

ガルシニアエキスの in vitro 染色体異常試験および in vivo 小核試験

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	大野, 弘美 田村, 英之 山下, 康弘 田村, 幸一 岩倉, 啓子
巻/号	47巻2号
掲載ページ	p. 80-84
発行年月	2006年4月

ノート

ガルシニアエキスの *in vitro* 染色体異常試験および *in vivo* 小核試験

(平成 17 年 10 月 24 日受理)

大野弘美^{*1,†} 田村英之^{*2} 山下康弘^{*2}
田村幸一^{*1} 岩倉啓子^{*2}*In vitro* Chromosome Aberration Test and *in vivo* Micronucleus Test of
Ca-type *Garcinia* ExtractHiromi ONO^{*1,†}, Hideyuki TAMURA^{*2}, Yasuhiro YAMASHITA^{*2},
Kouichi TAMURA^{*1} and Keiko IWAKURA^{*2}(*¹ Food Development Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.: 14, Nishinosho-monguchi-cho, Kisshoin, Minami-ku, Kyoto 601-8550, Japan; *² Toxicology Department, Discovery Research Laboratory, Nippon Shinyaku Co., Ltd.: 14, Nishinosho-monguchi-cho, Kisshoin, Minami-ku, Kyoto 601-8550, Japan; † Corresponding author)

The induction of chromosome aberration of Ca-type *Garcinia cambogia* extract containing about 65% (–)-hydroxycitric acid was investigated by use of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster lung cells (CHL/IU) and the micronucleus test in mice. In the chromosome aberration test, Ca-type *Garcinia cambogia* extract did not increase the number of cells with structural aberration and/or numerical aberrations.

The micronucleus test was carried out with bone marrow cells of Slc: ddY male mice after single oral administration of up to 2,000 µg/kg. There was no significant increase in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes.

These results indicate that Ca-type *Garcinia cambogia* extract does not induce chromosome aberration.

(Received October 24, 2005)

Key words: ガルシニア *Garcinia cambogia*; チャイニーズハムスター肺由来細胞 Chinese hamster lung cell; 染色体異常試験 chromosome aberration test; マウス mouse; 小核試験 micronucleus test

緒言

ガルシニア (*Garcinia cambogia*) は、オトギリソウ科の植物で、その果皮はインドや東南アジアを中心に香辛料として古くから食されている。ガルシニアの果皮には、(–)-hydroxycitric acid (HCA) が豊富に含まれており、HCA は、糖質から脂肪酸を生成する代謝経路上の ATP-クエン酸リアーゼを阻害することが知られている¹⁾。この ATP-クエン酸リアーゼの阻害活性に着目し、ガルシニアの果皮のエキス (ガルシニアエキス) を、ヒトに与えて効果を調べた試験では、体重の減少^{2)~4)} や体脂肪の減少^{3), 5)} が確認されている。また、ガルシニアエキスの摂取により脂肪燃焼速度が増加すること⁶⁾ なども報告されている。これらのことから、ガルシニアエキスは、体脂肪の蓄積を抑

制する機能性食品素材として期待されており、日本や欧米ではさまざまな食品に幅広く用いられている。

ガルシニアエキスの安全性に関しては、これまでにも報告されており、ラットを用いた経口急性毒性試験では 5,000 mg/kg の投与で死亡例は見られず⁷⁾、急性毒性的には安全であるといえる。また、反復投与毒性試験も行われており、阿武ら⁸⁾、齋藤ら⁹⁾ は、ラットへの高用量の混餌反復投与では、精巣に組織学的な病変や精巣重量の低値が認められるとしているが、一方 Shara ら¹⁰⁾ は、同様の試験でガルシニアエキスによる病変は認められなかったと報告している。その他、ヒト¹¹⁾ およびウサギ⁷⁾ では、皮膚刺激性はごく軽度であるとされており、復帰突然変異は陰性であったと報告されている¹¹⁾。

今回、Ca タイプのガルシニアエキスの安全性評価の一環として、新生チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いる染色体異常試験およびマウス骨髓細胞を用いる小核試験により染色体異常誘発性を検討した。な

† 連絡先

*¹ 日本新薬株式会社 食品開発研究所: 〒601-8550 京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14*² 日本新薬株式会社 研究開発本部 創薬研究所 安全性研究部: 〒601-8550 京都市南区吉祥院西ノ庄門口町 14

