【原 著】

ガゴメ昆布 (*Kjellmaniella crassifolia*) 由来フコイダンの遺伝毒性試験による安全性の評価

Safety Evaluation of Fucoidan from *Kjellmaniella Crassifolia* in Genotoxicity Tests

大野木宏^{1,*}, 滝本裕子², 鈴木里芳², Jeffry M STRONG², 鈴木信孝²
Hiromu OHNOGI^{1,*}, Yuko TAKIMOTO², Riho SUZUKI²,
Jeffry M STRONG², Nobutaka SUZUKI²

¹ タカラバイオ株式会社

² 金沢大学大学院医学系研究科臨床研究開発補完代替医療学講座

【要 旨】

ガゴメ昆布 (*Kjellmaniella crassifolia*) 由来フコイダンの安全性を評価するために遺伝毒性試験を行った。その結果、微生物を用いた復帰突然変異試験では代謝の有無に関わらず試験に用いた5菌株すべてにおいて陰性であった。細胞を用いた染色体異常試験では代謝の有無に関わらず染色体の構造異常ならびに数的異常は見られず陰性であった。マウスを用いた小核試験では小核出現は見られず、多染色性赤血球の減少もみられず陰性であった。以上の結果から、ガゴメ昆布フコイダンは、遺伝毒性を有さない安全な食品素材であることが示された。

【キーワード】

フコイダン, ガゴメ昆布, 安全性, 遺伝毒性試験

はじめに

ガゴメ昆布 (*Kjellmaniella crassifolia*) は主に北海道の函館近海に生育する褐藻類であり、古くからとろろ昆布や松前漬の材料として食されてきた。褐藻類には硫酸化フコースを構成糖とする多糖成分のフコイダンが含まれており、特にガゴメ昆布は昆布の中でも豊富にフコイダンを含有する。酒井らは、ガゴメ昆布からフコイダンを精製し、さらに海洋性フコイダン資化細菌由来のフコイダン分解酵素を用いてその化学構造を決定した¹⁾。その結果、ガゴメ昆布の主要なフコイダンとして硫酸化フコースのみからなる F-フコイダン、硫酸化フコース以外にウロン酸を含む U-フコイダン、硫酸化ガラクトースと硫酸化フコースからなる G-フコイダンが存在することが明らかとなった。さらに、最近ではガゴメ昆布フコイダンの機能性に関する研究が進められており、抗腫瘍作用、免疫賦活作用、血栓形成抑制作用、インフルエンザ予防作用、育毛作用など多様な働きが報告されている^{2,3)}。

昆布はその長い食経験から安全性が極めて高い食品素材と考えられるが、昆布から抽出したフコイダンの安全性に関する情報は少ない。今回、ガゴメ昆布由来のフコイダンの遺伝毒性試験における安全性を評価するために、復帰突然変異試験と染色体異常試験、小核試験を実施した。

受理日: 2011年6月3日

* 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社 Tel: 077-543-7201 Fax: 077-543-7238

E-mail: onogih@takara-bio.co.jp

材料と方法

1. 被験物質

ガゴメ昆布フコイダンは TaKaRa コンブフコイダン (タカラバイオ社製) を用いた。ガゴメ昆布フコイダンは乾燥ガゴメ昆布破砕物を原料に、塩化カルシウム存在下で熱水抽出を行い、限外濾過により低分子成分を除いた後、濃縮・殺菌・凍結乾燥を行い粉末化した。調製した TaKaRa コンブフコイダンの主要成分含量の分析結果は、フコース (38.6%)、硫酸基 (30.6%)、ウロン酸 (4.7%)、カルシウム (4.3%)、水分 (2.4%) であった。

