

【原 著】

ハトムギ熱水抽出物の変異原性試験

—復帰変異試験, マウスリンフォーマ試験 (MLA), マウス小核試験—

Mutagenicity Test for Hot Water Extract of *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf

—Reverse Mutation Test, Mouse Lymphoma Assay (MLA) and Mouse Micronucleus Test

林 浩孝^{1,2,*}, 石橋範人³, 太田真弓³, 新井隆成⁴, 重田優子², Jeffrey M STRONG²,
太田富久⁵, 鈴木信孝²

Hiroataka HAYASHI^{1,2,*}, Norihito ISHIBASHI³, Mayumi OHTA³, Takanari ARAI⁴,
Yuko SHIGETA², Jeffrey M STRONG², Tomihisa OHTA⁵, Nobutaka SUZUKI²

¹ 金沢大学イノベーション創成センター

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

³ バイオセラピー開発研究センター

⁴ 金沢大学大学院医学系研究科周生期医療専門医養成学講座

⁵ 金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻創薬科学講座

【要 旨】

ハトムギ (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) は伝統薬として長年用いられ, 抗腫瘍, 抗肥満, 抗糖尿などの機能をもつことが知られている. ハトムギの子実, 渋皮, 薄皮, 外殻の全ての部分の熱水抽出物の変異原性について検討するために, 細菌を用いた復帰変異試験, マウスリンフォーマ試験およびマウス小核試験を実施した. その結果, いずれの試験においても陰性の結果が得られ, 被験食は生体に対し, 変異原性を有する可能性はないと考えられた.

【キーワード】

ハトムギ, 熱水抽出物, 復帰変異試験, マウスリンフォーマ試験, 小核試験

はじめに

ハトムギは伝統的に中国や日本で古くから利用され, 抗腫瘍¹⁻³⁾, 抗肥満^{4,5)}, 抗糖尿⁶⁾ など様々な機能をもつことが報告されている. 本試験においてはハトムギの種子・渋皮・薄皮・外殻のすべての部分を含む熱水抽出物の変異原性の有無について, 細菌を用いた復帰変異試験, マウスリンフォーマ試験 (Mouse Lymphoma Assay: MLA) およびマウス小核試験を実施したので報告する.

材料および方法

1. 被験食

被験エキスはハトムギの子実, 渋皮, 薄皮, 外殻の全ての部分の既報告製法による熱水抽出物⁷⁾ (株式会社 CRD 製) を使用した.

受理日: 2009年9月1日

* 〒920-8640 石川県金沢市宝町 13-1 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

Tel: 076-265-2147 Fax: 076-234-4247 E-mail: pcam@med.kanazawa-u.ac.jp

2. 復帰変異試験 (Ames test)

試験菌株として、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 および大腸菌 WP2uvrA (日本バイオアッセイ研究センター) が用いられた。試験は矢作らの方法⁸⁾に従い、プレインキュベーション法で行なわれた。すなわち、被験食溶液 0.1 ml を代謝活性化処理の場合は、0.5 ml の S9mix (キッコーマン株式会社) あるいは 0.1 M Na-リン酸緩衝液 0.5 ml に調合し、菌懸濁液 0.1 ml を加え、37°C で 20 分間振盪した後、軟寒天 (ネズミチフス菌には L-ヒスチジン、大腸菌には L-トリプトファンを含むもの) を 2 ml 添加し、Vogel Bonner 最少グルコース寒天平板培地に重層し、37°C で 48 時間培養した。菌の background lawn 条件は実体顕微鏡によって評価され、出現した突然変異コロニーは肉眼で、復帰突然変異株はコロニーアナライザーで評価された。なお、以上の試験は、株式会社ユービーイー科学分析センターに委託・実施された。

3. マウスリンフォーマ試験 (MLA)