お、試験の実施にあたっては、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」(平成8年3月22日衛化第29号)および「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(平成11年11月1日 医薬審第1604号、以下遺伝毒性試験ガイドライン)を参考にした。

実験方法

1. 試験物質

Ca タイプのガルシニアエキスは、日本新薬株式会社製ガルシニアパウダーCR (以下GPCR, ロット番号: 041105A068) を使用した。本エキスはガルシニアの果皮のエキスにカルシウムを混入したタイプのエキスである。本エキスは灰褐色粉末で、HCA 65.7%, カルシウム 21.9%, 食塩 0.2% を含有し、室温で24か月以上安定である。

2. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験には、(財)ヒューマンサイエンス振興財団 研究資源バンクより入手した新生チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU 細胞 (Chinese hamster lung cell) を用いた。試験開始にあたり、液体窒素中に凍結保存していた細胞を解凍し、試験期間中3~4日ごとに継代培養して試験に供した。培地には仔牛血清 (GIBCO) を10% 添加した Eagle's MEM 液体培地 (GIBCO) を用い、細胞の培養は炭酸ガス培養器を使用し、炭酸ガス5%+空気95%、温度37°C、加湿条件下で実施した。

試験は、短時間処理法の代謝活性化系の非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系の存在下 (+S9 処理) ならびに連続処理法 (24時間処理) で実施した。+S9 処理は、オリエンタル酵母工業 (株) より購入した S9 分画 [SD 系雄性ラット (日本チャールズリバー (株) 製) に誘導剤として phenobarbital および 5,6-benzoflavone を併用投与して得られた肝ホモジネート 9,000×g 上清分画] に NADP などの補酵素を添加した S9mix を使用した。

試験は、継代培養中の細胞を、PBS(-) 溶液で洗浄した後、0.25% トリプシン溶液を用いてはく離して集め、プラスチックプレート (直径 60 mm) に 2×10^4 細胞を播種し3日間培養した後に、各濃度当たり2枚のプレートを用いて被験物質処理を行った。

GPCR を生理食塩液に懸濁させ、被験物質溶液とした。調製濃度は、被験物質溶液をプレート当たり10% 添加するとき、プレート内での被験物質濃度が処理濃度となるよう調製した。細胞数を指標とした用量設定試験 (細胞増殖抑制試験) の結果、GPCR は、いずれの処理においても、「遺伝毒性試験ガイドライン」で指定されている最高濃度である $5,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで、細胞増殖抑制を示さなかった。なお、処理終了時における被験物質の沈殿が -S9 処理および連続処理法では $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、+S9 処理では $2,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で認められた。以上の結果より、本試験における処理濃度は、被験物質の沈殿が認められる

濃度を基準に、短時間処理法の -S9 処理および連続処理法の場合、125, 250, 500, 1,000, 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に、短時間処理法の +S9 処理の場合、250, 500, 1,000, 2,000, 4,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

短時間処理法では、3日間培養したプレートに、-S9 処理の場合、被験物質溶液を、+S9 処理の場合、S9mix および被験物質溶液を添加し、6時間培養した。PBS(-) 溶液で洗浄し、新しい培地を加えて、さらに18時間培養した後、染色体標本を作製した。陽性対照には、-S9 処理では mitomycin C (MMC, 協和発酵工業 (株) 製) を、+S9 処理では benzo[a]pyrene (B[a]P, 和光純薬工業 (株) 製) を使用した。

連続処理法では、3日間培養したプレートに、被験物質溶液を添加し、24時間培養した後に染色体標本を作製した。陽性対照には、MMC を使用した。

いずれの処理においても、染色体標本作製の約2時間前のプレートにコルセミド溶液を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。コルセミド処理の後、トリプシン処理により細胞を収集した。75 mM 塩化カリウム溶液により低張処理 (37°C, 15分間) をした後、酢酸・メタノール固定液で固定した。少量の酢酸・メタノール固定液で沈渣の細胞を浮遊させ、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し自然乾燥させた後、ギムザ染色液で染色し、観察標本とした。