2. 細菌を用いた復帰突然変異試験

被験物質の変異原性を Ames 試験法により評価した⁴⁾。試験菌株は日本バイオアッセイ研究センターより分与されたネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 株および大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を使用した。被験物質は用時、注射用蒸留水 (局方、扶桑薬品工業社製) に溶解し段階希釈してそれぞれ試験に供した。試験の陰性対照物質は注射用蒸留水を、陽性対照物質は AF-2 (2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 和光純薬工業社製), SA (Sodium azide, 和光純薬工業社製), 9-AA (9-Aminoacridine, SIGMA-ALDRICH 社製), 2-AA (2-Aminoanthracene, 和光純薬工業社製) を用い、AF-2, 9-AA, 2-AA には DMSO (和光純薬工業社製) を、SA には注射用蒸留水を溶媒に使用した。試験はプレインキュベーション法で実施し、培養系列として代謝活性化によらない場合と代謝活性化による場合の 2 系列とした。試験物質 (被験物質, 陰性対照物質, 陽性対照物質) の溶液 0.1 ml, 0.1 M Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4, 代謝活性化によらない場合) あるいは S9mix (代謝活性化による場合, S9 はキッコーマン社製) 0.5 ml を混合後、菌懸濁液 0.1 ml を加え 37°C で 20 分間振とうした。その後、トップアガー (ネズミチフス菌の場合 L-ヒスチジン, 大腸菌の場合 L-トリプトファンを含む) 2 ml を加えて攪拌し、最小グルコース寒天平面培地に重層して固めた。なお、陰性対照群には 3 枚、その他は 2 枚のプレートをそれぞれ使用した。続いて 37°C で 48 時間培養後、各プレートに発生した復帰変異コロニー数を計測 (被験物質, 陰性対照物質はマニュアル計測, 陽性対照物質はコロニーカウンターによる計測) を行った。計測の際は同時に実態顕微鏡を用いてバックグラウンドローンから被験物質に対する菌の生育阻害の有無および被験物質の沈殿の状態について確認した。以上の試験は株式会社実医研で実施された。

3. ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

チャイニーズハムスター雌肺由来 CHL/IU 細胞を用いて、短時間処理法の代謝活性化によらない場合 (-S9mix) とよる場合 (+S9mix) 及び連続処理法の 3 系列により染色体異常試験を行った。細胞は大日本製薬社より購入し、培地は 10% 仔牛血清 (GIBCO 社製) を含むイーグル MEM (日水製薬社製) を用いた。

被験物質は用時、培地に溶解し段階希釈してそれぞれ試験に供した。試験の陰性対照物質は培地を、陽性対照物質は、代謝活性化によらない場合は MMS (Methylmethanesulfonate, SIGMA-ALDRICH 社製) を、代謝活性化による場合は DMN (Dimethylnitrosamine, 和光純薬工業社製) を用い、生理食塩液 (局方、大塚製薬工場社製) に溶解して培養液の 1/100 容を添加した。培地 5 ml を入れたシャーレに 2×10^4 個の細胞を播種した。3 日間培養後、培地を除去し、短時間処理法においては、試験物質 (被験物質, 陰性対照物質, 陽性対照物質) の溶液 2.5 ml に培地 (代謝活性化によらない場合) あるいは S9mix (代謝活性化による場合, S9 はオリエンタル酵母工業社製) 0.5 ml をそれぞれ加え、細胞を 6 時間培養後、細胞を生理食塩水で洗浄し新鮮な培地 5 ml を加え、更に 19 時間培養した。連続処理法においては、試験物質の溶液 5 ml をシャーレに入れ、細胞を連続で処理培養した。標本作製は各群 2 枚のシャーレを用い、air-dry 法で行った。培養終了後約 2 時間前にコルセミド (最終濃度 0.2 µg/ml, GIBCO 社製) を各群 2 枚のシャーレに添加して、分裂期の細胞を蓄積した。培養終了時に細胞を回収しカルノア固定液で細胞を固定後、スライドガラス上に滴下し空気乾燥させた。1.5% ギムザ (MERCK 社製) 懸濁液で細胞を染色し、顕微鏡下で染色体構造異常及び数的異常を観察した。構造異常については、染色分体型切断、染色分体型交換、染色体型切断、染色体型交換、その他を検鏡下で観察した。以上の試験は株式会社富士バイオメディックスで実施された。

