4	0.20	6.08
			2000	1	0.05(0.16 ± 0.08)	9.20 (7.64 ± 1.57)
陽性対照 CP	10	48	2000	28	1.40	6.58
			2000	31	1.55	6.11
			2000	33	1.65	6.32
			2000	22	1.10(1.43 ± 0.24)**	7.46 (6.62 ± 0.59)#

RET : 網状赤血球, NMRET : 小核をもつ RET

\*\* :  $p \leq 0.01$  (Kastenbaum と Bowman's の表から)

# :  $p \leq 0.01$  (t-test)

表 3 Kojic acid の幼若ラット骨髄を用いた小核試験の結果

処理群	用量 (mg/kg) <sup>a</sup>	投与経路	観察細胞数	MNRET	
				出現数	出現頻度 (%) (Mean ± SD)
陰性対照 (1%CMC)	0	po	2000	4	0.20
			2000	3	0.15
			2000	5	0.25
			2000	2	0.10
			2000	4	0.20(0.18 ± 0.06)
Kojic acid	500	ip	2000	6	0.30
			2000	7	0.35
			2000	4	0.20
			2000	6	0.30
			2000	3	0.15(0.26 ± 0.08)
Kojic acid	1000	ip	2000	15	0.75
			2000	19	0.95
			-	d	-
			2000	20	1.00
			2000	18	0.90(0.90 ± 0.11)**
Kojic acid	2000	ip	-	d	-
			-	d	-
			-	d	-
			-	d	-
			-	d	-
Kojic acid	500	po	2000	3	0.15
			2000	5	0.25
			2000	6	0.30
			2000	5	0.25
			2000	4	0.20(0.23 ± 0.06)
Kojic acid	1000	po	2000	7	0.35
			2000	8	0.40
			2000	13	0.65
			2000	7	0.35
			2000	9	0.45(0.44 ± 0.12)**
Kojic acid	2000	po	2000	21	1.05
			2000	30	1.50
			2000	29	1.45
			2000	23	1.15
			2000	36	1.80(1.39 ± 0.30)**
陽性対照 Mitomycin C	2	ip	2000	70	3.50
			2000	55	2.75
			2000	75	3.75
			2000	96	4.05
			2000	58	2.90(3.39 ± 0.55)**

a : 24 時間間隔で 2 回投与, 最終投与 24 時間後に標本作製

\*\* :  $p \leq 0.01$  (Kastenbaum と Bowman's の表から)

- : 死亡