染色体標本の観察は、1プレート2枚の標本を用い、染色体数 25 ± 2 本の範囲にある細胞と倍数体を観察対象とし、1標本当たり50細胞ずつ (1処理当たり200細胞) 選び、染色体異常 (構造異常および数的異常) の有無について盲検法により行った。染色体の構造異常については、ギャップ、染色分体型および染色体型の切断および交換に分けて調べるとともに断片化は別に調べ、それら以外の細粉化や細長化などは、染色体異常としなかった。ギャップの判定規準は、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。数的異常については、異数性は観察対象とせず倍数性についてのみ観察した。各処理群におけるギャップを除く場合の構造異常を有する細胞の出現数および倍数性異常を有する細胞の出現数を求め、出現率を算出した。各出現数について陰性対照群と被験物質処理群との間で Fisher の直接確率法により検定を行った。なお、有意水準は5%および1%とした。

3. マウス骨髄細胞を用いる小核試験

7週齢の Slc: ddY 系雄マウス (SPF) を日本エスエルシー (株) より購入し、7日間の検疫・馴化を行った後、健康かつ環境に馴化した動物を選択し、1群6匹で試験に供した。動物は、室温 20~26°C、湿度 35~75%、換気回数 15回/時間以上、人工照明 1日12時間を環境条件にした飼育室において、金網ブラケットケージに群別に収容し、水道水および固型飼料を自由に摂取させた。

GPCR は、0.5% methyl cellulose 水溶液 (0.5% MC 水溶液) に懸濁させ、被験物質投与液とした。調製濃度は

被験物質投与液を 20 mL/kg の投与容量で投与するとき、被験物質濃度が投与用量となるよう調製した。

最高投与用量は、「遺伝毒性試験ガイドライン」で指定されている 2,000 mg/kg とし、以下公比 2 で 3 用量設定した。陽性対照には、MMC を用いた。

被験物質投与液を 1 日 1 回 2 日間強制経口投与し、最終投与 24 時間後に生存している動物を炭酸ガス吸入法で安楽死させた後、大腿骨を摘出し、ウシ胎児血清を用いて骨髓細胞を洗い出した。採取した骨髓細胞を遠心分離し、骨髓塗抹標本を作製した。骨髓塗抹標本は、メタノールで固定した後、アクリジン・オレンジ溶液で染色し、標本観察に供した。

標本の観察は盲検法で行い、1 動物につき 2 枚の標本を用い、1 標本当たり全赤血球 500 個中の幼若赤血球 (PCE) および成熟赤血球 (NCE) と PCE 1,000 個中の小核を有する PCE (MNPCE) を数えた。すなわち、1 動物当たり全赤血球 1,000 個中の PCE と PCE 2,000 個中の MNPCE を数えた。標本の観察結果については、各動物ごとに、全赤血球 (PCE+NCE) 中の PCE の比率 (PCE%) および PCE 中の MNPCE の比率 (MNPCE%) を求めた後、群ごとに集計し、平均値および標準偏差を求めた。PCE% については、陰性対照群 (0.5% MC 水溶液) と各被験物質投与群の 2 群間で等分散の検定を行った後、分散が等しい場合には Student の *t* 検定を、分散が等しくない場合は Welch の検定を行った。有意水準は等分散の検定で両側 5% とし、Student の *t* 検定および Welch の検定で片側 1% とした。MNPCE% については、陰性対照群 (0.5% MC 水溶液) と各被験物質投与群の 2 群間で条件付 2 項検定 (Kastenbaum and Bowman による検定¹²⁾)

を用いて検定を行った。

結果および考察

1. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

短時間処理法による結果を Table 1 に示した。

陰性対照における構造異常を有する細胞の出現率は、-S9 処理および +S9 処理ともに 1.0% であった。また、倍数性異常を有する細胞の出現率は、-S9 処理および +S9 処理ともに 0.0% であった。陽性対照の MMC および B[a]P を処理した細胞では、染色分体型の切断および交換の異常が多数観察され、その出現率は 65.5% および 35.0% と陰性対照と比べて顕著な増加を示した。

GPCR を処理した細胞では、構造異常を有する細胞の出現率が、-S9 処理で 0.5~1.0%、+S9 処理で 0.0~1.5% となり、陰性対照と比較して有意な増加を示さなかった。また、倍数性異常を有する細胞の出現率は、-S9 処理および +S9 処理ともに 0.0% であり、陰性対照と比較して有意な増加を示さなかった。

連続処理法による結果を Table 2 に示した。

陰性対照における構造異常を有する細胞の出現率は、1.0% であった。また、倍数性異常を有する細胞の出現率は、0.0% であった。陽性対照の MMC を処理した細胞では、染色分体型の切断および交換の異常が多数観察され、その出現率は 47.0% と陰性対照と比べて顕著な増加を示した。