染色体異常試験の代替として、MLA を行った。マウス由来リンパ腫細胞 L517Y *tk*^{+/−}3.7.2c (ヒューマンサイエンス研究資源バンク製) は RPMI1640 培地 (日本製薬社製) に非働化 (56°C, 30 分) した 10% ウマ血清 (Invitrogen 社製) と 0.5% ペニシリン-ストレプトマイシン (ペニシリン 10,000 単位/ml, ストレプトマイシン 10,000 μg/ml) (Invitrogen 社製) を添加した培養液 (以下 RPMI-10 とする) 中で 37°C, CO₂ 濃度 5% の条件で培養した。

陽性対象として methyl methanesulfonate (MMS; Sigma-Aldrich 社製) を用い、突然変異検出用選択培地には trifluorothymidine (TFT; 和光純薬社製) を 3 μg/ml になるように添加した。

実験は、3 時間の短時間処理と 24 時間の長時間処理を行った。

(1) 短時間処理については RPMI-10 で 1.0×10^6 cells/ml とした細胞懸濁液 10 ml に RPMI-0 で調整した被験食溶液を 10 ml 加え、50 ml 遠沈管で 37°C, 3 時間振盪培養した。培養後培地を除去し、PBS で洗浄した。RPMI-10 で 2.0×10^6 cells/ml に調製し、一部を細胞毒性検出プレート (PE0) として、96 マイクロプレートに RPMI-20 で 1.6 cells/well で播種し、10~14 日間培養した。残りから 10 ml をフラスコに移し、 1.2×10^6 cells/ml を越さないように継代しながら 45~48 時間培養した。フラスコでの培養後、RPMI-20 で 10^6 cells/well (PE2), 変異原性検出プレートとして RPMI-20 に TFT 3 μg/ml になるように添加した選択培地で 2,000 cells/well (MF) 播種し、10~14 日間 (MF; 12 日間) 培養した。

(2) 長時間処理については、RPMI-10 で 1.0×10^6 cells/ml とした細胞懸濁液 2 ml と RPMI-10 で調製した被験食溶液を 5 ml, RPMI-10 を 2 ml を加え、フラスコで 37°C, 24 時間静置培養した。培養後は上記 (1) と同様の操作を行った。

(3) 突然変異度の解析

コロニーを含む well 数を計測し、以下に示すポアソン分布の式に従ってコロニー形成 (PE) および突然変異頻度 (MF) を算出した。なお、MF に関しては、コロニーのサイズで分類 (Large/Small) して計測し、T-MF, L-MF, S-MF をそれぞれ算出した。

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{N} \quad MF = \frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE2}$$

EW: コロニーを含まない well 数, TW: 総 well 数, N: well 当たりの平均播種細胞数

4. In vivo 小核試験

(1) 実験動物

9 週齢 ICR 雄マウス (日本チャールス・リバー社製) を 1 週間順化させ、健康なものを 10 週齢で使用した。オートクレーブで滅菌したホワイトクレーク (日本チャールス・リバー社製) を入れた樹脂製ケージに 5 匹ずつ収容し、設定温度 24°C, 明暗サイクル 12 時間の飼育室で固形飼料 CRF-1 (日本チャールス・リバー社製) と水道水を自由摂取で飼育した。

(2) 被験食投与量

陰性対照群として蒸留水を投与し、被験食 500 mg/kg 投与群, 1,000 mg/kg 投与群, 2,000 mg/kg 投与群, および陽性対照群としてシクロホスファミドを 100 mg/kg を投与した。各群の個体数はそれぞれ 5 匹とし、群分けは無作為に行った。

(3) 検体の調製および投与

被験食の所要量を正確に測定し、蒸留水に溶解した。検体をマウス体重 kg あたり 10 ml 投与した。胃ゾンデを用いて 24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。陰性対照群には蒸留水を上記と同様の方法で投与した。陽性対照群には採血の 24 時間前にシクロホスファミドを 1 回投与した。

