

平成10年度 厚生科学研究費補助金

(生活安全総合研究事業)

食品中の有害物質等の評価に関する研究

研 究 報 告 書

| | | | |
|-------|-----------------|--------|------|
| 主任研究者 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品部 | 合田幸広 |
| 分担研究者 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品部 | 豊田正武 |
| 分担研究者 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品添加物部 | 米谷民雄 |
| 分担研究者 | (財)食品薬品安全センター | 秦野研究所 | |
| | 食品衛生外部精度管理調査事業部 | | 内山貞夫 |

研 究 報 告 書 内 容

総括研究報告書

食品中の有害物質等の評価に関する研究

分担研究報告書

1. 日常食中の汚染物摂取量及び汚染物モニタリング調査研究
2. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究
3. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究
4. 菜種油中のステロール類の検査と評価に関する研究

総括研究報告書

食品中の有害物質等の評価に関する研究

主任研究者 合田幸広

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（総括研究報告書）

食品中の有害物質等の評価に関する研究

主任研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長

研究要旨

本事業は、食品中の有害物質（汚染物質、天然有害物質等）を場所と時間の軸のなかで、詳細に、継続的に、定性・定量的解析を行うことに意義がある。これらのデータは衛生行政の基礎資料となる。本年度は昨年度に引き続き国内食品汚染実態と、日常経口摂取による暴露状態を明らかにするために、汚染モニタリング及びマーケットバスケット方式による汚染物摂取量調査を実施した。更に、好酸球増多筋肉痛症（EMS）に関し 1998 年に公表された研究論文を検索し、その 14 報を化学分析、生体への影響、動物モデルに分けて概説し、現段階でのまとめを演繹した。アフラトキシンの試験法については、多機能固相抽出カラムと HPLC を利用した方法の有用性を評価した。脳卒易発性ラット（SHP-SP）への投与で大豆油に比べ生存期間は短縮すると報告されている菜種油の評価については、原因物質の可能性があるとする植物ステロール類を確認するとともに、26 週間混餌投与したラット（SHR）の心臓及び血管を調べた結果、菜種油は大豆油に比べ 2～3 倍量の植物ステロールが蓄積されていた。一方、菜種油投与による血圧上昇と細胞膜の脆弱化との関連性は低い、含有植物ステロールが細胞膜を脆弱化する可能性があった。

分担研究者

豊田正武・国立医薬品食品衛生研究所食品部長，合田幸広・国立医薬品食品衛生研究所食品部室長，米谷民雄・国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長，内山貞夫・（財）食品薬品安全センター秦野研究所食品衛生外部精度管理調査事業部長

A. 研究目的

食品の安全性及び健全性を確保するために必要な情報は、食品汚染物に関する情報と食品中の天然有害物情報である。食品中の化学物質の継続的なモニタリングとそれらに対する人間の暴露状態即ち日常の経口摂取量の把握とは、化学物質による食品汚染に関するリスクアナリシスの一環として食品衛生行政研究に不可欠な二本柱である。最近特に内分泌攪乱作用を示す環境ホルモンによる食品汚染が大きくクローズア

ップされていることから、そのような化合物も含んだ本研究の実態調査と暴露量調査は極めて重要な意味を持つ。好酸球増多筋肉痛症（EMS）に関し今後の同様な食中毒発生を未然に防止することを目的に、1998 年に公表された研究論文を検索した。アフラトキシンの試験法については、多機能固相カラムと HPLC を利用した方法の有用性を評価した。脳卒中易発性ラットへの投与で大豆油に比べ生存期間が短縮すると報告されている菜種油について、原因物質の

可能性があるとされている植物ステロール類の確認と混餌投与ラットの心臓及び血管中濃度を調べた。

B. 研究方法

1. 日常食の汚染物摂取量及びモニタリング調査研究：1)FAO/WHO 合同食品及び飼料汚染物モニタリング計画に対応して定められた項目について、食品中の含量を調査したデータの全国的な集計処理と保存を行った。更に全国 10 ヶ所で実施したトータルダイエツトスタディーの結果につき我が国のデータを作成した。2)モニタリングデータ収集に際しては誤入力をサーチするチェックプログラムを組み込んだウィンドウズ用 Excel によるデータ収集を実施した。3)トータルダイエツトの3試料を保存し後時代に備えた。

2. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究：主に 1998 年に発表されたトリプトファン、EMS 及び有毒油症 (TOS、toxic oil syndrome)に関する論文を、データベースとして MEDLINE、CA、SCISEARCH を用いて検索し、その 14 報を化学分析、生体への影響、動物モデルに分けて概説した。

3. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究：多機能固相抽出カラムで精製し、分析に蛍光検出 HPLC を利用した方法を検討し、ナッツ類等への応用性を調べた。

4. 菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究：菜種油に含まれる植物ステロールを GC/MS で帰属確認し SIM 法で定量した。菜種油投与ラットの心臓及び血管中の蓄積植物ステロール並びに生体機能の変化を調べた。

C. 研究結果及び考察

1. 日常食の汚染物摂取量及びモニタリン

グ調査研究

国内及び輸入食品汚染物のモニタリング件数は今年度約 19 万件が追加され 1998 年初頭現在 234 万件に上った。これらのデータから食品汚染物の検出レベルの経年変化、全国平均値及び汚染食品の種類、汚染レベル等が明らかとなった。また重金属、農薬等の 1 日摂取量を明らかにした。なお各食品群に関し、ND 値に定量下限値の 1/2 を用いて算出しても、汚染物の摂取量はその ADI を超えることはなかった。

2. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

肥満、不眠、頭痛、セロトニン欠損症への薬効で店頭販売されている 5-OH-Trp 製品及び睡眠障害や時差ボケ症に有効として店頭販売されているメラトニン製品からトリプトファン中不純物類似成分が同定されている。

3. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究

多機能固相抽出カラムと HPLC を利用した方法では、毒性の高い溶媒を使用せずに現行の通知で分析が規定されたナッツ類、米、ソバ等の分析が可能であった。また多くの香辛料ではアフィニティーカラムを組み合わせることで分析が可能となった。

4. 菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究

26 週間混餌投与したラット (SHR) の心臓及び大動脈血管中には、大豆油投与に比べ 2~3 倍量の植物ステロールが蓄積されていた。菜種油及びコレステロール 0.6 % 添加菜種油を投与した SHR-SP ラットでは血圧上昇、アラキドン酸投与による TXA₂ 産生の増大傾向、総及びウアバイン感受性 Na⁺-K⁺ ATPase 活性の高値、摘出大動脈収縮反応の有機名増強が観察された。

D. 結論

1. 日常食の汚染物摂取量及びモニタリング調査研究

全国約63自治研究機関との緊密な協力により行われているモニタリング調査、及び10機関との協力により行われているトータルダイエツトスタディーによる汚染物摂取量調査結果から、我が国における食品汚染のバックグラウンドレベル及び摂取量が明らかとなり、我が国の食生活の安全性を検証できる。

2. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

EMS 発症と関連することが指摘され、不明であった二種不純物の構造が判明した。市販トリプトファン関連商品(5-OH-Trp)中に Peak X と命名された不純物が同定され、EMS 様症状の発生が危惧されている。これら不純物を摂取したヒトの免疫、代謝系影響され EMS の発症に至る考えが大勢を占めるが、現在でも特定の不純物が原因であるとした結論は得られていない。

3. アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究

多機能固相抽出カラムと HPLC を利用したアフラトキシンの分析方法は簡便で、高毒性溶媒を利用せず、従来法とほぼ同等の精度と正確さで分析可能である。今後確認分析法としての多次元検出器及び TLC の利用等細部の検討が必要である。

4. 菜種油中のステロール類の検索と評価に関する研究

菜種油投与による血圧上昇と細胞膜の脆弱化との関連性は低いが、含有植物ステロールが膜の構成を妨害することで膜の機能に影響を与える可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

豊田正武、松田りえ子、五十嵐敦子、齋藤行生：日本における環境汚染物の1日摂取量の推定及びその由来の解析、48(9)、43-65 (1998)

2. 学会発表

なし

分担研究報告書

日常食中の汚染物摂取量
及び汚染物モニタリング調査研究

分担研究者 豊田正武

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担研究報告書）

日常食中の汚染物摂取量及び汚染物モニタリング調査研究

分担研究者 豊田 正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

本事業は、食品中の有害物質－汚染物質、天然有害物質等－を場所と時間の軸のなかで、詳細に、継続的に、定性・定量的解析を行うことに意義がある。これらのデータは衛生行政の基礎資料となる。本年度は昨年度に引き続き国内食品汚染実態と、日常経口摂取による暴露状態を明らかにするために、汚染物モニタリング及びマーケットバスケット方式による汚染物摂取量調査を実施した。別途モニタリングデータ収集法の改良を検討した3地方機関の協力により長期保存用トータルダイエツト試料を入手した。

協力研究者：

酒井洋（新潟県保健環境科学研究所）、市川久次（東京都立衛生研究所）、佐伯政信（千葉県衛生研究所）、臼井進（横浜市衛生研究所）、望月恵美子（山梨県衛生公害研究所）、宮部正樹（名古屋市衛生研究所）、堀伸二郎（大阪府立公衆衛生研究所）、津田泰三（滋賀県衛生環境センター）、田坂美和子（山口県衛生公害研究センター）、西岡千鶴（香川県衛生研究所）、宮里秀樹（沖縄県衛生環境研究所）、松田りえ子、五十嵐敦子（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

食品の安全性及び健全性を確保するために必要な情報は、食品汚染物に関する情報と食品中の天然有害物情報である。食品中の化学物質の継続的なモニタリングとそれらに対する人間の暴露状態即ち日常の経口摂取量の把握とは、化学物質による食品汚染に関するリスクアナリシスの一環として食品衛生行政研究に不可欠な二本柱である。最近特に内分泌攪乱作用を示す環境ホルモンによる食品汚染が大きくクローズアップされていることから、そのような化合物も含んだ本研究の実態調査と暴露量調査は極めて重要な意味を持つ。

B. 研究方法

- 1) 全国汚染物モニタリング計画：FAO/WHO 合同食品及び飼料汚染物モニタリング計画に対応して定められた項目について、食品中の含量を調査したデータの全国的な集計処理と保存を行った。
- 2) 全国汚染物摂取量計画：全国10ヶ所で実施したトータルダイエツトスタディーの結果を集計し、我が国の平均データを作成した。
- 3) モニタリングデータ収集法の改良：誤入力をサーチするチェックプログラムを組み込んだウィンドウズ用 Excel によるデータ収集を実施した。
- 3) フーツスペシミンバンク用試料の入手：