GPCR を処理した細胞では、構造異常を有する細胞の出現率が、0.0~1.0% となり、陰性対照と比較して有意な増加を示さなかった。また、倍数性異常を有する細胞の出現率は、0.0% であり、陰性対照と比較して有意な増加を

Table 1. Chromosome Aberration Test of Garcinia Powder CR: Short-term Treatment Method

Substance	Dose (μg/mL)	Treatment time (hr)	Recovery time (hr)	S9 mix	Number of analyzed cells	Number of structurally aberrant cells						Total (%) gap	Number of polyploid cells (%)	Cell proliferation rate (%)	
						gap	ctb	cte	csb	cse	frg				
Saline	—	6	—	18	—	200	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	100.0
Garcinia Powder CR	125	6	—	18	—	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	95.5
	250	6	—	18	—	200	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	98.0
	500	P	6	—	18	—	200	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	101.5
	1,000	P	6	—	18	—	200	0	1	1	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	101.9
	2,000	P	6	—	18	—	200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	99.8
MMC	0.1	6	—	18	—	200	0	47	101	0	0	0	131 (65.5)**	0 (0.0)	84.2
Saline	—	6	—	18	+	200	0	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	100.0
Garcinia Powder CR	250	6	—	18	+	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	113.1
	500	6	—	18	+	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0 (0.0)	118.4
	1,000	P	6	—	18	+	200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	109.1
	2,000	P	6	—	18	+	200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	100.4
	4,000	P	6	—	18	+	200	0	1	1	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	107.9
B[a]P	20	6	—	18	+	200	0	20	63	0	0	0	70 (35.0)**	0 (0.0)	72.5

ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; frg, fragmentation;

MMC, mitomycin C; B[a]P, benzo[a]pyrene

Fisher's exact test: Significant difference from control *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

P, precipitation

Table 2. Chromosome Aberration Test of Garcinia Powder CR : Long-term Treatment Method

Substance	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Treat- ment time (hr)	Recov- ery time (hr)	Number of analyzed cells	Number of structurally aberrant cells						Number of polyploid cells (%)	Cell prolifera- tion rate (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse	frg			Total (%) - gap	
Saline	—	24	—	0	200	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	100.0
Garcinia Powder CR	125	24	—	0	200	0	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	102.4
	250	24	—	0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	107.5
	500	P 24	—	0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	113.7
	1,000	P 24	—	0	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	115.9
	2,000	P 24	—	0	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	116.3
MMC	0.05	24	—	0	200	0	30	79	0	0	0	94 (47.0)**	0 (0.0)	89.6

ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; frg, fragmentation; MMC, mitomycin C

Fisher's exact test: Significant difference from control *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

P, precipitation

Table 3. Micronucleus Test of Garcinia Powder CR

Substance	Dose (mg/kg)	Number of animals	Frequency of MNPCE [%] (Mean \pm S.D.)	Range of MNPCE/2000PCE (Min—Max)	Ratio of PCE [%] (Mean \pm S.D.)
0.5% MC	—	6	0.18 \pm 0.08	1— 6	51.8 \pm 1.5
Garcinia Powder CR	500	6	0.21 \pm 0.08	3— 7	50.8 \pm 1.4
	1,000	6	0.18 \pm 0.04	2— 4	51.0 \pm 1.8
	2,000	6	0.15 \pm 0.07	1— 5	50.6 \pm 0.7
MMC	2	6	4.67 \pm 1.48**	56—144	50.4 \pm 1.3

Kasten-Baum: Significant difference from control *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Student's *t*-test: Significant difference from control *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

示さなかった。

以上の結果より、ガルシニアパウダー CR は *in vitro* において染色体異常誘発性を示さないと考えられた。

2. マウス骨髄細胞を用いる小核試験

一般状態観察の結果、いずれの投与群においても、死亡動物および一般状態の異常は認められなかった。

標本観察の結果を Table 3 に示した。陰性対照投与群における MNPCE% は、0.18%、PCE% は 51.8% を示した。また、陽性対照の MMC 投与群における MNPCE% は 4.67%、PCE% は 50.4% を示した。

GPCR 投与群における MNPCE% は、各投与群で 0.15~0.21% を示し、陰性対照と比較して有意な増加を示さなかった。また、GPCR 投与群における PCE% は、各投与群で 50.6~51.0% を示し、陰性対照と比較して有意な減少を示さなかった。