4. 動物を用いた小核試験

マウスを用いて骨髄における小核試験を行った。マウスは 7 週齢 ICR 雄マウス (日本チャールズ・リバー社製) を 1 週間馴化させたものを用いた。マウスはホワイトフレック (日本チャールズ・リバー社製) を床敷として入れたプラスチック製ゲージで個別飼育し、22°C、相対湿度 50%、照明時間 6~18 時の飼育室で、オートクレーブ滅菌した固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業社製) と紫外線照射した水道水を自由摂取させた。

被験物質は用時、注射用蒸留水に溶解し段階希釈してそれぞれ試験に供した。試験の陰性対照物質は注射用蒸

留水を、陽性対照物質は MMC (Mitomycin C, SIGMA-ALDRICH 社製) を注射用蒸留水に溶解して用いた。マウスは各群 6 匹を用いた。被験物質、陰性対照物質は 24 時間間隔で 2 回マウスに強制経口投与した。陽性対照物質は 1 回腹腔内投与によりマウスに投与した。投与液量はいずれも 10 ml/kg とした。最終投与後 24 時間にマウスから大腿骨を摘出し、骨髓細胞を回収した。スライドガラス上に細胞懸濁液を塗抹し室温で乾燥させた後、メタノールで固定した。3% ギムザ懸濁液で細胞を染色し、顕微鏡下で観察し 1 個体あたり 2000 個の多染性赤血球 (PCE: polychromatic erythrocytes) における小核 (mn-PCE: micronucleated PCE) の出現率ならびに 1 個体あたり 1000 個の全赤血球 (RBC: red blood cell erythrocytes) に対する多染性赤血球の比率を求めた。以上の試験は株式会社富士バイオメディックスで実施された。

結 果

1. 復帰突然変異試験

被験物質の変異原性を評価した結果を表 1 に示す。いずれの試験菌株でも 5000 µg/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500, 1250, 625, 312.5 µg/プレートの計 5 用量で試験した。各試験菌株の被験物質群の復帰突然変異コロニー数は代謝活性化の有無に関わらず、陰性対照群の 2 倍以上の増加を認めなかった。また、生育阻害およ

び被験物質の沈殿は認められなかった。一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数はいずれも陰性対照群と比較して顕著な増加が認められた。

2. 染色体異常試験

被験物質の染色体異常試験の結果を表 2 に示す。被験物質は 5 mg/ml を最高用量に以下公比 2 で 2.5, 1.2, 0.625 mg/ml の計 4 用量で試験した。染色体の観察用量は被験物質で処理された用量のうち、細胞増殖抑制がなくかつ中期分裂像が確認できる用量の高い順に 3 用量を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化による場合およびよらない場合では 5, 2.5, 1.25 mg/ml の 3 用量を観察領域とした。また、長時間処理法では、5 mg/ml の用量において細胞増殖抑制はないが中期分裂像が十分に観察できなかったため、2.5, 1.25, 0.625 mg/ml の 3 用量を観察領域とした。短時間処理法の -S9mix における構造異常の頻度は、陰性対照が 2.0%, 1.25 mg/ml が 1.5%, 2.5 mg/ml が 1.5%, 5 mg/ml が 1.0% を示し、いずれも陰性対照レベルであった。短時間処理法の +S9mix における構造異常の頻度は、陰性対照が 1.0%, 1.25 mg/ml が 1.0%, 2.5 mg/ml が 0%, 5 mg/ml が 0% を示し、いずれも陰性対照レベルであった。長時間処理法の構造異常の頻度は、陰性対照が 1.0%, 0.625 mg/ml が 0.5%, 1.25 mg/ml が 0.5%, 2.5 mg/ml が 0.5% を示し、いずれも陰性対照レベルであった。また、染色体の数的異常については、