(4) 採血および染色

最終投与の 24 時間後にエーテル麻酔下で心臓から全身血を採取した。その際抗凝固剤としてヘパリンを使用した。血液の染色には小核検出キットである gTOX Flow (ベックマン・コールター社製) を用いた。

(5) 多染性赤血球および小核含有多染性赤血球の計数

BD FACSCalibur フローサイトメーター (日本ペクト

表 1 被験食のネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 および大腸菌 WP2*uvrA* を用いた復帰変異試験

代謝活性化系の有無	ハトムギ熱水抽出物の用量 (μg /プレート)	塩基対置換型 (コロニー数/プレート)			フレームシフト型 (コロニー数/プレート)		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
-S9 mix	陰性対照	68	10	22	13	6	
	156	84	6	21	7	5	
	313	71	7	28	13	6	
	625	93	4	25	16	7	
	1250	88	4	20	11	3	
	2500	95	7	17	14	8	
	5000	89	8	26	15	9	
+S9 mix	陰性対照	92	8	28	17	13	
	156	87	5	29	23	8	
	313	91	6	27	24	5	
	625	117	10	36	22	10	
	1250	90	7	28	21	9	
	2500	94	4	33	23	10	
	5000	91	7	35	19	8	
陽性対照	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9-AA	
	S9 mix を必要としないもの	用量 (μg /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		コロニー数/プレート	610	335	160	549	201
	S9 mix を必要とするもの	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		用量 (μg /プレート)	1.0	2.0	10	0.5	2.0
		コロニー数/プレート	1207	359	1087	484	149

1) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2) NaN₃: Sodiumazide, 3) 9-AA: 9-Aminoacride, 4) 2-AA: 2-Aminoanthracene

表 2-1 被験食 3 時間連続処理後のマウス由来リンパ腫細胞 L517Y *tk*^{+/+}-3.7.2c の突然変異分析結果

ハトムギ濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	細胞生存率 (%) (PE0)	突然変異の頻度 ($\times 10^{-6}$) (T-MF)	染色体異常を示唆する突然変異の頻度 ($\times 10^{-6}$) (S-MF)
0 (陰性 control)	100	170.2	23.0
625	77.7	159.3	10.2
1250	101.1	199.1	25.7
2500	104.3	178.2	16.0
5000	75.6	208.6	37.1
MMS (陽性 control)	69.4	472.2	162.1* ¹

MMS; methyl methanesulfonate, *¹ 有意差あり p<0.0001

表 2-2 被験食 24 時間連続処理後のマウス由来リンパ腫細胞 L517Y *tk*^{+/+}-3.7.2c の突然変異分析結果

ハトムギ濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	細胞生存率 (%) (PE0)	突然変異の頻度 ($\times 10^{-6}$) (T-MF)	染色体異常を示唆する突然変異の頻度 ($\times 10^{-6}$) (S-MF)
0 (陰性 control)	100	157.6	18.6
625	95.4	115.2	15.4
1250	92.5	171.7	21.4
2500	98.4	133.3	37.9
5000	140.3	161.5	15.7
MMS (陽性 control)	50.5	861.3	401.8* ¹

MMS; methyl methanesulfonate, *¹ 有意差あり p<0.0001

ン・ディッキンソン社製) を使用して, 多染性赤血球および小核含有多染性赤血球の計数を下記の通りに実施した. すなわち, FSC および SSC により赤血球集団をゲートし, CD71 抗体および Propidium Iodide により正染性赤血球と多染性赤血球および小核含有多染性赤血球に分離した. そして, 多染性赤血球に占める小核含有多染性赤血球の割合 (以下, 小核出現頻度) を算出した. また,

被験物質が標的細胞を曝露した証拠を得るために, 細胞毒性の指標として赤血球に占める多染性赤血球の割合を算出した. 赤血球の計数は1個体あたりの多染性赤血球数が2,000個以上になるように行った.