トータルダイエットの14群の食品試料の調製を3地方機関（東京都、名古屋市、大阪府）に依頼した。

C. 研究結果及び考察

1) 汚染物モニタリング：国内及び輸入食品汚染物のモニタリング件数は今年度約19万件が追加され1998年初頭現在234万件に上った。これらのデータから食品汚染物の検出レベルの経年変化、全国平均値及び汚染食品の種類、汚染レベル等が明らかとなった。また重金属、農薬等の1日摂取量を明らかにした。図に1993年から1998年の6年間の調査汚染物の1日摂取量の年次推移を示した。なお各食品群に関し、ND値に定量下限値の1/2を用いて算出しても、汚染物の摂取量はそのADIを超えることはなかった。

2) モニタリングシステムの改良：昨年度開発したウィンドウズ用Excelに誤入力をサーチするチェックプログラム付きフロッピーにより全国からデータを収集した。初めての事業であるため手法と取り扱いについて相当数の問い合わせがあり、対処にかなり時間を費やした。なお食品化学課と協議し、食品番号の変更を行い、食品化学課が実施している農薬に関するモニタリング調査と本システムとの食品番号の共通化を行った。

D. 結論

1. 全国約63自治研究機関との緊密な協力により行われているモニタリング調査、及び10機関との協力により行われているトータルダイエットスタディーによる汚染物摂取量調査結果から、我が国における食品汚染のバックグラウンドレベル及び摂取量が明らかとなり、我が国の食生活の安全性を検証できた。

2. Excelを用いたモニタリングデータの

収集を初めて実施した。次年度からはスムーズな実行が可能となろう。

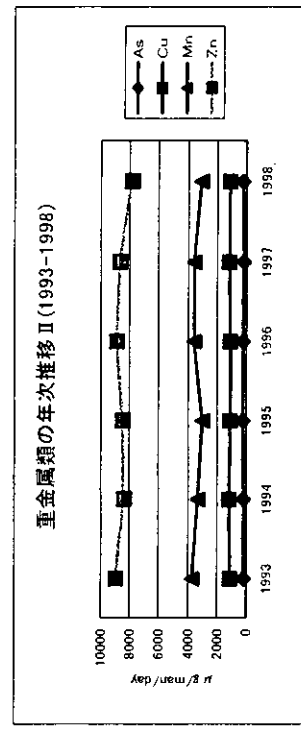
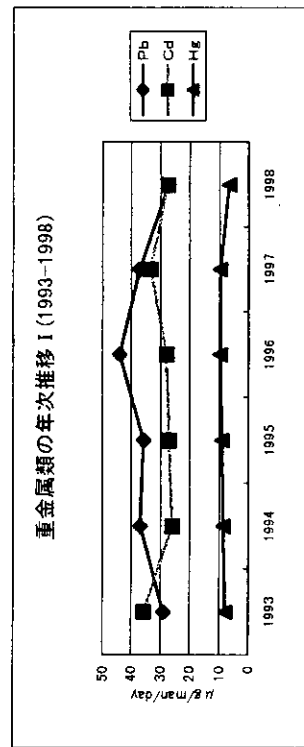
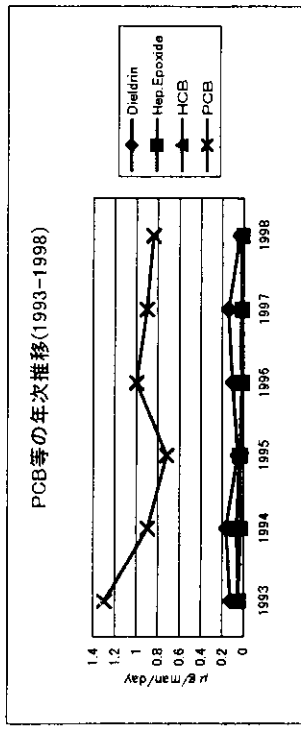
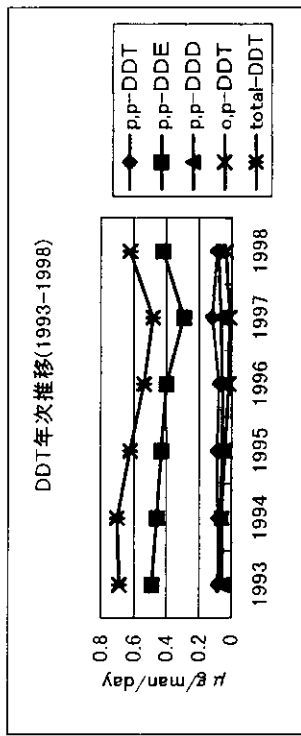
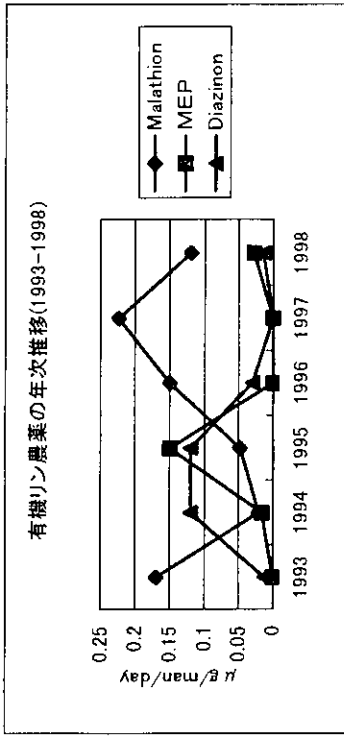
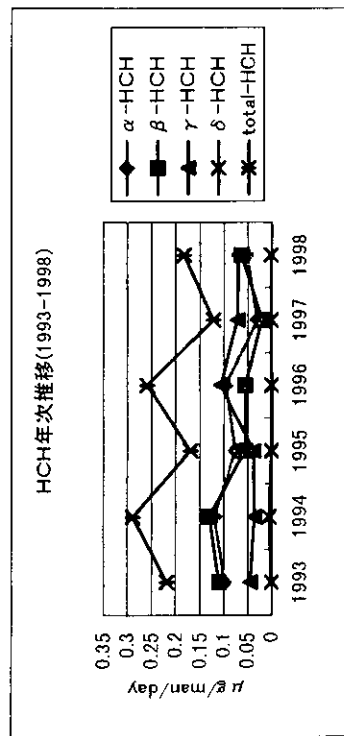
3. フーズスペシミンバンク：本年（平成10年度）より初めて正式に地方の3機関に14群からなるトータルダイエット試料の調製を依頼し、 -20°C の冷凍庫に貯蔵した。