表 1 細菌を用いた復帰突然変異試験

代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
-S9 mix	陰性対照	137	10	29	26	9
	312.5	136	15	27	30	10
	625	146	12	36	27	7
	1250	150	13	27	27	10
	2500	149	12	33	31	9
	5000	142	11	31	24	10
+S9 mix	陰性対照	149	16	38	43	13
	312.5	150	16	35	42	15
	625	154	20	30	35	16
	1250	152	15	35	37	15
	2500	145	18	40	38	16
	5000	149	18	31	34	18
陽性対照	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	-S9 mix 濃度 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	-S9 mix コロニー数/プレート	543	463	263	505	604
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	+S9 mix 濃度 (µg/プレート)	1	2	10	0.5	2
	+S9 mix コロニー数/プレート	961	261	1076	528	251

表2 は乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

処理系列	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体の構造異常		染色体の数的異常	
		観察細胞数	異常頻度 (%)	観察細胞数	異常頻度 (%)
短時間処理法	陰性対照	100	2.0	100	0
	1.25	100	1.5	100	0
	-S9 mix 2.5	100	1.5	100	0
	5	100	1.0	100	0
	陽性対照 MMS 0.04 mg/ml	100	69.0**	100	0
	陰性対照	100	1.0	100	0
	1.25	100	1.0	100	0
	+S9 mix 2.5	100	0	100	0
	5	100	0	100	0
	陽性対照 DMN 0.8 mg/ml	100	64.0**	100	0
長時間処理法	陰性対照	100	1.0	100	0
	0.625	100	0.5	100	0
	1.25	100	0.5	100	0
	2.5	100	0.5	100	0
	陽性対照 MMS 0.02 mg/ml	100	69.5**	100	0

**p<0.01: Fisher exact test で陰性対照との間に有意差あり

表3 動物を用いた小核試験

被験物質の用量 (mg/kg)	mn-PCE/2000PCE	PCE/1000RBC
陰性対照	0.09±0.04	54.1±4.8
500	0.08±0.05	54.0±3.3
1,000	0.10±0.04	53.6±3.0
2,000	0.10±0.08	53.0±3.7
陽性対照 MMC 4 mg/kg	5.29±0.32**	44.8±2.8 [‡]

** p<0.01: Kastenbaum and Bowman method で陰性対照との間に有意差あり

[‡] p<0.01: Dunnett's test で陰性対照との間に有意差あり

陰性対照も含めて全ての群において 0%を示した。一方、陽性対照では、各処理系列において 64.0～69.5%の構造異常細胞の出現を観察し、陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

3. 小核試験

被験物質は 2000 mg/kg を最高用量に以下、公比 2 で 1000 及び 500 mg/kg を設定した。全ての群において死亡例、一般観察における異常は認められなかった。また、体重においては、被験物質のいずれの用量群ならびに陽性対照群ともに陰性対照群に比較して統計学的に有意な差は認められなかった。骨髓塗抹標本観察の結果を表 3 に示す。小核出現率では、陰性対照群の 0.09±0.04% に対し、被験物質の 500, 1000 及び 2000 mg/kg 投与群でそれぞれ 0.08±0.05, 0.10±0.04 及び 0.10±0.08%を示し、投与量に依存した増加は認められなかった。一方、陽性対照群では小核出現率は 5.29±0.32%を示し、陰性対照群と比較して有意な増加が認められた。多染性赤血球比率

は、陰性対照群の 54.1±4.8% に対し、被験物質の 500, 1000 及び 2000 mg/kg 投与群でそれぞれ 54.0±3.3, 53.6±3.0 及び 53.0±3.7%を示し、陰性対照と比較して差は認められなかった。一方、陽性対照群では多染性赤血球比率は 44.8±2.8%を示し、陰性対照と比較して有意な減少が認められた。