以上の結果より、ガルシニアパウダー CR は *in vivo* において染色体異常誘発性を示さないと考えられた。

また、ガルシニアエキスをラットに対し高用量投与した場合には精巣毒性が認められることが報告されている^{8),9)}が、今回の試験結果から精巣毒性につながるような染色体異常は認められなかった。

ま と め

Ca タイプのガルシニアエキスについて、新生チャイニーズハムスター肺由来細胞を用いる染色体異常試験およ

びマウス骨髄細胞を用いる小核試験により、染色体異常誘発性を検討した結果、Ca タイプのガルシニアエキスは染色体の構造異常および倍数性異常を有する細胞の割合を増加させず、小核誘発性および骨髄増殖抑制作用も示さなかった。

したがって、Ca タイプのガルシニアエキスは染色体異常誘発性を有しないと考えられた。

文 献

- 1) Soni, M. G., Burdock, G. A., Preuss, H. G., Stohs, S. J., Ohia, S. E., Bagchi, D., Safety assessment of (–)-hydroxycitric acid and Super CitriMax, a novel calcium/potassium salt. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 1,513–1,529 (2004).
- 2) Sawada, H., Tomi, H., Tamura, K., Anno, T., Effects of liquid garcinia extract and soluble garcinia powder on body weight change—A possible material for suppressing fat accumulation—. *Oleoscience*, **46**, 1,467–1,474 (1997).
- 3) Anno, T., Oono, H., Tomi, H., Effects of long-term ingestion of jelly drink containing *Garcinia cambogia* extract and partially hydrolyzed guar gum on obesity. *J. Oleo Sci.*, **53**, 197–205 (2004).
- 4) Mattes, R. D., Bormann L., Effects of (–)-hydroxycitric acid on appetitive variables. *Physiol. Behav.*, **71**, 87–94 (2000).
- 5) Hayamizu, K., Ishii, Y., Kaneko, I., Shen, M., Sakaguchi, H., Okuhara, Y., Shigematsu, N., Miyazaki, S., Shima-

- saki, H., Effects of long-term administration of *Garcinia cambogia* extract on visceral fat accumulation in humans: A placebo-controlled double blind trial. *J. Oleo Sci.*, **50**, 805-812 (2001).
- 6) Lim, K., Ryu, S., Nho, H. S., Choi, S. K., Kwon, T., Suh, H., So, J., Tomita, K., Okuhara, Y., Shigematsu, N., (-)-hydroxycitric acid ingestion increases fat utilization during exercise in untrained women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**, 163-167 (2003).
 - 7) Ohia, S. E., Opere, C. A., Leday, A. M., Bagchi, M., Bagchi, D., Stohs, S. J., Safety and mechanism of appetite suppression by a novel hydroxycitric acid extract (HCA-SX). *Mol. Cell. Biochem.*, **238**, 89-103 (2002).
 - 8) Anno, T., Oono, H., Tomi, H., Kishida, K., Ishibashi, S., Iwakura, K., A 26-week repeated dietary dose toxicity study of free-type or ca-type garcinia extract in rats. *JJFC*, **10**, 85-95 (2003).
 - 9) 齋藤衛郎, 清瀬千佳子, いわゆる健康食品及び健康食品素材の健康影響の検討(2)—ガルシニア摂取による精巣毒性発現機序の解明—, 厚生労働科学研究補助費金(食品の安全性高度化推進研究事業) いわゆる健康食品の健康影響と健康被害に関する研究 平成16年度総括. 分担研究報告書, 2005, p. 69-92.
 - 10) Shara, M., Ohia, S. E., Schmidt, R. E., Yasmin, T., Zardetto-Smith, A., Kincaid, A., Bagchi, M., Chatterjee, A., Bagchi, D., Stohs, S. J., Physico-chemical properties of a novel (-)-hydroxycitric acid extract and its effect on body weight, selected organ weights, hepatic lipid peroxidation and DNA fragmentation, hematology and clinical chemistry, and histopathological changes over a period of 90 days. *Mol. Cell. Biochem.*, **260**, 171-186 (2004).
 - 11) Ginanneschi, M., Acciai, M. C., Sertoli, A., Bracci, S., Propolis allergy: Synthesis and patch testing of *gamma*, *gamma*-dimethylallyl caffeic acid ester and its *o*-methyl derivatives. *Contact Derm.*, **21**, 267-269 (1989).
 - 12) Kastenbaum, M. A., Bowman, K. O., Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.*, **9**, 527-549 (1970).