E. 研究発表

1. 論文発表

豊田正武、松田りえ子、五十嵐敦子、齋藤行生：日本における環境汚染物の1日摂取量の推定及びその由来の解析、48(9)、43-65 (1998)

汚染物摂取量年次推移



分担研究報告書

必須アミノ酸製品等による健康影響に関する
調査研究

分担研究者 米谷民雄

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担研究報告書）

必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究
（文献調査による最新の研究情報と現段階での結論）

分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長
協力研究者 斎藤博士 国立相模原病院臨床研究部
佐藤恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨

好酸球増多筋肉痛症（EMS）に関して1998年に公表された情報をまとめた。EMS発症と関連することが指摘され、不明であった二種類の不純物の構造が判明した。さらに、店頭販売されているトリプトファン関連商品（5-OH-Trp）中にPeak Xと命名された不純物が同定され、EMS様症状の発症が危惧されている。これらの不純物を摂取したヒトの免疫、代謝系が影響されEMS様症状の発症に至る、という考えが大勢を占めるが現在においても、特定の不純物が原因であるとした結論は得られていない。

A. 研究目的

本研究は、必須アミノ酸であるL-トリプトファン製品の摂取により発生した好酸球増多筋肉痛症（EMS、eosinophilia-myalgia-syndrome）の原因や症状について文献調査し、それにより今後の同様な食品中毒の発生を防止することにより、国民の安全な食生活に寄与することを目的としている。前年度の報告書以降に発表された論文を検索し、それらを基にEMS研究の現状を概観し、現時点における結論を演繹した。

B. 研究方法

主に1998年に発表されたトリプトファン、EMS及び有毒油症（TOS、toxic oil syndrome）に関する論文を、データベースとしてMEDLINE、TOXLINE、CA、SCISEARCHを用いて検索した結果、14報に到達することができた。

C. 研究結果及び考察

1. L-トリプトファン事故の概要

事故の概要については昨年度の報告書に既にまとめられているため、今年度は省略した。

2. EMSの原因

1) 化学分析

トリプトファン商品中にはEMS発症に関連するとされる6種類の不純物が同定されており、Peak E、Peak UV-5、Peak 200およびPeak Cの構造はすでにそれぞれ1,1'-ethylidene bis(tryptophan)、3-(phenylamino)alanine、2-(3-indolylmethyl)-L-tryptophan および6-hydroxytryptophanであることが判明している。しかし、Peak FFおよびPeak AAAに関しての報告はなかった。これを背景に構造解析が為され、Peak Cは3a-hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo-[2,-3b]-indole-2-carboxylic acidであることが改めて判明、さらにPeak FFが2-(2-hydroxy indoline)

tryptophanであることが判明した。しかし、Hillらが報告しているPeak AAAの存在を追試確認することが出来なかったとしている¹⁾。トリプトファン中の5つの不純物の内、3つが非indole構造であることを根拠にして、構造上の共通点とEMSおよびTOS発症の間に一定の関係があるとの指摘が為されたが結論は出ていない。

FDAは現在トリプトファンの店頭販売を禁じているが、代わって問題視されている化合物が肥満、不眠や頭痛と同様にセロトニン欠損症に薬効あり、と推奨され店頭で販売されている5-hydroxy-L-tryptophan (5-OH-Trp)である。5-OH-Trpはcaseおよびcontrolのトリプトファンのロット中にも微量に存在していることが判っていたが、その含量とEMSとの相関は見い出されていなかった。しかし、この5-OH-Trp摂取によるとされるEMS様症状の報告が1980年に為されている。最近では1991年に報告があり、caseロット中にPeak Xと命名された不純物が検出されている。最近になって本化合物の構造が6-hydroxy-1, 2, 3, 4, 4a, 9a-hexahydro- β -carboline-3-carboxylic acidであることが判明した。この解析結果を踏まえ市販されている合成ならびに天然物由来の5-OH-Trp標品の純度を測定したところ、いずれからもPeak Xの存在が確認された。さらに、ロチェスターとニューヨークの健康栄養品販売店から入手した6種類の5-OH-Trpを解析し、全てにcaseロット5-OH-Trp中に検出されるレベルの約3-15%のPeak Xが検出された。驚くべきことに、天然物由来抽出物として記載され“種からの抽出物”を謳ったブランド品からさえPeak Xが含まれていることが判明した。1991年の女性患者の例では50-70 mg/dayのPeak Xに暴露されていた計算になるが、調査解析した市販品中にはEMS様症状を起こす、とされる量より幾分少なめの量が含まれていることになる。現在、5-OH-Trp摂取に関連したEMS様症状の発症例