考 察

ガゴメ昆布フコイダンの安全性を復帰突然変異試験、染色体試験、小核試験によって評価した。復帰突然変異試験の結果、ネズミチフス菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株および大腸菌 WP2uvrA 株の全てにおいて、被験物質群の復帰変異コロニー数は代謝の有無に限らず陰性対照群の 2 倍以上の増加を認めなかった。従って、ガゴメ昆布フコイダンは塩基置換型、フレームシフト型いずれの変異も誘発しないと考えられた。染色体異常試験では、短時間処理法 (-/+S9mix) 及び連続処理法において被験物質群の 3 用量とも構造異常及び数的異常の頻度は陰性対照群と比べ有意な差は認められなかった。従って、ガゴメ昆布フコイダンは CHL/IU 細胞の染色体に異常を誘発しないものと考えられた。小核試験では、被験物質の用量に応じた小核出現率の増加は認められなかったことからガゴメ昆布フコイダンは小核誘発性はないと考えられた。また、被験物質群において多染性赤血球比率の減少は認められなかったことから、ガゴメ昆布フコイダンは骨髓細胞増殖抑制を誘発しないと考えられた。

フコイダンは昆布やワカメ、モズクなどの褐藻類に含

まれる多糖成分であり、熱水により容易に抽出される。われわれ日本人は長年、海藻をそのままの形やダシの形で食している。したがって、フコイダン自体はその食経験からも安全性が極めて高い食品成分といえる。Kimらはワカメメカブ由来のフコイダンについて遺伝毒性試験を実施し、復帰突然変異試験、染色体試験、小核試験において問題がないことを報告している⁵⁾。今回の遺伝毒性試験においてガゴメ昆布フコイダンは全て陰性の結果であったことにより、ヒトに対して安全性が高い食品素材であると考えられた。

結 論

ガゴメ昆布フコイダンの遺伝毒性試験を行った。その結果、復帰突然変異試験、染色体異常試験、小核試験の

いずれにおいても陰性であり、ガゴメ昆布フコイダンの安全性が示された。

参 考 文 献

- 1) 酒井 武, 加藤郁之進. 海藻由来フコイダンとそのオリゴ糖の構造と生物活性. バイオサイエンスとインダストリー. 2008; 60: 23–26.
- 2) 水谷滋利, 廣田有花, 出口寿々ら. ガゴメ昆布フコイダンの機能性. New Food Industry. 2008; 50: 22–34.
- 3) 水谷滋利. ガゴメ昆布 (*Kjellmaniella crassifolia*) フコイダンの免疫活性化作用. Food Style 21. 2010; 14: 29–31.
- 4) Yahagi T, Nagao M, Seino M, et al. Mutagenesis of *N*-nitrosamines of Salmonella. Mutat Res 1997; 48: 121–130.
- 5) Kim KJ, Lee OH, Lee BY. Genotoxicity study of fucoidan from *Sporophyll* of *Undaria pinnatifida*. Food Chem Toxicol 2010; 48: 1101–1104.

ABSTRACT

Safety Evaluation of Fucoidan from *Kjellmaniella Crassifolia* in Genotoxicity Tests

Hiromu OHNOGI¹, Yuko TAKIMOTO², Riho SUZUKI²,
Jeffrey M STRONG², Nobutaka SUZUKI²

¹ TAKARA BIO INC.

² Department of Complementary and Alternative Medicine Clinical Research and Development,
Kanazawa University Graduate School of Medical Science

We evaluated the safety of fucoidan from Gagome Kombu (GKF) in genotoxicity tests. In bacterial reverse mutation test, GKF had no reverse mutation inducing activity on five bacterial strains with or without S9 metabolic activation. In chromosome aberration test, GKF had neither structural nor numerical chromosome aberration inducibility with or without S9 metabolic activation. In micronucleus test, neither formation of micronuclei nor decrease of micronucleated reticulocytes was observed in the bone marrow of the mice treated by GKF. These results indicate that GKF has no genotoxic activities under the condition of this study.

Key words: fucoidan, Gagome kombu, safety, genotoxicity test