(6) 有意差検定

小核出現頻度について陰性対照に対する t 検定を実施し, 片側検定で有意確率が 0.025 以下の場合を有意差あ

表3 被験食経口投与後のマウス末梢血の多染性赤血球の割合と小核含有多染性赤血球の出現頻度

Group	Animal No.	Cell Counts		MNPCE	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/PCE	p-value FOR MNPCE***	
		PCE	NCE****					
Negative control	1	3155	105106	10	2.91%	0.32%		
	2	3103	148060	7	2.05%	0.23%		
	3	3088	114443	4	2.63%	0.13%		
	4	3202	98686	4	3.14%	0.12%		
	5	2854	155587	4	1.80%	0.14%		
	Mean					2.51%	0.19%	
	SE					0.23%	0.03%	
Test (500 mg/kg)	1	3300	393961	5	0.83%	0.15%		
	2	2826	129606	6	2.13%	0.21%		
	3	2668	168003	4	1.56%	0.15%		
	4	3979	115275	5	3.34%	0.13%		
	5	2327	168856	8	1.36%	0.34%		
	Mean					1.84%	0.20%	0.4347
	SE					0.38%	0.04%	
Test (1000 mg/kg)	1	2881	141272	5	2.00%	0.17%		
	2	4414	112599	3	3.77%	0.07%		
	3	2397	173106	1	1.37%	0.04%		
	4	2298	120773	3	1.87%	0.13%		
	5	2859	114696	5	2.43%	0.17%		
	Mean					2.29%	0.12%	*
	SE					0.37%	0.02%	
Test (2000 mg/kg)	1	2619	69843	3	3.61%	0.11%		
	2	2941	348188	5	0.84%	0.17%		
	3	3624	100807	3	3.47%	0.08%		
	4	3251	106675	4	2.96%	0.12%		
	5	2659	109137	5	2.38%	0.19%		
	Mean					2.65%	0.14%	*
	SE					0.45%	0.02%	
Positive control**	1	2717	130511	63	2.04%	2.32%		
	2	2332	123121	57	1.86%	2.44%		
	3	3864	237556	75	1.60%	1.94%		
	4	3947	261083	55	1.49%	1.39%		
	5	2448	82216	43	2.89%	1.76%		
	Mean					1.98%	1.97%	0.0003
	SE					0.22%	0.17%	

* 被験食含有投与群の平均値は陰性対照より低いか, もしくは等しかったので t 検定実施せず

** Cyclophosphamide は陽性対照として 100 mg/kg 経口投与

*** 検定の結果 P Value が 0.025 よりも低いもしくは等しい場合に有意差ありとした

**** PCE: polychromatic erythrocyte (多染性赤血球), NCE: normochromatic erythrocyte (正染性赤血球), MPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte (小核含有多染性赤血球)

りとした。なお、小核出現頻度が陰性対照よりも低かった場合は検定を実施しなかった。

赤血球に占める多染性赤血球の割合について陰性対照に対するt検定を実施し、片側検定で有意確率が0.025以下の場合を有意差ありとした。なお、赤血球に占める多染性赤血球の割合が陰性対照よりも大きかった場合は検定を実施しなかった。

統計処理にはKaleidaGraphを使用し、両側検定の有意確率を半分にした値を片側検定の有意確率とした。

結 果

1. 復帰変異試験 (表 1)

被験食について、ネズミチフス菌 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および大腸菌 WP2uvrA を使用して変異原性試験を実施した結果、陽性判定の基準となる復帰変異コロニー数の最高値が陰性対照値の2倍以上に増加しなかったことから、陰性であると判断した。

2. マウスリンフォーマ試験 (MLA) (表 2-1, 表 2-2)

被験食とコントロールの突然変異の頻度を比較したが、短時間処理法・長時間処理法ともに有意な増加はみられなかった。また、染色体異常を示唆する値も有意な増加はみられなかった。