は報告されていないが、栄養補助剤の入手が医学的な管理下にないため5-OH-Trpの摂取濃度が増える傾向が見られる。さらに、本剤の使用に関して最近刊行された著作の中では、種々の病気の軽減を図るために300-900 mg/day以上の消費が薦められている。これに従うなら、Peak Xの消費レベルがcaseロットのそれに達する危惧があると報告された²⁾。

メラトニンとは元来、睡眠障害や時差ボケ症状に対して処方されることの多い睡眠調節機能を持った松果腺から分泌される脳内ホルモンである。メラトニンはある種の食物にも含まれておりDietary Supplement Health and Education Act.の監視下でアメリカにおいて店頭販売されている。1995年の統計によれば200万人以上の新たな消費者がいると見積もられている。本剤の投与に起因すると思われる幾つかの副作用が知られており、その一つに不眠を訴えた癌患者への投与が末梢血好酸球増多を引き起こした例がある。食品補助剤として店頭販売されている三種類のメラトニン商品中に7種類の不純物が同定され、その中の6種類はトリプトファン中の不純物に類似していることが判明した。詳細な検討により、hydroxymelatoninの二種類のisomer以外に4種類が同定され、後者はメラトニンとホルムアルデヒドの縮合産物であり、これらがPeak EおよびPeak Cそのものであることが判明した。これら縮合産物の未修飾メラトニンに対する存在比は0.1-0.5%と計算された。一方、トリプトファン中のPeak Eの存在比は0.05-0.1%である。時差ボケ症状に対して投与されたメラトニンの量は7日間で5 mg/dayであり、この量は0.5-4.0 g/dayを数ヵ月間摂取したEMS患者のそれより極端に少ない。しかしながら、メラトニンをはじめとした食品補助剤を大量に摂取した場合に好酸球増多症が起きる可能性は充分にあると指摘されている³⁾。この危惧は我が国で現実のものとなった。すなわち、プロテイン製剤(トリプト

ファンを添加していない)の大量の服用により、好酸球増多症、全身の筋痛、末梢神経障害、反復する耳下腺炎を呈した症例が報告された。同プロテイン製剤からはPeak Eに相当するUV吸収ピークが検出され、EMSとの診断がなされた。幸いなことに本例では同製剤の服用中止により耳下腺炎は完全に消失しないものの末梢血での好酸球増多の速やかな低下に伴い全身症状の改善がみられた⁴⁾。

EMSと多くの臨床症状を共有するTOSについても病因論的考察が為されている。TOS発症の原因の一つとされる不純物3-phenylamino-1,2-propanediol (PAP)のエステルおよびエステルアミドはラットやヒトの肝臓で代謝を受けEMS発症との関連が指摘されている。3-(phenylamino)alanine (PAA)に変わることが判っている。この知見はEMS、TOS発症が共通のtriggerをもつ可能性を示唆する。これを検証するべくトリプトファンと菜種油がスクリーニングされたが、双方に共通する一定の不純物の存在を見い出せなかった。しかし、HPLC法の分解能が向上した結果、以前にPeak 200として同定されていたピークがさらにPeak 31を含んでいることが判明し、EMSとの関連の可能性が示唆されている⁵⁾。

一定の不純物を生体が摂取した時、どのように代謝されるのかを知ることは非常に重要である。これを知るためには標識した不純物を合成する必要がある。このような観点からTOS発症に強く関連すると考えられている3-phenylamino-1,2-propanediol (PAP)を³Hおよび¹⁴Cで標識した脂肪酸モノおよびジエステルの合成法が報告されている。しかしこの標識PAPを用いての代謝学的実験は為されておらず、今後の研究の進展が待たれる⁶⁾。

2) 生体への影響

EMSやTOSにおける病態形成の機序に関しては不明な点が多いが、CD4陽性Th2型リンパ球のIL-5産生の亢進が背景にあるとの説明がなされてきた。その論拠は血清中のIL-5、GM-

CSF上昇や好酸球の顆粒に由来する細胞傷害性蛋白であるECPレベルの上昇を来し、好酸球性筋炎に皮下症状を併発した女性の例にも求めることが出来る。一方、炎症局所への好酸球浸潤はIL-5のみの作用ではなくEotaxinに代表されるケモカインとの協同作業によって惹起される、と言う考えが支持されて来ている。Eotaxinの遊走活性は好酸球に特異的であり、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞等から産生されることが判明しているが、EMSを含む好酸球性筋炎との関連を論じた研究はない。この有力で選択的好酸球遊走活性を持ったケモカインが筋肉においても好酸球集積を起こし、EMSの病態形成に一役買っているか否かの検証が待たれる⁷⁾。

EMSにおけるPeak Eの病因論的役割を支持する報告がある。すなわち、Peak Eそれ自体が好酸球遊走活性を持つこと、Peak Eで刺激した血管内皮細胞への好酸球の接着が有意に増加し、この接着が抗ICAM-1抗体により減少することが報告されている。さらに、Peak Eで刺激したヒト末梢血単核白血球からは*in vitro*での好酸球の生存期間を延長させる活性物質が産生され、この物質がGM-CSFであることが同定されている。これらの知見はPeak Eが血管内皮細胞、好酸球および単核白血球に作用して好酸球の振る舞いおよび生存に影響を及ぼしEMSにおける組織傷害に関与する可能性を示唆している⁸⁾。