3. In vivo 小核試験 (表 3)

いずれの被験食投与群においても小核出現頻度は陰性対照と比較して有意に高い値ではなかった。また、被験食の投与濃度依存的に小核出現頻度が高くなることもなかった。一方、陽性対照は陰性対照と比較して小核出現頻度が有意に高い値であった。

また、いずれの被験食投与群においても正染性赤血球に占める多染性赤血球の割合が陰性対照と比較して有意に低い値ではなかった。

考察と結論

近年、食の安全性を求める声が急速に上がってきており、今年9月からは消費者庁も新設され、ますます安全性の科学的検証の重要度は増すものと考えられる。今回、ハトムギの子実、渋皮、薄皮、外殻の全ての部分の熱水抽出物の変異原性について検討するために、細菌を用いた復帰変異試験、マウスリンフォーマ試験およびマウス小核試験を実施したが、いずれの試験においても陰性の結果が得られた。したがって、被験食は生体に対し、変異原性を有する可能性はないと考えられた。

参 考 文 献

- 1) Lee MY, Lin HY, Cheng F, et al. Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) bran. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(6): 1933–1939.
- 2) Yu F, Gao J, Zeng Y, et al. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity. *J Ethnopharmacol* 2008; 26; 119(2): 252–258.
- 3) Woo JH, Li D, Wilsbach K, et al. Coix seed extract, a commonly used treatment for cancer in China, inhibits NFkappaB and protein kinase C signaling. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(12): 2005–2011.
- 4) Son BK, Kim JY, Lee SS. Effect of adlay, buckwheat and barley on lipid metabolism and aorta histopathology in rats fed an obesogenic diet. *Ann Nutr Metab* 2008; 52(3): 181–187.
- 5) Kim SO, Yun SJ, Lee EH. The water extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) exhibits anti-obesity effects through neuroendocrine modulation. *Am J Chin Med* 2007; 35(2): 297–308.
- 6) Yeh PH, Chiang W, Chiang MT. Effects of dehulled adlay on plasma glucose and lipid concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats fed a diet enriched in cholesterol. *Int J Vitam Nutr Res* 2006; 76(5): 299–305.
- 7) Hayashi H, Ohta Y, Arai T, et al. Acute oral toxicity test of hot water extract of *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf in Rats. *JJCAM* 2009; 6(2): 105–110.
- 8) 矢作多貴江. 環境中の発がん物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について. 蛋・核・酵. 1975; 20: 1178–1189.

ABSTRACT

Mutagenicity Test for Hot Water Extract of *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf —Reverse Mutation Test, Mouse Lymphoma Assay (MLA) and Mouse Micronucleus Test

Hiroataka HAYASHI^{1,2}, Norihito ISHIBASHI³, Mayumi OHTA³, Takanari ARAI⁴, Yuko SHIGETA²,
Jeffrey M STRONG², Tomihisa OHTA⁵, Nobutaka SUZUKI²

¹ Center for Innovation, Kanazawa University

² Department of Complementary and Alternative Medicine Clinical Research and Development, Kanazawa University

³ Biotherapy Development Research Center Co., Ltd.

⁴ Endowed Center for the Advancement of Pregnancy, Perinatal and Infant Care,
Kanazawa University Graduate School of Medical Science

⁵ Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

Coix lacryma-jobi L. var. *ma-yuen* Stapf is a grass long been used in traditional medicine as a nourishing food and reported to possess pharmacological effects including anti-tumor, anti-obesity, anti-diabetic, etc. In order to evaluate the possible mutagenicity of the hot water extract of all parts (husks, pellicles, and astringent skin) of the food, we performed a reverse mutation test in bacteria, a mouse lymphoma assay and a mouse micronucleus test. The results of all tests were negative. It was concluded that the extract has no mutagenicity for living bodies.

Key words: *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf, hot water extract, reverse mutation test, mouse lymphoma assay test, micronucleus test