1987-1990年にわたってトリプトファンを摂取していた女性にEMSとBリンパ球性白血病(B-CLL)が発症した例が報告されている。化学療法剤としてのシクロホスファミド/プレドニソンの投与によってEMS症状は完全に消失しB-CLLの症状も寛解期を迎えることが出来た。数年後のB-CLLの再燃に際してもEMSの再発はなかった。これまでも好酸球性筋膜炎(EF)、皮下繊維炎やWells型蜂窩織炎の様な好酸球増多を伴う疾患にT-CLLが併発する例は知られているが、悪性線維性(hi

stiocytoma) にEMSを併発したのは本例のみである。B-CLLあるいは非ホジキン性リンホーマにEMSが併発する例やトリプトファン自身の摂取に伴ってこれら血液性癌疾患が増えていることを示す報告はない。このような背景を基に B-CLLとトリプトファン摂取に関連した EMSとの相関を検証している。多数のEMS患者を対象としたretrospectiveな調査によれば、トリプトファン摂取に関連して EMSと診断された患者に悪性血液性癌疾患を併発した例はなく、後期になって以前に強皮症性変化を来した皮膚病変の上に悪性線維性histiocytomaを発症した一例があるのみである。加えて、本例において持続性活性化を起こしているリンパ球クローンはB cellsではなくT cellsであった。この結果はトリプトファン摂取とB-CLL発症との間に有意な相関がないことを示唆している⁹⁾。

EMS患者に重症な全身症状や中枢神経系の異常が起こることは既に報告されているが、深刻な中枢神経異常(CNS)を起こしたEMS患者(CNS-EMS)、16人に観られた神経症状、MR所見ならびにMR分光学的所見についての論説がある。神経学的所見としては小鬱病(100%)、健忘症(88%)、間歇性錯乱(38%)、疲労感(31%)、運動障害(31%)、再発性頭痛(19%)、大鬱病(13%)さらに稀にはあるが痴呆(6%)症状が観られる。MR所見上の特徴は大脳皮質下部での巣状病変、深部脳髓白質での巣状病変、大脳皮質萎縮、脳室拡張、瀰慢性および脳髓白質周囲病変である。MR分光学的所見としては炎症性脳血管性疾患に符合するコリン成分の増加、N-acetylaspartateの減少およびlipid-macromoleculeの増加に加え、グルタミン増加、myo-inositol減少および急性のCNS障害もしくは代謝性脳疾患に符合するコリンの減少が起こる。これらの所見はCNS-EMS患者において観られる脳病変や神経代謝産物のパターンが既知の炎症性脳血管性疾患のそれに符合することを示すが、CNS-EMSを呈

した別の患者において肝性脳疾患と同じ、もしくは類似した代謝性脳疾患患者に符合する神経代謝産物を有する場合もある。このようなことから、EMSや関連した好酸球増多性疾患を持った患者で観られる神経学的異常は、脳血管障害や二次的な代謝性脳疾患の双方が絡んでいる可能性を認識した上で慎重に解釈すべきだとしている¹⁰⁾。

TOS患者においても慢性期にEMSと同じ様な多くの神経障害が起こることが知られている。caseロット中の不純物 oleoylanilide がマウスの神経由来細胞株 Neuro 2A(N2A)に対して及ぼす影響が調べられている。oleoylanilide はN2A細胞のviabilityやプラスチックなどへの接着性に影響を与えることなく、アクチン細胞骨格の変化ならびにラミニン、フィブロネクチンといった細胞外マトリックスへの接着性を減少させることが判明した。アクチンはグルタミン酸レセプターであるNMDA発現を調節できることから postsynaptic 反応を形成する上での重要な成分の一つであり、postsynaptic density 蛋白PSD-95に関係している。この知見はEMSやTOS患者においてNMDAレセプターのアゴニストであるキノリン酸レベルが有意に高いという事実や oleoylanilide を投与した動物にHuntington舞蹈病で観られる神経細胞欠損を再現できるという報告に鑑み注目される。一方、中枢神経系に於ける細胞外マトリックス蛋白としてラミニンやフィブロネクチンは主要な成分であると同時に末梢神経系における神経障害の後に起こる軸索変性にも関与するとの報告がある。これらのことから細胞骨格と細胞外マトリックス間の相互作用を考慮することがTOSそして恐らくはEMSで観られるある種の神経症状発症機序を理解する助けになるとしている¹¹⁾。

TOS発症に関連するoilは過酸化物を多量に含み酸化作用に対して不安定であることが判明しており、生じたフリーラジカルが本中毒症を引き起こすという仮説がある。これは

caseロットを与えたラット組織のホモジネート中で脂肪が過酸化された時に生成されるMDA (malondialdehyde)の量が増加することや、脂肪酸やanilideに由来する多くの酸化物が生成されて来るという実験結果に論拠がある。このような知見を背景に caseロットoilを混ぜた飼料で4週間飼育した後のモルモット肝臓microsomeでの脂質脂肪酸組成の変化および脂質過酸化作用に与える影響が調べられている。結果的には非加熱のcaseロットoilおよびcontrol oilで飼育した際、microsomeでの抗酸化的な代謝を受けるリン脂質脂肪酸のプロフィールや酵素活性のパターンに有意な差はみられなかった。加えて、controlならびにcaseロットoilを加熱して与えた場合、glutathione peroxidase活性増加とlipid過酸化産物の減少が起きたが、その程度に有意な差はみられなかった。このことはcaseロットoil中に存在するフリーラジカルがmicrosomeでの代謝系に何ら影響しないことを意味し、TOS発症との関連が否定的であることを示唆する¹²⁾。

TOS発症に関しては食習慣の相違と異なり、遺伝的な感受性やHLAとの連鎖が指摘されている。TOSのマウスモデルを使い、発症との関連が指摘されているオレイン酸 anilide

(OAA)を腹腔内投与した後の免疫応答は、マウスの系統に依存して起こることが報告されている。すなわち、マウスの主要組織適合抗原systemであるH-2^aを遺伝的背景に持つC57BL/6マウスでは何ら病的症状を呈することなく、ポリクローナル(非特異的)なBリンパ球活性化のみ起こるが、H-2^aを背景に持ったA/Jマウスの殆どが急性消耗症状を呈して死に至った。分子生物学的検索ではマウスの系統の違いが脾臓におけるサイトカインの遺伝子発現ならびにイムノグロブリンの産生、分泌状況の違いとなって現われた。C57BL/6マウスでは血清IgE値の上昇やTNF- β mRNA発現の低下が観られることからTh2リンパ球が動

いているものと推測されるが、A/Jマウスではin vivoで脾細胞によるIL-1 α , IL-10ならびにIFN- γ のmRNA発現が亢進すると共にin vitroではTNF- α が多量に分泌されることからTh1リンパ球が動いていると思われる。本実験結果はTOS患者が急性死あるいは慢性自己免疫性疾患の何れかに陥るという事実を良く反映していると考えられ、遺伝的な感受性もTOS発症機序を考える上で重要であることを示唆している¹³⁾。

TOS患者の自然経過については不明な点が多い。集団を対象とした推計学的な調査が本症が発生して間もなく行われているが、本調査は一つの村に居住する患者のみを対象としたものであり、その調査も1989年に終了している。スペインとイタリアの医師により構成された調査委員会が実施したNottingham Health Profileアンケートは1993-1994年の間に生存しているTOS患者、1400人を対象とし、層状無作為抽出法を採用、回答は2/3から得られた。質問事項は神経症状ならびに自己免疫学的症状をはじめとした項目から成り、スコア化(NHPQ scores)して多変量解析に供した。結果として、TOS患者の罹患割合が2:1(女性/男性)となり以前の流行初期の記載に一致した。10年経過した現在、50才を境に前後共に、重症の強皮症様症状ならびに明瞭な神経学的な症状を有する患者は女性において2-3倍多くみられた。50才以下に限定した場合、これらの症状が見られない患者は男性に多く女性の1.5倍であった。TOSは女性に好発する傾向にあるが、その理由として女性がより高濃度の有毒油に暴露されているか、根拠はないが感受性において女性が優っているのではあるまいか、としている¹⁴⁾。

3) 動物モデル

特定の疾患を惹起する可能性のある不純物を特定したり、疾患が成立した場合の組織の傷害される過程を解析して行く上で、動物モデルが果たす役割は大きい。この意味でEMS

の動物モデル確立が待たれているが一つだけ報告されている。すなわち、EBTをC57BL/6マウスの腹腔に接種したところ皮膚および筋膜炎が起り、組織学的検査により炎症の存在を認めた、と言う報告である⁸⁾。筋周囲および筋炎や繊維化は起こらなかった。しかし、残念なことに本報告をした著者自身がその後の報告で前言を翻した。すなわち、EBTの腹腔接種でC57BL/6マウスに皮膚炎症を再現できなかった。

D. 結論

平成9年度報告書の結論の項にあるようにEMSはトリプトファンを大量摂取したヒトにおいて、その際含まれていた不純物が免疫、代謝系異常を引き起こし生じた、とする考えが現在においても支持されている。EMSとの関連を指摘されていた不純物のうちPeak AAAについてはその存在自体が疑問視され、その他の5つの不純物 (EBT, PAA, Peak C, Peak FF, Peak 200) についても明確な関連を示唆した報告はない。これら不純物の培養細胞への添加が機能的な変化を起こすことは明瞭にされているが、EMSの病態形成機序の理解に直接結び付くような決定的証拠は動物モデルが無いこともあって得られていない。5-OH-Trp中に検出されたPeak Xのように、食物および栄養補助蛋白製剤中にEMS様症状を起こす不純物が今後も発見される可能性がある。店頭販売される蛋白製剤は今後も増えることはあっても減ることはないと思われされる。徹底した品質管理と行政チェックが必要とされる由縁である。

E. 文献

1. BL. Williamson, KL. Johnson, *et al.*, "On-line HPLC-tandem mass spectrometry structural characterization of case-associated contaminants of L-tryptophan implicated with the onset of eosinophilia myalgia syndrome", *Toxicol Lett*, 99, 139-150 (1998).
2. BL. Williamson, K Klarskov, AJ. Tomlinson, *et al.*, "Problems with over-the-counter 5-hydroxy-L-tryptophan", *Nature Med*, 4(9), 983 (1998).
3. BL. Williamson, AJ. Tomlinson, PK. Mishra, *et al.*, "Structural characterization of contaminants found in commercial preparations of melatonin: Similarities to case-related compounds from L-tryptophan associated with eosinophilia-myalgia syndrome", *Chem Res Toxicol*, 11, 234-240(1998).
4. 秋山雄次、鈴木輝彦、田中政彦他、"反復する耳下腺炎を併発した好酸球増加・筋肉痛症候群の一例" *アレルギー* 46 (12), 1273-1276 (1997).
5. BL. Williamson, AJ. Tomlinson, KM. Hurth, *et al.*, "Rapid HPLC screening method for contaminants found in implicated L-tryptophan associated with eosinophilia myalgia syndrome and adulterated rapeseed oil associated with toxic oil syndrome", *Biomed Chromatography*, 12, 255-261 (1998).
6. M. Guardiola, A Messegue, "Synthesis of tritium and carbon-14 labelled linoleic acid esters of 3-phenylamino-1,2-propanediol, compounds potentially involved in the etiology of the toxic oil syndrome", *J Labbell Comp Radiopharmaceut*, XL1(1), 75-80 (1998).
7. MC. Pickering, MJ. Walport, "Eosino-philic myopathic syndrome", *Curr Opin Rheumatol*, 10(6), 504-510 (1998).
8. J. Varga, V-M. Kähäri, "Eosinophilia-myalgia syndrome, eosinophili fasciitis, and related fibrosing disorders", *Curr*

- Opin Rheumatol*, 9(6), 562-570 (1997).
9. A. Böhme, M. Wolter, D. Hoelzer, "L-tryptophan-related eosinophilia-myalgia syndrome possibly associated with a chronic B-lymphocytic leukemia", *Ann Hematol*, 77, 235-238 (1998).
 10. LJ. Haseler, WL. Sibbitt, *et al.*, "Neurologic, MR imaging, and MR spectroscopic findings in eosinophilia myalgia syndrome", *Am J Neuroradiol*, 19,1687-1694 (1998).
 11. JL. Martinez, MM Behrens, *et al.*, "Oleoylanilide, a possible causative agent of toxic oil syndrome, interferes with the cytoskelton in a neuronal cell line", *Neurotoxicol Teratol*, 19(2), 147-150 (1997).
 12. JC. Arevalo, MN, Perez-Gonzalez, *et al.*, "Phospholipid fatty acid and lipid peroxidation in liver microsomes from guinea pigs fed oil related to the toxic oil syndrome", *Comp Biochem Physiol Part C*, 120, 111-119 (1998).
 13. C. Berking, MV. Hobbs, *et al.*, "Strain-dependent cytokine profile and susceptibility to oleic acid anilide in a murine model of the toxic oil syndrome", *Toxicol Appl Pharmacol*, 148, 222-228 (1998).
 14. AG. Camara, MP. Paz, *et al.*, "Health status measurement in toxic oil syndrome", *J Clin Epidemiol*, 51(10), 867-873 (1998).

分担研究報告書

アフラトキシン告示試験法の改良に関する研究

分担研究者 合田幸広

分担研究報告書

アフラトキシンの告示試験法の改良に関する研究

主任研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長

研究要旨

動物実験により発ガン性が明らかにされているマイコトキシンであるアフラトキシン (AF) の公定分析法の改良を目的として、多機能固相抽出カラムとHPLCを利用した方法を検討した。その結果、本法は、毒性の高い溶媒を利用せずに現行の「通知」で分析が規定されたすべての試料で分析可能であるが判明した。さらに、本法を用いて、米、ソバ、小麦、緑豆、ゴマ、ブルーボピーシード、キヌア、エンドウで分析が可能であった。また、赤トウガラシ、コショウ等、多くの香辛料類では、アフィニティカラムを組み合わせることで分析が可能となった。

協力研究者

穂山 浩、豊田正武 (国立医薬品食品衛生研究所食品部)

田中敏嗣 (神戸市環境保健研究所食品化学部)

田端節子 (都立衛生研究所環境保健部)

岡野清志 (マイコトキシン検査協会)

前田憲二、藤井明美 (横浜検疫所輸入食品検査センター)

A. 研究目的

我が国では、カビ毒 (マイコトキシン) の食品汚染による国民の健康被害を防止するため、マイコトキシンの中で動物実験により発ガン性が明らかにされているアフラトキシンについて、食品中の規格基準が定められ、その分析法が公定法として通知 (環食 128 号) されている。しかし本公定法は、分析行程が極めて煩雑で、分析方法の習熟に時間がかかる上、クロロホルム、ベンゼンといった毒性の高い溶媒を多用しているという問題が指摘されていた。本研究では、この公定法の改良

を目的として、毒性の低い溶媒を利用した迅速分析法の検討を行った。さらに、同分析法では妨害ピークが検出され、分析が困難な試料について、アフィニティー (AF)カラムを用いた試験法を検討した。良好な結果を得たので報告する。

B. 研究方法

毒性の低い溶媒を利用した迅速分析法として、穂山らが既に報告 (食品衛生学雑誌 37(4), 195-201(1996)) している、多機能固相抽出カラムで精製し、分析に蛍光検出HPLCを利用した方法を検討した。また、多機能カラムで精製がうまくいかない場合、多機能カラムで部分精製された試料液の残りを減圧乾固後、MeOH 1 mLで溶解し、さらに水 4 mLを加え試料液とし、AFカラム [Rhône diagnostics AFRAPREP] に負荷した。さらに同試料液の容器上の残渣も 20% MeOH 5 mLで洗いこみ同様に負荷し、次いで、カラムを水 10 mLで洗浄し、カラム内の水をできる限り排出後、さらに 20% MeOH 5 mLで